

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390426

研究課題名(和文) 歯根膜細胞由来の iPS 細胞の作製と歯根膜組織再生法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy for periodontium regeneration using periodontal iPS cells

研究代表者

赤峰 昭文 (Akamine, Akifumi)

九州大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00117053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、iPS細胞を用いて、欠損を生じた歯周組織の再生する新たな治療法の開発を目的とした。神経堤細胞は歯周組織間葉系細胞の起源であるため、まずヒト皮膚線維芽細胞由来のiPS細胞を用いて、神経堤細胞の特徴を持った細胞へ誘導した。次にこの細胞を歯根膜プライマリー細胞の細胞外基質との培養によって、歯根膜細胞の特徴を有した細胞を獲得した。そこでヌードラットを用いて、歯周組織欠損モデルを作製し、得られた歯根膜細胞様細胞を移植した結果、喪失した歯槽骨の一部とさらに歯根膜組織の一部が再生したことが、組織学的に観察された。本研究より、iPS細胞を用いた歯周組織再生療法の臨床応用への道筋を示すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a novel therapy to regenerate defects formed in periodontium using iPS cells. As neural crest cells are thought to be the origin of mesenchymal cells that fabricate the periodontium, we first induced iPS cells derived from human skin fibroblasts to neural crest (NC)-like cells. We then cultured these cells on culture dishes coated by extracellular matrices produced by primary human periodontal ligament (PDL) cells. Consequently we obtained PDL-like cells from NC-like cells, which exhibited the features of PDL cells. In this context, we transplanted such PDL-like cells into the defect of periodontium experimentally created in rat mandibular, and observed the partial regeneration of alveolar bone and PDL tissue after 4 weeks of transplantation histologically. We therefore believe that our results indicated the way to clinically apply iPS cells for periodontal regenerative therapy.

研究分野：歯科保存学

キーワード：歯根膜組織 iPS細胞 歯周組織再生 神経堤細胞

1. 研究開始当初の背景

歯根膜組織には幹細胞が含まれており、歯根膜組織の維持や再生に重要な働きをしていることが知られている。そのため多くの研究者が歯根膜幹細胞を用いた再生療法の開発に向けた研究を行っている。申請者らは、これまで2種のヒト歯根膜幹細胞クローン株を作製し、歯根膜幹細胞の特性について解析を行ってきた。しかしながら、これらの細胞株は自己複製能や多分化能を有しているが、クローン細胞株であるため、歯根膜システムの多様な分化段階にある幹細胞を含んだ細胞集団ではない。すなわち歯根膜組織には、様々な分化段階の幹細胞が含まれており、これらの細胞が組織内の他の細胞や基質と相互作用を行い、適切に分化することによって、歯根膜組織の構造維持に寄与していると考えられることから、細胞株だけでは生体内での組織の再構築を十分に達成できないと推察された。

歯根膜組織を含めた歯を構成する間葉系細胞は、神経堤細胞に由来することから、これらの細胞を用いることで、喪失した歯根膜組織の再生のみならず、歯の再生の糸口にもなり得るものと推察された。そこで、多様性のある幹細胞集団を得るために、人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いて、歯根膜細胞の起源といわれる神経堤細胞様細胞へ分化誘導し、多様性を有した未分化な歯根膜細胞集団を作製し、その機能解析を行う。さらにこれを歯周組織欠損モデルへ移植する。これらの実験を系統立って行うことによって、喪失した歯周組織が再生できる新規の組織再生法を開発することが可能になると企図した。

2. 研究の目的

申請者らは、ヒト歯根膜幹細胞クローン株を作製し、それらの歯根膜組織再生能についてこれまで解析を行ってきた。しかしながらラットへの移植実験では、この細胞株が歯根膜組織再生に積極的な関与を示す十分な結果が得られていない。これは、用いた細胞株が一定の分化段階に限られたクローン株であるため多様性を欠き、その結果予測通りの分化が進まなかったことによると推察された。したがって歯根膜組織再生には、歯根膜の発生期に存在するような極めて未分化な細胞を含めた多様な分化段階の幹細胞が必要であると考えに至った。そこで本研究では、歯根膜細胞由来のiPS細胞を用いて、その特性の解析、プライマリーの歯根膜細胞との相互作用や分化能の解析、そして歯周組織を欠損した動物実験モデルを用いてiPS細胞による歯根膜組織再生法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

プライマリーのヒト歯根膜細胞へ Nanog, Lin28, Oct4, Sox2 の遺伝子を導入し、ヒト

歯根膜細胞由来のiPS細胞(理化学研究所より購入)を作製し、この細胞を用いて、Leeらの報告(Nat Protoc, 2010)に基づいて神経堤細胞様細胞への分化誘導を試みる。この分化誘導した細胞を用いて、神経堤細胞マーカーの発現を解析し、さらに骨系細胞分化ならびに脂肪細胞への多分化能について解析する。さらにこの神経堤細胞様細胞とヒト歯根膜プライマリー細胞との相互作用について解析し、iPS細胞を歯根膜細胞系統へ分化誘導する方法を明らかにする。そしてin vivoにおける、iPS細胞由来の神経堤細胞様細胞による歯根膜組織再生能について明らかにするために、ラットを用いた歯周組織欠損実験モデルを確立する。このモデルの歯周組織欠損部位へ、神経堤細胞様細胞を移植することによって、歯周組織再生能について組織学的に評価する。

4. 研究成果

本研究では、当初の計画に従い、プライマリーのヒト歯根膜細胞へ Nanog, Lin28, Oct4, Sox2 の遺伝子をコードした Minicircle (System Biosciences 社より購入) を操作手順に従い、遺伝子導入し、iPS細胞の樹立を数回試みた。その結果、微少なコロニー形成を認めるも、成長せず、適切なiPS細胞を得ることができず、またその原因についても明らかにすることができなかった。したがって、方針を変更し、京都大学の山中教授らが作製した、ヒト皮膚線維芽細胞由来のiPS細胞を用いて、まず歯根膜細胞の起源である神経堤細胞への分化誘導を行うことにした。

このiPS細胞を神経堤細胞様細胞に分化誘導するために、Leeらの報告に従い、まずiPS細胞のコロニーを個々に分散し、MEF細胞の培養上清と共に培養してiPS細胞の増殖を行った。培養皿上で約50%程度に増殖した細胞に、TGF-betaシグナルの抑制剤ならびにBMP活性の拮抗薬として働くNogginを添加した培地で培養し、増殖を促進した。その後、海馬細胞や中枢神経系の神経細胞の培養用無血清培地にて培養することによって、約半月をかけて神経堤細胞様細胞への分化誘導を行った。

この分化誘導した細胞は、ES細胞マーカーであるNanogならびにOCT4遺伝子を発現しており、さらに神経堤細胞マーカーであるNestin, p75NTR, SLUG, SOX10遺伝子を発現することが明らかになった。さらに免疫細胞学的染色により、誘導された細胞は、中枢神経マーカーであるPAX6を発現する細胞集団の中にp75NTR発現細胞のコロニーが形成されていた。以上の結果から、iPS細胞からの神経堤細胞分化に成功したと判断した。

次に、iPS細胞から神経堤細胞様細胞が誘導された割合について検討するため、この細

胞が発現する表面抗原の1つである p75NTR の発現について、フローサイトメトリー解析を行った。その結果、約9割の細胞が陽性反応を示した。そこで MACS を用いた磁気細胞分離法によって陽性細胞を分離し、継代培養に成功した。さらにこの分離した細胞を用いて、骨系細胞分化誘導培地(含アスコルビン酸、beta-グリセロリン酸、デキサメサゾン)にて5週間の培養を行い、アリザリンレッド染色を行った結果、陽性反応が認められ、骨系細胞へ分化することが明らかになった。一方、脂肪細胞誘導培地にて培養を試みたが、細胞のダメージが大きく十分な分化誘導を確認することはできなかった。

そこで、この神経堤細胞様細胞と歯根膜細胞との相互作用について解析を行うため、まずヒト歯根膜プライマリー細胞とフィルターを介して2週間の共培養を行った結果、歯根膜細胞のマーカーである、periodontal ligament-associated protein-1 (PLAP-1)/asporin ならびに alkaline phosphatase (ALP) の遺伝子発現が約2倍に有意に促進した。したがって、ヒト歯根膜プライマリー細胞によって、iPS 細胞由来の神経堤細胞様細胞の歯根膜細胞様細胞への分化が誘導されることが示唆された。次に、ヒト歯根膜プライマリー細胞の膜抗原による分化誘導の可能性について検討した。培養皿上でコンフルエントに増殖したヒト歯根膜プライマリー細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、PBS で十分に洗浄後、この細胞上に神経堤細胞様細胞を播種した。同様に2週間培養を行ったが、神経堤細胞様細胞による歯根膜細胞分化は確認されなかった。以上の結果より、神経堤細胞様細胞の分化にはヒト歯根膜プライマリー細胞によって分泌される因子が重要であることが示唆された。

しかしながら、上述したように、ヒト歯根膜プライマリー細胞由来の分泌成分による誘導効率が十分ではなかったため、その効率をさらに上昇させることにした。まず、ヒト歯根膜プライマリー細胞を培養皿上でコンフルエントになるまで、培養した後、EDTA を用いて、細胞のみを剥離して、歯根膜細胞由来の細胞外基質でコートされた培養皿を作製し、その上で神経堤細胞様細胞を培養した。コントロールとして、神経堤細胞様細胞の培養に用いている、Fibronectin および Laminin でコートした培養皿を用いた。その結果、歯根膜細胞外基質上で培養した、神経堤細胞様細胞は、歯根膜細胞に特徴的な遺伝子である、ALP, alpha-Smooth Muscle Actin, Collagen 1 & 12, Epidermal Growth Factor Receptor, Fibriillin 1, Osteoprotegerin, Osteopontin, PLAP 1, Periostin の発現を有意に上昇した。中でも PLAP 1 は、歯根膜での発現が顕著であるが、この発現はコントロールの培養皿上で培養した場合の、約150倍程度に上昇して

いた。これらの結果から、神経堤細胞様細胞の歯根膜細胞様細胞への分化誘導には、ヒト歯根膜プライマリー細胞の細胞外基質が有効であることが示唆された。

そこで、上記に様にして、神経堤細胞様細胞から誘導した歯根膜細胞様細胞の、歯根膜組織再生能について解析するため、in vivo モデルを作製した。動物モデルには、ヌードラットを用いて、両側下顎第1および第2臼歯部の頬側歯槽骨ならびに歯根膜組織を削除して、歯根を露出させ、この欠損部位の再生について組織学的に解析することとした。この欠損部位に、足場材として用いたゼルフォームと混和した、神経堤細胞様細胞由来の歯根膜細胞様細胞を移植し、4週間後に固定し、歯根膜組織再生について検討した。コントロールには、ゼルフォーム単味を移植したものを用意した。その結果、コントロールと比較して、欠損部位の歯槽骨が顕著に再生しており、さらにそれに伴って、一部歯根膜組織の再生も観察することができた。

以上の結果より、ヒト皮膚線維芽細胞由来の iPS 細胞を神経堤細胞様細胞へ誘導し、さらに歯根膜細胞様細胞へ分化誘導した細胞は、歯周組織再生能を持つことが示唆された。歯根膜幹細胞は、歯周組織再生において有用な細胞であると考えられているが、通常、組織再生に用いるために十分な数の幹細胞を得ることは困難である。本研究結果より、患者本人から得られた iPS 細胞から分化誘導した細胞を用いることで、歯周組織再生に必要な未分化な細胞集団を十分な細胞数で獲得することが可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計12件)

Monnouchi S, Maeda H, Yuda A, Hamano S, Wada N, Tomokiyo A, Koori K, Sugii H, Serita S, Akamine A. Mechanical induction of interleukin-11 regulates osteo/cementoblastic differentiation of human periodontal ligament stem/progenitor cells. J Periodontal Res. 査読有, 50 巻, 2015, 231-239. doi: 10.1111/jre.12200.

Yuda A, Maeda H, Fujii S, Monnouchi S, Yamamoto N, Wada N, Koori K, Tomokiyo A, Hamano S, Hasegawa D, Akamine A. Effect of CTGF/CCN2 on osteo/cementoblastic and fibroblastic differentiation of a human periodontal ligament stem/progenitor cell line. J Cell Physiol. 査読有, 230 巻, 2015. 150-159. doi: 10.1002/jcp.24693.

Sugii H, Maeda H, Tomokiyo A, Yamamoto N, Wada N, Koori K, Hasegawa D, Hamano S, Yuda A, Monnouchi S, Akamine A. Effects of

Activin A on the phenotypic properties of human periodontal ligament cells. Bone. 査読有, 66 巻, 2014, 62-71.

doi: 10.1016/j.bone.2014.05.021.

Teramatsu, Y, Maeda H, Sugii H, Tomokiyo A, Hamano S, Wada N, Yuda A, Yamamoto N, Koori K, Akamine A. Expression and effects of epidermal growth factor on human periodontal ligament cells. Cell Tissue Res. 査読有, 357 巻, 2014, 633-643.

doi: 10.1007/s00441-014-1877-x.

Koori K, Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, Kawachi G, Hasegawa D, Hamano S, Sugii H, Wada N, Akamine A. The roles of calcium-sensing receptor and calcium channel in osteogenic differentiation of undifferentiated periodontal ligament cells. Cell Tissue Res. 査読有, 357 巻, 2014, 707-718,

doi: 10.1007/s00441-014-1918-5.

Maeda H, Tomokiyo A, Wada N, Koori K, Kawachi G, Akamine A. Regeneration of the periodontium for preservation of the damaged tooth. Histol Histopathol. 査読有, 29 巻, 2014, 1249-1262.

Wada N, Maeda H, Hasegawa D, Gronthos S, Bartold PM, Menicanin D, Fujii S, Yoshida S, Tomokiyo A, Monnouchi S, Akamine A. Semaphorin 3A induces mesenchymal stem-like properties in human periodontal ligament cells. Stem Cell Dev. 査読有, 23 巻, 2014, 2225-2236.

doi: 10.1089/scd.2013.0405.

Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, Wada N, Akamine A. Periodontal tissue engineering: defining the triad. Int J Oral Maxillofac Implants. 査読有, 28 巻, 2013, e461-e471.

doi: 10.11607/jomi.te26.

Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Monnouchi S, Akamine A. Prospective Potency of TGF- β 1 on Maintenance and Regeneration of Periodontal Tissue. Int Rev Cell Mol Biol. 査読有, 304 巻, 2013, 283-367.

doi: 10.1016/B978-0-12-407696-9.00006-3.

Kono K, Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, Yamamoto N, Wada N, Monnouchi S, Teramatsu Y, Hamano S, Koori K, Akamine A. Exposure to transforming growth factor-1 after basic fibroblast growth factor promotes the fibroblastic differentiation of human periodontal ligament stem/progenitor cell lines. Cell Tissue Res. 査読有, 352 巻, 2013, 249-263.

doi: 10.1007/s00441-012-1543-0.

Yamamoto N, Maeda H, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Monnouchi S, Kono K, Koori K, Teramatsu Y, Akamine A. Expression and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on periodontal

ligament cells. J Clin Periodontol. 査読有, 39 巻, 2012, 556-564.

doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01881.x.

Tomokiyo A, Maeda H, Fujii S, Monnouchi S, Wada N, Kono K, Koori K, Yamamoto N, Teramatsu Y, Akamine A. A multipotent clonal human periodontal ligament cell line with neural crest cell phenotypes promotes neurocytic differentiation, migration, and survival. J Cell Physiol. 査読有, 227 巻, 2040-2050, 2012.

doi: 10.1002/jcp.22933.

〔学会発表〕(計6件)

Hamano et al. Effect of α 2 Adrenergic Receptor on Human Periodontal Ligament Cells. 93rd General Session & Exhibition of the IADR. March 11-14, 2015. Boston, USA.

長谷川 大学 他、Wnt5a は Ror2-JNK シグナルを介してヒト歯根膜幹細胞株の骨芽細胞様分化を抑制する。第141回日本歯科保存学会秋季学術大会。2014.10.30-31.山形市

杉井 英樹 他、Activin A がヒト歯根膜細胞に及ぼす影響について。第138回日本歯科保存学会春季学術大会。2013.6.27-28.福岡市

Maeda H et al. CaCl₂-added Resin Exerts Bioactive Effects on Periodontal Ligament Cells. 91st General Session & Exhibition of the IADR. March 20-23, 2013. Seattle, USA.

Wada N et al. Induction of stem/undifferentiated cells from periodontal ligament cells by Sema3A. The Australian Health and Medical Research Congress 2012, Nov 25-28, 2012, Adelaide, Australia.

祐田 明香 他、CTGF が未分化なヒト歯根膜細胞株の骨芽細胞様分化に及ぼす影響。第137回日本歯科保存学会秋季学術大会。2012.11.22-23. 広島市

〔図書〕(計2件)

Maeda et al., Nova Science Publishers, Inc., INDUCTION OF BMP-2 IN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS BY CALCIUM-BASED BIOMATERIAL, 2012, 309

Maeda et al., Differentiation of Periodontal Stem/Progenitor Cells: Roles of TGF-beta1, 2012, 319

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤峰 昭文 (AKAMINE, Akifumi)
九州大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号：00117053

(2) 研究分担者

前田 英史 (MAEDA, Hidefumi)
九州大学病院・歯内治療科・講師
研究者番号：10284514

(3) 連携研究者

和田 尚久 (WADA, Naohisa)
九州大学病院・歯内治療科・講師
研究者番号：60380466

(4) 連携研究者

門野内 聡, (MONNOUCHI Satoshi)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号：30609558