

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592905

研究課題名(和文)口腔粘膜由来 iPS 細胞を用いたセメント質・歯根膜再生型インプラントの開発

研究課題名(英文)The development of the cementum / periodontal membrane reproduction type implant with induced pluripotent stem cells derived from oral mucosa

研究代表者

豊田 長隆 (TOYODA, NAGATAKA)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：80257344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜由来 iPS 細胞とエムドゲイン、マトリゲルの存在下に HAT-7 細胞との共培養にて、iPS 細胞株の細胞増殖、形態変化、ならびに歯の発生過程で発現する転写因子である Msx1、Pax9、Lhx6 の発現と共培養でラット歯原性上皮細胞(HAT-7)表面における Pax 誘導因子の存在とラット歯原性上皮細胞(HAT-7)表面における Pax 9 の誘導活性を認めた。

エムドゲイン、マトリゲル、GFR マトリゲルに含まれる細胞成長因子を抗体アレイおよび Bio-Plex サスペンションアレイシステムを用いて網羅的に解析したが細胞成長因子の同定には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Under existence of a lining-of-the-mouth origin iPS cell, Emdogain, and Matarigel, in co-culture with HAT-7 cell, The cell growth of an iPS cell stock, altered morphology, And existence of the Pax inducing factor in the rat odontogenic epithelial cell (HAT-7) surface and the inducible activity of Pax9 in the rat odontogenic epithelial cell (HAT-7) surface were accepted by the revelation and co-culture of Msx1, Pax9, and Lhx6 which are the transcription factors revealed in a dental generating process. Although the cell growth factor contained in Emdogain, Matigel, and GFR Matarigel, was comprehensively analyzed using the antibody array and the Bio-Plex suspension array system, it did not result in identification of a cell growth factor.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：再生歯学 口腔粘膜由来 iPS 細胞

1. 研究開始当初の背景

本格的高齢社会に突入したわが国においては、高齢者の約8割が相当数の歯を喪失しており、その大部分が義歯や歯科用インプラントなどの人工物での機能補填により治療されている。このことから今後わが国国民、特に高齢者の生活の質 (Quality of Life) の向上を図る上で、歯の再生医療実現の意義は大きいと考えられる。歯を含む種々の臓器や組織の再生を目指す上で重要なことは、安定した幹細胞の供給源を確保することであり、現在胚性幹細胞 (ES 細胞)、成体幹細胞、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いた研究が活発に行われているが、なかでも倫理的な問題がなく、ES 細胞に匹敵する多能性を有する iPS 細胞には大きな期待が寄せられている。iPS 細胞を応用した再生医療を実現するためには、細胞の入手が容易であり個々の患者の負担が軽い組織から iPS 細胞作製のための細胞を入手することが重要であるが、本研究の研究分担者はヒト口腔粘膜由来 iPS 細胞の樹立に成功した (J Biosci Bioeng 110, 345-350, 2010)。

また、これまでに本研究の分担者はマウス骨髄間質細胞由来成体幹細胞とエナメルマトリックスタンパク質 (エムドゲイン®)、基底膜マトリックス (マトリゲル®) などの細胞外基質を利用したラット歯原性上皮細胞株 (HAT-7) との共培養系を用いて、この細胞の歯原性間葉細胞 (歯髄細胞、象牙芽細胞、セメント芽細胞、歯根膜細胞、固有歯槽骨細胞へ分化する) への分化誘導を試み、歯原性間葉細胞に発現することが明らかとなっている Msx1、Lhx6、Pax9 の遺伝子発現について検索したところ、(1) エムドゲイン® が Msx1 および Lhx6 の発現を誘導すること、(2) マトリゲル® が Msx1 の発

現を誘導すること、(3) GFR マトリゲル® (含まれる生理活性物質を除いたマトリゲル®) は誘導活性を失っていること、(4) Pax9 は HAT-7 細胞の共存下のみ誘導されること、(5) HAT-7 の培養上清中には誘導活性が認められないことが明らかとなった。(日口外誌 55, 474-481, 2009)。この結果は、骨髄間質細胞が歯原性間葉細胞への分化能を有しているとともに、エムドゲイン®、マトリゲル® 中および HAT-7 細胞表面に幹細胞を歯原性間葉細胞へ分化誘導する因子が含まれていることを強く示唆している。

2. 研究の目的

このような研究結果を踏まえ、本研究はエムドゲイン® およびマトリゲル® 中に含まれている歯原性間葉細胞分化誘導因子、HAT-7 細胞表面上に発現していると考えられる分化誘導因子の同定を行うとともに、口腔粘膜由来 iPS 細胞の歯原性間葉細胞への分化誘導を行い、さらに口腔粘膜由来 iPS 細胞のセメント芽細胞、歯根膜細胞への分化誘導を試みるとともに、その分化誘導条件の確立を目指すことを目的とする。さらに明らかとなった分化誘導因子のチタン表面への固定化を図ることにより、セメント質・歯根膜再生型インプラントの開発を最終的な目的とするものである。

3. 研究の方法

(1) 口腔粘膜由来 iPS 細胞の歯原性間葉細胞への分化誘導

われわれが以前に報告 (日口外誌 55, 474-481, 2009) した骨髄間質由来成体幹細胞の歯原性細胞への分化誘導についての研究で用いた方法に準じ、われわれがすでに保有する口腔粘膜由来 iPS 細胞とエムドゲイン、マトリゲルの存在下に

HAT-7 細胞との共培養を行い、iPS 細胞株の細胞増殖、形態変化、ならびに歯の発生過程で発現する転写因子である Msx1、Pax9、Lhx6 の発現について RT-PCR 法、Western blot 法を用いて検討した。

(2) ラット歯原性上皮細胞(HAT-7)表面における Pax 誘導因子の存在の確認

HAT-7 細胞表面に Pax9 の発現を誘導する分子が存在していることを確認するため、HAT-7 細胞をコンフルエントの状態まで培養した後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、細胞の生命活動を停止させるとともに細胞膜表面上に存在しているタンパク性分子を固定した HAT-7 細胞を PBS にて十分洗浄した後、口腔粘膜由来 iPS 細胞を播種し、Pax9 の誘導活性の存在について検討した(図1)。

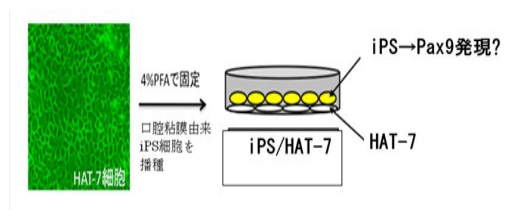


図1

(3) 各種細胞外基質中の存在する分化誘導因子の同定

エムドゲイン[®]、マトリゲル[®]、GFR マトリゲル[®](生理活性物質を生化学的方法により除去したマトリゲル[®])および HAT-7 細胞の歯原性間葉細胞分化誘導活性の差に着目し、それぞれに含まれる細胞成長因子を抗体アレイおよび Bio-Plex サスペンションアレイシステムを用いてタンパク質レベルで網羅的に解析した。

それぞれの細胞外基質あるいは細胞膜表面に存在している細胞成長因子の組成の違いから、Msx1、Lhx6、Pax9 のそれぞれに対する誘導因子の同定に

たり、1) エムドゲイン[®]とマトリゲル[®]との比較から Lhx6 の誘導因子、2) マトリゲル[®]と GFR マトリゲル[®]との比較から Msx1 の誘導因子、3) エムドゲイン[®]と HAT-7 細胞の細胞膜との比較から Pax9 の誘導因子についてそれぞれ同定を行った(図2)。

また同様の方法により、歯原性間葉細胞に発現することが知られている Gli2 および Barx1 の遺伝子発現を誘導する分子についても同定を行う。さらに、これらの因子を用いて口腔粘膜由来 iPS 細胞の培養を行い、periostin、N-tenascin 等の発現および石灰化基質形成能を指標として、セメント芽細胞、歯根膜細胞への分化誘導条件の確立について検討した。

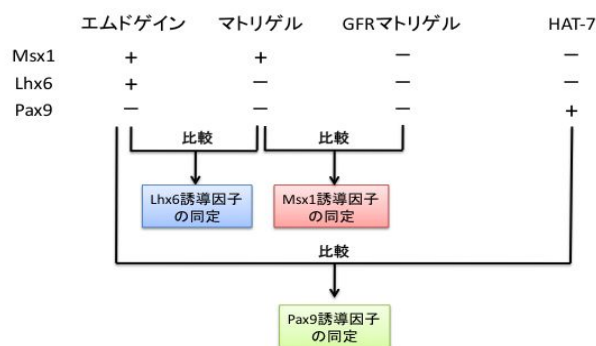


図2

4. 研究成果

(1) 口腔粘膜由来 iPS 細胞の歯原性間葉細胞への分化誘導

口腔粘膜由来 iPS 細胞とエムドゲイン、マトリゲルの存在下に HAT-7 細胞との共培養にて、iPS 細胞株の細胞増殖、形態変化、ならびに歯の発生過程で発現する転写因子である Msx1、Pax9、Lhx6 の発現を認めた。

(2) ラット歯原性上皮細胞(HAT-7)表面における Pax 誘導因子の存在の確認
HAT-7 細胞をコンフルエントの状態

まで培養した後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、細胞の生命活動を停止させるとともに細胞膜表面上に存在しているタンパク性分子を固定した HAT-7 細胞を PBS にて十分洗浄し、口腔粘膜由来 iPS 細胞を播種したところ、ラット歯原性上皮細胞(HAT-7)表面における Pax 9 の誘導活性を認めた。

(3) 各種細胞外基質中の存在する分化誘導因子の同定

エムドゲイン[®]、マトリゲル[®]、GFR マトリゲル[®](生理活性物質を生化学的方法により除去したマトリゲル[®])および HAT-7 細胞の歯原性間葉細胞分化誘導活性の差に着目し、それぞれに含まれる細胞成長因子を抗体アレイおよび Bio-Plex サスペンションアレイシステムを用いてタンパク質レベルによる網羅的に解析からでは細胞成長因子の同定には至らなかった。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 長隆 (TOYODA, NAGATAKA)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：80257344

(2) 研究分担者

里村 一人 (SATOMURA, KAZUHITO)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：80243715

早川 徹 (HAYAKAWA, TORU)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：40172994

佐藤 徹 (SATO, TORU)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：30170765