

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592989

研究課題名(和文) 不死化歯原性細胞との相互作用を利用した人工多能性幹(iPS)細胞による歯再生医療

研究課題名(英文) Development of tooth regenerative therapy using the interaction between immortalized odontogenic cell and iPS cells.

研究代表者

永井 宏和 (NAGAI, Hirokazu)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：50282190

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、申請者らが樹立した不死化歯原性細胞株との相互作用によって、iPS細胞の歯原性細胞への分化誘導を行うとともに、申請者らが開発した炭酸アパタイトの歯再生用scaffoldとしての有用性について検討した。

iPS細胞から直接歯原性細胞へ分化誘導することができなかったため、iPS細胞を一度間葉系幹細胞へ分化誘導させ、骨、軟骨、脂肪への分化能を確認した。一方、scaffoldとしては、低結晶性炭酸アパタイトは生体内で破骨細胞によって吸収され、炭酸アパタイト上で培養した間葉系幹細胞が骨芽細胞へ分化した。また、BMPと複合化した炭酸アパタイトがラット背部皮下で異所性に骨を形成した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we try to develop the tooth regenerative therapy using the interaction between immortalized odontogenic cell and human induced pluripotent stem (iPS) cells. We used iPS cells for cell source of tooth regenerative therapy, and used low crystalline carbonate apatite for scaffold of tooth regenerative therapy. As a result, it was revealed that 1) the differentiation of human iPS cells to mesenchymal stem cell-like cells was induced, 2) carbonate apatite was resorbed by osteoclast in vivo, 3) mesenchymal stem cells from iPS cells cultured on carbonate apatite disk differentiated into osteoblastic cells, 4) carbonate apatite granules combined with BMP-2 stimulated the ectopic new bone formation by promoting osteoblastic differentiation of mesenchymal cells in the surrounding tissue.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生医学 歯の再生 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

現在、失われた歯の治療は義歯やインプラントなどの人工材料によって行われているが、近年、再生医療の研究が進み、失った歯を取り戻すことも夢ではなくなりつつある。しかしながら、人工的な歯の構築に成功したこれまでの研究は、細胞源としてラットやマウスなどの胎児期歯胚細胞を用いた研究がほとんどであり、臨床応用を考えると現実的ではない。また、ヒトの細胞ではないことも問題である。再生医療の細胞源としては、様々な間葉系細胞へ分化が可能な間葉系幹細胞が有望である。最近では、間葉系幹細胞の心筋、神経、皮膚など胚葉を越えた分化が示されているが、間葉系幹細胞は骨髄中に含まれる数が少なく、増殖能も低い。また、継代培養によって分化能が低下することから、臨床応用を進める上で大きな障害となっている。臨床応用を考えると、ヒト由来の細胞を用いた基礎実験の蓄積が必須であり、豊富な細胞を供給できると考えられる幹細胞を用いた新たな歯再生医療の開発が重要である。これらの問題を解決できるのが、iPS (induced Pluripotent Stem) 細胞である。iPS 細胞は分化した細胞に Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 遺伝子を導入して多能性を獲得させた細胞であり、ES 細胞の大きな問題点である倫理的問題と拒絶反応が解決された。iPS 細胞にはがん化の問題があったが、最近、マイクロ RNA を用いた iPS 細胞が報告され、がん化の問題も解決されつつある。歯の発生過程において、エナメル芽細胞と象牙芽細胞は歯原性上皮と間葉細胞との相互作用によって分化していく。この相互作用には BMP や TGF- β , FGF, エナメル蛋白などの多くの分子が関与している。申請者らはマウス歯胚からエナメル芽細胞株および象牙芽細胞株を樹立し、その分化機構についての研究を行ってきたが、現段階では、効率的な間葉系幹細胞からの歯原性細胞へ分化誘導に成功した研究はない。

一方、再生医療の 3 大要素のひとつである scaffold (細胞の足場) についていうと、骨再生用 scaffold の研究は盛んに行われているが、歯再生用 scaffold の研究はほとんどない。骨再生用 scaffold としてはハイドロキシアパタイトが有用なことが知られているが、焼結体であるハイドロキシアパタイトは体内で吸収されず、再生された骨の中に異物として残留する重大な欠点がある。歯の再生医療を考えると、生体内で吸収される生体材料が不可欠である。この問題を解決するために、申請者らは、焼結操作なしに低結晶性炭酸アパタイトを作製することに成功し、この炭酸アパタイトが培養系で骨芽細胞の分化を促進すること、生体内で吸収されて骨に置換されることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

iPS (induced Pluripotent Stem) 細胞は

あらゆる細胞に分化が可能な細胞であり、再生医療の細胞源として注目を浴びている。iPS 細胞は、間葉系幹細胞の細胞数の少なさや増殖能の低さ、継代培養による分化能の低下などの臨床応用する上での問題が解決できることから、本研究では iPS 細胞を歯の再生医療の細胞源として用いる。iPS 細胞の分化を制御することは困難であることが予想されるため、iPS 細胞を間葉系幹細胞へ分化させる方法を確立し、その iPS 細胞由来の間葉系幹細胞を歯の再生医療に用いる。

エナメル芽細胞と象牙芽細胞は歯原性上皮と間葉細胞との相互作用によって分化していくことから、本研究では申請者らが樹立したエナメル芽細胞株と象牙芽細胞株を用いて、歯の発生段階における上皮-間葉相互作用を解明する。さらに、iPS 細胞をこれらの不死化歯原性細胞株を共培養することによって歯原性細胞 (エナメル芽細胞、象牙芽細胞) への分化誘導を行って、新しい歯の再生医療を開発する。

また、本研究では再生医療の重要な要素である scaffold の開発を行う。申請者らが開発した低結晶性炭酸アパタイトは培養系で骨芽細胞の分化を促進し、生体内で吸収されて骨に置換される。本研究では、この生体吸収性の低結晶性炭酸アパタイトを応用した新たな歯再生用の scaffold の開発を行う。

3 研究の方法

(1) 不死化歯原性細胞株との共培養による iPS 細胞の歯原性細胞への分化誘導

iPS 細胞を申請者らが樹立した不死化歯原性細胞株 (エナメル芽細胞株、象牙芽細胞株) と共培養 (単層培養、コラーゲンゲル内での三次元培養、ペレット培養) して、iPS 細胞のエナメル芽細胞および象牙芽細胞への分化を検討する。細胞を共培養した後、エナメル芽細胞に特異的な遺伝子 (*Amelogenin*, *Tuftelin*, *Enamelin* など) および象牙芽細胞に特異的な遺伝子 (*BMP-4*, *DSP*, *DMP1* など) の発現を RT-PCR 法、あるいはウェスタンブロット法および免疫染色により検討する。

(2) 基底膜成分、エナメル蛋白、分化増殖因子による iPS 細胞の歯原性細胞への分化誘導

iPS 細胞を、マトリゲル®あるいはラミニン、型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、フィブロネクチンなどの基底膜成分で表面処理した培養皿上で培養、エナメル蛋白 (エムドゲイン®) で表面処理した培養皿上で培養、歯の発生過程に関わる分化増殖因子 (BMP, TGF- β , FGF, EGF など) やエナメル蛋白 (エムドゲイン®) を培地に加えて培養し、iPS 細胞のエナメル芽細胞および象牙芽細胞への分化を検討する。

(3) iPS 細胞の間葉系幹細胞への分化誘導
iPS 細胞を直接歯原性細胞へ分化誘導することは困難であることが予想されるため、ES

細胞からの間葉系幹細胞の分化誘導法を参考にして、iPS 細胞からの間葉系幹細胞の分化誘導法を確立する。すなわち、コンフルエントに達した iPS 細胞をトリプシン処理してペトリディッシュ上に播種し、胚様体の形成を誘導する。3 日後に、形成された胚様体を細胞培養用ディッシュに移して、レチノイン酸を加えた培地で培養する。8 日後に、トリプシン処理にて全細胞を回収し、培地に再懸濁した後、ゼラチンコートした細胞培養用ディッシュで 1 時間培養する。その後、上清を除去し、接着細胞を血清低減培養液に bFGF を加えた間葉系間細胞用培地で継代培養し、iPS 細胞由来の間葉系幹細胞を得る。この細胞の特性を FACS で解析し、申請者が樹立したヒト骨髄由来間葉系幹細胞と比較検討する。また、骨、軟骨、脂肪への分化能についても検討する。

(4) 歯再生用の scaffold の開発

申請者が開発した低結晶性炭酸アパタイトを応用して、新しい歯再生用の scaffold を開発する。

炭酸アパタイト上での培養

iPS 細胞および不死化歯原性細胞株を低結晶性炭酸アパタイト上で培養し、細胞の増殖、分化に与える影響について検討する。細胞増殖は MTT assay により評価し、細胞の分化は、RT-PCR 法により象牙芽細胞特異的遺伝子およびエナメル芽細胞特異的遺伝子の発現を調べる。

炭酸アパタイトの生体内での反応

炭酸アパタイト顆粒をラット背部皮下に埋植し、病理組織学的に評価する。

炭酸アパタイトの再生医療のスクAFFォールドとしての有用性の検証

iPS 細胞由来間葉系幹細胞を低結晶性炭酸アパタイト顆粒に播種してヌードマウス背部皮下への移植を行い、病理組織学的に評価する。

BMP-2 と複合化させた炭酸アパタイト顆粒の移植実験

BMP-2 と複合化させた炭酸アパタイト顆粒をラット背部皮下に埋植し、病理組織学的に評価する。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞の特性

歯の再生医療の細胞源として用いる iPS 細胞の培養系を確立し、その特性について検討を行った。iPS 細胞の培養系の確立：理化学研究所から購入したヒト iPS 細胞(HPS0002)を実験に用いた。マイトマイシン C 処理したマウス胎仔線維芽細胞をフィーダー細胞として iPS 細胞を培養して継代した後、凍結保存を行った。さらに、維持培養、凍結、解凍を繰り返し行った iPS 細胞について、免疫染色とアルカリフォスファターゼ染色を行って多能性を維持していることを確認した。

(2) 不死化歯原性細胞株との共培養による iPS 細胞の歯原性細胞への分化誘導

iPS 細胞を申請者が樹立した不死化歯原性細胞株(エナメル芽細胞株、象牙芽細胞株)と共培養して、エナメル芽細胞に特異的な遺伝子および象牙芽細胞に特異的な遺伝子の発現を RT-PCR 法で検討したが、エナメル芽細胞および象牙芽細胞への分化を示す遺伝子の発現上昇は認めなかった。

(3) 基底膜成分、エナメル蛋白、分化増殖因子による iPS 細胞の歯原性細胞への分化誘導

iPS 細胞を、マトリゲル®あるいはラミニン、型コラーゲンで表面処理した培養皿上で培養して、エナメル芽細胞に特異的な遺伝子および象牙芽細胞に特異的な遺伝子の発現を RT-PCR 法で検討したが、エナメル芽細胞および象牙芽細胞への分化を示す遺伝子の発現上昇は認めなかった。

(4) iPS 細胞の間葉系幹細胞への分化誘導

iPS 細胞から直接歯原性細胞へ分化誘導することができなかったため、iPS 細胞を一度間葉系幹細胞へ分化誘導することを試みた。ES 細胞からの間葉系幹細胞の分化誘導法を参考にして、iPS 細胞からの間葉系幹細胞への分化誘導を行った。コンフルエントに達した iPS 細胞をペトリディッシュ上に播種し、形成された胚様体を細胞培養用ディッシュに移してレチノイン酸を加えた DMEM-10% FCS で培養した 8 日後に、全細胞を回収し、ゼラチンコートした細胞培養用ディッシュで 1 時間培養し、接着細胞を血清低減培養液に bFGF を加えた間葉系間細胞用培地で継代培養し、iPS 細胞由来の間葉系幹細胞を得た。得られた iPS 細胞由来間葉系幹細胞の骨、軟骨、脂肪への分化能を確認したが、分化効率に問題があったため、現在、CXCR4 をマーカーとして、iPS 細胞由来間葉系幹細胞をさらに純化している。

(5) 歯再生用の scaffold の開発

炭酸アパタイトの生体内での反応

炭酸アパタイト顆粒をラット背部皮下に埋植し、2、4、8、12、28 週後に試料を摘出した。摘出物のマイクロ CT から炭酸アパタイトの顆粒径を測定したところ、顆粒径は経時的に小さくなった。さらに、脱灰切片の TRAP 染色では顆粒周囲に陽性細胞が多数みられたことから、生体内で吸収されたことが明らかとなった。

炭酸アパタイトの再生医療のスクAFFォールドとしての有用性の検証

iPS 細胞由来間葉系幹細胞の歯原性細胞への分化誘導が困難であったため、iPS 細胞由来間葉系幹細胞を低結晶性炭酸アパタイト顆粒に播種してヌードマウス背部皮下への移植を行い、再生医療のスクAFFォールドとしての有用性を組織学的に評価した。背部皮下での異所性骨形成は観察できなかったが、顆粒表面には iPS 細胞由来間葉系幹細胞と考えられる細胞が接着していることが確認できた。

BMP-2 と複合化させた炭酸アパタイト顆

粒の移植実験

BMP-2 と複合化させた炭酸アパタイト顆粒をラット背部皮下に埋植し、2、4、8、12、28 週後に試料を摘出した。HE 染色による組織学的評価では、異所性の硬組織形成が BMP 50µg と複合化した炭酸アパタイトを埋植したラットでアパタイト顆粒を取り囲むようにみられた。Osterix と Runx2 の免疫染色の結果では、埋植後 2～4 週で炭酸アパタイト顆粒の周囲に多数の発現細胞を認めた。Osterix 発現細胞は、28 週まで顆粒周囲や新生骨周囲に存在したが、Runx2 発現細胞は 8 週以降は減少したことから、異所性の骨形成は 4～8 週までに活発に行われていると考えられた。

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 1 件)

1. Effects of low crystalline carbonate apatite on proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow cells. Hirokazu Nagai, Masako Kobayashi-Fujioka, Kenji Fujisawa, Go Ohe, Natsumi Takamaru, Kanae Hara, Daisuke Uchida, Tetsuya Tamatani, Kunio Ishikawa, Youji Miyamoto. J Mater Sci Mater Med., 26(2), 99, 2015. 査読あり。

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 炭酸アパタイト被覆炭酸カルシウムを用いたハイブリッド型骨補填材料による骨再生の試み 小林真左子 永井宏和、藤澤健司、都留寛治、石川邦夫、山中克之、熊谷知弘、宮本洋二。第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 2014 年 11 月 17 日、タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)
2. 炭酸アパタイト被膜炭酸カルシウムを用いた新規骨置換材料による骨再生の試み 小林真左子 永井宏和、原 香苗、鎌田久美子、工藤隆治、藤澤健司、宮本洋二。第 59 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会 2014 年 10 月 18 日、幕張メッセ (千葉県・千葉市)
3. Application of Low Crystalline Carbonate Apatite Combined With BMP-2 to Bone Reconstruction. Hirokazu Nagai, Kanae Hara, Masako Kobayashi, Go Ohe, Tetsuya Tamatani, Kenji Fujisawa, Youji Miyamoto., American association of Oral Maxillofacial Surgeons (aaoms) 96th Annual Meeting, scientific Sessions & Exhibition, September 11, 2014, Hawaii Convention center,

Hilton Hawaiian Village, Hawaii (USA).

4. Nobel Bone Regeneration System Using Carbonate Apatite-coated Carbonate Calcium in Vivo. Masako Kobayashi, Hirokazu Nagai, Kanae Hara, Kenji Fujisawa, Daisuke Uchida, Tetsuya Tamatani, Youji Miyamoto., American association of Oral Maxillofacial Surgeons (aaoms) 96th Annual Meeting, scientific Sessions & Exhibition., September 11, 2014, Hawaii Convention center, Hilton Hawaiian Village, Hawaii (USA).
5. 低結晶性炭酸アパタイトの顎骨再建への応用に関する基礎的研究 第 6 報 BMP-2 との併用効果。永井宏和、原香苗、小林真左子、藤澤健司、都留寛治、山本克史、石川邦夫、宮本洋二。第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 2013 年 11 月 25 日、タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)。
6. BMP2 の骨誘導に対する FGF ファミリーの併用効果。小林真左子、宮本洋二、井関祥子。第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2013 年 5 月 24 日、栃木県総合文化センター (栃木県・宇都宮市)。
7. ゼラチン複合型炭酸アパタイトフォームの創製。原 香苗、永井宏和、都留寛治、石川邦夫、宮本洋二。第 34 回日本バイオマテリアル学会大会 2012 年 11 月 26 日～27 日、仙台国際センター (宮城県・仙台市)
8. 新規徐放性ナノゲルを用いた FGF18 による BMP2 依存的な骨修復能の改良。小林真左子、宮本洋二、井関祥子。第 57 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会、2012 年 10 月 21 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

〔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

永井 宏和 (NAGAI, Hirokazu)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授
研究者番号：50282190

(2)研究分担者

宮本 洋二 (MIYAMOTO, Youji)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：20200214

玉谷 哲也 (TAMATANI, Tetsuya)
徳島大学・病院・講師
研究者番号：30274236

内田 大亮 (UCHIDA, Daisuke)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20335798

大江 剛 (OHE, Go)
徳島大学・大学病院・助教
研究者番号：60432762

(3)連携研究者 なし