

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861770

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞からの歯根膜細胞分化方法の確立と歯根膜付インプラント開発への応用

研究課題名(英文) Establishment of a differentiation method of periodontal ligament cells from human iPS cells, and development of dental implant with periodontal ligament.

研究代表者

加藤 龍史 (KATO, RYUSHI)

東北大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90706699

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)：ヒト歯根膜細胞に初期化遺伝子を導入してヒトiPS細胞を樹立し、得られたiPS細胞を用いて歯根膜細胞を誘導し、将来的にインプラントに人工歯根膜を付与することを目的とする。

本研究では、ヒト歯根膜から単離した細胞に、京都大学iPS研究所でサブクローニングされたiPS細胞作製用プラスミドをElectroporationによって遺伝子導入してiPS細胞樹立を試みた。遺伝子導入して3週間後、辺縁の明瞭なiPS細胞様コロニーが認められた。これまで、ヒト歯根膜細胞iPS細胞から歯根膜細胞への誘導を目指した条件検討を行った。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is establishment of a differentiation method of periodontal ligament (PDL) cells from iPS cells, which is generated by transfection of reprogramming genes in human PDL cells.

We first isolated human PDL cells. The PDL cells were transfected with plasmids for iPS cell generation. Three weeks after transfection, iPS cell-like colonies with clear edge were observed. In addition, we examined the experimental conditions with the aim of differentiation of the iPS cells into PDL cells.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：iPS細胞 歯根膜

1. 研究開始当初の背景

歯根膜は、歯槽骨とセメント質の間に存在し、歯を顎骨内に固定するだけではなく、咬合力といったメカニカルストレスが顎骨に直接加わらないように緩衝する役割も果たしている。また、歯根膜はコラーゲン線維や細胞成分のほか、血管および神経も存在しており、様々な外的刺激を感受する感覚装置としての役割など、歯周組織の恒常性維持に関与している。

我々のグループはこれまで、「ヒト歯根膜細胞間ギャップ結合 (GJ) による細胞間コミュニケーション」について研究を行ってきた。ヒト歯根膜細胞における GJ の発現と機能性について比較検討を行い、GJ を介した細胞間コミュニケーションの骨代謝へ及ぼす影響を調べた結果、単離・培養されたヒト歯根膜細胞間には機能的な GJ が存在し、GJ を介した細胞間コミュニケーションの存在が明らかとなった。

また、矯正的歯の移動時における圧迫側モデルとして低酸素環境下における GJ の機能性およびタンパク・mRNA 発現検討を行った結果、低酸素環境下において歯根膜細胞間 GJ を介した細胞間コミュニケーションは負の調節を受け、GJ タンパクの減少と関連する事が示唆された。GJ 阻害薬投与群では、RANKL mRNA 発現は有意に上昇する一方で、OPG mRNA 発現の有意な減少を認めた。これらの結果から、歯根膜細胞間における GJ を介した細胞間コミュニケーションが骨代謝制御へ関与している可能性が示唆された。我々のグループのこれまでの研究結果および過去の報告から、歯槽骨のリモデリングには歯根膜細胞と骨系細胞との細胞間情報伝達が重要な役割を担う可能性が極めて高く、歯根膜細胞同士、および歯根膜細胞と他細胞間との GJ を介した細胞間コミュニケーションによって、骨芽細胞や破骨細胞といった細胞の分化・増殖が誘導され、歯の移動に必要な歯槽骨のリモデリングが制御されている可能性が示唆されている。

現在、先天的および後天的歯の欠損部位への補綴治療として用いられているデンタルインプラント治療は、骨組織とインプラントが直接結合するオッセオ

インテグレーションによって顎骨内に生着している。これらの人工材料を用いた治療は、機能回復において有効とされているものの、歯根膜組織が欠落しているため、歯根膜機能や神経機能などの歯の生理的機能を有しておらず、完全な機能的咬合系の回復することはできていない。これまでに、既存の口腔インプラントに歯根膜が有する機能を付与させることを目的とした材料学的アプローチが試みられてきたが、複雑な機構によるインプラント体の破損による脱離などの問題が生じ、広く実用化には至っていない。このような背景から、欠損歯の咬合機能回復に貢献する歯根膜機能を、幹細胞と組織工学技術によって補うことが可能となれば、天然歯とほぼ同等の生理機能を有する次世代のハイブリッド型インプラントとして、より生物学的な機能的咬合系の回復が可能であると考えられる。また、歯根膜線維を有したインプラントが患者の生活の質を向上させるだけでなく、人工歯根膜再生の知見が、歯周病の治療および歯周組織再生への応用も期待される。そのため、人工歯根膜再生の基盤的技術の開発は、患者および術者から切望されている。

現在、再生医療への応用が期待される幹細胞として ES 細胞や体性幹細胞が知られているが、最近、山中らがマウス (Takahashi and Yamanaka, Cell, 2006)、さらに、ヒトの人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を作製し (Takahashi et al, Cell, 2007)、現在 iPS 細胞を用いた再生医療の実現に向けた研究が多方面で活発に行われている。iPS 細胞の歯科への応用として、今までエナメルマトリクス誘導体と iPS 細胞を骨欠損部に用いて歯周組織の回復を計った研究 (Xuejing et al, J Cellular Physiol, 2011)、iPS 細胞から ameloblast への分化方法を確立した研究 (Arakaki et al, JBC, 2012)、iPS 細胞から神経堤細胞を経由した象牙芽細胞への分化方法を確立した研究 (Otsu, et al, Stem Cells and Development, 2012) などが行われ、歯科の再生医療の実現のために、iPS 細胞が有用であることが示唆された。しかし、iPS 細胞から歯根膜細胞への分化に成功した報告はまだ無く、この技術の実現および臨床への応用が切望されている。

このような背景のもと、将来ヒトへの臨床応用も可能な基盤技術を開発するために、人工歯根膜構築の為の細胞シーズとして、組織から採取した幹細胞ではなく、ヒト iPS 細胞を歯根膜細胞へと分化させる事を着想した。また、ヒト iPS 細胞由来歯根膜細胞における GJ の局在および GJ を介した細胞間コミュニケーションを初代培養歯根膜細胞と比較検討を行うことで、ヒト iPS 細胞由来歯根膜細胞の **characterization** を行うこととした。得られた iPS 細胞由来歯根膜細胞を細胞ソースとして将来的にヒト再生歯根膜を作製し、インプラントに人工歯根膜を付与することによる、天然歯とほぼ同等の生理機能を有する次世代のハイブリッド型インプラント作製を目指す。

## 2. 研究の目的

ヒト歯根膜から分離した歯根膜細胞に初期化遺伝子を導入してヒト iPS 細胞を樹立し、歯根膜細胞への分化能の高い iPS 細胞作成方法を確立する。得られたヒト iPS 細胞から歯根膜細胞への分化への分化方法を確立する。初代培養歯根膜細胞と比較検討を行うことで、ヒト iPS 細胞由来歯根膜細胞の **characterization** を行う。このようにして得られた iPS 細胞由来歯根膜細胞は、将来的に、人工歯根膜をインプラントに付与した次世代のハイブリッド型インプラント作製の細胞ソースとして期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト歯根膜細胞の単離と培養

矯正歯科治療のために抜歯された健全な第一小臼歯及び第三大臼歯から、過去の報告に従ってヒト歯根膜細胞の単離を行った。抜去歯は phosphate buffered saline (PBS) にて 2 回洗浄後、外科用替え刃メスを用いて歯根膜組織を歯根膜線維ごと歯根表面から剥離した。歯根表面から剥離した歯根膜組織を 15ml チューブに入れ 1500rpm 5 分間で 2 回遠心分離し、ペレットに 5mg/mL コラゲナーゼ type II および 2.5mg/mL dispase I 含有 alpha-medium minimum

essential medium ( $\alpha$ -MEM)にて、37°C で 60 分間消化した。単離された歯根膜細胞は 10% 非動化済ウシ胎仔血清 (heat-inactivated fetal bovine serum: HIFBS) および 1% penicillin/streptomycin (最終濃度 100Unit/mL および 100  $\mu$ g/ml) 含有  $\alpha$ -MEM で培養した。培地は週 2 回交換した。

### (2) ヒト歯根膜細胞を用いた iPS 細胞の樹立

Okita ら (Nat Methods, 2011) の方法に従って、ヒト歯根膜から単離した細胞に、京都大学 iPS 研究所でサブクローニングされた iPS 細胞作製用エピソーマルプラスミドである OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC を遺伝子導入した。その後、2 日に 1 回 10%FBS 培地と交換した。遺伝子導入 7 日後に培地を除去、PBS で洗浄し、0.25% Trypsin/1mM EDTA を用いて細胞を回収し、細胞数を計測した。計測した細胞を  $2.0 \times 10^4$  個/ml となるように調整し、Mitomycin C 処理した SNL フィーダー細胞上に播種し、37°C 5%  $\text{CO}_2$  で一晚培養した。以後、10%FBS 培地をヒト iPS 細胞用培地に置換し、以後 2 日に 1 度培地を交換した。

### (3) ヒト歯根膜細胞由来 iPS 細胞から歯根膜細胞への誘導

ヒト iPS 細胞を低接着性の培養ディッシュにて培養し、胚葉体を形成させる。胚葉体を培養し、コンフルエントに達した時点で継代し、単一の線維芽細胞用形態を示すまで培養を継続する。得られた細胞をヒト歯根膜細胞の培養上清を用いて培養する。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト歯根膜細胞の単離と培養

単離されたヒト歯根膜細胞を示す(図 1)。これらの細胞は、紡錘形の線維芽細胞様の形態を示した。

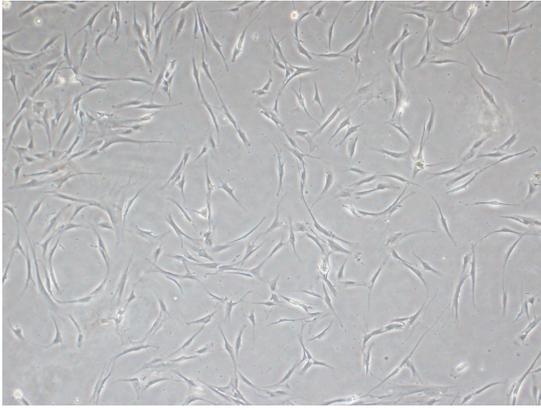


図1：単離された歯根膜細胞

(2) ヒト歯根膜細胞を用いた iPS 細胞の樹立

ヒト歯根膜細胞遺伝子導入して3週間後、辺縁の明瞭な iPS 細胞様コロニーが認められた。

(3) ヒト歯根膜細胞由来 iPS 細胞から歯根膜細胞への誘導

これまで、ヒト歯根膜細胞由来 iPS 細胞から歯根膜細胞への誘導を目指した条件検討を行った。

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

加藤 龍史 (KATO, Ryushi)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：90706699