

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390525

研究課題名（和文）：iPS細胞を用いた歯周組織再生療法に関する総合的研究

研究課題名（英文）：A comprehensive study on periodontal regeneration using induced pluripotent stem (iPS) cells

研究代表者：野口 和行 (NOGUCHI KAZUYUKI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90218298

研究成果の概要（和文）：

本研究は、iPS細胞による歯周組織再生の可能性の検討とヒト歯肉線維芽細胞由来iPS細胞の樹立を目的とした。

まず、骨分化刺激したマウスiPS細胞をラットの歯周組織欠損モデルへ移植した。骨分化刺激したiPS細胞は石灰化物の沈着が認められ、この細胞を移植したところ欠損部周囲への新生骨と、象牙質上に新生セメント質様組織が形成された。

我々は、ヒト歯肉線維芽細胞由来iPS細胞の樹立にも成功し、新規歯周組織再生療法の基盤を築くことができた。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to investigate the possibility of the periodontal regeneration by iPS cell transplantation and to establish human gingival fibroblast derived iPS cell.

Culturing iPS cells in osteogenic medium, we observed calcium diposition by Alizarin Red S staining and osteocalcin positive immunostaining cells. In rat periodontal fenestration model, transplantation of the iPS cells encouraged not only new bone formation but also cementum formation on the denuded dentin surface.

Mouse iPS cells stimulated with osteogenic medium promote periodontal regeneration in rat periodontal fenestration model.

Moreover, we established human gingival fibroblast derived iPS cell. The results of this study may underlie new periodontal therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：iPS細胞、歯周組織再生、移植・再生医療、再生・組織

1. 研究開始当初の背景

歯科領域において、歯の喪失の主要な原因の一つである歯周病は、国民の良好な QOL および ADL の維持あるいは向上のために解決すべき重要な課題である。従来の歯周治療では、破壊された歯周組織を維持することは可能であるが、歯周組織再生は困難であった。近年、Guided Tissue Regeneration (GTR) 法あるいはブタ歯胚由来のエナメルマトリックスデリバティブ (EMD) を使用した歯周組織再生療法が臨床応用されるに至ったが、術式の煩雑さ、異種動物由来の生物材料、さらに適応症の限界（その限られた中ですら部分的な再生しか得られない）などいくつかの大きな問題点がある。そのようなことから、広範囲の歯周組織欠損に対し安全な再生療法の開発が求められており、その一つとして自家細胞移植療法が期待されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は歯周病により失われた歯周組織に対し、iPS 細胞を用いた次世代型歯周組織再生治療を目指すことである。歯周組織再生のメカニズム、未分化の細胞から成熟した歯周組織細胞までの分化の詳細な解析を行うとともに、ヒト歯肉線維芽細胞からの iPS 細胞作製を試みる。

3. 研究の方法

(1) 骨分化刺激したマウス iPS 細胞のラット歯周組織欠損への移植

① マウス iPS 細胞の骨分化刺激

マウス iPS 細胞は、京都大学で樹立されたものを RIKEN より購入した。マウス iPS 細胞の骨分化誘導は、まず Hnaging drops 法にて胚様体 (Embryoid Bodies : EB) を形成した。3 日目に EB を浮遊培養し、5 日目に骨分化培地にて 4 週間、接着培養を行った。本研究では、細胞移植に細胞シートを用いるため、細胞シート回収用温度感受性 dish の UpCell® を使用した。UpCell® は Type I Col でコーティングした。骨分化の評価としては、石灰化を Alizarin Red 染色にて、骨分化最終段階のマーカである Osteocalcin を細胞免疫染色にて評価した。

② ラット開窓型骨欠損モデルの作製と iPS 細胞移植

ラットは、8 週齢のオス、F344 ラットを用い、FK506 にて免疫抑制を行った。歯周組織欠損は下顎右側第一第二臼歯の歯根を覆っている骨をラウンドバーにて開窓した。実験群には骨分化刺激した iPS 細胞シートを移植し、移植を行わないものを対照群とした。移植 4 週後に屠殺し、通法に従い中性脱灰を行い、頬舌断にてパラフィン切片を作製。HE 染色と

アルシアンブルー染色を行った。

本研究は、鹿児島大学の遺伝子組換え実験および動物実験倫理委員会の承認のもと行われた。

(2) ヒト歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞の樹立

① ヒト歯肉線維芽細胞

歯肉組織は、保存不可と診断された歯もしくは歯周外科を必要と診断された歯の辺縁部歯肉を抜歯/歯周外科時に局所麻酔下で、No. 15 の替刃メスにて 1mm x 3mm 程度採取した。得られた組織からヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) を OutGrowth 法にて分離・培養した。

② iPS 細胞の樹立

5 つの遺伝子 (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *LIN28* 及び *NANOG*) をレトロネクチン法にて導入することで iPS 細胞を作製した。樹立した iPS 細胞について、その分化能と分化マーカーとなる遺伝子の発現パターンを解析した。さらに、得られた iPS 細胞の多分化能を確認するために、SCID マウスを用いて奇形種形成実験を行った。

4. 研究成果

(1) 骨分化刺激したマウス iPS 細胞のラット歯周組織欠損への移植

● 骨分化刺激したマウス iPS 細胞の石灰化
骨分化刺激から 5 - 6 日目で細胞外マトリックスが出現した。図 1 に示すように、28 日目で Alizarin Red 染色陽性の石灰化物の沈着を認めた。一方、通常の Growth Medium で培養したコントロール群では石灰化物の沈着は認められなかった。

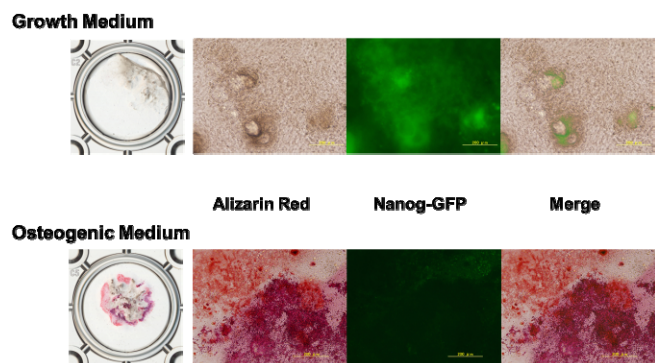


図 1 Alizarin Red S 染色

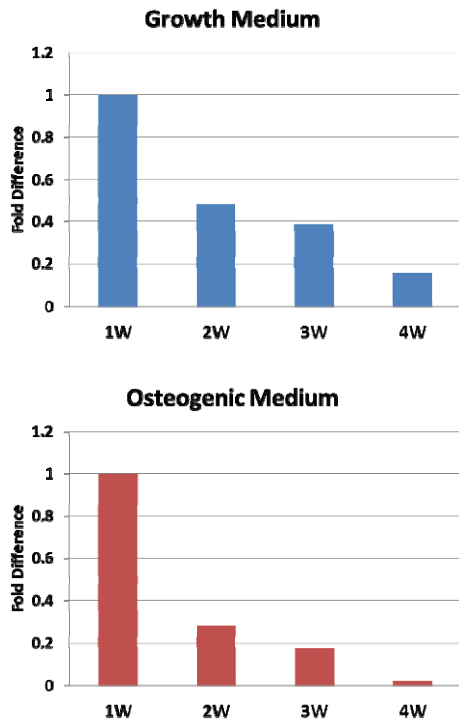
また、図 1 中央に示す Nanog-GFP だが、用いた iPS 細胞は、未分化マーカーである Nanog のプロモーターにて GFP を発現しているため、未分化な細胞は GFP 陽性である。Growth Medium で培養したものには未分化な細胞が残っていることが分かる。Osteogenic Medium で培養したものについても一部未分化な細胞

胞が残っているが、Alizarin Red で染色された部位には未分化な細胞が残っていないことが分かる。

●未分化マーカー Nanog の発現レベルの変化

Nanog の発現を Real-Time PCR 法で確認した。図 2 に示すようにコントロール群 (Growth Medium) とテスト群 (Osteogenic Medium) いずれも経時的に Nanog の発現が減少しているのが認められた。

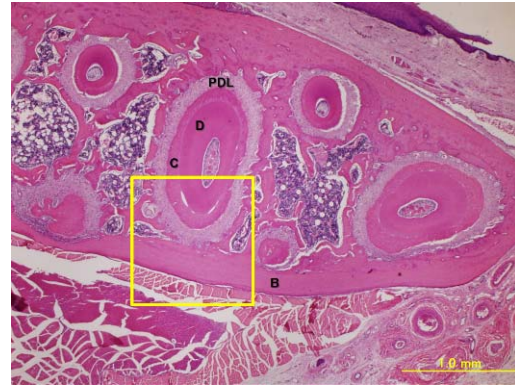
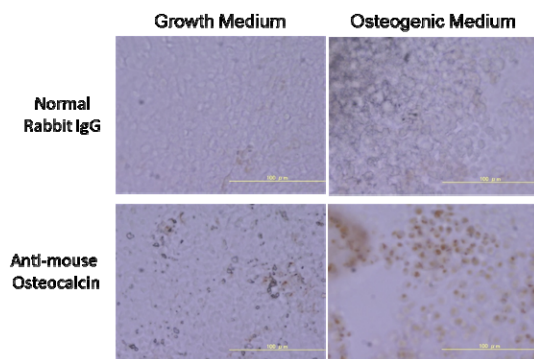
図 2 Nanog 発現量の経時的变化



●細胞免疫染色 (オステオカルシン)

骨分化刺激から4週後に、骨芽細胞マーカーの1つであるオステオカルシンを細胞免疫染色にて確認した。その結果を図3に示す。左に Growth Medium、右に Osteogenic Medium を示す。上段はコントロール IgG、下段に抗オステオカルシン抗体にて染色したものを示す。骨分化培地で培養することで、オステオカルシンの発現を認めた。

図 3 Osteocalcin を細胞免疫染色にて観察



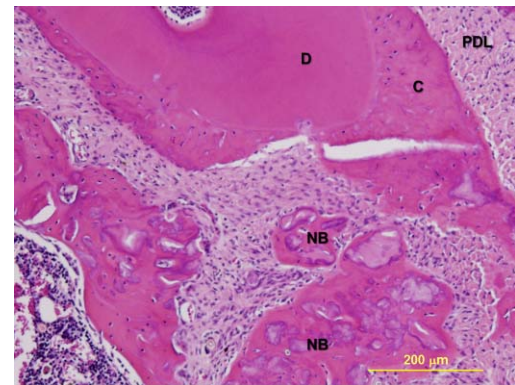
B = 歯槽骨 ; C = セメント質; D = 象牙質; PDL = 歯根膜

●骨分化刺激したマウス iPS 細胞のラット歯周組織欠損への移植

図 4A 正常組織 (頬舌断)

四角で囲った部位を評価対象とした。

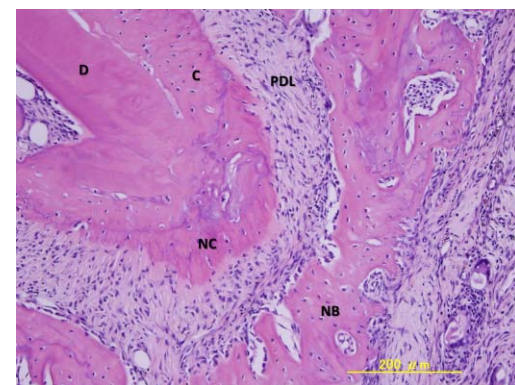
図 4B コントロール群



NB = 新生骨; C = セメント質; D = 象牙質; PDL = 歯根膜

本研究では、コントロール群においてもある程度の新生骨の形成が確認できたが、新生セメント質はほとんど認められなかった。

図 4C テスト群



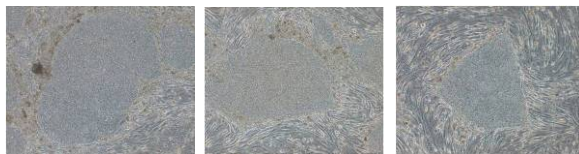
NB = 新生骨; C = セメント質; NC = 新生セメント質; D = 象牙質; PDL = 歯根膜

図 4C に示すように、テスト群では新生骨のみならず、新生セメント質様組が織象牙質上に認められた。

以上のことから、移植した iPS 細胞の動態について詳細は不明であるが、新生セメント質や新生骨の再生には少なくとも移植した部位の微小環境が影響していると思われる。また、iPS 細胞の分化制御は現段階では困難であるが、歯周組織再生における細胞ソースとして iPS 細胞の可能性が示唆された。

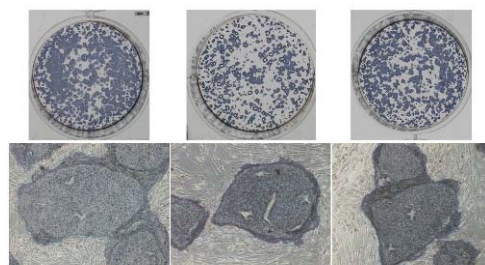
(2) ヒト歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞の樹立
 ピックアップしたコロニーの中から 3 クローンが ES 細胞様の形態と順調な増殖を示した。形態写真を図 5 に示す。

図 5 iPS 細胞 3 クローンの外観



培養した 3 クローンについて、TRACP & ALP double stain kit を用いたアルカリホスファターゼ染色を行い、陽性であることを確認した。染色結果の写真を図 6 に示した。

図 6 アルカリホスファターゼ染色



得られたヒト歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞について、RT-PCR 法を用いて hES 細胞のマーカー発現を調べた。図 7 に示すように、Nanog, KLF4, Oct3/4, Sox2, DPPA4, Rex1 いずれのマーカーも発現していた。

図 7 hES 細胞のマーカー遺伝子発現

	IPS KS2-2	HGF	MEF	Non-Template
Nanog	+	-	-	-
KLF4	+	-	-	-
Oct3/4	+	-	-	-
Sox2	+	-	-	-
DPPA4	+	-	-	-
Rex 1	+	-	-	-
GAPDH	+	+	+	+

ヒト歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞の多分化能を確認するために、SCID マウスを用いて奇形種形成実験を行った。図 8 に示すように、

内胚葉、中胚葉、外胚葉系組織への分化を確認できた。

図 8A 腸管腔と考えられる組織

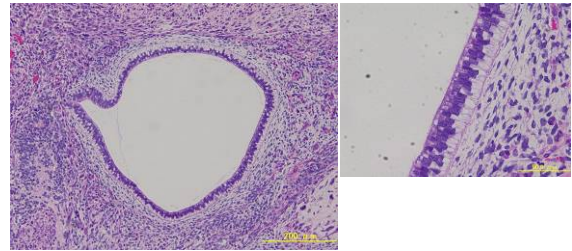


図 8B 軟骨と考えられる組織

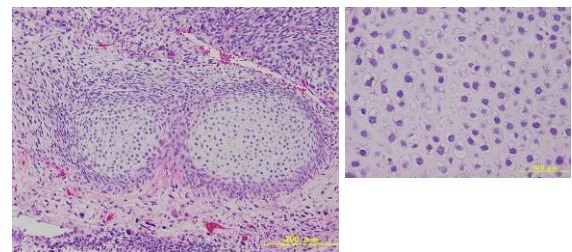
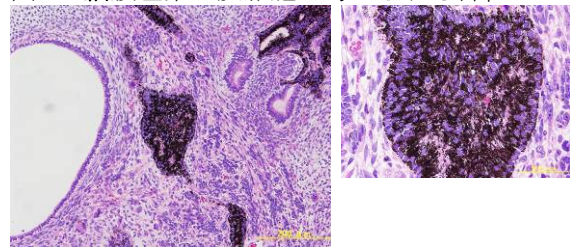


図 8C 網膜色素上皮細胞と考えられる部位



以上のことから、得られたヒト歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞は、hES 細胞のマーカーを発現しており、3 胚葉への分化能を持つことから、hES 細胞と同様の性質を持っていると考えられ、iPS 細胞を用いた次世代型歯周組織再生療法開発の基盤を築くことができた。

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計5件)

① Shirakata Y, Taniyama K, Yoshimoto T, Takeuchi N, Noguchi K. Effect of bone swaging with calcium phosphate bone cement on periodontal regeneration in dogs. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011 in Press, 査読有り

② Yoshinori Shirakata, Naoshi Takeuchi, Takehiko Yoshimoto, Katsuyoshi Taniyama, Kazuyuki Noguchi. Effects of enamel matrix derivative and basic fibroblast growth factor with β -tricalcium phosphate on periodontal regeneration in 1-wall intrabony defects: An experimental study in dogs, Int J Periodont Rest Dent, 2011 in press, 査読有り

③ Shirakata Y, Taniyama K, Yoshimoto T, Miyamoto M, Takeuchi N, Matsuyama T, Noguchi K. Regenerative effect of basic fibroblast growth factor on periodontal healing in two-wall intrabony defects in dogs. J Clin Periodontol. 2010, 37(4):374-81. 査読有り

④ Yonamine Y, Matsuyama T, Sonomura T, Takeuchi H, Furuichi Y, Uemura M, Izumi Y, Noguchi K. Effectable application of vascular endothelial growth factor to critical sized rat calvaria defects. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010;109(2):225-31. 査読有り

〔学会発表〕(計3件)

① 白方良典 竹内尚士 吉元剛彦 谷山勝義 野口和行、イヌの1壁性骨欠損における β -TCPを基材としたEMDおよびbFGF併用による歯周組織再生 第54回春季日本歯周病学会 2011年5月28日 (福岡)

② 迫田賢二 野口和行、iPS細胞による次世

代型歯周組織再生療法を目指した研究 日本歯科医学会 第27回「歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い」2011年1月4日 (東京)

③ 迫田賢二 白方良典 中村利明 松山孝司 野口和行、骨分化刺激したマウス iPS 細胞のラット歯周組織欠損への移植 第53回秋季日本歯周病学会 2010年9月19日(香川)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 和行 (NOGUCHI KAZUYUKI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90218298

(2) 研究分担者

松山 孝司 (MATSUYAMA TAKASHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：40253900

迫田 賢二 (SAKODA KENJI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：70419654