

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293395

研究課題名(和文) 小分子化合物を利用したiPS細胞の腫瘍化抑制技術による歯槽骨増生法の確立

研究課題名(英文) Establishment of iPS cell-based bone tissue engineering using small molecule compounds

研究代表者

江草 宏 (Egusa, Hiroshi)

東北大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30379078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：現在の歯科治療において、骨誘導能をもたない既存の骨補填材を用いた骨再生あるいは骨造成には技術的な困難が伴う。近年、iPS細胞等を用いた骨増生技術の確立に期待が寄せられているが、iPS細胞から確実に骨芽細胞へ分化誘導し、移植先で腫瘍を形成させない技術が求められている。本研究で我々は、iPS細胞の骨芽細胞分化を促進し、腫瘍形成を抑制するいくつかの小分子化合物を見出した。また、スタチン系薬剤を用いることで、iPS細胞による腫瘍形成を抑制しながら効果的な骨再生が得られる可能性が示唆された。本研究結果が、iPS細胞を用いた新たな骨増生技術の確立へと発展していくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Bone regeneration and augmentation in dental treatments cannot be easily accomplished because conventional bone grafting materials are not osteoinductive. Induced pluripotent stem cells (iPS cells) are expected to be useful for alveolar bone augmentation/regeneration; however, their clinical application will require complete differentiation toward an osteogenic cell fate to avoid tumor formation. In this research project, we found several small molecule compounds, which enhance osteogenic differentiation of iPS cells, and that application of statins to iPS cell constructs enables efficient bone augmentation and suppresses tumor formation in an animal model. These findings represent an important step toward the therapeutic application of iPS cells to bone tissue engineering in dentistry.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：再生歯学 骨再生 iPS細胞 小分子化合物

### 1. 研究開始当初の背景

補綴歯科治療において、広範な歯槽骨の欠損を補うためには、従来の歯科補綴学的手法に加え、骨誘導能をもつ細胞の移植を基盤とした新たな治療法を開発することが望まれる。

iPS 細胞を用いた歯槽骨増生技術の安全性を担保するためには、多分化能を有する iPS 細胞を移植した先で腫瘍化させることなく、骨組織へ確実に分化誘導する技術の確立が重要な課題である。この問題を解決するために、iPS 細胞の腫瘍形成マーカーを指標に FACS で細胞ソーティングする方法等が提案されているが、この技術には細胞数の確保が困難であることやコンタミネーションの危険性を伴うという欠点がある。

本研究において申請者は、小分子化合物の多機能性に着目し、骨芽細胞分化誘導促進作用および抗腫瘍作用を併せ持つ化合物を見出し、これを利用した iPS 細胞の腫瘍化を抑制した骨再生技術を着想した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ケミカルバイオロジーのアプローチによって、iPS 細胞の腫瘍化抑制作用および骨芽細胞分化促進作用を併せ持つ化合物を同定し、その作用機序を解析することで、化合物を利用した簡便かつ確実な iPS 細胞の腫瘍化抑制技術による歯槽骨増生技術の研究基盤を確立することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 骨芽細胞分化を指標とした化合物のスクリーニング

分子標的が既知のライブラリーである LOPAC (1,280 種化合物; Sigma 社) および既知の骨芽細胞分化誘導促進化合物に対して I 型コラーゲンレポーター骨芽細胞を用いた一次スクリーニングを行った。一次スクリーニングで得た候補化合物を対象に、iPS 細胞の骨芽細胞分化を指標とした二次スクリーニングを行った。

#### (2) シンバスタチンが iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響

シンバスタチンの骨芽細胞分化促進作用を、マウス歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞 (mGF-iPS 細胞) を用いて確認した。骨芽細胞への分化は、骨芽細胞特異的遺伝子の発現を対象にした Real time RT-PCR 解析および石灰化基質形成を検出するアリザリンレッド染色を用いて評価した。

#### (3) シンバスタチンが未分化 iPS 細胞に及ぼす影響

シンバスタチンが骨芽細胞分化誘導培地中の未分化 mGF-iPS 細胞の細胞数に及ぼす影響を、iPS 細胞未分化マーカーの抗体を用いてフローサイトメトリーにて解析後、未分化マーカー陰性の細胞

をソーティングし、Real time RT-PCR 法を用いて骨芽細胞特異的遺伝子発現を評価した。

また、シンバスタチンが未分化 mGF-iPS 細胞のアポトーシスに及ぼす影響を、アポトーシスマーカーを用いて、フローサイトメトリーにて検出した。

#### (4) シンバスタチンの腫瘍抑制作用の検討

温度応答性ゲルを用いて、mGF-iPS 細胞の三次元細胞凝集体の作製を試みた。この技術を基盤に、シンバスタチン添加骨芽細胞分化誘導培地にて分化誘導後、mGF-iPS 細胞の三次元細胞凝集体を免疫不全マウス背皮下に移植した。飼育 28 日後の腫瘍抑制能および異所性の骨形成能をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色により組織学的に評価した。

#### (5) シンバスタチンを用いた iPS 細胞凝集体による骨誘導能の検討

mGF-iPS 細胞または GFP 恒常発現マウス iPS 細胞 (mGFP-iPS 細胞) から作製した三次元細胞凝集体を、シンバスタチン含有骨芽細胞分化誘導培地にて分化誘導後、免疫不全ラット頭蓋骨に作製した直径 5 mm の骨欠損部に移植した。術後 28 日後の移植部位の組織から作製した切片を、HE 染色および骨細胞マーカーの免疫蛍光染色にて組織学的に評価した。また、移植部位の頭蓋骨を実験動物用マイクロ CT で撮影し、撮影画像から欠損部に再生した骨組織の骨密度を計測した。

### 4. 研究成果

#### (1) iPS 細胞の骨芽細胞分化を促進する化合物の同定

二次スクリーニングの結果、スタチン系薬剤が、mGF-iPS 細胞の骨芽細胞分化を促進する化合物としてヒットした。

#### (2) シンバスタチンが iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響

シンバスタチンは、mGF-iPS 細胞の骨芽細胞特異的遺伝子の発現および細胞外基質の石灰化を濃度依存的に有意に促進した。

#### (3) シンバスタチンが未分化 iPS 細胞に及ぼす影響

骨芽細胞への分化誘導過程で、シンバスタチンは、iPS 細胞未分化マーカー陽性を示す未分化 iPS 細胞の細胞数を濃度依存的に減少させる一方で、未分化マーカー陰性を示す細胞における骨芽細胞特異的遺伝子の発現を有意に促進した。また、シンバスタチンは、未分化マーカー陽性細胞のアポトーシスマーカーの活性を増強し、アポトーシス細胞の割合を有意に増加させた。

#### (4) シンバスタチンの腫瘍抑制作用の検討

温度応答性ゲルを用いて骨芽細胞に分化誘導した mGF-iPS 細胞の三次元細胞

凝集体の作製を試みた結果、層状の構造を有する三次元的な石灰化細胞構造体を作製することが可能であった。

また、シンバスタチンを用いて作製した mGF-iPS 細胞凝集体の移植部位には、マウス背皮下において腫瘍形成を認めず、移植体の周囲には骨様組織の形成を認めた。

(5) シンバスタチンを用いた iPS 細胞凝集体による骨誘導能の検討

ラット頭蓋骨欠損モデルにおいて、シンバスタチンを用いて作製した mGF-iPS 細胞凝集体を移植した結果、移植後に腫瘍形成は認めず、皮質骨と同等の骨密度を有する骨組織の再生を認めた。また、シンバスタチンを用いて作製した mGFP-iPS 細胞凝集体を移植した部位に形成された皮質骨中には、GFP 陽性と骨細胞マーカー陽性を示す骨細胞の存在を認めた。

以上の結果より、シンバスタチンはマウス iPS 細胞の骨芽細胞分化誘導過程で、骨芽細胞への分化を促進するとともに未分化な iPS 細胞をアポトーシスに誘導する可能性が示唆された。また、シンバスタチンを用いて作製した iPS 細胞凝集体は、移植先における腫瘍形成を抑制しながら骨欠損部の再生を可能にすることが示唆された。

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 9 件)

Okawa H, Kayashima H, Sasaki JI, Miura J, Kamano Y, Kosaka Y, Imazato S, Yatani H, Matsumoto T, Egusa H: Scaffold-free fabrication of osteoinductive cellular constructs using mouse gingiva-derived induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Int*, Article ID 6240794, 2016. (査読有) doi.org/10.1155/2016/6240794

Matsumoto T, Egusa H, Kato K, Tsuji T: Biodental engineering. *J Oral Biosci*, 57(2): 80-85, 2015. (査読有) doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2015.01.002

Egusa H: Increasing diversity in prosthodontic research. *J Prosthodont Res*, 58(4): 191-192, 2014. (査読有) doi: 10.1016/j.jpor.2014.08.002

Egusa H, Kayashima H, Miura J, Uraguchi S, Wang F, Okawa H, Sasaki J-I, Saeki M, Matsumoto T, Yatani H: Comparative analysis of mouse induced pluripotent stem cells and mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation in vitro.

*Stem Cells Dev*, 23(18): 2156-2169, 2014. (査読有)

doi:10.1089/scd.2013.0344

江草 宏, 于 冠男, 鎌野優弥, 大川博子, 山本治毅, 矢谷博文: 歯肉を用いた医療応用に安全な iPS 細胞の開発 新たな再生歯科医療技術の創成に向けて. *日歯医学会誌*: 33: 54-58: 2014. (査読無)

http://www.jads.jp/jjads\_j/jjads\_j\_33.pdf

江草 宏: iPS 細胞の骨生物学への応用と歯科臨床への展望. *医学生物学電子顕微鏡技術学会誌*: 27(2), 67-69, 2013. (査読無) DOI コード・URL なし

Arakaki M, Egusa H, Otsu K, Saito I, Miura T, Harada H: Frontier dental research on iPS cells. *J Oral Biosci*, 55(4): 191-199, 2013. (査読有)

http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2013.08.002

[学会発表](計 33 件)

江草 宏: iPS 細胞を用いた骨再生医療戦略, 第 70 回 東京工業大学精密工学研究所シンポジウム シンポジウム「精密工学の新展開 - 医歯工連携から社会実装へ - 」, 2016 年 3 月 11 日 (横浜市).

江草 宏: iPS cell-based strategies in bone tissue engineering, The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science 国際シンポジウム “Regenerative Oral Science”, 2016 年 1 月 19 日 (仙台市)

江草 宏: iPS cells: What they are and what they can contribute to the field of dentistry, Chulalongkorn-Tohoku Joint Symposium in Dental Science 2015, 2015 年 12 月 9 日 (Bangkok, Thailand).

江草 宏: iPS cells and their expected role in the future of dentistry, The 3rd Sino-Japan Dental Science Symposium, 2015 年 11 月 24 日 (Fujian, 中国).

江草 宏: iPS 細胞技術が描く歯科医療の未来, 平成 27 年度 日本補綴歯科学会東北・北海道支部学術大会 特別講演, 2015 年 10 月 25 日 (盛岡市).

江草 宏: iPS cells: What they are and what they can contribute to the field of dentistry, Hong Kong University - Tohoku University 1st Bilateral Dental Symposium, 2015 年 10 月 16 日 (香港, 中国).

江草 宏: iPS 細胞を用いた骨再生研究とインプラント臨床への展望, 第 45 回 日本口腔インプラント学会学術大会シンポジウム「口腔インプラント治療や歯科治療は、生物学の進歩によってどう変わるか」, 2015 年 9 月 22 日 (岡山市)

大川博子, 萱島浩輝, 佐々木淳一, 矢谷博文, 江草 宏: iPS 細胞を用いたスキャフォールドフリー骨増生技術の開発, 日本口腔インプラント学会, 2015 年 9 月 22 日(岡山市).

江草 宏: iPS cells and their expected role in the future of prosthodontics, 16th Biennial Meeting of International College of Prosthodontists, 2015 年 9 月 18 日 (Seoul, 韓国).

大川博子, 河阪幸宏, 新部邦透, 矢谷博文, 江草 宏: シンバスタチンを用いた iPS 細胞凝集体による骨誘導能, 歯科基礎医学会, 2015 年 9 月 12 日(新潟市).

江草 宏: iPS 細胞が可能にする歯科医療とは, 日本臨床歯周病学会第 33 回年次大会 教育講演, 2015 年 7 月 18 日(仙台市).

江草 宏: iPS cells: What they are and what they can contribute to the field of dentistry, Sichuan-Tohoku Dental Symposium 2015, 2015 年 7 月 10 日 (Sichuan, 中国).

江草 宏: iPS 細胞を用いた骨組織再生, 日本組織培養学会第 88 回大会 シンポジウム「臨床のため細胞培養」, 2015 年 5 月 27 日(広島市).

江草 宏: 歯科領域における再生医療の動向と展望, 第 69 回 日本口腔科学会学術集会 教育研修会講演 シンポジウム「再生医療の最前線」, 2015 年 5 月 13 日(大阪府).

江草 宏: iPS cells: What they are and what they can contribute to prosthodontics, 2015 Biennial Joint Congress of JPS-CPS-KAP 国際シンポジウム “The Latest Progress of Dental Science”, 2015 年 4 月 11 日(箱根).

江草 宏: Application of iPS Cells in Bone Biology, China-Japan-Korea Dental Science Symposium 2014 国際シンポジウム “Biologic Contribution in The Prosthodontic Research”, 2014 年 11 月 8 日(Dalian, 中国).

江草 宏: iPS 細胞が可能にする歯科医療とは, 第 73 回 日本矯正歯科学会学術大会 特別講演, 2014 年 10 月 21 日(千葉市).

大川博子, 萱島浩輝, 矢谷博文, 江草 宏: スタチン化合物が iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響, 日本補綴歯科学会 中国・四国・関西支部合同支部学術大会, 2014 年 9 月 6 日(倉敷市).

江草 宏: iPS 細胞の骨生物学への応用と歯科臨床への展望, 平成 26 年度 日本歯科理工学会 北海道・東北地方会夏季セミナー 特別講演, 2014 年 8 月 2 日(仙台市).

Okawa H, Kayashima H, Yamamoto H,

Yatani H, Egusa H: Vertical bone augmentation using iPS cell constructs with simvastatin, 92th IADR General Session, 2014 年 6 月 27 日(Cape Town, South Africa).

⑳ 江草 宏: iPS 細胞が可能にする歯科医療とは, 第 65 回 東北大学歯学会 特別講演, 2014 年 6 月 13 日(仙台市).

㉑ 江草 宏: iPS 細胞が可能にする歯科医療とは, 昭和大学 学士会後援セミナー, 2014 年 5 月 19 日(東京).

㉒ 江草 宏: iPS 細胞の骨形成能と歯科臨床への展望, 第 68 回 日本口腔科学会学術集会 シンポジウム「iPS 細胞が拓く未来の医療」, 2014 年 5 月 9 日(東京都).

㉓ 江草 宏: iPS 細胞が可能にする歯科医療とは, 第 47 回 新潟歯学会総会 特別講演, 2014 年 4 月 19 日(新潟市).

㉔ 江草 宏: Application of iPS Cells in Bone Biology, Kyudai Oral Bioscience 2014 国際シンポジウム “Oral Stem Cells”, 2014 年 2 月 28 日(福岡市).

㉕ 江草 宏: iPS Cells in Regenerative Dental Medicine, The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science 国際シンポジウム “Cell Manipulation and Tissue Regeneration”, 2014 年 1 月 21 日(仙台市).

㉖ 江草 宏: Stem Cells in Regenerative Dental Medicine, 2013 Thailand International Conference on Oral Biology 国際シンポジウム “Stem Cells and Tissue Engineering”, 2013 年 11 月 28 日(Bangkok, Thailand).

㉗ 江草 宏: iPS 細胞が可能にする歯科医療とは, 平成 25 年度 日本補綴歯科学会 関西支部学術大会 生涯学習公開セミナー「歯科におけるバイオサイエンスの基礎と応用」, 2013 年 11 月 24 日(大阪市).

㉘ 江草 宏: 歯肉から作る iPS 細胞が可能にする歯科医療とは, 第 25 回 日本小児口腔外科学会学術大会 シンポジウム「小児口腔外科と再生医療」, 2013 年 11 月 2 日(東京都).

㉙ 大川博子, 江草 宏, 矢谷博文: Simvastatin がマウス歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響, 第 55 回 歯科基礎医学会学術大会, 2013 年 9 月 22 日(岡山市).

㉚ 江草 宏: iPS 細胞を用いたスキャフォールドフリー骨組織再生, 第 55 回 歯科基礎医学会学術大会 シンポジウム「Biodental Engineering ~ バイオ研究と材料科学の融合 ~」, 2013 年 9 月 22 日(岡山市).

㉛ 江草 宏: iPS 細胞の骨生物学への応用と歯科臨床への展望, 第 29 回 医学生物学電子顕微鏡技術学会 特別講演, 2013

年6月9日(横須賀市).

- ③③ 江草 宏: iPS細胞の骨形成能と歯科臨床への展望, 第67回日本口腔科学会学術集会 シンポジウム「歯周組織における再生医療」, 2013年5月23日(宇都宮市).

〔図書〕(計 3件)

江草 宏: 末永書店, 再生医療の固定性補綴治療への展開(冠橋義歯補綴学テキスト), 2015, 280(213-219).

江草 宏: 医歯薬出版, 幹細胞と再生歯科医療(口腔組織学・発生学 第2版), 2015, 384(125-130).

Yu G, Kamano Y, Wang F, Okawa H, Yatani H, Egusa H: Springer, Feeder cell sources and feeder-free methods for human iPS cell culture(Interface Oral health Science 2014), 2015, 351(145-159).

〔その他〕

学術賞受賞

大川博子: 優秀ポスター賞(デンツプライ賞), 日本口腔インプラント学会・学術学会(演題: iPS細胞を用いたスキャフォールドフリー骨増生技術の開発), 2015年9月22日.

大川博子: Finalist, IADR Arthur R. Frechette 若手歯科補綴学研究者賞(演題: Vertical bone augmentation using iPS cell constructs with simvastatin), 2014年6月27日.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

江草 宏 (EGUSA, Hiroshi)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 30379078

(2)研究分担者

矢谷 博文 (YATANI Hirofumi)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 80174530

(平成26年度より連携研究者)

(3)連携研究者

松本 卓也 (MATSUMOTO Takuya)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 40324793

佐伯 万騎男 (SAEKI Makio)

新潟大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 30273692