

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09622

研究課題名(和文) ウスタビガ菌シルクプロテインとiPS細胞による歯槽骨再生技術の開発

研究課題名(英文) Development of periodontal tissue regeneration method using hiPS cells and silk protein

研究代表者

菊池 和子 (Kikuchi, Kazuko)

岩手医科大学・歯学部・講師

研究者番号：40326690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯周組織は、常に慢性炎症が惹起されているので、炎症の制御が必要とされる。この研究の目的は、物質A(物質名は秘匿)がもつ治癒促進効果、抗炎症作用、抗菌性に関するエビデンスを確立し、iPS細胞と併用することで新規の歯槽骨再生技術を考案することである。治癒促進を評価するマウス皮膚炎モデルを確立し、炎症抑制効果を一部で認めた。また大腸菌とカンジダ菌で抗菌作用を調査したが、有意に抑制する効果は認めなかった。一方で、ヒトiPS細胞を神経堤細胞を経由して間葉系幹細胞に分化誘導する系、さらには骨芽細胞に誘導する系を確立した。-TCPとの混合物をこの間葉系幹細胞とともに移植すると硬組織形成が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周組織の再生において、細胞移植治療を行う場合、いかなるスキャホールドを使うかは重要な課題である。一般的に細胞の移植は、細胞の保持と周囲環境との問題があり、十分な成果が得られていない。特に歯周組織の場合、慢性炎症が存在し困難を有する。本研究におけるスキャホールドはそのような点を一部改善する効果があることが認められた。さらにヒトのiPS細胞を用いた移植でも骨の再生が認められ、今後改善する点があるものの、将来の歯周組織再生に生かせると考えられた。

研究成果の概要(英文)：It is very important to control the infection in the case of periodontal regeneration, because the periodontal tissues are always exposed to the oral bacteria. The purpose of this project is to establish the effect on bioproduct A derived from some insects in the healing acceleration, anti-bacteria, anti-inflammatory and to develop new periodontal tissue regenerative method using human iPS cells and biomaterial scaffold of bioproduct A. In the experiment using the mouse skin irritation model, the products exhibited the effect of healing acceleration in some degree, but not that of anti-bacteria in the point of pelage regeneration. We succeeded the induction of osteoblast from human iPS cells via induction of neural crest like cells and mesenchymal stem cells, and product regenerative bone tissue from human iPS cells-mesenchymal stem cells using transplantation methods into SCID mice.

研究分野：小児歯科学・障害者歯科学

キーワード：骨再生 歯周組織再生 昆虫産物 ヒトiPS細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨の再生には、乾燥骨、アパタイトなどの人工骨移植を用いる方法、間葉系幹細胞や iPS 細胞などの細胞移植を用いる方法など様々な方法が報告されている。しかし、基本的に移植に用いる生体材料は細菌感染の温床になりやすく、歯周組織のように常に口腔内の感染にさらされており、慢性的な炎症が惹起されている中での、骨の再生は失敗するリスクが大きい。従って、歯周組織への移植には、生体安全性の他に抗菌性や抗炎症作用などの特性を持った生体材料が望ましいと考えられる。

シルクは、外科手術用の縫合糸として従来から使用されている安全性の高い生体材料である。シルクファイブロインスポンジは、形態学的な加工が容易であること、生分解性がポリ乳酸の約 3 倍程度遅く、生体での形態維持に効果的であること、移植中は全く炎症を引き起こさないなどの特徴から、血管内皮細胞の足場としての人工血管や骨芽細胞、角膜の移植用スキャホールドとしての応用研究が行われている(カイコを利用した医薬品原料や医療機器等の開発の手引き、農林水産省委託プロジェクト研究報告書より)。このような農産物資源開発の国家プロジェクトの中で、昆虫の種類によっては特別の機能的特性をもった物質が見いだされており、例えば同じシルクでもより弾力性の高いスズメバチシルクなどを用いたスキャホールド作製も試みられている。ウスタビガ(チョウ目ヤママユガ科)の繭の抽出液は、岩手県南部で古くから民間療法の口内炎治療薬として使用されてきたが、我々の研究でこの抽出液が、炎症を引き起こす COX2 の産生を選択的に抑制することを見いだした。ウスタビガ繭の抽出液は抗炎症性や抗菌性をもつことから、我々の居住する岩手県南部で古くからの民間療法の口内炎治療薬として使用されてきた。

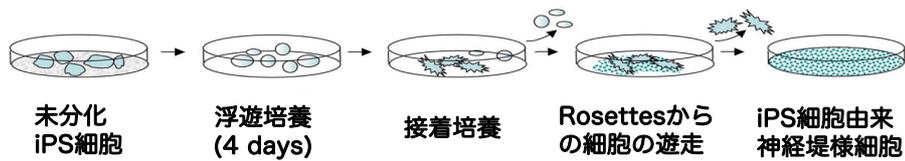
我々は、iPS 細胞から神経堤細胞を樹立して、象牙芽細胞に分化させる方法を世界で初めて報告した(Stem Cells Dev. 1;21(7):1156-64. 2012)。この結果を応用して、研究代表者はまた、iPS 細胞から神経堤細胞、さらに間葉系幹細胞への分化を経由させて効率的に骨芽細胞に分化させ、骨再生に応用する研究を報告した(J Hard Tissue Biol. 27(1) 1-10 2018)。そこで我々の研究グループでは、昆虫由来天然化合物に関する研究と iPS 細胞による再生医療の開拓の両面で、再生医療の分野へと展開することを考案した。

### 2. 研究の目的

歯周組織などの炎症や感染のリスクを伴う組織への生体材料として、繭の産物は他のスキャホールドよりも有用性の高い結果が得られるのではないかと仮説を検証する。このスキャホールドの治癒促進効果、抗炎症作用、抗菌性に関する科学的エビデンスを確立するとともに、従来のスキャホールドとしての実績を活かしてヒト iPS 細胞による新規の歯槽骨再生技術を考案する。

### 3. 研究の方法

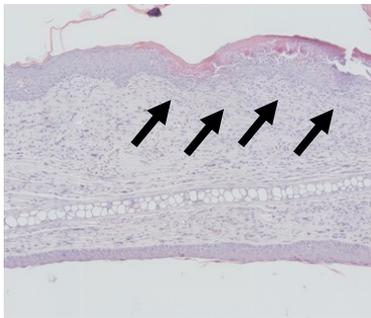
- 1) 抗炎症性効果を検証するための皮膚炎モデルマウスを作製する。マウス背部皮膚にピオスタ AD を 100mg を週に 2 回、計 6 回投与し、皮膚炎が惹起される期間ならびに物質 A における治癒促進効果を検証した。コントロールとしてグリセリンを用いた。
- 2) 抽出物の抗菌作用の解析。寒天培地に菌液を接種し、滅菌ろ紙ディスクを設置した。ろ紙ディスクに物質 A~F の懸濁液を 10 $\mu$ l 接種した。陽性コントロールとして、アンピシリン 100mg/ml、ファンギゾン 250  $\mu$ g/ml を用いた。48 時間培養(37°C)を行い、阻止円の形成によって抗菌性を評価した。
- 3) ヒト iPS 細胞から神経堤細胞への分化。ヒト iPS 細胞をフィーダーフリーヒト iPS 細胞維持培地にて培養を維持した。マトリゲルあるいはゲルトレックス含有培地に切り換えて、低付着性培養プレートにて浮遊培養にてスフェロイドを形成させ、その後神経分化誘導培地にてゲルトレックスコートプレートにて培養することで付着させる。遊走してきた細胞を神経堤細胞とする。Stem Cells Dev. 1;21(7):1156-64. 2012 をベースとした基本的培養方法の流れを下記に示す。



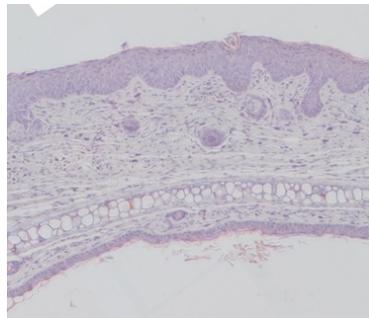
- 4) ヒト iPS 細胞から間葉系幹細胞への分化。上記の細胞を血清含有 DMEM/hamF-12 培地に切り換えることで間葉系幹細胞に誘導する。その後、骨分化誘導培地にて培養後、アリザリンレッド染色にて骨分化(石灰化)を確認した。
- 5) iPS 細胞由来間葉系幹細胞と  $\beta$ -TCP に物質 Aa を添加して SCID マウスの頭蓋骨の骨膜下あるいは皮下に移植して一ヶ月後の骨形成能を評価した。

#### 4. 研究成果

- 1) 皮膚炎モデルマウスの作製と繭抽出物の治癒促進効果について。物質 B については、一部において、下図に見られるように抗炎症効果や毛の再生等の現象が観察されたが、症状が多様であり、十分な効果の検証についてはさらなる解析が必要であった。



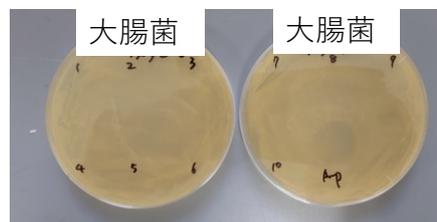
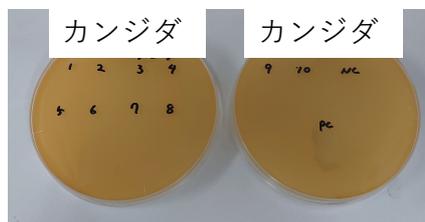
ビオスタを塗布すると、皮膚に潰瘍を伴った炎症が惹起される。



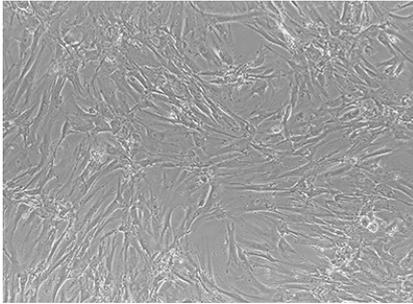
物質Bを塗布した場合は、皮膚に生じた炎症を和らげ、治癒促進効果が一部に見られた。

- 2) 抗菌作用に関する結果

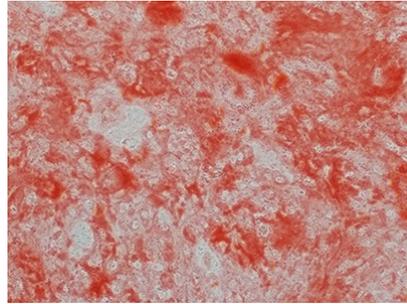
大腸菌ならびにカンジダ菌を用いて、物質 A~I について抗菌効果を検討した。コントロールとしてのアンピシリンやファンギズンは優位な阻止円を形成したが、サンプルについてはこれらの既存の抗生物質と比べると明確な効果を得ることはできなかった。しかし、細菌数の減少などについては、今後検討を継続する必要がある、全く抗菌効果がなかったとは判断できない。



- 3) ヒト iPS 細胞から神経堤細胞、間葉系幹細胞さらに骨芽細胞への分化誘導上記方法に従って、神経堤細胞に分化誘導してさらに血清入り培地に交換することで間葉系幹細胞に分化した。さらに間葉系幹細胞に対して骨分化誘導培地にて培養を行うと石灰化を形成した。以上の結果より、ヒト iPS 細胞から骨芽細胞への分化誘導による骨芽細胞の作製には成功したと判断できる。

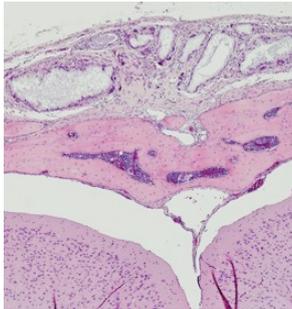


ヒトiPS細胞を間葉系幹細胞に分化誘導した。

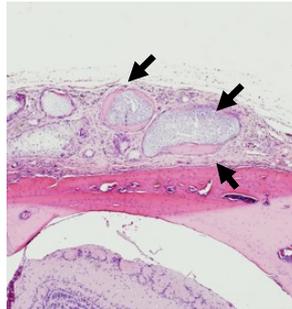


間葉系幹細胞を骨分化誘導培地に切り換えて骨芽細胞に分化誘導した。アリザリンレッド染色にて石灰化を確認した。

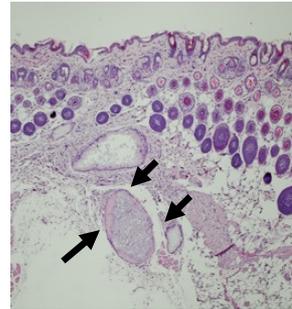
- 4) 物質 C と  $\beta$ -TCP, ヒト iPS 細胞由来間葉系幹細胞との組み合わせで, 頭蓋骨の骨膜下, あるいは皮下に移植して骨形成能を評価した。その結果, 物質 C を含有したものにおいて骨形成能が確認できた。しかし, 実験件数が少ないのでこの点についてはさらに実験を行う必要がある。またこれらの硬組織周囲においてヒト特異的抗体でヒト iPS 細胞由来間葉系幹細胞の存在が確認できなかったため, ヒト iPS 細胞由来間葉系幹細胞が直接骨形成を行ったとは断定できなかった。しかし, 幹細胞による周囲組織の修復誘導あるいは骨分化誘導によってマウス細胞を介して骨形成が行われたのではないかと推測した。



ヒトiPS由来間葉系幹細胞移植では  $\beta$ -TCP 周囲には石灰化は認めなかった。



ヒトiPS由来間葉系幹細胞,  $\beta$ -TCP に物質 C と共に移植すると周囲には石灰化は認められた。



ヒトiPS由来間葉系幹細胞,  $\beta$ -TCP に物質 C と共に皮下に移植した場合でも石灰化形成は認められた。

- 5) 考察。歯周組織は、常に感染にさらされており、慢性炎症が惹起されているので、他の組織再生とは異なり、常に炎症の制御が必要とされる。この研究の目的は、物質 A (物質名は秘匿) がもつ独特の治癒促進効果, 抗炎症作用, 抗菌性に関する科学的エビデンスを確立するとともに、iPS 細胞のスキヤホールドとして活かすことによって、新規の歯槽骨再生技術を考案することである。そこで、2018 年度に物質 A (治療促進効果, 組織学的解析, 炎症性メディエーターの発現を評価する実験系の確立のためのマウス皮膚炎モデルを確立した。またこの皮膚炎モデルに投与してコントロール群と比較したところ、炎症抑制効果を認めた。2019 年度においてこの炎症抑制効果について組織学的解析を進めた結果、治癒促進効果は明確に判定できなかった(統計的データが得られなかったため)。また物質 A ~ I において大腸菌とカンジダ菌で抗菌作用を調査したが、菌の増殖を有意に抑制する効果は認めなかった。一方で、ヒト iPS 細胞を神経堤様細胞 (NCLC) を経由して間葉系幹細胞に分化誘導する系、さらには骨芽細胞に分化誘導する系を確立した。加えて物質 A を  $\beta$ -TCP との混合物をヒト iPS 細胞由来間葉系幹細胞とともに SCID マウスに移植して骨形成の評価ならびに治癒促進効果について検討した結果、硬組織形成が確認できた。物質 A の有用性については、さらなる解析が必要であると考えられた。歯周組織の再生において細胞移植治療を行う場合、いかなるスキヤホールドを使うかは重要な課題である。一般的に細胞の移植は、細胞の保持と周囲環境とに問題があり、十分な成果が得られていない。特に歯周組織の場合、慢性炎症が存在し困難を有する。本研究におけるスキヤホールドはそのような点を一部改善する効果があることが認められた。さらにヒトの iPS 細胞を用いた移植でも骨再生が認められ、今後改善する点があるものの、将来の歯周組織再生に生かせると考えられた。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Harada Hidemitsu, Otsu Keishi	4. 巻 2019
2. 論文標題 Microdissection and Isolation of Mouse Dental Epithelial Cells of Continuously Growing Mouse Incisors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 3~11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-9012-2_1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Jimenez-Rojo Lucia, Pagella Pierfrancesco, Harada Hidemitsu, Mitsiadis Thimios	4. 巻 8
2. 論文標題 Dental Epithelial Stem Cells as a Source for Mammary Gland Regeneration and Milk Producing Cells In Vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1302~1302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells8101302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kim Eun-Jung, Yoon Kyung-Sik, Arakaki Makiko, Otsu Keishi, Fukumoto Satoshi, Harada Hidemitsu, Green David William, Lee Jong-Min, Jung Han-Sung	4. 巻 248
2. 論文標題 Effective Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells Into Dental Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 129~139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvdy.24663	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 原田英光、大津 圭史	4. 巻 24
2. 論文標題 歯の発生，萌出，乳歯歯根吸収および関連するトピックス	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 小児歯科臨床	6. 最初と最後の頁 14-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kazuko Kikuchi, Tomoyuki Masuda, Naoki Fujiwara, Akiyoshi Kuji, Hiroyuki Miura, Han-Sung Jung, Hidemitsu Harada and Kenshi Otsu	4. 巻 27
2. 論文標題 Craniofacial Bone Regeneration using iPS Cell-Derived Neural Crest Like Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Otsu Keishi, Ida-Yonemochi Hiroko, Ikezaki Shojiro, Ema Masatsugu, Hitomi Jiro, Ohshima Hayato, Harada Hidemitsu	4. 巻 148
2. 論文標題 Oxygen regulates epithelial stem cell proliferation via RhoA-actomyosin-YAP/TAZ signal in mouse incisor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.194787	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 稲葉陽, 池崎晶二郎, 原田英光, 森川和政, 大津 圭史
2. 発表標題 エナメル芽細胞におけるLPAシグナルの機能的役割
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuko Kikuchi, Tomoyuki Masuda, Naoki Fujiwara, Akiyoshi Kuji, Hiroyuki Miura, Han-Sung Jung, Hidemitsu Harada, Keishi Otsu
2. 発表標題 Craniofacial Bone Regeneration using iPS Cell-Derived Neural Crest Like Cells
3. 学会等名 第28回硬組織再生生物学会 学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊池和子, 久慈昭慶, 森川和政
2. 発表標題 iPS細胞由来神経堤細胞を用いた頭蓋顔面骨再生
3. 学会等名 第56回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊池和子, 藤原尚樹, 久慈昭慶, 三浦廣行, 原田英光, 大津圭史
2. 発表標題 iPS細胞由来神経堤細胞を用いた頭蓋顔面骨再生
3. 学会等名 第44回岩手医科大学歯学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	原田 英光  (Harada Hidemitsu)  (70271210)	岩手医科大学・歯学部・教授    (31201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------