

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592962

研究課題名(和文) iPS細胞由来の高純度間葉系幹細胞を用いた新規歯周組織再生療法に関する研究

研究課題名(英文) The study of periodontal regeneration with mesenchymal stem cells derived from iPS cells

研究代表者

迫田 賢二 (Sakoda, Kenji)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：70419654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、iPS細胞からの間葉系幹細胞(MSC)作製を目的としたが、そのMSCを得ることができなかった。そこで新規歯周組織再生療法開発にMSCを使用した。

我々はチタンインプラント表面への歯周組織構築を目指し、歯根発生期に重要なエナメルマトリックスタンパク(EMD)を用いた。EMDを固定したチタン(Ti-EMD)上では、MSCのVEGF産生が亢進した。Ti-EMD上ではセメントマーカのEMP1の遺伝子発現が亢進した。EMD刺激のMSCではCEMP1タンパクの発現を認めた。EMD刺激で石灰化物の沈着も確認された。本研究では、MSCからCEMP1陽性細胞へと分化させることができた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was generation of iPS-derived mesenchymal stem cells (MSC). However, we couldn't generate MSC from iPS cells. So we used the MSC to develop a new periodontal regenerative therapy.

Many researches has reported to the important role of enamel matrix derivative (EMD) in periodontal wound healing. Enamel matrix proteins provide an initial and essential step in the formation of a cellular cementum. We attempted to induce the cementum on the titanium implant by using the EMD.

EMD was immobilized by tresyl chloride-activation technique. MSC were seeded on the different titanium surfaces. The titanium surface with EMD immobilization (Ti-EMD) showed the significantly higher VEGF production of MSC than normal titanium surface. We observed that Ti-EMD stimulated a significant increase in the expression of CEMP1 mRNA in MSC compared with the control. Furthermore, EMD induced the production of CEMP1 protein in MSC. The mineralization was also confirmed by EMD stimulus.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周組織再生 間葉系幹細胞 セメント質

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病により破壊される歯周組織は歯槽骨、セメント質、歯根膜といった複数の異なる組織によって構成されていることから、多能性を持つ iPS 細胞は歯周組織再生のための有力な細胞ソースとして考えられる。

近年、歯周病治療においても臨床応用されている再生療法であるが、歯周組織再生療法は歯根膜に存在する幹細胞、いわゆる「歯周組織幹細胞」を幹細胞源としている。この歯周組織幹細胞については、Seo らによりその多分化能が証明された (*Lancet* 2004 ; 364 : 149-55)。しかし、生体内の幹細胞数は加齢とともに減少することが知られており、歯周組織再生に関しても、高齢者の方や重度歯周病の場合には内在性の歯周組織幹細胞だけでは十分な再生が期待できない。そのため幹細胞移植による次世代型の再生療法の開発が期待されている。これまで歯周組織再生の分野では、骨髄由来間葉系幹細胞や歯根膜幹細胞等の組織幹細胞を用いた研究がなされて良好な成果があげられている (*J Periodontol.* 2006; 1003-7, *J Clin Periodontol* 2008;35(12):1066-72.)。しかしながら、身体への侵襲が大きいことや、採取量・回数に制限があるといった問題もある。

そこでこれらの問題を解決するため、我々は iPS 細胞を間葉系幹細胞 (MSC) へ分化誘導した間葉系幹細胞 (iMS 細胞) を歯周組織再生に応用することとした。歯根の発生期においては歯小囊に存在する間葉系幹細胞が重要な役割を担っていることから、iMS 細胞は歯周組織再生に有用と考えられる。

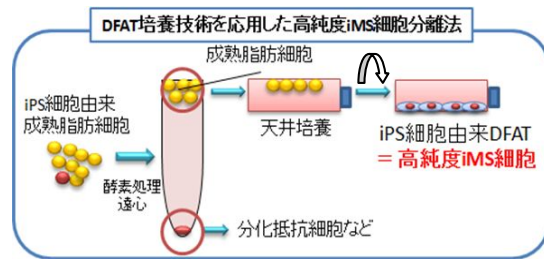
### 2. 研究の目的

発生学的視点から歯周組織再生を再考すると、歯根の発生期には、ヘルトヴィッチ上皮鞘を構成するエナメル上皮が幼若な象牙質上にエナメルマトリックスタンパクを分泌し、そこに MSC が誘導されてセメント芽細胞や線維芽細胞に分化する。したがって、ルートプレーニング後の根面にエナメルマトリックスタンパクを塗布するとセメント質を含めた歯周組織の再生が起こるはずであり、これが現在臨床で頻用されているエムドゲイン®の基本コンセプトである。本研究は、既存のエムドゲイン®による歯周組織再生療法のコンセプトと、これからの再生医療を担うであろう iPS 細胞 (本研究では iPS 細胞由来の iMS 細胞) を組み合わせ「次世代型歯周組織再生療法」開発の基盤を確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、iPS 細胞由来の高純度間葉系幹細胞 (iMS 細胞) を得るために、脂肪組織に由来する脱分化脂肪細胞 (De-differentiated fat cells:DFAT) 作製の技術を応用した。すなわち、iPS 細胞を脂肪細胞へ分化させ、その成熟脂肪細胞を天井培

養することで非常に純度の高い幹細胞集団を得るといった試みである (下図)。



#### iPS 細胞の脂肪細胞への分化

マウス iPS 細胞は、京都大学で樹立されたものを RIKEN より購入した。マウス iPS 細胞の骨分化誘導は、まず Hnanging drops 法にて胚様体 (Embryoid Bodies : E B) を形成した。3 日目に E B を浮遊培養し、5 日目にレチノイン酸 100nM を添加しさらに 3 日間浮遊培養した。次に、ゼラチンコーティングのディッシュ上で脂肪分化培地にて 1 週間接着培養を行った。その後、脂肪細胞栄養培地にて 10 日間培養した。脂肪分化の評価としては、Oil Red O 染色を行った。

#### iPS 細胞由来脂肪細胞の間葉系幹細胞への分化 (iMS 細胞)

得られた脂肪細胞は、20%FBS 含有 DMEM 培地で満たした 25cm<sup>2</sup> カルチャーフラスコ内に播種され、上下反転させ、その中で 1 週間天井培養した。その後、培地交換を行い通常培養した。

得られた細胞における、間葉系幹細胞マーカー (CD146+, CD90+, CD73+, CD105+, CD34-, CD46-) の確認を行った。

#### 間葉系幹細胞の歯周組織セメント芽細胞への分化

チタンインプラント表面への歯周組織構築を試みた。チタン表面への歯周組織の構築には、歯根の発生期を模倣し、エナメルマトリックスタンパク (EMD) を用いた。EMD をチタン表面へ固定するために、チタン表面をトレシルクロライド処理した。トレシル化チタン上に EMD を 37 °C で 24 時間作用させた。

EMD を固定したチタン (TiEMD) の細胞障害性をみるために Tali® Viability Kit (Life technologies) を使用した。次に、固定した EMD の活性の一部を見るために、EMD チタン上での細胞の VEGF 産生を ELISA 法にて定量した。セメントマーカー (CEMP1、CAP)、歯根膜マーカー (Periostin、PLAP-1)、骨マーカー (Cbfa1、OCN) の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で解析した。さらに、CEMP1 のタンパク発現を細胞免疫蛍光染色法で解析した。石灰化物の沈着は Alizalin Red 染色法を用いた。

#### 4. 研究成果

##### iPS 細胞の脂肪細胞への分化と iMS 細胞分化

我々は、通常の脂肪細胞分化法をアレンジし、MEF フィーダー細胞上で脂肪細胞分化を行った。その結果、図 1 に示すように、脂肪滴を有した丸い細胞集団を得ることができた。

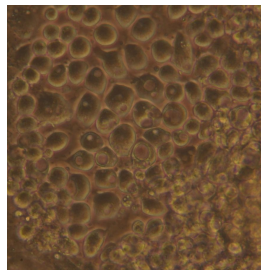


図 1 iPS 細胞の脂肪細胞への分化

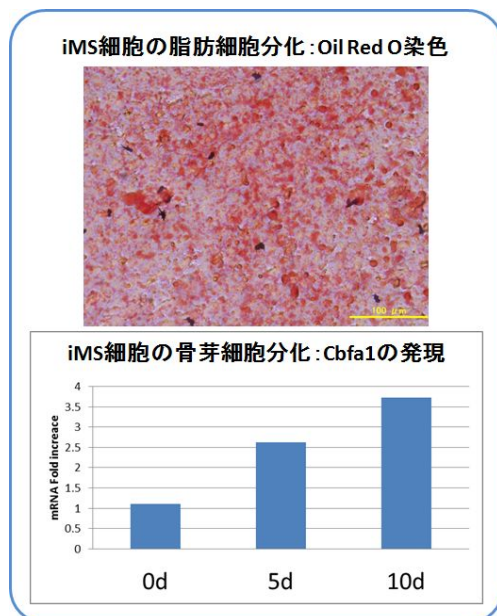
この細胞を用いて天井培養を行ったが、生体から得られる脂肪細胞と違い、完全に浮遊する細胞は見られなかった。残念ながら、生体から得られる成熟脂肪細胞と同等の脂肪細胞へと分化誘導することは出来なかった。

脂肪細胞への分化誘導はある程度確立した方法として認知されているが、生体の成熟脂肪細胞と同等の細胞を得るためにはさらなる研究が必要である。

天井培養による iMS 細胞が出来なかったため、我々は別の方法での分化誘導を模索した。Amer Mahmood ら( Journal of Bone and Mineral Research, Vol.25, No.6, June 2010, pp1216-1233 )の報告に基づき、iPS 細胞分化において TGF-beta シグナリング抑制することで iMS 細胞への分化を試みた。

得られた、iMS 細胞を脂肪細胞分化培地で培養すると図 2 のように Oil Red O 染色陽性の細胞を得ることができた。さらに、骨芽細胞分化培地で培養すると、骨芽細胞の分化マーカーの一つである、Cbfa1 の遺伝子発現を確認できた。

図 2 iMS 細胞の分化



次に、得られた iMS 細胞の間葉系幹細胞マーカー( CD146+, CD90+, CD73+, CD105+, CD34-, CD46- )を調べた。その結果、iMS 細胞の間葉系幹細胞マーカーはネガティブであった。他の論文で報告されている方法も試みたが、結果的に我々は間葉系幹細胞様細胞を得ることはできなかった。

そこで、本研究の最終目標である歯周組織再生を間葉系幹細胞を用いて研究することとした。

##### 間葉系幹細胞の歯周組織セメント芽細胞への分化

##### ・EMD 固定したトレシル化チタン上でのヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の Cell Viability

通常培養したものをコントロール (Cont) とし、無処理のチタン上で培養したものを Ti-Cont、EMD 固定したトレシル化チタン上で培養したものを Ti-EMD とした。それぞれ、2日間培養したのち、細胞の Cell Viability を測定したところ、いずれも細胞生存率に影響はなかった (表 1)。

表 1 EMD固定したトレシル化チタン上でのヒト間葉系幹細胞のCell Viability

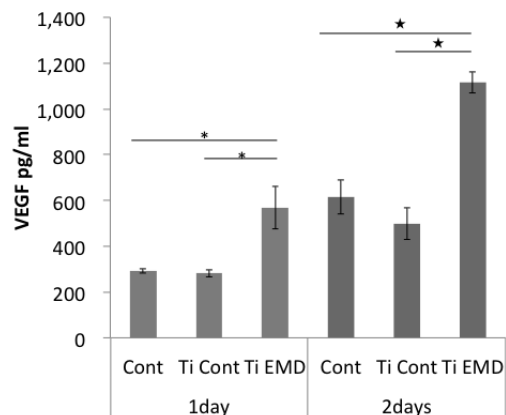
2 days	Conc.	% cells	# cells	
Cont.	Green only	7.43X10 <sup>4</sup> cells/mL	95%	156
	Red only	0.05X10 <sup>4</sup> cells/mL	1%	1
	Green and Red	0.00X10 <sup>4</sup> cells/mL	0%	0
	No Green, no Red	0.38X10 <sup>4</sup> cells/mL	5%	8
Ti-Cont.	Green only	1.50X10 <sup>5</sup> cells/mL	92%	314
	Red only	0.05X10 <sup>4</sup> cells/mL	0%	1
	Green and Red	1.10X10 <sup>4</sup> cells/mL	7%	23
	No Green, no Red	0.24X10 <sup>4</sup> cells/mL	1%	5
Ti-EMD	Green only	1.32X10 <sup>5</sup> cells/mL	84%	278
	Red only	0.14X10 <sup>4</sup> cells/mL	1%	3
	Green and Red	1.91X10 <sup>4</sup> cells/mL	12%	40
	No Green, no Red	0.38X10 <sup>4</sup> cells/mL	2%	8

Green: 生細胞  
Red: 死細胞

##### ・EMD 固定したトレシル化チタン上での hMSC の VEGF 産生

固定した EMD の活性の有無を確かめるために、Ti-EMD 上での hMSC の VEGF 産生を ELISA 法にて定量した。培養 1 日後、2 日後いずれも Ti-EMD 上での hMSC の VEGF 産生は、Cont、Ti-Cont に比べて有意に亢進していた (図 3)。

図 3 Ti-EMD上でのhMSCのVEGF産生

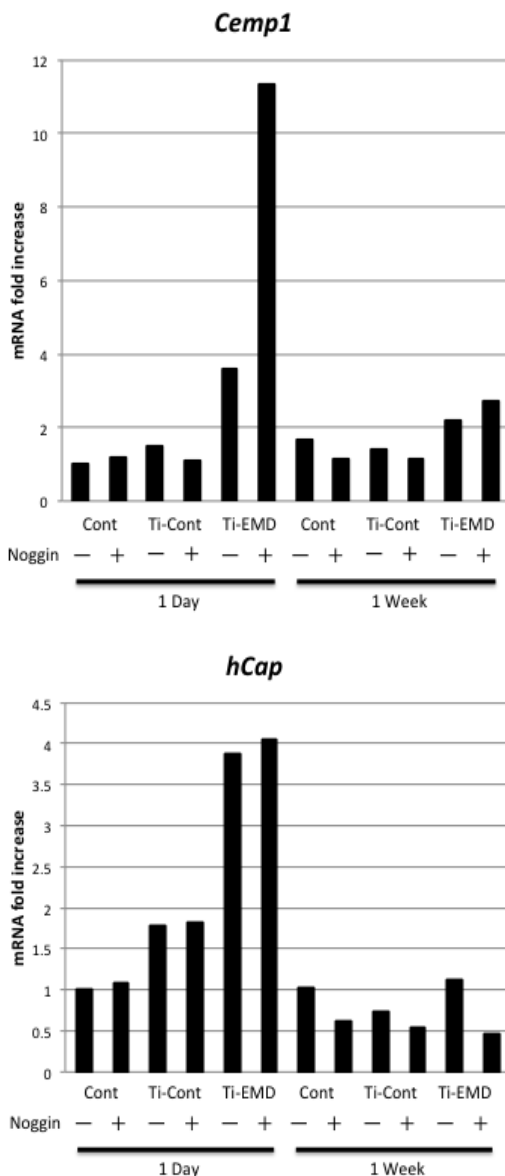


・ EMD 固定したトレシル化チタン上での hMSC のセメント芽細胞、歯根膜細胞、骨芽細胞それぞれのマーカー発現解析

歯根膜細胞において、BMP-2 は骨芽細胞への分化は促進するが、セメント芽細胞への分化には抑制的に働いているとの報告があることから、我々は、EMD 中の BMP-2 の作用を抑制するために、BMP-2 アンタゴニストの Noggin を併用した。

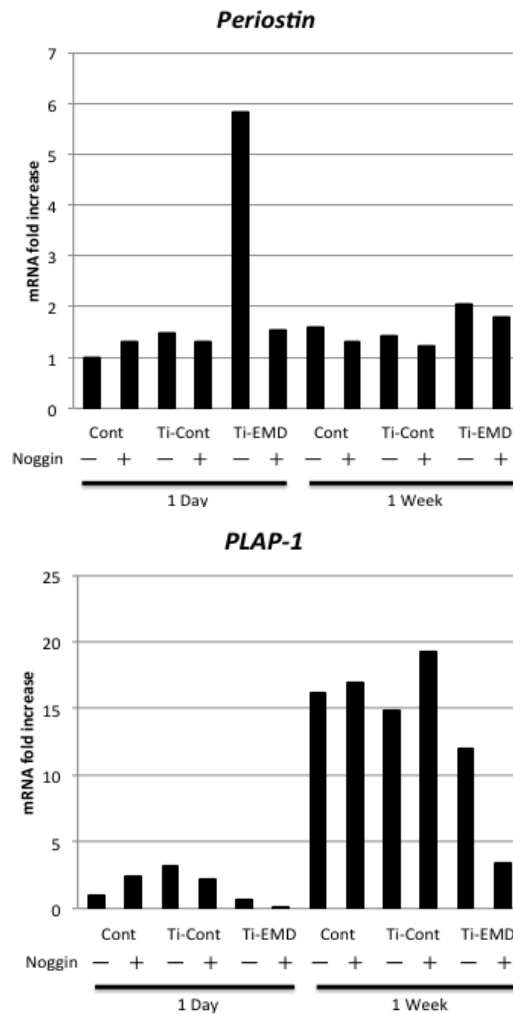
まず、セメント芽細胞マーカーである *Cemp1* と *Cap* の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で解析した。*Cemp1* 発現については Ti-EMD でその発現が亢進しており、Noggin の添加によりその発現がさらに更新した。*Cap* 発現については、Ti-EMD でその発現が亢進していたが、Noggin の影響は見られなかった (図 4)。

図 4 hMSC におけるセメント芽細胞マーカーの遺伝子発現



次に、歯根膜マーカーである *Periostin* と *PLAP-1* の遺伝子発現を同様に解析した。*Periostin* については、Ti-EMD で発現の亢進がみられたが、Noggin の添加により EMD の効果が抑制された。*PLAP-1* については、EMD によりその発現が亢進することはなかった (図 5)。

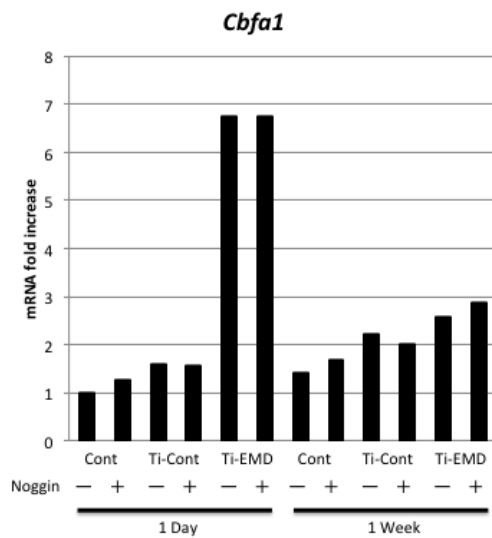
図 5 hMSC における歯根膜マーカーの遺伝子発現



次に、骨芽細胞への分化の初期に促進的な役割を果たす *Cbfa1* についてその遺伝子発現を同様に解析した。Ti-EMD において *Cbfa1* の発現は亢進したが、Noggin の影響は認められなかった (図 6)。



図6 hMSCにおける初期の骨芽細胞分化  
マーカーCbfa1の遺伝子発現

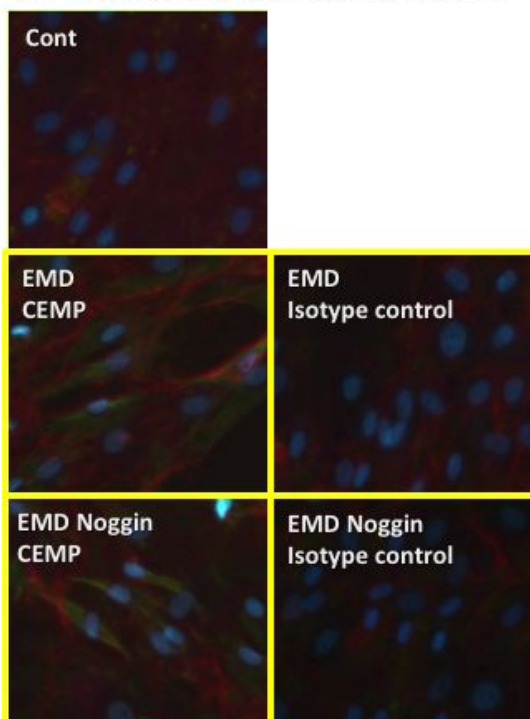


・CEMP1 タンパクの細胞免疫蛍光染色

hMSC において、EMD 刺激もしくは EMD と Noggin の刺激によって CEMP1 の遺伝子発現が確認されたため、CEMP1 のタンパク発現について細胞免疫蛍光染色にて解析することとした。

1 週間の刺激を行い、蛍光顕微鏡にて観察を行ったところ、EMD 群と EMD + Noggin 群では細胞質内に CEMP1 タンパクの発現が認められた (図7)。

図7 hMSCでのCEMP1の細胞免疫蛍光染色

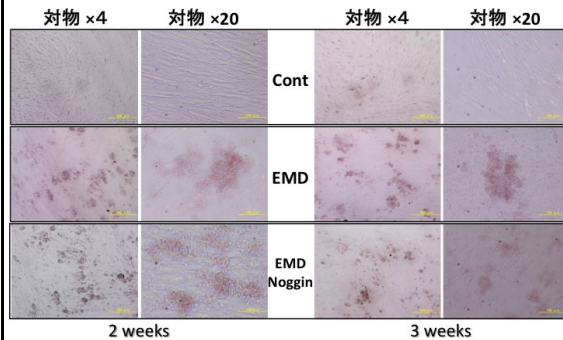


青;核 緑;CEMP1 赤;細胞膜

・Alizalin Red 染色

最後に、EMD/EMD & Noggin 刺激による hMSC での石灰化物沈着を確かめるために、維持培地に EMD/EMD&Noggin を添加し、3 週間培養後、Alizalin Red 染色法にて解析した。その結果、コントロールでは石灰化物はみられなかったが、EMD、EMD & Noggin いずれの刺激においても石灰化物の沈着が認められた。ただし、Noggin 添加群では EMD 単独刺激に比べて石灰化物の沈着は少なかった (図8)。

図8 EMD/EMD&Noggin刺激によるhMSCでの石灰化物の沈着



本研究では、iPS 細胞から高純度の間葉系幹細胞を作製することを目的とし、そのために幾つかの方法を模索したが最終的に iPS 細胞由来の間葉系幹細胞を得ることができなかった。そこで、我々の最終目標である新規歯周組織再生療法開発のツールとして間葉系幹細胞を使用することとした。

歯周組織再生療法には、GTR 法とエムドゲイン®療法があり、前者では有細胞セメント質が、後者では無細胞セメント質が再生してくるといわれている。その詳細なメカニズムには未解明な点も多く存在するが、そもそも、どうして有細胞セメント質と無細胞セメント質の2種類あるのかは不明である。2つのセメント質の作られるスピードが違うことは昔から知られており、無細胞セメント質に対して有細胞セメント質の方が速い (*J Clin Periodontol.* 1990;17(9):663-8)。しかし、有細胞セメント質の付着強度には疑問がもたれていることや、(*Quintessence Int.* 1998;29(10):621-30)、歯周組織再生療法において再生させようとしているのは歯周炎で破壊された歯根歯頸側の無細胞セメント質が主であることから、有細胞セメント質の再生は真の意味での歯周組織再生とはいえないかもしれない。そこで、無細胞セメント質の再生・構築が速く効率的にできれば予知性の高い治療になると思われ、未だ不明な点が多いセメント芽細胞に焦点を当てセメント芽細胞分化誘導に着目した。

図4に示すように、エムドゲイン®を固定したチタン表面上で hMSC はセメント芽細胞の

マーカーの一つである CEMP1 を発現し、Noggin を添加することで CEMP1 の遺伝子発現が有意に亢進した。また、タンパクレベルにおいても、CEMP1 の発現を細胞免疫蛍光染色にて確認することができた。さらに、Alizalin Red 染色により、石灰化物の沈着も確認することができた。

現在臨床で用いられているインプラントの骨との結合は、「オッセオインテグレーション」によるものである。その促進に向けて、我々の研究室でも様々な表面処理を施したチタンやジルコニア上での骨芽細胞の動態について報告してきた。Marei らは、インプラント埋入時に、未分化間葉系幹細胞を同時に移植することでインプラント体周囲に歯周組織付着器官様組織が再生したことを報告した (*J Oral Implantol.* 2009; 35(3):106-29)。また、Hayakawa らはチタン表面にタンパク質を表面固定するトレシルクロリド法を確立した (*J Biomed Mater Res.* 2003; 67A: 684-688)。我々はこの方法を用いてチタン表面にエムドゲイン®を固定した。EMD 固定したトレシル化チタン上で、hMSC の VEGF 産生亢進が認められたことから、固定した EMD の活性の一部は確認できた。しかし、EMD 中に含まれるタンパク成分全てがトレシル化チタン上に固定されたとは言い切れないため、今後詳細な検討が必要である。

本研究は、インプラント周囲に歯周組織付着器官を構築することで、その恒常性と自己再生・修復能および力学的緩衝能を合わせ持った口腔インプラントを提案する。そのためにはチタン上でのセメント質形成は絶対条件である。その基盤確立のためには本研究成果のみならず、今後の更なる研究が必要であると考えられる。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

迫田 賢二 (SAKODA, Kenji)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
研究者番号：70419654

##### (2) 研究分担者

中村 利明 (NAKAMURA, Toshiaki)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
研究者番号：60381183

吉本 剛彦 (YOSHIMOTO, Takehiko)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・客員研究員  
研究者番号：60419653

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：