

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462976

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を応用した新たな直接覆髄法の開発

研究課題名(英文) Development of a new direct pulp capping method with human iPS cells

## 研究代表者

樋口 直也 (HIGUCHI, Naoya)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：10329609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞を用いた象牙芽細胞様細胞への分化誘導における至適因子について、スキャホールドとして、ゼラチン、ラミニン、コラーゲンタイプⅠ、コラーゲンタイプⅡ、フィブロネクチンを用い、分化誘導因子として、BMP-2、-4、-7を使用し、比較検討した。その結果、スキャホールドとして10%ゼラチンを、誘導因子としてBMP-4を用いることが至適であることが明示された。

ヒト歯肉線維芽細胞のiPS細胞への初期化については、セルライン化された歯肉線維芽細胞にエピソーマルベクターをエレクトロポレーションで導入した。現在、初期化の成否を、qPCR法を用いて導入遺伝子の発現で確認中である。

研究成果の概要(英文)：We considered which ECM component (i.e., Collagen type I, gelatin, fibronectin, collagen type II) combined with each inducer (bone morphogenetic protein (BMP)-2, -4, -7) was the most suitable to support the proliferation of human induced pluripotent stem (iPS) cell lines and their differentiation into odontoblast-like cells. The results showed us that 10% gelatin combined with BMP-4 was most suitable.

On the other hand, we tried to generate iPS cells with three episomal plasmid vectors (including four factors) for reprogramming human gingival fibroblasts. They were transfected with electroporation and have been confirmed by the expression of reprogramming genes by qPCR.

研究分野：医歯薬学 歯学 保存治療系歯学

キーワード：ヒトiPS細胞 ヒト歯肉線維芽細胞 象牙芽細胞 直接覆髄

### 1. 研究開始当初の背景

象牙芽細胞は直接覆髄処置後に露髄面に誘導され存在することが望まれる細胞であるが、現在最も用いられている直接覆髄剤である水酸化カルシウムは、接触した表層の歯髄をその高い pH により壊死させ、歯髄の治癒機構から象牙芽細胞を誘導する。また、その成功率は必ずしも高いものではなく<sup>1)</sup>、成功率や組織親和性を考慮すると必ずしも望まれる薬剤ではない。

近年、人工多能性幹細胞(iPS 細胞)からさまざまな組織の細胞へ、およびその逆の分化誘導法が確立されつつある<sup>2)3)</sup>。また、iPS 細胞への誘導方法についても、1) 癌化に関与すると言われる c-Myc 遺伝子の代わりに L-Myc 遺伝子を用いる報告<sup>4)</sup>など、導入遺伝子を変更したり、2) 以前からベクターとして用いられていたレトロウィルスを、アデノウィルス、センダイウィルスなどの別ウィルスに変更したり<sup>5)6)</sup>、3)ベクターをウィルスからプラスミドに変更したり<sup>7)</sup>とさまざまな改良が報告されており、癌化や奇形腫(テラトーマ)の出現回避のための研究が世界的に急速に進められ、iPS 細胞から様々な体細胞、各体細胞から iPS 細胞へのより安全な誘導のメカニズムが徐々に解明、開発されつつある。

しかし、象牙質再生のメカニズムに着目した研究は国内外で少なく、その詳細は不明であり、組織発生および再生医療に関する歯科医学研究は大きく立ち遅れているのが現状である。各幹細胞から象牙芽細胞様細胞への分化誘導についても、いまだ確立されておらず、現在さまざまな方法で検討されている(現在では、研究分担者である尾関らが、マウス iPS 細胞、マウス ES 細胞およびヒト骨格筋幹細胞からマウス象牙芽細胞様細胞への分化誘導法を確立している)。また、歯肉線維芽細胞から iPS 細胞への初期化については、1 編の報告<sup>8)</sup>はされているものの、癌化(白血病)を誘発する可能性を含むレトロウ

ィルスを使用しており、その安全性に疑問が残る報告である。さらに、臨床応用の実現性が高いと考えられる方法である、ヒト歯肉線維芽細胞からヒト iPS 細胞へ誘導し、ヒト象牙芽細胞様細胞へと分化させるという一連の流れに沿った報告はされていない。

本研究で基本的な知見を得て、生体親和性の高い新たな直接覆髄処置の開発を含めて、臨床応用の可能性を検討する。

### 2. 研究の目的

本研究は、人工多能性幹細胞(iPS 細胞)の作製技術を応用し、ヒト歯肉線維芽細胞から、歯髄内に存在する象牙芽細胞様細胞を分化誘導し、生化学的手法を用いて、基礎的知見を得る。それにより、侵襲性の高い既存の直接覆髄処置に代わる、組織再生を利用した新たな、非侵襲性の歯髄保護方法の開発を含めて、その臨床応用を検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞からヒト象牙芽細胞様細胞への分化誘導法の確立と確認

理化学研究所から入手可能であるヒト iPS 細胞に Hanging drop 法<sup>9)</sup>を施した後、レチノイン酸存在下で3日間、浮遊培養させ、神経堤細胞に誘導した。その後、Ozeki らの方法<sup>10)</sup>に従い、細胞外マトリックス(コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン)上に細胞を播種し、BMP-2、4、7 存在下で7日間培養を行い、象牙芽細胞への分化誘導を行った。その際、細胞外マトリックスの種類や BMP の種類、濃度、作用時間などの至適条件を検討した(図1)。

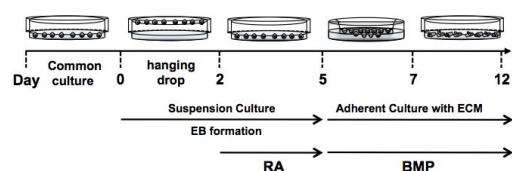


図1 iPS 細胞の象牙芽細胞への分化誘導法

BMP 添加後、1、3、5、7 日目での各細胞の形態学的変化を光学顕微鏡下で観察した。また、BMP 添加 7 日後、total RNA を RNeasy (QIAGEN) により抽出し、象牙芽細胞分化マーカーである DSPP (象牙質シアロリン蛋白質) と Enamelysin、神経堤細胞分化マーカーである FoxD3、Sox10 の遺伝子発現を Real time-PCR 法を用いて観察した。また、象牙芽細胞分化マーカーである DSP (象牙質シアロ蛋白質) の発現を免疫染色法により観察した。さらに石灰化能を ALP 染色とアリザリンレッド染色により観察した。

#### (2) ヒト歯肉線維芽細胞からヒト iPS 細胞への初期化と確認

被験者の歯周外科中に得られる健全歯肉からの歯肉線維芽細胞を用いる前に、セルライン化されたヒト歯肉線維芽細胞を用いて、初期化条件を検討した。Okita ら<sup>7)</sup>の方法に従い、100mm ディッシュにコンフルエントになった歯肉線維芽細胞を PBS (Gibco) で洗浄後、0.25%トリプシン/1mM EDTA (Invitrogen) で、37、3 分間インキュベートし、遠心にて回収した。細胞数は  $6 \times 10^5$  の 5 乗に調整した。Addgene より入手した 3 種類のエピソーマルベクター (pCXLE-hOCT3/4-SHP53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL) を大腸菌から QIAprep (QIAGEN) を用いて抽出した。抽出したエピソーマルベクターの確認は、pCXLE-hOCT3/4-SHP53-F と pCXLE-hSK については、制限酵素である EcoR と Bgl、pCXLE-hUL については Nhe と Sac を用い、ダブルダイジェスト後の電気泳動にて行った。その後、一度の導入に使用する量、つまり各 1  $\mu\text{g}$  (計 3  $\mu\text{g}$ ) に調整した。プラスミドベクターを 1650V、10ms、3pulse の条件下でエレクトロポレーションにより、歯肉線維芽細胞に導入した。翌日、培地を交換し、以降 2 日間に一度、培地の交換を行った。7 日後にフィーダー細胞 (MEF) 上に継代し、8

日後に培地を iPS 細胞用に変更後、iPS 細胞の単離を試みた。初期化の成否については、qPCR 法を用いて、OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC の遺伝子発現で確認した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト iPS 細胞からヒト象牙芽細胞様細胞への分化誘導法の確立と確認

スキャホールドとしては、10%ゼラチンにおいて、統計学的に有意に高い細胞増殖能が認められた (表 1)。

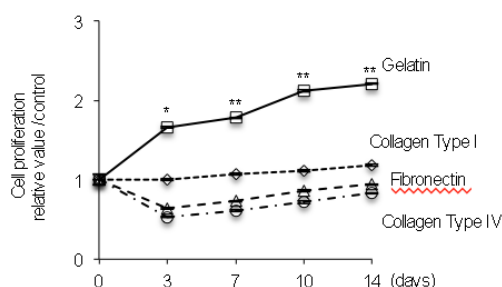


表 1 至適スキャホールドの検討

また、分化誘導因子として、BMP-4 添加群において、統計学的に有意な象牙芽細胞分化マーカー (DSPP, MMP-20, DMP-1) の発現が認められた (表 2)。

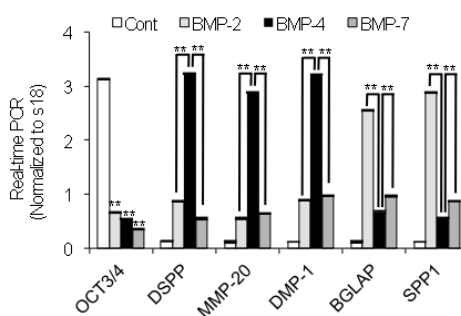


表 2 至適分化誘導因子の検討

今回の至適スキャホールドの研究結果は、研究分担者である尾関らが報告している、ヒト骨格筋幹細胞を象牙芽細胞様細胞に分化誘導させる際の至適スキャホールド<sup>11)</sup>と一致していたものの、マウス iPS 細胞を象牙芽細胞

胞様細胞に分化誘導させる際<sup>10)</sup>とは異なっていた。今後、分化誘導後の象牙芽細胞様細胞の表面性状など、さらに詳細な解析が必要であると思われる。

(2) ヒト歯肉線維芽細胞からヒト iPS 細胞への初期化と確認

当初予定していたウイルスベクターによる遺伝子導入を、将来の臨床導入を考慮し、より安全で、現実性のあるエピソーマルベクターを利用する方法に変更した。抽出したベクターを制限酵素で切断し、確認した(図2)。

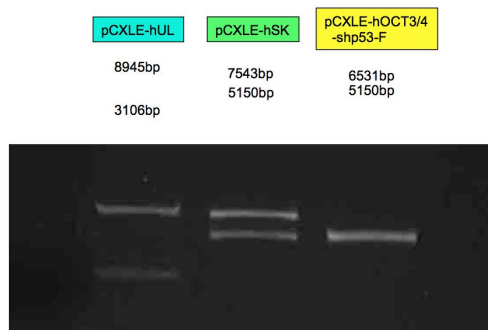


図2 プラスミドの確認

現在、ヒト歯肉線維芽細胞を iPS 細胞に初期化しているところであるが、今後、ヒト歯肉線維芽細胞から象牙芽細胞様細胞までの一連の分化誘導法が、セルライン化した歯肉線維芽細胞のみならず、患者から分離培養した野生株でも適応できることが求められる。そうすることで、将来的に、何らかの理由で失った象牙質部分に、不要な歯肉から作製した象牙芽細胞様細胞を安全に移植することができ、象牙質を形成させる治療、つまり、現在の直接覆髄法に代わる新たな治療方法の開発につながるため、今後もさらなる研究の継続が必要である。

#### <引用文献>

- 1) P. Aquilar et al., Journal of Endodontics 37(5), 581-587, 2011
- 2) H. Uosaki et al., PLoS ONE 7(10), 2012

- 3) A. Nsair et al., PLoS ONE 7(10), 2012
- 4) M. Nakagawa et al., Proc Natl Acad Sci USA 107(32) 14152-14157, 2010
- 5) M. Stadtfeld et al., Science 7 945-949, 2008
- 6) N. Fusaki et al., Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 85(8) 348-362, 2009
- 7) K. Okita et al., Science 7 949-953, 2008
- 8) M. Ohnuki et al., Current Protocols in Stem Cells Biology 4A.2.1-4A.2.25, 2009
- 9) J. Kawaguchi et al., Bone 36 758-769, 2005
- 10) N. Ozeki et al., PLoS One 8(11):e80026, doi 10.1371, 2013
- 11) N. Ozeki et al., J Biol Chem 289(20):14380-14391, 2014

#### 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 2 件)

Inamoto K, Sakuma S, Ariji Y, Higuchi N, Izumi M, Nakata K: Measurement of cerebral blood volume dynamics during volitional swallowing using functional near-infrared spectroscopy: An exploratory study. Neuroscience Letters 588: 67-71, 2015.  
DOI: 10.61016/J.neulet.2014.12.034

Moriguchi K, Hasegawa Y, Higuchi N, Murakami Y, Yoshimura F, Nakamura H, Nakata K, Ohno N: Light and electron Microscopic observation of the Oxygen free radical production site in human leukocytes during Tannerella forsythia phagocytosis. J. Electr. Microsc. Technol. Med. Boil 28(2): 81-82, 2015.

〔学会発表〕(計 2 件)

Inamoto K, Higuchi N, Sakuma S, Ariji Y, Nakata K: Prefrontal

cortical hemodynamic response associated with pain in the gingiva. International Association for Dental Research Australia and New Zealand Division Annual Scientific Meeting (New Zealand, Dunedin), 2015.8.25.

Sakuma S, Inamoto K, Higuchi N, Arijji Y, Adachi M, Harata R, Tuchiya A: Time-dependent changes in prefrontal cortex activity during tooth clenching. International Association for Dental Research Australia and New Zealand Division Annual Scientific Meeting (New Zealand, Dunedin), 2015.8.25.

〔図書〕(計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

樋口 直也 (HIGUCHI, Naoya)  
愛知学院大学・歯学部・講師  
研究者番号： 1 0 3 2 9 6 0 9

### (2)研究分担者

尾関 伸明 (OZEKI, Nobuaki)  
愛知学院大学・歯学部・講師  
研究者番号： 7 0 4 6 9 0 0 5

中村 洋 (NAKAMURA, Hiroshi)  
愛知学院大学・歯学部・名誉教授  
研究者番号： 4 0 0 6 4 8 7 8

### (3)連携研究者

なし