

## 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：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22792093

研究課題名（和文）：iPS細胞の歯周組織幹細胞への分化誘導機構の解明－幹細胞ニッチからのアプローチ

研究課題名（英文）：Induced pluripotent stem (iPS) cells in co-culture with periodontal ligament cells

研究代表者：迫田 賢二 (SAKODA KENJI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：70419654

## 研究成果の概要（和文）：

本研究はiPS細胞を歯周組織幹細胞へ導くために、歯周組織幹細胞ニッチとして考えられる歯周組織由来細胞とiPS細胞を共培養することを試みた。

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ところ、新生骨と、新生セメント質様組織が形成された。次に、歯根膜由来細胞とiPS細胞を共培養した。遺伝子発現を網羅的に解析したところ、骨形成関連遺伝子の発現が上昇すると同時に、そのシグナルが抑制されるような遺伝子発現の変化を認めた。

## 研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to induce the periodontal ligament stem cells from iPS cell by co-culture with periodontal ligament 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.

In the co-culture system, undifferentiated iPS cells were decreased. We investigated the gene expression using PrimerArray®. The differentiated iPS cells increased BMP-2, TGF-β2, and Noggin mRNA expression levels compared with control, while Smad9 and BMPR-1b mRNA expression level were decreased. Further studies are necessary.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
総 計	3,000,000	900,000	3,900,000

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、再生・組織、組織幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病により破壊される歯周組織は歯槽骨、セメント質、歯根膜といった複数の異なる組織によって構成されていることから、多分化能を持つ iPS 細胞は歯周組織再生のための有力な細胞ソースとして考えられる。最近、歯周病治療においても臨床応用されている再生療法であるが、歯周組織再生療法は歯根膜に存在する幹細胞、いわゆる「歯周組織幹細胞」を幹細胞源としている。この歯周組織幹細胞を対象とした研究については、Seo らによりその多分化能が証明され (*Lancet* 2004 ; 364 : 149-55)、申請者のグループもその特徴を報告してきた (*J Periodont Res.* 2006; 41:303-10)。このように、歯周組織幹細胞が歯根膜中に存在し、その特徴についても詳細が明らかになりつつあるが、歯周組織幹細胞を制御する細胞周辺環境 (ニッチ) については報告されていない。また、iPS 細胞から歯周組織幹細胞への分化を決定づける周辺環境については不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、歯周組織幹細胞ニッチからのアプローチにより、iPS 細胞から歯周組織幹細胞への分化誘導を確立することである。

## 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

#### ●ラット開窓型骨欠損モデルの作製と iPS 細胞移植

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。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) マウス iPS 細胞と歯周組織由来細胞との共培養による、iPS 細胞の動態変化  
使用細胞：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。フィーダー細胞には、コントロール群としてマウス胎児線維芽細胞 (MEF)、テスト群としてラッ

ト歯根膜由来細胞 (rPDL)、マウスセメント芽細胞を用いた。これらのフィーダー細胞は、Mitomycin C 処理にて細胞増殖を停止させ、さらに、細胞表面を CM-DiI にて蛍光標識した。6 日間の共培養の後、1 回継代しフィーダー細胞フリーで培養したものを蛍光顕微鏡で観察し、さらに tRNA を抽出し遺伝子発現パターンの解析を行った。

### (3) ヒト iPS 細胞の間葉系幹細胞様細胞への分化

ヒト iPS 細胞は当研究室で樹立したものを使用。間葉系幹細胞様細胞への分化は Mahmoodi らの方法 (*Journal of Bone and Mineral Research* Vol. 25 No. 6, 2010, 1216-1233) に準じた。分化能を確認するため、骨分化刺激と脂肪細胞分化刺激を行った。

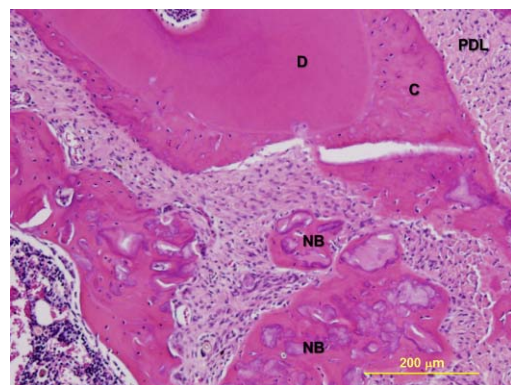
## 4. 研究成果

### (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



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

図 1 A 正常組織 (頬舌断)  
四角で囲った部位を評価対象とした。



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

図 1 B コントロール群

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。

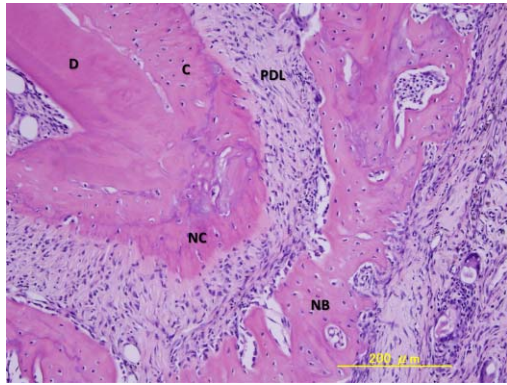


図 1C テスト群

図 1C 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織が象牙質上に認められた。

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。

次に、iPS 細胞が歯周組織由来細胞から受ける影響についてマウス iPS 細胞と歯周組織由来細胞との共培養を確立し、*in vitro* で解析を行った。

(2) マウス iPS 細胞と歯周組織由来細胞との共培養による、iPS 細胞の動態変化

#### ●顕微鏡像

・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。図 2 に示すように、フィーダー細胞は CM-DiI で細胞標識された。

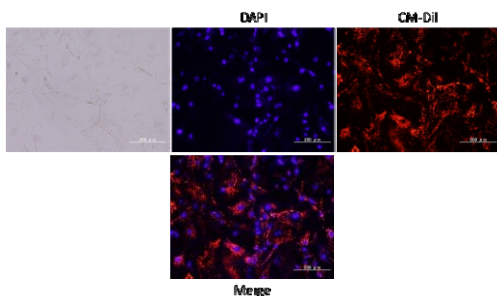


図 2 MEF の蛍光顕微鏡像

DAPI により核染色を行い (青)、CM-DiI により細胞表面を標識した (赤)。

6 日間の共培養の後、1 度継代し、フィーダーフリーの状態にして細胞の状態を観察した。図 3 にその状態を示す。

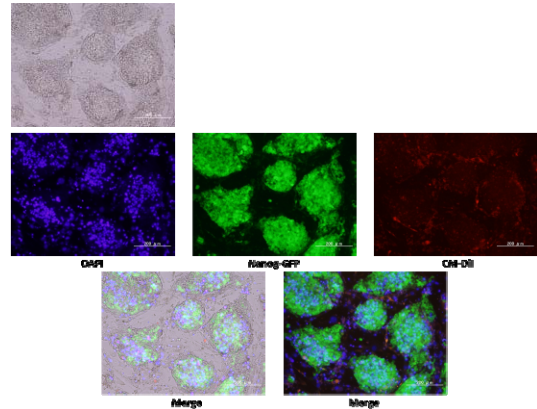


図 3A 通常培養後 (コントロール) の iPS 細胞

1 度継代することで、ほとんどのフィーダー細胞 (MEF) は除去された。iPS 細胞は Nanog 陽性で、未分化な状態が保たれている。

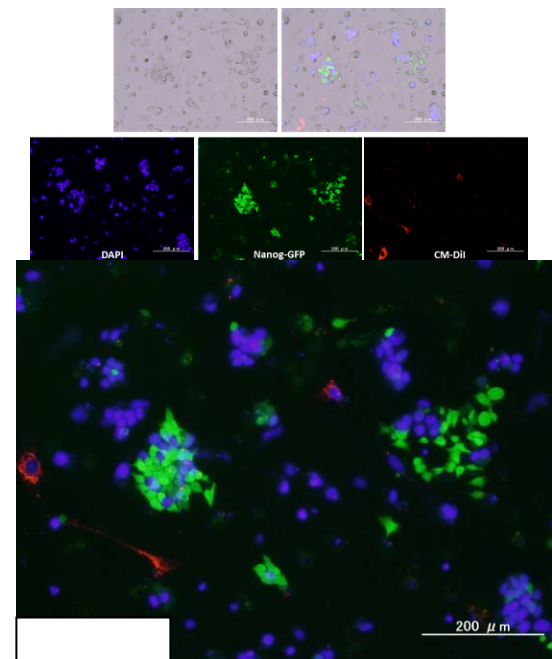


図 3B rPDL との共培養後の iPS 細胞 1 度継代することで、ほとんどのフィーダー細胞 (rPDL) は除去された。また、Nanog 陽性の未分化な iPS 細胞は存在するものの、コントロールに比べるとその割合は減少している。すなわち、rPDL の影響により iPS 細胞が分化したことを示している。

セメント芽細胞との共培養では、原因は分からないが、培養 5 日目で細胞が剥がれてしまった。

次に、rPDL の iPS 細胞への影響について、遺伝子発現解析を行った。



歯根膜細胞のマーカである S100A4 と Periostin について RT-PCR 法にて検討した。図 4 に示すように、S100A4 の発現は確認できなかったが、Periostin の発現は上昇していた。

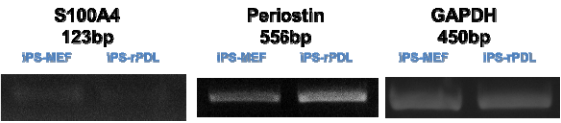


図 4 歯根膜細胞マーカーの発現

次に、PrimerArray® (Wnt signaling pathway、Cytokine-cytokine receptor interaction、TGFβ signaling pathway) にて遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。

図 5 Wnt signaling pathway

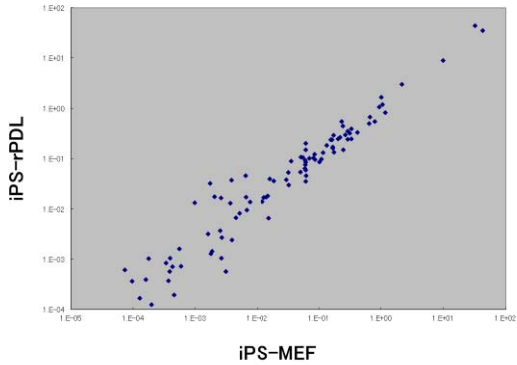


図 5 A Scatter Plot

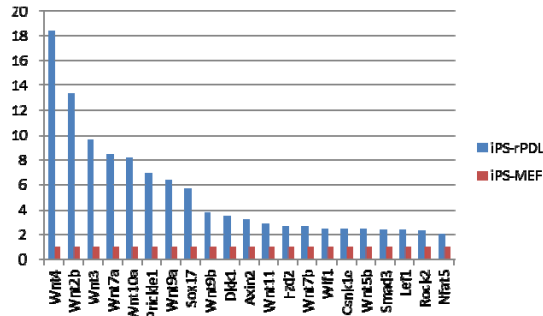


図 5 B 発現が亢進した遺伝子群

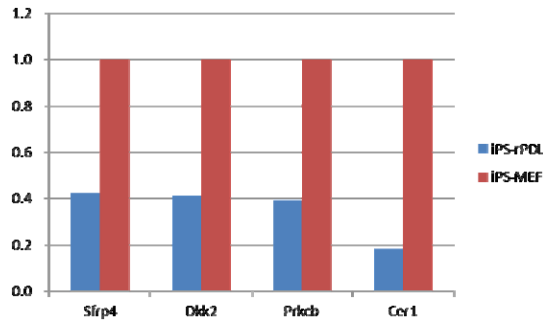


図 5 C 発現が減少した遺伝子群

Wnt 関連遺伝子で発現の上昇がみられたのは、Wnt2b, Wnt3, Wnt4, Wnt5b, Wnt7a, Wnt7b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt11 であった。逆に抑制されたものは、Sfrp4, Dkk2, Prkcb, Cer1 であった。Wnt/β-カテニン経路は、脊椎動物および無脊椎動物の発生における細胞運命決定を調節している。発生過程において、Wnt/β-カテニン経路は、多くの異なる細胞種や組織において、レチノイン酸、FGF、TGF-β、BMP などの多様な経路からのシグナルを統合する役目を担う。しかしながら、詳細については、不明な点が多く、今後さらなる解析が必要である。

図 6 Cytokine-cytokine receptor interaction

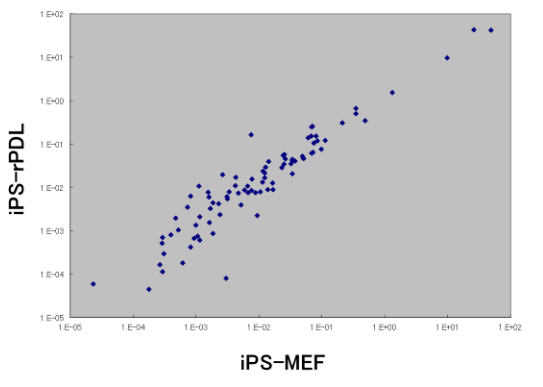


図 6 A Scatter Plot

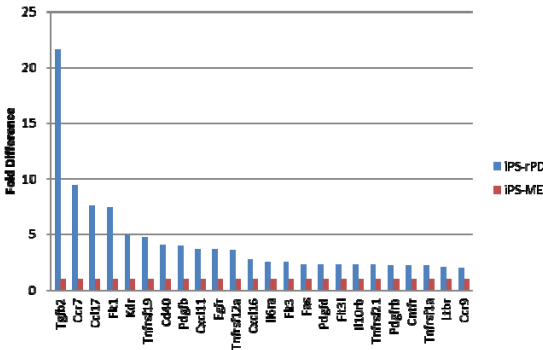


図 6 B 発現が亢進した遺伝子群

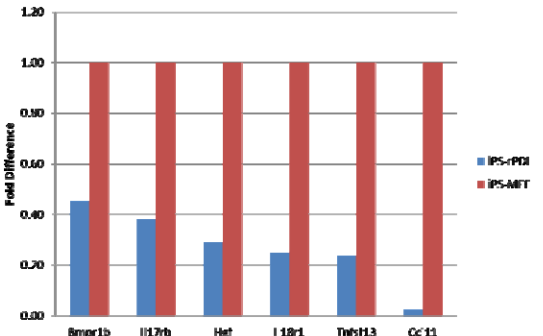


図 6 C 発現が減少した遺伝子群

サイトカインとレセプターの発現をみたこのアレイでは、TGFb2 の遺伝子発現が著しく上昇していた。また、BMPR-1b の発現が減少していた。

図 7 TGFβ signaling pathway

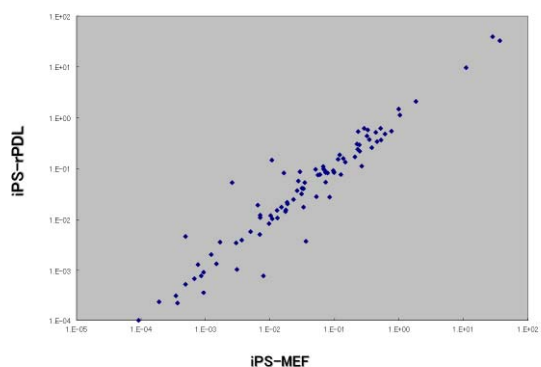


図 7 A Scatter Plot

図 7 B 発現が亢進した遺伝子群

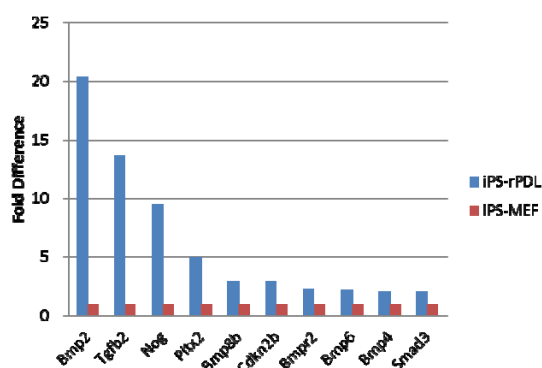
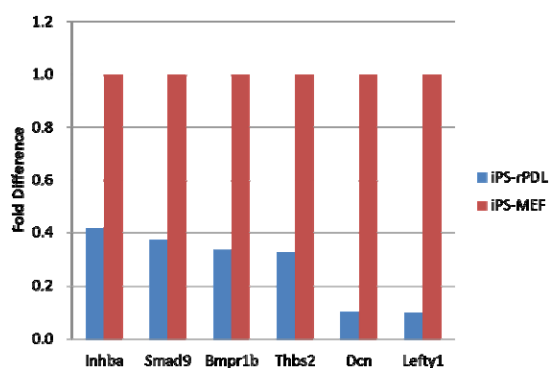


図 7 C 発現が減少した遺伝子群



TGFβ signaling pathway 関連遺伝子では、BMP2、TGFb2 の発現が著しく、また、BMP2 のアンタゴニストである Noggin の発現も上昇していた。一方で、Smad9 や BMPR-1b の発現が減少していた。

これまでのことから、iPS 細胞を直接歯周組織関連細胞へ分化させるには不明な点が多く、現時点では困難であることが分かった。そこで、今後は iPS 細胞を一度間葉系幹細胞へ分化させ、そこでの歯周組織由来細胞の影響を調べていく予定である。

(3) ヒト iPS 細胞の間葉系幹細胞様細胞への分化

ヒト iPS 細胞の間葉系幹細胞様細胞への分化は現在進行中である。分化することは可能であるが、問題は分化した細胞の純度である。現在、高純度の間葉系幹細胞への分化法を模索しているところである。

## 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)

〔学会発表〕(計 2 件)

①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)

②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

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