

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390456

研究課題名(和文) iPS細胞を用いたバイオ歯移植による革新的う蝕治療法の基盤研究開発

研究課題名(英文) Research and development of innovative caries treatment by biotooth transplantation using iPS cells

研究代表者

中島 美砂子 (NAKASHIMA, MISAKO)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・再生歯科医療研究部・部長

研究者番号：20207773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、iPS細胞に加圧刺激を加えることにより短時間に*in vitro*で象牙芽細胞に分化させることを目的とする。最適なコート法を用いて穴加工シリコン膜へのiPS細胞の接着性の向上を図った後、膜上にiPS細胞を播種した場合、加圧強さ19.6kPa、播種細胞数 4.0×10^5 cells/平方cm、加圧9時間で象牙芽細胞分化が最も効率よく誘導され、象牙芽細胞マーカー発現がみられ、また象牙芽細胞の形態学的特徴を示す膜の細孔への突起伸長がみられた。加圧による象牙芽細胞への分化誘導のメカニズムとしてBMP7及びWnt10aの発現上昇及びMAPK signaling pathwayの関与が示された。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed at the induction of iPS cells into odontoblastic differentiation in response to mechanical compression of the three-dimensional silicon membrane scaffold with dental tubule-like pores. The membrane was precoated with optimal method and materials to enhance iPS cell attachment. The optimal conditions, which were 19.6 kPa in compression magnitude, 4.0×10^5 cells/cm² in cell density, and 9 hours of loading time, efficiently induced odontoblastic differentiation, showing significantly increased expression of odontoblast specific markers and enhanced elongation of cellular processes into the pore of membrane, a typical morphological feature of odontoblasts. In addition, up-regulation of BMP7 and Wnt10a and the involvement of the MAPK signaling pathway were observed. These results suggested the importance of three-dimensional physical structure of the scaffold in odontoblastic differentiation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：細管象牙質形成 加圧刺激 歯髄幹細胞 iPS細胞 間葉系幹細胞 う蝕治療

1. 研究開始当初の背景

現在のう蝕治療法では人工物で修復するため隙間ができ、細菌侵入により再びう蝕となることが多い。歯髄が露出した場合、一般に水酸化カルシウム製剤が用いられるが、象牙質は壊死層下に少量形成されるにすぎず、細菌侵入を完全には封鎖できず、歯髄炎治療も困難である。よって、歯がしみたり痛みがあれば抜髄せざるを得ない。抜髄も完璧な方法はなく、歯を喪失する可能性が増大する。そのため私どもは、従来から象牙質・歯髄再生療法の開発を行ってきた。以前開発した歯髄幹細胞と BMPs を用いた細胞あるいは遺伝子導入法による象牙質再生では、露出面上に大量の象牙質が再生されるが、方向性のない骨様象牙質であり、網目状の未石灰化部からの細菌の再感染の可能性があった^{1,2)}。よって次に、う蝕欠損部を、方向性のある細管象牙質再生により元通りの歯に戻す新しいう蝕治療法を開発してきた。すなわち、象牙細管に類似した穴加工が施されたシリコーン膜に、歯髄幹細胞を付着させ垂直加圧すると、短時間に象牙芽細胞へ分化誘導できた。このバイオ歯（象牙芽細胞および基質）をイヌ歯髄露出面に移植すると方向性のある細管象牙質が形成された³⁾。しかしながら、歯髄幹細胞は、ヒトの不用の智歯、乳歯などから分取できるが、年齢とともに歯髄組織の供給が困難になる。一方、羊膜幹細胞、骨髄幹細胞などの他組織由来の間葉系幹細胞でも歯髄幹細胞と同様に垂直加圧により象牙芽細胞に分化させることができる可能性が示唆された。さらに、現在、iPS 細胞の作製技術が急速に進んでおり、今後急速に、iPS 細胞を組織幹細胞に代替して用いる再生医療研究が進むものと推察される。よって、本研究では、う蝕欠損部の細管象牙質再生に対して、歯髄幹細胞の代わりに iPS 細胞を用いる着想にいたった。

- 1) Nakashima M.: Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16(3): 369-376, 2005.
- 2) Nakashima M., Akamine A.: The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J. Endod.* 31(10): 711-718, 2005.
- 3) 発明者：中島美砂子、石田敬雄
発明の名称：細胞分化装置、細胞分化方法、及び象牙芽細胞
出願日：2009年3月17日
特開：2010年9月30日 2010-213631
PCT出願：2010年4月12日
PCT/JP2010/02652 (WO2011/128930A1)

2. 研究の目的

本研究は、穴加工シリコーン膜上に iPS 細胞を播種し、加圧刺激を加えることにより短時間に *in vitro* で象牙芽細胞に分化させる。作製したバイオ歯をイヌの歯髄露出面に移植して細管象牙質を再生する。また、加圧による象牙芽細胞への分化メカニズムを分子生物学的および蛋白化学的解析により解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 組織幹細胞を用いた象牙芽細胞分化誘導のための加圧最適条件の決定

1) ヒト幹細胞の分離・培養

同意を得た後に智歯より即座に歯髄を摘出し、37°C で1時間酵素消化後歯髄幹細胞を分離し、10% FBS 添加の DMEM 中で培養した。ヒト骨髄由来幹細胞 (BMSCs, JCRB1160) はヒューマンサイエンス研究資源バンクから購入し、ヒト羊膜間葉系細胞 (AMCs) は生物資源応用研究所から提供を受けた。ヒト BMCs は IGF、EGF、10% FBS 添加の EBM2 を用いて培養した。ヒト AMCs は、LIF、bFGF、PDGF、10% FBS 添加の DMEM/F12 を用いて培養した。

2) 穴加工 scaffold への細胞播種及び加圧刺激
直径 5 μm 、深さ 10 μm 、ピッチ 10 μm の細孔を有する scaffold (シリコーン膜) (Strex, Inc., Osaka, Japan) を作成し、プラズマ処理を行った後に collagen type I-A (Cellmatrix[®], Nitta Gelatin) でコーティングを行った。各組織幹細胞を scaffold へ播種し 16 時間培養した。続いて、象牙芽細胞分化培地：10% FBS、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L-ascorbic acid 2-phosphate、終濃度 1mM のリン酸を添加した DMEM に変え、外部コントローラーにより加圧強さ、加圧周期が可変である垂直加圧装置 (Strex, Inc.) に細胞を付着させた scaffold を内蔵したチャンバーを取り付け、一定期間加圧刺激を負荷した。

至適条件検討のため、細胞密度 2.0×10^5 、 4.0×10^5 、および 7.5×10^5 cells/cm² DPSCs を scaffold へ播種し 16 時間培養した後に、19.6 kPa、0.083Hz、9 時間の加圧刺激を負荷した。その後 6 日間培養し評価を行った。続いて、至適加圧強さの検討のため、細胞密度 4.0×10^5 cells/cm² で細胞を播種し 16 時間培養し、17.0 kPa、19.6 kPa、および 22.2 kPa の加圧刺激を負荷した。その後 6 日間培養し評価した。

さらに至適加圧時間の検討のため、細胞密度 4.0×10^5 cells/cm² で細胞を播種し 16 時間培養した後に、19.6kPa、0.083Hz で 6 時間、9 時間、および 12 時間の加圧刺激を負荷した。その後 6 日間培養し評価を行った。また、ヒト DPSCs を scaffold へ播種し、加圧刺激を負荷せずに 6 日間培養を行ったもの、および歯胚をコントロールとして用いた。象牙芽細胞分化における播種細胞密度、加圧強さ、およ

び加圧時間の至適条件は、下記のように、リアルタイム RT-PCR と共焦点レーザー顕微鏡像にて決定した。

3) リアルタイム RT-PCR 解析

細胞および歯胚組織のトータル RNA 1 μg から First strand cDNA を合成した。リアルタイム RT-PCR は、*DSPP* および *enamelysin* を用いて、Light Cycler 330 (Roche Diagnostics)にて行った。各遺伝子発現量は β -actin の発現量に対する相対値で表示した。

4) 共焦点レーザー顕微鏡解析

加圧刺激による象牙芽細胞分化誘導後に、象牙芽細胞の特徴である細胞突起の伸長を確認するため、形態学的解析を行った。細胞は Dil にて標識した。加圧刺激による分化誘導を行った細胞と、加圧刺激を負荷していない細胞は、3.5 cm ガラスボトムディッシュに移し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

5) ヒト BMSCs 及び AMCs の象牙芽細胞分化誘導

象牙芽細胞分化における象牙細管様構造体の重要性を調べるため、他組織由来のヒト BMSCs と AMCs を用いて、ヒト DPSCs と同様の最適加圧刺激による象牙芽細胞分化誘導を試みた。ディッシュ上で 6 日間培養したサンプル、シリコン膜上で 6 日間培養したサンプル、細孔非存在下において至適条件で加圧刺激を負荷した後 6 日間培養したサンプルをコントロールとして用いた。

(2) 加圧刺激による象牙芽細胞分化誘導メカニズムの解明

1) 遺伝子発現解析

加圧刺激による象牙芽細胞分化誘導において発現が上昇する遺伝子を検索するため、至適条件で加圧刺激を負荷したヒト歯髄幹細胞と、加圧刺激を負荷していないヒト歯髄幹細胞のマイクロアレイ解析を行い比較した。

さらに、加圧刺激による象牙芽細胞分化において発現が上昇する遺伝子の検討を行うため、以下のサンプルにおいて遺伝子発現を確認した。(i) normal culture cells: ヒト DPSCs を培養ディッシュ上で象牙芽細胞分化培地にて 6 日間培養、(ii) non-induced cells for 16 h: ヒト DPSCs をシリコン膜上で 16 時間培養、(iii) non-induced cells for 6 days: ヒト DPSCs をシリコン膜上で象牙芽細胞分化培地にて 6 日間培養、(iv) mechanically induced cells: ヒト DPSCs をシリコン膜上で 16 時間培養した後、象牙芽細胞分化培地に変え 6 時間、9 時間、および 12 時間の加圧刺激を負荷し、その後 6 日間培養。上記の細胞において、*TGF- β ₁*、*Smad5*、*BMP4*、*BMP7*、*Wnt5a*、*Wnt10a* を用いてリアルタイム RT-PCR 解析を行った。

2) ウェスタンブロット解析・MAPK 阻害実験
加圧刺激による象牙芽細胞分化において MAPK signaling pathways の関与を調べるため、MAPK ERK1/2 と p38 のリン酸化をウェスタンブロットにより検討した。ヒト DPSCs をシリコン膜上で 16 時間培養した後、加圧刺激を 10 分間負荷したサンプルと 1 時間負荷したサンプル、コントロールとしてヒト DPSCs を培養ディッシュ上で 16 時間培養したサンプル、および scaffold 上で 16 時間培養したサンプルを用いた。5 μg のタンパク質を PVDF 膜に転写し、室温で 1 時間ブロッキング後、一次抗体の anti-p-ERK antibody (E-4) (1:1,000) と anti-p-p38 antibody (Tyr 182)-R (1:500) を 4 $^{\circ}\text{C}$ 、一昼夜反応させた。続いて、anti-mouse IgG-HRP および anti-rabbit IgG-HRP を加え、4 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間反応させ、Immunostar Zeta (Wako) で検出した。さらに、ERK1/2 と p38 タンパク質の総量を測定するため、同じ PVDF 膜のストリッピングを行い、一次抗体の anti-ERK antibody (K-23) (1:1,000) と anti-p38 antibody (C-20) (1:1,000) を反応させた後、IgG-HRP (Cell Signaling) を反応させ、バンドの検出を行った。

さらに、MAPK signaling pathways の関与を確認するため MAPK・ERK1/2・p38 signaling 阻害実験を行った。ヒト DPSCs を細胞密度 $4.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ で 16 時間培養し、加圧刺激負荷の 1 時間前に各々の阻害剤 U0126 25 μM と SB203580 20 μM を添加した。その後 9 時間の加圧刺激を負荷し、6 日間培養した後にリアルタイム RT-PCR にて象牙芽細胞マーカーの発現を確認した。ヒト DPSCs に阻害剤を添加せず加圧刺激を負荷しないサンプル、阻害剤を添加し加圧刺激を負荷しないサンプルおよび阻害剤を添加せず加圧刺激を負荷したサンプルをコントロールとして用いた。

(3) 加圧刺激による iPS 細胞の象牙芽細胞分化誘導

1) iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞 (201B7; HPS0063) は、理化バイオリソースセンターから購入し、フィーダーレス培養を行った。あらかじめ Laminin-5 にて dish をコートし、bFGF を添加したフィーダーレス培地 (ReproFF2, リプロセル) にて 2 日に 1 回培地交換を行いながら、培養した。

2) Scaffold への接着性の向上法

iPS 細胞の剥離、分散時にはアポトーシスを抑制するために ROCK 阻害剤を添加し、Scaffold に対して、(i) collagen type I-A、(ii) collagen type I-A + laminin、(iii) collagen type I-A + NIH3T3 培養上清、(iv) collagen type I-A + bFGF (培地に添加) をコートして、 $4.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ を播種し 16 時間培養した後に、19.6

kPa、9時間の加圧刺激を負荷し、6日間培養して、最適なコート方法を決定した。

3) SCID マウス皮下移植による象牙質形成
SCID マウス異所性移植モデルを用いて、*in vivo* における象牙質形成を調べた。穴加工と加圧の有無による象牙質形成の違いを比較検討するため、(i)穴加工(+) \cdot 加圧(+), (ii)穴加工(-) \cdot 加圧(+), (iii)穴加工(+) \cdot 加圧(-), (iv)穴加工(-) \cdot 加圧(-)の4条件について行った。シリコーン膜は、直径3.5mmに切り取り、プラズマ処理、滅菌後 collagen type IA、Laminin-5にてコートし、iPSC細胞を播種した。19.6 kPaで9時間加圧し、一晚培養後移植した。3か月後に摘出、解析する予定である。

4. 研究成果

(1) ヒト組織幹細胞の象牙芽細胞分化の最適条件

ヒト DPSCs の象牙芽細胞分化の至適条件の検討を行った。共焦点レーザー顕微鏡像により、播種する細胞密度は 4.0×10^5 cells/cm² において、シリコーン膜のほぼ全ての細孔への細胞突起伸長がみられた。一方、細胞密度 2.0×10^5 cells/cm² および 7.5×10^5 cells/cm² では、細孔の一部にのみ突起伸長がみられた。さらに、加圧刺激を負荷していない細胞においては突起の伸長が認められなかった。また、象牙芽細胞マーカーの *DSPP* および *enamelysin* は 4.0×10^5 cells/cm² において最も高い発現がみられた。続いて加圧強さについては、19.6 kPa において最も細胞が突起を伸長しており、象牙芽細胞マーカーも高発現であった。さらに加圧刺激時間においては、9時間において最も細胞が突起を伸長しており、象牙芽細胞マーカーも高発現であった。以上のことから、シリコーン膜を用いた加圧刺激によるヒト DPSCs の象牙芽細胞分化至適条件は、細胞密度 4.0×10^5 cells/cm²、加圧強さ 19.6 kPa、加圧時間 9 時間であった。

次に、DPSCs の象牙芽細胞分化のための至適加圧条件を用いて、ヒト BMSCs および AMCs の象牙芽細胞分化誘導を試みた。その結果、細孔を有するシリコーン膜上で加圧刺激を負荷したヒト BMSCs および AMCs はヒト DPSCs と同様に、ほぼ全ての細孔に細胞突起を伸長した(図 1M-R)。細孔を有さないシリコーン膜上で加圧刺激した場合(図 1A-F)、あるいは細孔存在下で加圧刺激を負荷しない場合(図 1G-L)においては、細胞突起の伸長はほぼ認められなかった。また、リアルタイム RT-PCR による象牙芽細胞マーカーの発現解析により、細孔を有するシリコーン膜を用いて加圧刺激した BMSCs および AMCs は、ヒト DPSCs と同様に *DSPP* と *enamelysin* の高発現がみられたが、その他の場合ではほぼ発現がみられなかった(図 1S、T)。また、細孔を

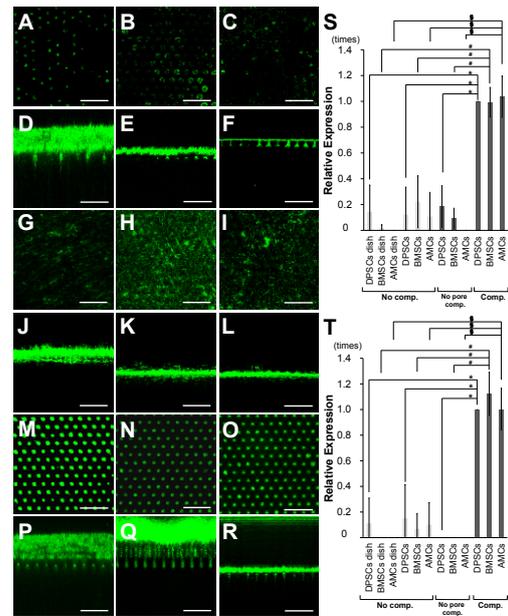


図 1. hBMSCs と hAMCs の加圧刺激負荷による象牙芽細胞分化

(A-R) 共焦点レーザー顕微鏡像。 (A-C, G-I, M-O) シリコーン膜横断面、(D-F, J-L, P-R) シリコーン膜縦断面、(A, D) hDPSCs、(B, E) hBMSCs、(C, F) hAMCs をシリコーン膜上で培養。(G, J) hDPSCs、(H, K) hBMSCs、(I, L) hAMCs を細孔非存在下で加圧刺激負荷、(M, P) hDPSCs、(N, Q) hBMSCs、(O, R) hAMCs にシリコーン膜上で加圧刺激負荷 Scale bar = 30 μ m. (S) リアルタイム RT-PCR による *DSPP* 発現、(T) リアルタイム RT-PCR による *enamelysin* 発現、 dish; ディッシュ上で培養、No comp; 加圧刺激無し、No pore comp; 細孔非存在下で加圧刺激負荷、Comp; 加圧刺激負荷 * $P < 0.01$, vs hDPSCs(Comp.), # $P < 0.01$, vs hBMSCs(Comp.), § $P < 0.01$, vs hAMCs(Comp.)

有するシリコーン膜上で加圧刺激を負荷したヒト DPSCs、BMSCs、AMCs の間では *DSPP* と *enamelysin* の発現に有意差はみられなかった。

(2) 加圧刺激負荷による遺伝子発現の変化
象牙芽細胞分化至適条件で刺激を負荷したヒト DPSCs と加圧刺激を負荷していないヒト DPSCs をマイクロアレイ解析にて比較した。加圧刺激により発現が上昇する遺伝子を同定した。その中で、*TGF- β ₁*、*Smad5*、*BMP4*、*BMP7*、*Wnt5a*、*Wnt10a* の 6 つの遺伝子を選択し、遺伝子発現の変化をリアルタイム RT-PCR により確認した。*TGF- β ₁*、*Smad5*、*Wnt5a* は培養ディッシュ上で 6 日間培養したサンプルで高発現であり(図 2A、B、E)、*BMP4* は加圧刺激を負荷せずに 6 日間培養した場合で高発現であった(図 2C)。一方で、*BMP7* と *Wnt10a* においては加圧刺激 9 時間の象牙芽細胞分化至適条件で高発現であり、6 時間や 12 時間の加圧刺激では発現が減少し、加圧刺激を負荷した場合さらに発現が減少し、象牙芽細胞マーカー

一の発現と同様の発現傾向を呈した(図 2D、F)。

(3) MAPKs のリン酸化および阻害実験

加圧刺激による象牙芽細胞分化に MAPK signaling pathway の関与を確認するため、ウェスタンブロットにて MAPK ERK1/2・p38 のリン酸化を確認した。ヒト DPSCs のリン酸化は、加圧刺激 1 時間で活性化した(図 2G、J)。一方、加圧刺激を負荷していないサンプルにおいては、ERK1/2 および p38 のリン酸化は活性化しなかった。また、ERK1/2 と p38 の阻害剤である U0126 と SB203580 の添加により、象牙芽細胞マーカーの発現は著しく減少した(図 2H、I、K、L)。以上のことから、加圧刺激による象牙芽細胞分化は MAPK ERK1/2・p38 阻害により抑制されることが示された。

(4) iPS 細胞の象牙芽細胞への分化

1) ROCS 阻害剤および scaffold のコート法

DPSCs と比べて iPS 細胞はシリコン膜

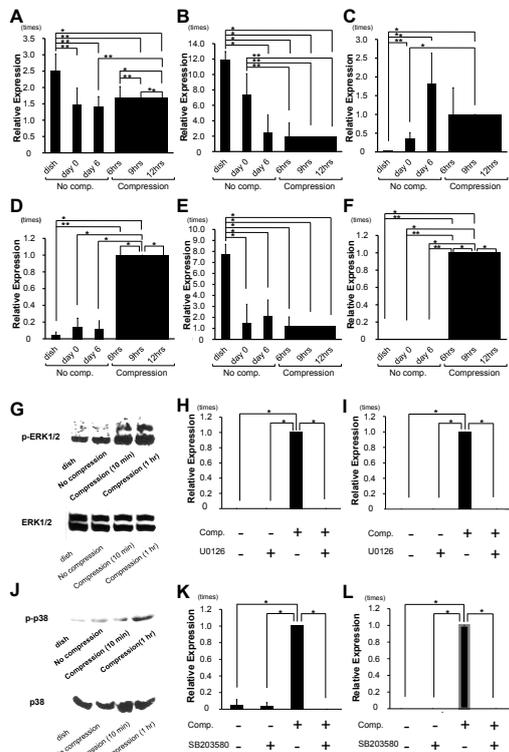


図 2. 加圧刺激負荷による遺伝子発現および MAPK signaling pathway

(A-F) リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現 (A) *TGF-β1*、(B) *Smad5*、(C) *BMP4*、(D) *BMP7*、(E) *Wnt5a*、(F) *Wnt10a* 独立した 3 回の実験を行い、データは標準偏差で示した。* $P < 0.01$; ** $P < 0.05$ 。(G) ウェスタンブロットによる MAPK ERK1/2 のリン酸化 (J) ウェスタンブロットによる MAPK p38 のリン酸化 (H, I, K, L) リアルタイム RT-PCR による象牙芽細胞マーカー発現 (H, K) *DSPP*、(I, L) *enamelysin*、U0126; ERK1/2 阻害剤、SB203580 * $P < 0.01$ 。

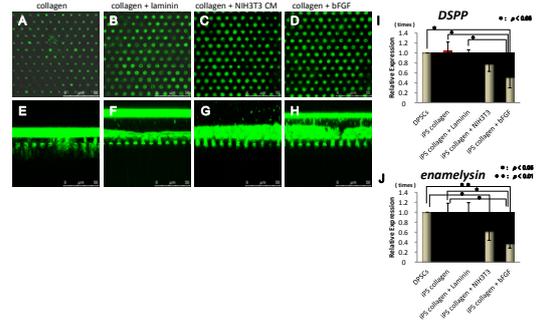


図 3. ヒト iPS 細胞に対する加圧刺激による象牙芽細胞分化 (コート法による変化)

(A-H) 共焦点レーザー顕微鏡像

(A-D) シリコン膜横断面、(E-H) シリコン膜縦断面、(A, E) collagen IA、(B, F) collagen IA+laminin、(C, G) collagen IA+NIH3T3 培養上清、(D, H) collagen IA+bFGF (I) リアルタイム RT-PCR による *DSPP* 発現 (J) リアルタイム RT-PCR による *enamelysin* 発現。* $P < 0.01$; ** $P < 0.05$ 。

scaffold への接着性が悪かったため、接着性を高める方法を検討した。ROCK 阻害剤によりやや細胞の接着性は良くなった。さらに、iPS 細胞は、collagen あるいは collagen と laminin のコートにより、接着性が上がり、象牙芽細胞分化が促進された(図 3、F、H、I、J)。

よって、iPS 細胞も穴加工 scaffold 上で、他組織間葉系幹細胞と同様の至適条件で加圧することにより、象牙芽細胞に分化することが明らかとなった。よって、象牙細管類似の三次元穴構造が象牙芽細胞への分化に重要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Miyashita S., Nermeen E.M.B.A., Murakami M., Iohara K., Yamamoto T., Horibe H., Kurita K., Takano-Yamamoto T., Nakashima M. Mechanical forces induce odontoblastic differentiation of mesenchymal stem cells on three-dimensional biomimetic scaffolds. *J.Tissue Eng. Reg. Med.* 査読有、2014.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 宮下俊郎、Nermeen El Motaz、村上真史、庵原耕一郎、山本照子、中島美砂子：「シリコン膜を用いた加圧刺激によるヒト歯髄細胞の象牙芽細胞への分化誘導」第 11 回日本再生医療学会総会、2012 年 6 月 14 日、横浜
2. 宮下俊郎、村上真史、庵原耕一郎、山本照子、中島美砂子。「シリコン膜を用いた加圧刺激によるヒト歯髄細胞の象牙芽細胞への分化誘導」第 136 回日本歯科保存学会 2012 年度春季学術大会 2012 年 6 月 29 日、沖縄
3. 宮下俊郎、庵原耕一郎、山本照子、中島美砂子。「三次元 scaffold を用いた加圧刺激による間葉系幹細胞の象牙芽細胞への分化誘導」第 72 回日本矯正歯科学会大会、2013 年 10 月 9 日、長野

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 美砂子 (NAKASHIMA MISAKO)
国立長寿医療研究センター
歯科口腔先進医療開発センター・再生歯科医
療研究部・部長 研究者番号：20207773

(2) 研究分担者

庵原 耕一郎 (IOHARA KOICHIRO)
歯科口腔先進医療開発センター・再生歯科医
療研究部・室長 研究者番号：60435865

渡邊 淳 (WATANABE ATSUSHI)
国立長寿医療研究センター
共同利用推進室・室長 研究者番号:90321843

中村 洋 (NAKAMURA HIROSHI)
愛知学院大学・歯学部・教授 研究者番号：
40064878

村上 真史 (MURAKAMI MASASHI)
歯科口腔先進医療開発センター・再生歯科医
療研究部・研究員 研究者番号：30614531