



Title	マウス歯肉線維芽細胞由来iPS細胞の骨芽細胞分化能の解析
Author(s)	萱島, 浩輝
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59292
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

緒言

近年，歯科治療におけるインプラント治療では，自家骨を用いた骨移植や骨増生術などの再生治療が多く行われるようになった．ただし，高度顎堤吸収や腫瘍の摘出が原因で欠損部位が広範囲にわたるケースでは，大きい外科的侵襲，治癒期間の延長，術後の組織吸収などの問題が残っており，より低侵襲かつ確実な再生治療法の発展が求められている．近年，皮膚などの細胞に数個の遺伝子を導入することで細胞を初期化する人工多能性幹細胞（iPS 細胞）が発見された．個々の患者から作製した iPS 細胞は，胚性幹細胞（ES 細胞）や組織幹細胞が抱える問題を回避できる可能性を有していることから，歯や歯周組織の再生歯科医療への応用が期待されている．申請者らは，この iPS 細胞を歯肉から効率的に作製可能であることを報告してきたが，細胞を移植後に腫瘍化せずに骨組織へ確実に分化誘導する技術は確立されておらず，iPS 細胞の骨芽細胞分化機構も明らかになっていない．

本研究の目的は，歯肉由来 iPS 細胞を確実に骨芽細胞に分化誘導する手法を検討し，iPS 細胞を骨再生の移植材料として応用する技術を探索することである．

方法

マウス歯肉線維芽細胞および皮膚線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて c-myc 遺伝子を除いた Oct3/4, Sox2, Klf4 の山中因子を導入して iPS 細胞を作製した．導入後，フィーダー細胞上に形成したアルカリフォスファターゼ陽性の ES 細胞様コロニーを検出し，リプログラミング効率を算出した．

作製した iPS 細胞から胚様体を作製し，浮遊，接着状態の iPS 細胞胚様体あるいは胚様体をトリプシン処理し，分散した細胞を通常の骨芽細胞分化誘導培地で 30 日間培養した．iPS 細胞の比較対象には，マウス大腿骨より分離した骨髓由来間葉系幹細胞を用いた．また，分化誘導培地に骨芽細胞分化促進小分子化合物（シンバスタチン，フェナミル，レスベラトロール）を添加して iPS 細胞凝集体を培養した．また，温度応答性高分子である NIPAAm ゲルを用いて iPS 細胞の三次元細胞集合体を作製し，骨芽細胞分化誘導培地あるいはシンバスタチン存在下にて 30～50 日間分化誘導を行った．

分化評価として，骨芽細胞特異的遺伝子である Runx2, Osterix, BSP, Osteocalcin の発現を RT および Real time RT-PCR にて解析し，溶解細胞中のカルシウム濃度を MXB 法にて測定した．また，石灰化基質形成を von Kossa 染色および，走査型電子顕微鏡(SEM)観察で確認し，石灰化物をフーリエ変換

【11】

氏 名	萱 島 浩 輝
博士の専攻分野の名称	博 士（歯学）
学 位 記 番 号	第 25019 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 3 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学 位 論 文 名	マウス歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞の骨芽細胞分化能の解析
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 矢谷 博文 (副査) 教 授 村上 伸也 講 師 権田 知也 講 師 上松 節子

型赤外分光(FT-IR)、エネルギー分散型分析装置(EDX)および電子線回折を用いて解析した。

さらに、分化誘導した iPS 細胞集合体を SCID マウス背皮下へ移植し、飼育 28 日後の異所性の骨形成および腫瘍形成を評価した。

結果および考察

歯肉線維芽細胞は皮膚線維芽細胞よりも約 10 倍高いリプログラミング効率 (0.02%) を示した。また、骨芽細胞分化誘導における培養条件を検討した結果、iPS 細胞の胚様体のままで接着培養した場合に最も von Kossa 染色陽性面積が大きく、骨芽細胞特異的遺伝子の発現量が高かった。この条件で分化誘導した iPS 細胞の SEM 像には、豊富な細胞外基質に多くの石灰化物が観察され、細胞溶解液中には著明なカルシウムが検出された。また、FT-IR 解析の結果、分化誘導するに従って経時的にアミノ酸の豊富な基質の中にハイドロキシアパタイトに関連するリン酸基および炭酸アパタイトに関連する炭酸基を認め、EDX 解析においても、細胞表面に存在する石灰化基質にカルシウムとリンから構成されたアパタイトに関連するリン酸カルシウムを認めた。さらに、電子線回折解析の結果、ハイドロキシアパタイトの結晶構造を認めた。これらの骨芽細胞分化における iPS 細胞と骨髄由来間葉系幹細胞を比較検討した結果、iPS 細胞は骨髄由来間葉系幹細胞と同様の骨芽細胞分化能を示した。また、小分子化合物の添加は、iPS 細胞の骨芽細胞分化を著明に促進した。

また、通常の骨芽細胞分化誘導培地で 30 日間分化誘導した iPS 細胞集合体は、移植先で骨様組織を形成したものの、腫瘍形成を認めた。一方で、iPS 細胞集合体をシンバスタチン存在下で分化誘導した場合には、移植先における腫瘍形成を認めず、移植体の周囲には成熟した骨用組織の形成を認めた。

以上の結果から、試験管内で成熟した骨芽細胞へ分化誘導した歯肉由来 iPS 細胞集合体は、生体内で新生骨を形成することが明らかとなった。また、シンバスタチンを用いた iPS 細胞の骨芽細胞分化誘導は、移植先における腫瘍形成を抑制することが見出された。今後、この技術が自己由来 iPS 細胞を用いた骨移植材料へと発展することが期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯肉由来 iPS 細胞を確実に骨芽細胞に分化誘導する手法を検討し、同細胞を骨再生の移植材料として応用する技術を探索することを目的として行ったものである。

その結果、通常の骨芽細胞分化誘導培地を用いた分化誘導によって、マウス歯肉由来 iPS 細胞は骨芽細胞特異的遺伝子の発現を亢進し、著明な石灰化物の沈着および分化誘導による経時的なカルシウム含有量の増加を認めた。さらに、同 iPS

細胞が形成した石灰化基質には、リン酸カルシウムの存在およびハイドロキシアパタイトの結晶構造を認めた。

さらに *in vitro* にて成熟骨芽細胞へと分化誘導した同 iPS 細胞集合体は、生体内で新生骨を形成することが明らかとなった。また、シンバスタチンを用いた同 iPS 細胞の骨芽細胞分化誘導は、移植部位における腫瘍形成を抑制した。

以上の結果は、本研究で用いた技術が自己由来 iPS 細胞を用いた骨再生技術へと発展することを示唆するものであり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。