

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670811

研究課題名(和文) 歯肉線維芽細胞由来ヒトiPS細胞を用いた新たな歯根膜組織誘導ストラテジー

研究課題名(英文) The novel strategy to regenerate periodontal ligament tissue using 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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞を用いて歯根膜組織を再生する方法の確立を目的に、細胞分化方法および細胞移植の足場となるスキャフォールドの検討を行った。ヒト歯根膜細胞をハイブリッドスキャフォールドに浸透させ培養したところ、細胞は生着しており増殖および細胞外基質の沈着が認められた。また、iPS細胞を神経堤細胞に分化誘導後、TGF-beta刺激下にて歯根膜細胞と共培養したところ、歯根膜関連マーカーの発現が上昇した。さらに詳細な検討が必要であるが、iPS細胞をハイブリッドスキャフォールドをキャリアとして移植することで新たな歯根膜組織再生誘導法の開発に繋げていける可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish novel method to regenerate periodontal tissue by use of iPS cells. We examined the effects of new cell differentiation method and scaffold where cells attach and form tissue. When human periodontal ligament cells (HPDLCs) were cultured on the hybrid scaffolds, HPDLCs attached and proliferated well on the scaffold, and also formed extra cellular matrix tissue. In addition, co-culture of neural crest cells differentiated from iPS cells with HPDLCs in the presence of TGF-beta upregulated the expression of periodontal ligament-related markers, suggesting iPS cell differentiation into HPDLC-like cells. Although further studies are required, the combination of iPS cells induced to differentiate into neural crest-like cells and hybrid scaffold could be alternative cell source for novel cell transplantation method to regenerate periodontal ligament tissue.

研究分野：歯科保存学

キーワード：歯根膜組織 iPS細胞

### 1. 研究開始当初の背景

根破折歯の意図的再植法や重度歯周病の歯周組織再生誘導法は、歯根膜組織のダメージ範囲が大きい場合は、歯周組織の再生が困難であり治療が奏功しないケースが少なくない。近年、幹細胞移植による歯周組織再生法の確立が期待されており、我々はこれまでに間葉系幹細胞であるヒト歯根膜幹細胞が多分化能、歯根膜様組織再生能および免疫抑制能を有していることから歯周組織再生における移植細胞源として有用である可能性を示してきた (Fuji S. et al, *J Cell Physiol* 215:743-749,2008; Tomokiyo A, et al, *Differentiation* 76:337-347, 2008; Wada N. et al, *J Cell Physiol* 219: 667-676, 2009)。しかしながら、歯根膜幹細胞をはじめとする間葉系幹細胞の臨床応用を想定した場合、安定した品質を保持する幹細胞を効率よく獲得することが困難である場合がある。一方、我々は、豪州アデレード大学 Prof. Gronthos および Prof. Bartold の研究室にてヒト歯肉線維芽細胞ならびに歯根膜線維芽細胞由来の iPS 細胞を樹立している (Wada N, et al, *J Periodontal Res* 46:438-447, 2011)。iPS 細胞は間葉系幹細胞と比較して、分化能が高く安定した品質を維持でき、数も確保できるという利点があることから、近年、組織再生医療の新たな細胞源として大いに注目されている。そこで、iPS 細胞を用いて歯根膜組織を再生する方法が可能であるか否かを検討することを研究計画とした。

### 2. 研究の目的

本研究では、

- (1) iPS 細胞による新たな歯根膜組織誘導方法の確立
- (2) iPS 細胞移植の足場となるスキャフォールドの検討

を行い、より効率の高い iPS 細胞を用いた新たな歯科保存治療法を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞

ヒト歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞、ヒト歯根膜細胞由来 iPS 細胞 (Wada N, et al, *J Periodontal Res* 46:438-447, 2011) およびヒト皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞 (理化学研究所より購入) を用いて、実験を行った。また、ヒト抜去臼歯から獲得した歯根膜組織を酵素処理した後、培養皿に播種、培養し出現してきた細胞をヒト歯根膜細胞 (HPDLC) として実験に使い、ヒト歯根膜幹細胞クローンとして我々が既に樹立している 1-17 (Tomokiyo A, et al, *Differentiation* 76:337-347, 2008) を用いた。

#### (2) スキャフォールド

細胞の足場として collagen scaffold ならびにハイブリッドスキャフォールドである nano

beta-TCP collagen scaffold (Ibara A. et al, *J Nanomater* 2013:ID639502, 2013) を用いて、*in vitro* 実験を行った。

- ① 細胞接着性および増殖性の検討：スキャフォールドを HPDLC-3U 懸濁液中に浸漬させ 2 時間遠心培養し、細胞を浸透させた各スキャフォールドの細胞接着、細胞増殖および細胞分化への影響を検討する。解析方法として、切片にし、HE 染色や DAPI 染色を行い、接着細胞数の測定ならびに観察を行う。
- ② 組織形成能の検討：骨芽細胞分化誘導培地を用いて細胞培養し、切片作製後 HE 染色にて組織構造物の観察を行う。

### (3) iPS 細胞の細胞分化誘導

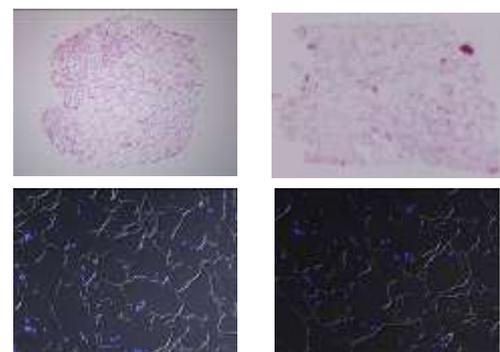
Lee らの方法 (Lee et al., *Nat Protoc* 5:688-701 2010) に基づいて、ヒト皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞の培地中に SB431542 および Noggin を添加し培養後、Nerobasal 培地に交換し、神経堤細胞様細胞への分化誘導を行った。

以上の方法で分化誘導を図った細胞を transwell を用いて、HPDLC-3U と 10 日間共培養を行った。また、同様に TGF-beta 刺激を行い共培養を行った。その後、total RNA を回収し、real-time PCR にて歯根膜細胞マーカーの発現を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 細胞移植の足場となるスキャフォールドの検討

Collagen scaffold ならびに nano beta-TCP collagen scaffold の細胞生着ならびに細胞増殖能を検討するために、各スキャフォールドに対して、HPDLC-3U を浸透させて、1, 3, 7 日後のスキャフォールド内の細胞の状態について解析した。その結果、いずれもスキャフォールドにおいて HPDLC-3U は生着しており、細胞増殖に関して増加傾向が認められた (図 1, 2)。また、両スキャフォールド間で比較すると、nano beta-TCP collagen scaffold における生着細胞数が collagen scaffold と比較して有意に多かった (図 2)。



Collagen scaffold

Nano beta-TCP collagen scaffold

図 1

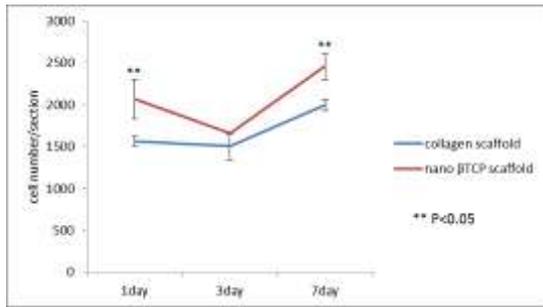


図 2

次に、nano beta-TCP collagen scaffold における組織形成能について検討するために、1-17 をスキャフォールドに浸透させ、骨芽細胞分化誘導培地において培養したところ、スキャフォールド内に細胞外基質が豊富に認められた (図 3)。

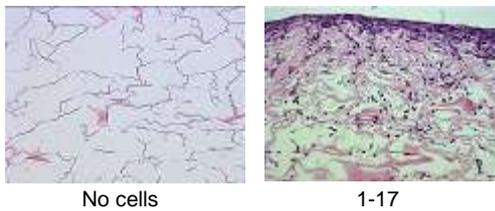


図 3

以上の結果より、コラーゲンを基盤としたスキャフォールドは組織再生を目的とした細胞移植において有効である可能性が示唆された。また、ナノサイズの beta-TCP を含有したコラーゲンスキャフォールドは細胞生着性に加えて組織誘導能も高いことから、より有望である可能性が示された。

#### (2) iPS 細胞を用いた歯根膜細胞様細胞誘導

本研究では、当初の計画に従い、ヒト歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞およびヒト歯根膜細胞由来 iPS 細胞を大量培養し、間葉系幹細胞へと分化させ、歯根膜組織再生のための移植細胞源としての有用性を検討することを目的としていたが、安定した細胞維持および分化のコントロールが困難であった。そこで、ヒト皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞を *in vitro* にて神経堤細胞様細胞に分化誘導し、これを用いて、歯根膜細胞分化誘導が可能であるかを検討した。

iPS 細胞を神経堤細胞様細胞まで分化させた後、transwell を用いて HPDLC-3U と共培養した結果、歯根膜細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼおよび periostin の発現が有意に上昇し、さらに TGF-beta 存在下で培養した群では periostin の発現がさらに増強される結果となった (図 4)。

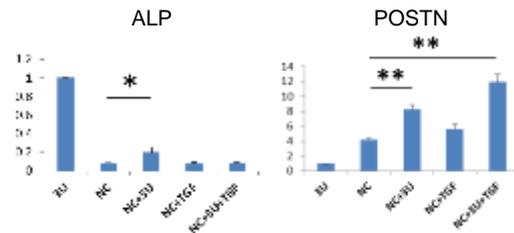


図 4

以上の結果から、iPS 細胞を神経堤細胞様細胞に分化誘導後、歯根膜細胞が分泌する液性因子と TGF-beta を組み合わせて刺激することで、歯根膜細胞の特徴を示す細胞に分化誘導できることが示唆された。

さらに *in vivo* 動物モデル等を用いた詳細な検討が必要であるが、本誘導法を用いて分化誘導を行った iPS 細胞とハイブリッドスキャフォールドをキャリアとして移植することで、新たな歯根膜組織再生法の確立に繋がっていきける可能性が示された。さらに発展させることで、より効率の高い iPS 細胞を用いた歯科保存治療法を提供できるものと考えられる。

#### 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 9 件)

- ① Hasegawa D, Wada N, Maeda H, Yoshida S, Mitarai H, Tomokiyo A, Monnouchi S, Hamano S, Yuda A, Akamine A. Wnt5a induces collagen production by human periodontal ligament cells through TGFβ1-mediated upregulation of Periostin expression. *J Cell Physiol*. 査読有 2015 Feb 5. [Epub ahead of print] doi: 10.1002/jcp.24950
- ② 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 osteoblastic/cementoblastic differentiation of human periodontal ligament stem/progenitor cells. *J Periodontal Res*. 査読有 50(2):231-239. 2014. doi: 10.1111/jre.12200
- ③ 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 66:62-71, 2014. doi: 10.1016/j.bone.2014.05.021

- ④ 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(1):150-159, 2014. doi: 10.1002/jcp.24693
- ⑤ 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(3):633-643, 2014. doi: 10.1007/s00441-014-1877-x
- ⑥ 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(3):707-718, 2014. doi: 10.1007/s00441-014-1918-5
- ⑦ 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 Cells Dev*. 査読有 23(18): 2225-2236, 2014. doi: 10.1124/mol.114.094979
- ⑧ 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(10):1249-1262, 2014. [http://www.hh.um.es/Abstracts/Vol\\_29/29\\_10/29\\_10\\_1249.htm](http://www.hh.um.es/Abstracts/Vol_29/29_10/29_10_1249.htm)
- ⑨ Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Monnouchi S, Akamine A. Prospective Potency of TGF-β1 on Maintenance and Regeneration of Periodontal Tissue. *Int Rev Cell Mol Biol*. 査読有 304:283-367, 2013. doi: 10.1016/B978-0-12-407696-9.00006-3

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 杉井英樹、前田英史、友清淳、和田尚久、門野内聡、長谷川大学、濱野さゆり、祐田明香、吉田晋一郎、赤峰昭文. 骨芽細胞

胞様分化における ActivinA の作用は前骨芽細胞と歯根膜細胞とで相反する. 第141回日本歯科保存学会秋季学術大会、山形テルサ（山形市）、2014年10月30、31日

- ② 長谷川大学、和田尚久、前田英史、吉田晋一郎、門野内聡、御手洗裕美、濱野さゆり、祐田明香、赤峰昭文. Wnt5a は TGF β1 を介してヒト歯根膜細胞のコラーゲン線維形成を促進する. 第140回日本歯科保存学会春季学術大会、滋賀県立芸術劇場（大津市）、2014年6月19、20日
- ③ 長谷川大学、和田尚久、前田英史、友清淳、門野内聡、郡勝明、吉田晋一郎、寺松陽子、濱野さゆり、祐田明香、杉井英樹、赤峰昭文. Wnt5a がヒト歯根膜細胞に及ぼす影響について. 第139回日本歯科保存学会秋季学術大会、秋田県総合生活文化会館（秋田市）、2013年10月17、18日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

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

赤峰 昭文 (AKAMINE, Akifumi)  
九州大学・歯学研究院・教授  
研究者番号：117053

### (2) 研究分担者

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

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

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

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：

、