

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861679

研究課題名(和文) 歯槽骨再生治療へのダイレクト・リプログラミング技術の応用

研究課題名(英文) Application of direct reprogramming technology to periodontal tissue Regenerative therapy

研究代表者

山本 健太 (Yamamoto, Kenta)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00636160

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)： 歯槽骨吸収は歯牙の喪失につながり、患者のQOLを著しく低下させる。骨吸収部に自己骨芽細胞を移植できれば、歯槽骨を再生し歯牙喪失を回避出来る可能性がある。我々は最近、ヒト線維芽細胞にレトロウイルス・ベクターを用いて4つの転写因子の遺伝子を導入すると骨芽細胞を誘導できることを報告した。本研究ではこの技術をさらに発展させ、導入遺伝子が染色体に組み込まれていない骨芽細胞の樹立を試みた。

その結果、プラスミド・ベクターを用いた遺伝子導入によりヒト線維芽細胞を骨芽細胞に誘導することに成功した。導入遺伝子は染色体に組み込まれていなかった。本研究の成果は、安全で有効な新しい骨再生医療につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： Alveolar bone resorption associated with advanced periodontitis causes tooth loss to remarkably reduce patients' QOL. Transplantation of autologous osteoblasts into the alveolar bone region may facilitate alveolar bone regeneration to prevent tooth loss. Recently we reported that human fibroblasts were directly reprogrammed into osteoblasts by transducing four transcription factor genes by means of retrovirus vectors. In this study, we improved this technology to obtain reprogrammed osteoblasts in which any transgene is not integrated into their chromosomes.

As results, human fibroblasts were successfully converted into osteoblasts by transfecting genes by a plasmid vector. Transgenes were not integrated into the chromosome of the resultant cells. The present technology may lead to novel regenerative medicine for alveolar bone resorption.

研究分野：再生歯科医学、骨免疫学、歯周病学

キーワード：再生医療 骨芽細胞 ダイレクトリプログラミング

1. 研究開始当初の背景

歯周病は我が国の成人の 80%が罹患しているといわれ、歯周病の進行に伴う歯槽骨の吸収は、歯牙を喪失する最も主要な原因となっている。患者由来の骨芽細胞を、歯槽骨の吸収部位に移植すれば、歯牙の喪失を予防し、患者の QOL および ADL を著明に改善できる可能性がある。現在自己骨芽細胞を作出する方法としては、骨髄由来間葉系幹細胞から誘導する方法があり、外傷や骨肉腫切除後の骨欠損に対してはすでに臨床応用されているが、細胞採取に伴って大きな侵襲があること、得られる細胞の数が不十分であるなどの問題がある。また iPS 細胞から誘導する方法も考えられるが、未分化細胞の混入に伴う腫瘍化の危険性が否定しにくい。

我々は最近、ヒト体細胞に Runx2、Osterix、Oct4、L-myc の 4 遺伝子を導入し、骨芽細胞へと直接誘導する技術(ダイレクト・リプログラミング)を開発し報告した(Yamamoto et al., PNAS, 2015)。しかしながら現状では、レトロウイルス・ベクターを用いて遺伝子を導入しているため、導入遺伝子が染色体に組み込まれた骨芽細胞が得られる。そこで染色体への遺伝子の組み込みがない骨芽細胞の作出方法が望まれる。

2. 研究の目的

レトロウイルス・ベクターを用いて上記の 4 遺伝子を導入する代わりに、プラスミド・ベクターを用いて、4 遺伝子もしくはそれより少ない数の遺伝子を導入する。このような手法によって、染色体に導入遺伝子が組み込まれていない骨芽細胞を、ヒト体細胞から直接誘導することを目的とした。本研究の成果は、歯槽骨吸収に対する画期的新治療技術を提供する可能性がある。

3. 研究の方法

- 1) 細胞：ヒト由来正常細胞を用いた。
- 2) 遺伝子導入：遺伝子組換え実験は認可を受けて行った。骨芽細胞の分化に關与する転写因子等の遺伝子を組み込んだプラスミド・ベクターを構築した。これらを上記の細胞に導入後、種々の条件で培養した。
- 3) 染色：Alkaline phosphatase(ALP)染色、Alizarin Red S 染色および von Kossa 染色を定法のとおりに行った。
- 4) 遺伝子発現解析：Real time RT-PCR で解析した。
- 5) 細胞移植：動物実験は認可を受けて行った。免疫不全マウスの精巣被膜下に、誘導した骨芽細胞を移植した。
- 6) 骨芽細胞の生着および石灰化基質形成の評価：組織学的、免疫組織化学的評価にて行った。

4. 研究成果

1) プラスミド・ベクターによるヒト骨芽細胞誘導

骨芽細胞の分化に關与する転写因子等の遺伝子を組み込んだプラスミド・ベクターをヒト体細胞に導入し、誘導培地にて培養した結果、ALP 陽性の細胞が誘導された。得られた細胞は、元の体細胞と比し、骨芽細胞特異的遺伝子を強力に発現しており、骨関連タンパクも発現するとともに、石灰化骨基質も産生することが確認された(図 1)。また FBS を含まないゼノフリーの培養でも同様の結果を得られた。

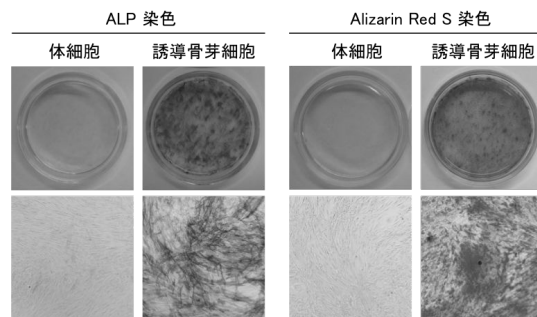


図 1：体細胞からプラスミド・ベクターで直接誘導した骨芽細胞は、ALP 陽性で石灰化骨基質を産生する。

得られた細胞から継時的に DNA を抽出し、qPCR でプラスミド配列のコピー数を定量すると、培養に伴いコピー数は激減し、1 細胞あたり 1 コピー以下になった。したがって、本法で得られた骨芽細胞の染色体には、導入遺伝子は組み込まれていないことが明らかとなった。

また、培地に加える血清として、ウシ胎仔血清の換りにヒト血清を用いても、骨芽細胞は誘導できた。

2) 誘導したヒト骨芽細胞の生体内石灰化骨基質産生能および造腫瘍性の検討

上記の手法で誘導した骨芽細胞を、免疫不全マウスの精巣被膜下に接種すると、接種部位に石灰化沈着を認めた(図 2)。また石灰化骨基質の周囲にヒト Runx2 陽性細胞を認めた。一方、移植後長期間観察しても、テラトーム形成は認めなかった。

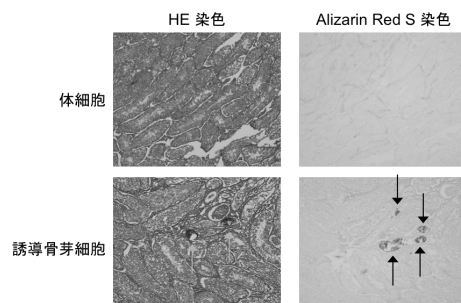


図 2 : 体細胞からプラスミド・ベクターで直接誘導した骨芽細胞は、生体内でも骨基質を産生する。

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 6 件)

1) Generation of directly converted human osteoblasts that are free of exogenous gene and xenogenic protein. Yamamoto K, Sato Y, Honjo K, Ichioka H, Oseko F, Sowa Y, Yamamoto T, Kanamura N, Kishida T, Mazda O. J Cell Biochem 2016 (in press) (査読有り)

2) Electrical stimulation with periodic alternating intervals stimulates neuronal cells to produce neurotrophins and cytokines through activation of mitogen-activated protein kinase pathways. Yamamoto K, Yamamoto T, Honjo K, Ichioka H, Oseko F, Kishida T, Mazda O, Kanamura N. Eur J Oral Sci 123, 403-408, 2015. (査読有り)

3) Transduction of Oct6 or Oct9 gene concomitant with Myc family gene induced osteoblast-like phenotypic conversion in normal human fibroblasts. Mizoshiri N, Kishida T, Yamamoto K, Shirai T, Terauchi R, Tsuchida S, Mori Y, Ejima A, Sato Y, Arai Y, Fujiwara H, Yamamoto T, Kanamura N, Mazda O, Kubo T. Biochem Biophys Res Commun 467, 1110-1116, 2015. (査読有り)

4) Reprogrammed functional brown adipocytes ameliorate insulin resistance and dyslipidemia in diet-induced obesity and type 2 diabetes. Kishida T, Ejima A, Yamamoto K, Tanaka S, Yamamoto T, Mazda O. Stem Cell Reports 13, 569-581, 2015. (査読有り)

5) Direct conversion of human fibroblasts into functional osteoblasts by defined factors. Yamamoto K, Kishida T, Sato Y, Nishioka K, Ejima A, Fujiwara H, Kubo T, Yamamoto T, Kanamura N, Mazda O. Proc Natl Acad Sci USA 112, 6152-6157, 2015. (査読有り)

6) Inhibition of osteoclastogenesis by osteoblast-like cells genetically engineered to produce interleukin-10. Fujioka K, Kishida T, Ejima A, Yamamoto K, Fujii W,

Murakami K, Seno T, Yamamoto A, Kohno M, Oda R, Yamamoto T, Fujiwara H, Kawahito Y, Mazda O. Biochem Biophys Res Commun 456, 785-791, 2015. (査読有り)

[学会発表](計 3 件)

1) ダイレクト・コンバージョンによる機能的なヒト骨芽細胞の創出. 山本健太, 山本俊郎, 佐藤良樹, 大迫文重, 雨宮傑, 金村成智. 第 143 回日本歯科保存学会. 2015/07/21-22. 東京.

2) 機能的なヒト骨芽細胞のダイレクト・リプログラミング. 山本健太, 山本俊郎, 佐藤良樹, 岸田綱郎, 松田修, 金村成智. 第 36 回日本炎症・再生医学会. 2015/07/21-22. 東京.

3) Direct reprogramming of functional human osteoblasts for periodontal tissue regeneration. Yamamoto K, Yamamoto T, Kishida T, Mazda O, Kanamura N. International Association for Dental Research. 2015/03/11-14. Boston.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 2 件)

名称: 骨芽細胞及びその調製方法
発明者: 山本健太, 岸田綱郎, 山本俊郎, 松田修
権利者: 京都府公立大学法人
種類: 特許
番号: PCT/JP2014/069628
出願年月日: 2014 年 7 月 24 日
国内外の別: 国外

発明の名称: 骨芽細胞及びその調製方法
発明者: 山本健太, 岸田綱郎, 山本俊郎, 松田修
権利者: 京都府公立大学法人
種類: 特許
番号: 特願 2015-163880
出願人: 京都府公立大学法人
出願日: 平成 27 年 8 月 21 日
国内外の別: 国内

○取得状況(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山本 健太 (Yamamoto Kenta)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 0 0 6 3 6 1 6 0

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし