

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861634

研究課題名(和文) iPS細胞技術に骨再生促進化合物を応用した垂直的・広範囲の歯槽骨増生技術の開発

研究課題名(英文) Vertical Bone Augmentation Using iPS Cell Constructs with small molecule

研究代表者

萱島 浩輝 (Kayashima, Hiroki)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50632121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、iPS細胞を補綴・インプラント治療において求められる垂直的骨増生技術として臨床応用するための研究基盤を確立することである。
これまでに同定した小分子化合物は、マウスiPS細胞の骨芽細胞分化を促進し、成熟した骨芽細胞へ分化可能であることが明らかとなった。さらに、pNIPAAmゲルを用いて作製したiPS細胞集合体は、骨組織に特異的なリン酸カルシウムを含んでいることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Small molecules such as simvastatin can enhance osteogenesis of iPS cells and promote mature bone formation of iPS cells. Therefore, small molecules could be promising for investigating the basis of osteogenic differentiation of iPS cells for future bone tissue engineering to achieve successful results of dental implant and prosthetic treatments.

研究分野：歯科補綴学・再生医学

キーワード：再生医療

1. 研究開始当初の背景

抜歯、歯周病等によって生じる垂直的かつ広範囲に欠損した歯槽骨を再建するために行われる骨再生誘導療法には、大きい外科的侵襲、術後の組織吸収などの問題が残っており、効率の良い骨組織再生治療法の開発が望まれている。個々の患者自身の細胞から作製可能な iPS 細胞は、歯槽骨の再生医療に有用であるが、iPS 細胞を垂直的かつ広範囲な骨欠損に対する新規歯槽骨再生技術として臨床応用するためには、iPS 細胞が有する骨芽細胞分化能の多角的な評価および、iPS 細胞の骨芽細胞分化機構を解明し、確実に骨芽細胞へ分化誘導する技術が必要である。さらに、iPS 細胞を三次元的な集合体を移植材とする技術の開発も必要である。

そこで、本研究代表者は、ケミカルバイオロジーのアプローチから、骨芽細胞分化制御に最も特異的に働く薬理活性をもつ小分子化合物を探索することで、iPS 細胞の骨芽細胞分化に特異的な現象を捉えることが可能であると考えた。さらに、移植に向けた三次元培養において、細胞のみで構成される細胞移植によるアプローチに着目した。スキャフォールドフリーによる細胞移植は、従来のスキャフォールドを用いた場合と比較して、細胞移植体を準備することが容易であるなど、数々の利点を有している。

これらのケミカルバイオロジーおよびスキャフォールドフリーの概念を併用することにより、新たな iPS 細胞移植技術を構築できることが期待できると考えた。

2. 研究の目的

本研究計画では、ケミカルバイオロジーおよびスキャフォールドフリーのアプローチによって、iPS 細胞の骨形成を強力に促す分子を同定し、さらには、補綴歯科治療において切望される垂直的な歯槽骨再生医療技術として臨床応用へと展開するための研究基盤を確立するため、具体的に、以下の項目を明らかにすることを目的とした。

(1) 申請者がこれまでにスクリーニングにより同定している小分子化合物が iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響を明らかにする。

(2) 温度応答性高分子 pNIPAAm ゲルを用いた iPS 細胞集合体の作製モデルを確立する。

(3) iPS 細胞の骨芽細胞分化における三次元培養システムの検討を行い、骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞の分化を促進する候補小分子化合物を骨芽細胞分化誘導培地に添加して iPS 細胞を培養し、化合物郡が、実際に iPS 細胞の骨芽細胞分化に促進的に作用するかどうかを評価する。分化の評価は、骨芽細胞特異的遺伝子 (Osterix, Osteocalcin) の発現を RT-PCR 法にて解析する。また、分化誘導した iPS 細胞が産生した石灰化基質の結晶構造を電子線回折にて解析した。

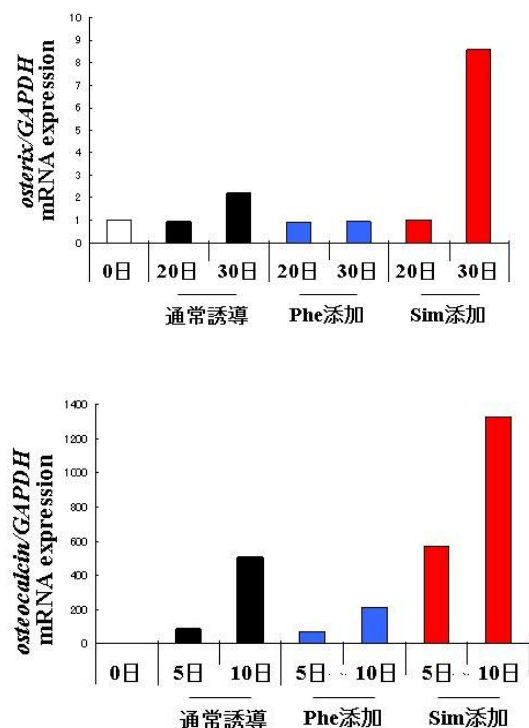
(2) 温度応答性高分子 pNIPAAm ゲルを用いた iPS 細胞集合体の作製モデルを確立するため、三次元プリンタを用いて移植に適した iPS 細胞集合体のモールドを造形し、三次元培養システムの検討を行った。

(3) iPS 細胞の三次元培養システムの検討を行い、骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討した。pNIPAAm ゲルを用いて作製した iPS 細胞集合体が、試験管内において形成した石灰化基質を EDX 解析にて評価した。

4. 研究成果

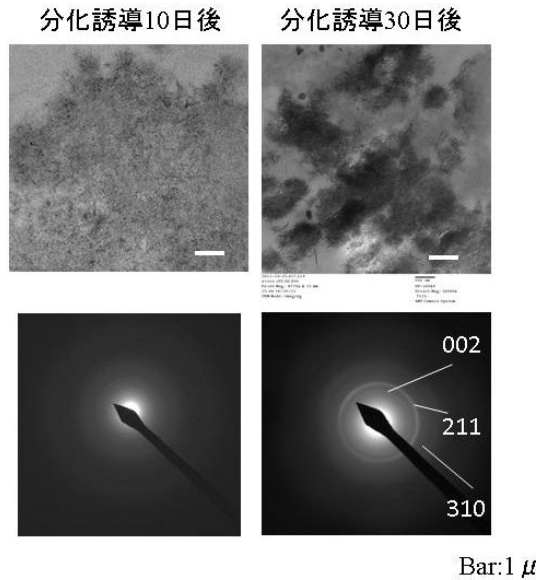
同定した骨芽細胞分化を促進する小分子化合物を用いて、マウス間葉系幹細胞および iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討した結果、同定した小分子化合物は、骨芽細胞特異的な遺伝子発現を促進した (図 1)。

図 1. 小分子化合物が iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響



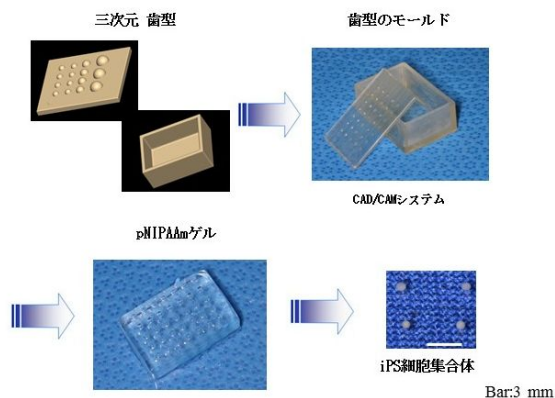
さらに、TEMを用いた電子線回折分析の結果、ハイドロキシアパタイトの結晶構造を有する成熟した骨芽細胞まで分化誘導可能であることが明らかとなった(図2)。

図2 . 骨芽細胞分化誘導を行った iPS 細胞の TEM 観察および電子線回折解析



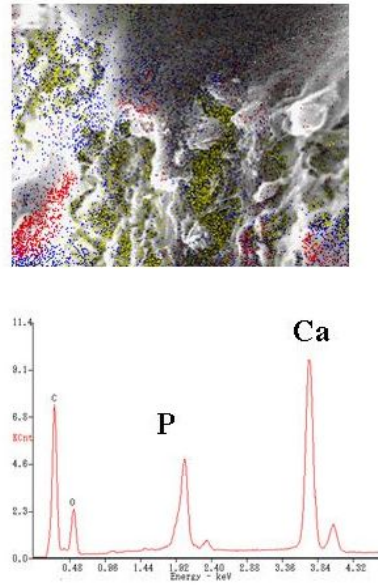
次に、iPS 細胞を移植材として用いるために必要となる三次元培養の確立へ向け、iPS 細胞集合体を作製するモールドデザインについて検討し、三次元プリンタにてモールドを造形した。このモールドおよび pNIPAAm ゲルを用いて、iPS 細胞凝集体を作製した(図3)。

図3 . iPS 細胞集合体の作製



作製した iPS 細胞集合体を、バイオリアクターを用いた振盪培養によって、骨芽細胞へ分化誘導を行った。EDX 解析を行った結果、iPS 細胞集合体の周囲は、骨組織に特異的なリン酸カルシウムの存在に関連するカルシウムおよびリンを含んだ細胞外基質で構成されていることが明らかとなった(図4)。

図4 . 骨芽細胞分化誘導を行った iPS 集合体の石灰化基質の形成



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 .

Egusa H, Kayashima H, Miura J, Uraguchi S, Wang F, Okawa H, Sasaki J, 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.* 15; 23(18):2156-69, 2014.

〔学会発表〕(計4件)

1 .

大川博子、萱島浩輝、山本治毅、矢谷博文、江草 宏； Vertical Bone Augmentation Using iPS Cell Constructs with Simvastatin International Association for Dental Research (IADR), 2014年6月25-28日、South Africa

2 .

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 平成 26 年度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7-8日、倉敷、岡山

3 .

大川博子、萱島浩輝、山本治毅、矢谷博文、江草 宏； Vertical Bone Augmentation Using iPS Cell Constructs with Simvastatin AAP 2014 Annual

Meeting、2014 年 11 月 21-23 日、Taipei
Taiwan

4 .

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 第 45 回 公益社
団法人日本口腔インプラント学会学術大会、
2015 年 9 月 22 日、岡山

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

萱島浩輝 (KAYASHIMA HIROKI)

大阪大学大学院歯学研究科・助教

研究者番号 : 50632121