

2024年度（第49回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	大 阪 歯 科 大 学	研究所名等		
研 究 課 題	iPS細胞からの歯根膜幹細胞分化誘導と新規歯周組織再生戦略		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	① iPS細胞 ② 歯周病 ③ 再生			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
橋 本 典 也	大阪歯科大学歯学部	教 授	研究代表者・論文作成

○研究分担者

[illegible]

iPS 細胞からの歯根膜幹細胞分化誘導と新規歯周組織再生戦略

1. 研究の目的

本研究の目的は、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）から歯根膜由来間葉系幹細胞（PDLSC）への分化誘導法を確立し、得られた iPS 細胞由来歯根膜幹細胞（iPS-PDLSC）が歯周組織を再生する能力を有するか否かを検証することである。歯周病は細菌感染による慢性炎症により歯を支持する歯周組織が破壊され、最終的には罹患歯の抜歯に至る疾患である。日本では歯周病の罹患率が非常に高く、歯の喪失原因として最大である。従来の再生治療では適応症例や再生組織量に限界があり、新規再生治療法の開発が求められている。近年、iPS 細胞を用いた再生医療が注目されており、加齢黄斑変性やパーキンソン病、脊髄損傷などへの治療応用が進んでいる。iPS 細胞は多能性幹細胞であり、理論的には無限に分化・増殖が可能であることから、臨床応用に向けた細胞供給源として非常に有望である。しかし、iPS 細胞から PDLSC への分化誘導法についてはこれまで十分に解明されていない。本研究では、歯根膜細胞培養上清を用いて iPS 細胞から PDLSC への分化誘導を試み、その特性を RNA-seq 解析により明らかにする。また、分化誘導の過程でのゲノム安定性についても評価し、移植医療に適した iPS-PDLSC の誘導作製を目指す。さらに、タンパク質の網羅的解析を通じて分化メカニズムを解明し、動物モデルを用いた移植実験によって歯周組織の再生効果を検証する。これらの検討により、iPS 細胞を用いた新規歯周組織再生治療の開発に貢献することが本研究の最終目標である。

2. 研究の計画

本研究では、iPS 細胞から PDLSC への分化誘導法を確立し、歯周組織再生への応用を目指す。分化誘導には、動物由来成分を排除した Xeno-Free 条件での培養を基本とし、腫瘍形成リスクを軽減するため c-Myc を使用せず、エピゾーマルベクターで樹立された iPS 細胞を使用する。まず、歯根膜細胞の培養上清を用いて iPS 細胞を培養し、歯根膜特異的遺伝子（Periostin、Asporin/PLAP1）の発現を指標に分化誘導条件の至適化を行う。in vitro において骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨芽細胞への分化能を評価し、間葉系幹細胞マーカー（CD19、CD44、CD73、CD90、CD105）および多能性幹細胞マーカー（TRA-1-60、TRA-1-81、SSEA4）の発現を確認する。さらに、分化前の iPS 細胞、分化後の iPS-PDLSC、歯根膜幹細胞の RNA を用いて RNA-seq 解析を行い、遺伝子発現の網羅的解析を通じて分化誘導の分子メカニズムを明らかにする。同時に、G-Band assay を用いて核型異常の有無を検討し、臨床応用に必要なゲノム安定性の確認も行う。これらの検討により、iPS-PDLSC が歯周組織再生に有用な細胞源として応用可能かを評価し、新規歯周組織再生治療法の開発につなげる。

3. 研究の成果

iPS 細胞から iPS-PDLSC への分化誘導方法を検討した。歯根膜細胞の培養上清を iPS 細胞に加えることで iPS 細胞が iPS-PDLSC へ分化することを確認した。iPS-PDLSC は培養上清によって分化誘導を行うと紡錘形の形態に変化し、1 週間以内に多能性幹細胞のマーカー遺伝子である Oct4 が消失した。また、2〜3 週間後に Periostin、Asporin/PLAP1、I 型コラーゲンなど歯根膜特異的な遺伝子の発現が上昇した。さらに細胞表面タンパクの検討を行ったところ、iPS-PDLSC では間葉系幹細胞マーカー（CD19、CD44、CD73、CD90、CD105）が発現し、多能性幹細胞マーカー（TRA-1-60、TRA1-81、SSEA4）が消失していた。これらの結果は、iPS-PDLSC の特徴が歯根膜細胞に類似していることを示していると考えられる。RNA-seq 解析を行い、iPS-PDLSC と歯根膜細胞の遺伝子発現パターンを比較したところ、PCA 解析で iPS-PDLSC と歯根膜細胞が近傍に位置し、iPS 細胞とは明確に異なる位置に配置された。また、iPS-PDLSC と歯根膜細胞は約 80%以上の遺伝子発現において共通していた。この結果から、iPS-PDLSC が歯根膜細胞に非常に近い遺伝子発現パ

ターンを示すことが明らかとなった。さらに、iPS-PDLSC のゲノムの安定性を G-band 法を用いて検討したところ、3 つの iPS-PDLSC のゲノム構造を評価したが、1 つの iPS-PDLSC において染色体断片の付加が認められた。その他の細胞では特に異常は観察されなかった。

4. 研究の反省・考察

本研究では、iPS 細胞から iPS-PDLSC への分化誘導方法を確立し、iPS-PDLSC が歯根膜細胞に類似した遺伝子発現パターンを示すことを明らかにした。結果として、iPS 細胞から歯周組織再生に必要な PDLSC を効果的に誘導できる可能性が示唆された。しかし、いくつかの課題と反省点も明らかとなった。

まず、iPS-PDLSC の分化誘導過程におけるゲノム安定性について、G-band 法を用いた検討で染色体断片の付加が一部の iPS-PDLSC で確認された。この結果は、iPS 細胞由来の細胞を臨床応用する際の重要な課題を浮き彫りにした。ゲノムの安定性が確保されることは、再生医療において極めて重要であり、今後の研究では、分化誘導過程におけるゲノム安定性をさらに詳細に評価し、安定性向上のための対策を講じる必要がある。

次に、iPS-PDLSC が歯根膜細胞に非常に近い遺伝子発現パターンを示したことは、iPS 細胞からの歯周組織再生における応用の可能性を示唆している。しかし、iPS 細胞と歯根膜細胞との完全な同等性は確認できなかったため、iPS-PDLSC が歯根膜細胞に類似していても、その機能が完全に一致するかどうかは未だ不明である。この点については、さらに詳細な機能解析や in vivo での再生能力の評価を行う必要がある。

今後の研究では、分化誘導の最適化やゲノム安定性の向上を目指し、iPS-PDLSC の臨床応用に向けた安全性と効率性の確保に注力する必要がある。また、iPS-PDLSC の機能を確認するため、再生医療のモデルとなる動物実験を通じて、その再生能力をさらに検証することが求められる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

①谷口侑里映、城潤一郎、岩崎剣吾、橋本典也、百田義弘. iPS歯根膜細胞由来エクソソームを用いた歯周組織再生のための徐放化担体の開発. 令和6年度日本歯科理工学会近畿・中四国地方会. 2024. 12. 7. 神戸国際会館、神戸市

②Taniguchi Y, Jo J, Iwasaki K, Hashimoto Y, Momota Y. Exosomes from iPS-Derived PDL Cells Promotes Osteogenic and Anti-Inflammatory Properties. 第72回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会. 2024. 11. 16. カクイックス交流センター、鹿児島市

③谷口侑里映、西口雄祐、城潤一郎、岩崎剣吾、橋本典也、百田義弘. 歯周組織再生治療への応用に向けたiPS由来歯根膜細胞エクソソームの基礎的研究. 第11回日本細胞外小胞学会学術集会. 2024. 10. 28. 京王プラザホテル、東京都

④Iwasaki K, Wu Y, Ishikawa I, Hashimoto Y. Differentiation of iPS Cells into Periodontal Ligament Stem Cells and Their Potential for Periodontal Tissue Regeneration. The 15th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting. 17-18, October 2024. Grand Plaza Hanoi, Hanoi, Vietnam.

⑤谷口侑里映、西口雄祐、上田衛、窪寛仁、橋本典也. 歯周組織再生に向けたiPS由来歯根膜細胞exosomeの単離およびその関連microRNAの発現測定. 第78回日本口腔科学会学術集会. 2024. 7. 20. 東京大学 本郷キャンパス、東京都

⑥谷口侑里映、岩崎剣吾、呉珣璠、上田衛、橋本典也、百田義弘. 歯周組織再生に向けたiPS由来歯根膜細胞からの細胞外小胞の単離. 第82回日本歯科理工学会学術講演会. 2024. 4. 21. カクイックス交流センター、鹿児島市

(3) 出版物

なし