

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 2 8 年 6 月 2 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861678

研究課題名(和文) 歯肉線維芽細胞のダイレクトリプログラミングによる骨芽細胞の作成

研究課題名(英文) Direct induction of osteoblast from human Gingival fibroblast cells

研究代表者

白石 剛士 (SHIRAISHI, Takeshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：00613580

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)：歯槽骨、顎骨の欠損は患者のQOLを低下させる原因となる。近年、線維芽細胞から軟骨細胞へとダイレクトリプログラミングする手法が報告されている。そこで本研究では歯肉線維芽細胞をダイレクトリプログラミングすることで、骨芽細胞を誘導する手技の研究を行った。エレクトロポレーション法による遺伝子導入でRNAX-2、BMP-4の遺伝子発現を確認した。

研究成果の概要(英文)：A loss of an alveolus bone and a jawbone will be the cause which makes patient's QOL fall. The method of direct reprogramming is reported to chondrocytic from fiber blastic in recent years. Therefore we studied the procedures to guide osteoblasts using the direct reprogramming method from human gingival fibroblast cells in this study. The genetic manifestation of RNAX-2 and BMP-4 was confirmed by genetic introduction by electroporation way.

研究分野：再生医療

キーワード：ダイレクトリプログラミング

1. 研究開始当初の背景

腫瘍や外傷などで生じた顎骨欠損に対し、骨移植に代わる治療法として細胞工学的な手法を応用した低侵襲で効果的な顎骨再生療法を開発することは、口腔外科領域において重要な課題である。Tissue Engineering による組織の再生には、細胞、基質、調節因子の3つが重要な役割を果たしているが、再生医療に用いる細胞源として、骨髓や脂肪組織に含まれる間葉系幹細胞(MSC)などの組織幹細胞に加え、無限増殖と多分化能を兼ね備えた多能性幹細胞(ES細胞、iPS細胞)が用いられている。このうち骨髓由来のMSCは顎骨の再建に期待されているが、骨髓の採取には得られる細胞数が少ないことや、侵襲が大きいといった問題がある。そこで、申請者の研究室では歯科口腔外科医が採取すること可能で、侵襲が比較的小さい、歯髄・歯根膜、あるいは頬脂肪体組織(B-ADSCs)からMSCを採取し、骨組織の再生のための有用な方法の開発を進め一定の成果を得ることができた。(Ikeda, et al. 2011 Shiraishi et al. 2012)。B-ADSCsの免疫組織学的な評価では、間葉系幹細胞のマーカーである、STRO-1の発現が認められた。またB-ADSCsのFACSではCD-90, CD-105, Stro-1陽性細胞の存在を確認した。歯根膜由来幹細胞、B-ADSCsをそれぞれ骨芽細胞へと分化させ、Vivoで評価を行った所、骨形成が確認された。NIHイメージングを用いた評価では、強力な骨分化因子であるrhBMP-2と共にこれらのMSCを培養することで、より多くの骨様組織が形成されることが判明した。しかし、これらの培養細胞の増殖・分化能には個体差が大きく、得られた骨芽細胞様細胞は質量ともにバラツキがあり、また培養操作には多大な労力と経費を要することも明らかとなった。一方2006年山中らはマウス繊維芽細胞にOct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycなどの転写因子を導入すると、多分化能と自己複製能を合わせもつiPS細胞が得られることを報告した(Takahashi et al. 2006)。このiPS細胞を用いた、病因の解明、新薬の開発、再生医療が大きく期待されている。近年iPS細胞の樹立方法・分化誘導法は改善され、その安全性や効率は高まりつつある。一方で、iPS細胞ができる効率は0.1~1%と低いこと、リプログラミングまでに2週間要すること等の問題点がある。また、iPS細胞を作成し目的とする細胞へ分化させた際に未分化な細胞が残っていると、奇形腫を発症する危険性がある。

近年これらの問題点を解決する試みとして、体細胞(線維芽細胞)をiPS細胞を介さずに直接別の組織の組織幹細胞や前駆細胞に変換する、ダイレクトリプログラミングの手法が研究され報告されている(Son et al. 2011, Sekiya et al. 2011)。ダイレクトリプログラミングとは複数の転写因子を体細胞に導入し、体細胞を直接目的とする細胞へ分化

転換させる方法である。このダイレクトリプログラミングの手法を用いて、線維芽細胞から「心筋細胞」や「肝細胞」が作成されている。また、Tumakiらはマウス皮膚繊維芽細胞培養にc-MycとKlf4の2つのリプログラミング因子と、1つの軟骨誘導因子SOX9を導入することで軟骨細胞様細胞を誘導できるとしている(Tumaki et al 2011)。体細胞をiPS細胞へとリプログラミングさせ目的とする細胞へ分化させた場合、50日程度の期間を要していたが、ダイレクトリプログラミング法では、目的細胞へ分化させるまでに要する期間は2週間程度であり、誘導の短期化が可能となる。また、リプログラミングを行わないため未分化な細胞が存在せず奇形腫形成の危険性が低いという利点がある。

そこで申請者はこのダイレクトリプログラミングの手法を骨組織の再生にも応用できると考え、細胞源として歯肉線維芽細胞を用いたダイレクトリプログラミング法により骨芽細胞様細胞を作成するという発想に至った。

2. 研究の目的

口腔外科領域では再生医療を応用した歯槽骨、顎骨の再建が研究されている。この再生医療に用いられる細胞ソースとして間葉系幹細胞などの組織幹細胞や、人工多能性幹細胞(iPS)が期待されているが、これらの細胞の臨床応用にあたっては、組織幹細胞の培養期間の短期化、iPSの腫瘍形成の抑制などまだ克服すべき課題も多い。近年、線維芽細胞からiPS細胞を介することなく心筋細胞へと分化させる、ダイレクトリプログラミングの手法が発表され注目を浴びている。ダイレクトリプログラミングは腫瘍形成の可能性が低く、目的とする細胞への誘導期間が短いといった利点がある。そこで本研究では、口腔外科医でも容易に採取することが可能な歯肉線維芽細胞をダイレクトリプログラミングすることで骨芽細胞様細胞を誘導し、骨欠損部へ応用することで、効果的な顎骨の再生を可能とする治療法の創出を目指す。

再生医療に用いる細胞ソースとして、口腔外科領域で採取が可能な組織は歯根膜・歯髄、顎骨骨髓、頬脂肪体組織などである。しかし、歯根膜・歯髄から細胞を得るためには抜歯や抜髄が必要となる。また顎骨骨髓、頬脂肪の採取にも比較的大きな外科的侵襲を伴うこととなる。さらに、これらの細胞をhomogeneityを維持した状態で培養するためには、熟練した培養技術が必要である。一方、歯肉線維芽細胞は少ない侵襲で採取することができ、培養も容易で増殖の速度も早いといった利点を有している。さ

らに、歯肉組織には間葉系幹細胞が存在することが明らかにされている(Egusa et al.2010, Anh D. Le et al. 2009)。また、歯

肉組織の採取は美容的・機能的に障害が少なく、治癒が迅速であることからわれわれ歯科医師が採取できる有用な細胞ソースである。本研究では歯肉線維芽細胞に、一部のリプログラミング因子と共に骨転写因子を導入してダイレクトリプログラミングすることで骨芽細胞様細胞を誘導し、新たな骨再生の手法を確立することを目的としている。

本研究は、線維芽細胞をダイレクトリプログラミングの手法を用いて骨芽細胞様細胞へと誘導させる研究で、iPS 細胞が有する欠点を補うことができると考えられる。また、用いる細胞ソースとして歯肉線維芽細胞を用いることで、簡便、廉価な手法で組織の再生を図る方法の開発に主眼を置いているところが特色である。

3．研究の方法

Egusa らの方法を基本として歯肉線維芽細胞の単離を行う。研究に同意が得られた患者で、デンタルインプラント2次手術の際に、歯肉パンチなどを用いて切除した余剰な歯肉を実験に用いる。採取した歯肉を 10%FBS 含有 MEM 培地を用いて、5%CO₂ 37 条件下に培養する。数日後に歯肉組織片から outgrowth して得られた細胞が歯肉線維芽細胞となる。申請者は、現在までに脂肪由来間葉系幹細胞を使用した骨再生の研究に従事しており、歯肉からの歯肉線維芽細胞の単離に技術的な問題点はない。

効果的な遺伝子導入方法に関する検討。誘導因子を細胞に作用させる際、従来までの技術ではレトロウイルスを用いて遺伝子を細胞に導入していた。この手法は iPS 細胞誘導に適していたが、導入遺伝子が染色体の不特定な位置に組み込まれることによって宿主の遺伝子発現を乱す、導入遺伝子自体の発現が安定しない、あるいは誘導後も導入遺伝子が発現したりする問題があった。その結果、安定な誘導細胞が得られないことや、細胞が癌化しやすくなるなどの不都合が生じていた。そこで、本研究では遺伝子導入にはプラスミドを用いたエレクトロポレーション法を用いる。エレクトロポレーション法の利点として 1) 導入する遺伝子量に制限がない 2) 導入時間が極めて短時間である 3) 連続投与が可能であることが挙げられる。申請者が所属する研究室の研究により、エレクトロポレーション法は他の遺伝子導入方法に比べ、効率よく遺伝子導入が可能となることが判明している。

4．研究成果

歯肉線維芽細胞の単離、培養は可能であった。

ダイレクトリプログラミングの手法を確立するために、現在までわれわれが使用してきたヒト脂肪由来肝細胞を用いた遺伝子導入の検討を行った。誘導因子を細胞に直接作用させる際従来までの技術ではレトロウイ

ルスを用いて遺伝子導入を行っていた。この手法は iPS 細胞の誘導に適していたが、導入遺伝子が染色体の不特定な位置に組み込まれることで宿主の遺伝子発現を乱す問題点があった。そこで遺伝子導入にプラスミドを用いたエレクトロポレーション法による遺伝子導入を検討した。エレクトロポレーション法による遺伝子導入システムとして Neon Transfection System を用いた。この結果、ヒト脂肪由来肝細胞に RUNX-2、BMP-4 を導入し遺伝子発現を確認した。

ダイレクトリプログラミングに必要な転写因子を歯肉線維芽細胞へ遺伝子導入して、得られた細胞が iPS 細胞の状態を得ていないかを確認する。Nanog の発現は細胞が分化全能性の維持していることを示しており、iPS 細胞の指標となる。本研究で遺伝子導入した歯肉線維芽細胞の Nanog の発現を、RT-PCR を用いて 1,3,5,7 日目に経時的に評価し、ダイレクトリプログラミングを行なった場合に細胞が初期化されていないことを確認する予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
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

白石 剛士 (SHIRAISHI, Takeshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）
客員研究員
研究者番号：00613580