2025年度（第50回）学術研究振興資金　学術研究報告

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	①iPS細胞　②歯周病　③再生		

〇研究代表者

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

〇研究分担者

氏　　名	所　　属	職　　名	役　割　分　担
本　田　義　知	大阪歯科大学歯学部	教　　授	論文作成
岩　﨑　剣　吾	大阪歯科大学歯学部	准　教　授	動物実験、培養実験、データ整理、論文作成
神　田　龍　平	大阪歯科大学歯学部	講　　師	培養実験、論文作成

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

歯周病は、口腔細菌を原因とする慢性炎症によって、歯を支持する歯周組織が破壊される疾患である。歯周病が進行すると歯の動揺や咀嚼機能の低下を招き、最終的には罹患歯は抜歯に至る。日本成人における歯周病の罹患率は高く、現在、日本人が歯を喪失する最大の原因となっており、失われた歯周組織を再生し、歯の保存を可能にする治療法の開発は重要な課題である。歯周組織再生療法として GTR 法や各種再生材料を用いた治療が行われているが、適応症例や再生量には限界があり、高度に破壊された症例に対して安定した再生を得ることは困難である。そのため、より有効な新規歯周組織再生療法の開発が求められている。

近年、培養細胞を用いた再生医療が次世代治療として注目され、歯周病領域においても間葉系幹細胞を用いた歯周組織再生が期待されている。中でも歯根膜由来間葉系幹細胞（periodontal ligament stem cell: PDLSC）は、歯周組織の恒常性維持や修復に関わる細胞として注目され、歯周組織再生に有望な細胞源の一つと考えられている。我々はこれまでに、歯根膜から単離した PDLSC をラット歯周組織欠損部へ移植することにより、歯周組織再生が促進されることを明らかにしてきた。しかしながら、PDLSC の採取には抜歯が必要であり、採取可能な細胞数にも限界があるため、臨床応用を見据えると安定した細胞供給源の確保が大きな課題となっている。

一方、iPS 細胞は高い自己複製能と多分化能を有する多能性幹細胞であり、理論上、目的とする細胞を大量に供給できる可能性を有する。このため、再生医療における細胞源として大きな期待が寄せられてきた。しかし、iPS 細胞から歯周組織再生に重要な役割を果たす PDLSC への分化誘導法は十分には確立されていない。そこで本研究では、iPS 細胞から歯根膜幹細胞様細胞（iPS-PDLSC）を分化誘導する方法の確立を目指し、その細胞学的特性を明らかにするとともに、歯周組織欠損モデルにおける再生能を検証することを目的とした。本研究により、iPS 細胞を用いた新たな歯周組織再生療法の基盤構築につながる知見を得ることを目指した。

2. 研究の計画

iPS 細胞から iPS-PDLSC を分化誘導する方法の確立を申請一年目に行い、さまざまな細胞特性を検証した。その結果を受けて、申請二年目には分化誘導を行った細胞が歯周組織再生治療に利用可能であるのか、そして iPS-PDLSC の分化誘導メカニズムの解明ための研究を計画した。具体的に以下の実験項目を研究計画とした。

① iPS-PDLSC 移植による歯周組織再生の検討

免疫不全ラットに外科的歯周組織欠損モデルを作成し、iPS 細胞から分化誘導した iPS-PDLSC を移植し、組織の再生についての検討を行う。上顎第一臼歯近心面の歯槽骨、歯根膜、セメント質、象牙質の一部を外科的に削除し歯周組織欠損を作製後、細胞シート化した iPS-PDLSC を移植し、４週間後にマイクロ CT、組織形態計測を用いて歯周組織再生を評価する。

②培養上清中に含まれるタンパク成分に対する網羅的解析

iPS-PDLSC の分化誘導メカニズムの解明のために、歯根膜細胞の培養上清に含まれる因子についての解析を行う。歯根膜細胞の培養上清は非常に多くの因子が含まれると考えられるため網羅的解析を用いて因子の特定をすすめる。

3. 研究の成果

まず iPS-PDLSC を細胞シート化するために温度応答性培養皿を用いて培養を行った。本培養皿上で培養した iPS-PDLSC は良好に増殖し、培養 4 日後に培養温度を低下させることによって細胞シートとして回収することが可能であった。免疫不全ラットの上顎第一大臼歯近心根に外科的に歯周組織欠損を形成し、シート化した iPS-PDLSC を移植した。移植 4 週間後にマイクロ CT を撮影し硬組織形成を評価したところ、iPS-PDLSC を移植した欠損では何も移植していない対照群欠損と比較して、露出している歯根表面面積が有意に減少していた。さらに切片を作製し組織学的に再生組織を観察したところ、iPS-PDLSC 移植群では新たな歯槽骨、歯根膜、セメント

質の形成が大きく促進している像が認められた。新生歯槽骨高さを割合で算出し比較したところ、iPS-PDLSC 群において対照群と比較して有意に新生された歯槽骨の割合が高いことが明らかとなった。さらに HE および Azan 染色を行った組織像では、iPS-PDLSC の移植によって新たな歯根膜、歯槽骨の形成を伴う新生歯周組織形成が増強し、コラーゲン線維の一端を根面セメント質に埋入したシャーピー線維様構造の形成が増強している像が認められた。これらの結果から iPS-PDLSC の移植によって正常な組織構造を持つ新生歯周組織の再生が増強されることが示された。

iPS 細胞から iPS-PDLSC への分化誘導メカニズムの検証の為に、分化誘導に用いた PDL 培養上清の内容物について詳細な検討を行った。培養上清中には多種多様な因子が含まれていることが予想されたため、多くの細胞分化に重要な役割を果たす増殖因子の網羅的解析を行った。本解析には Growth Factor Array 解析を用いた。本方法は同時に 41 種の増殖因子の測定が可能であった。本解析の結果、PDL 培養上清には多量の Hepatocyte Growth Factor(HGF)および Vascular Endothelial cell Growth Factor-A (VEGF-A)が含まれていることが明らかとなった。

4. 研究の反省・考察

本研究では、iPS 細胞から歯根膜細胞様細胞への分化誘導を基盤として、得られた iPS-PDLSC を細胞シート化し、歯周組織欠損へ移植することで、歯槽骨、歯根膜、セメント質を含む新生歯周組織の形成が促進されることを示した。これまでに iPS 細胞から歯根膜細胞様細胞へ分化誘導した研究は報告されているが、iPS-PDLSC の移植によって実際に歯周組織再生が促進されることを示した研究は限られており、本研究はその最初の検討の一つとなる可能性がある。特に、本研究で用いた裂開型の歯周組織欠損は、一般的に再生が困難な欠損形態であることから、このモデルにおいて再生促進効果が認められたことは、iPS-PDLSC を用いた歯周組織再生治療の高い再生能力を示唆する重要な成果であると考えられる。

一方で、本研究には今後検討すべき課題も残されている。まず、今回用いた欠損モデルは裂開型欠損に限定されており、臨床で遭遇する多様な歯周組織欠損に対して同様の再生効果が得られるかは明らかではない。今後は、異なる形態や大きさの歯周組織欠損モデルを用いて、iPS-PDLSC 移植の有効性をさらに検証する必要がある。また、移植した iPS-PDLSC が再生組織内でどのように局在し、歯槽骨、歯根膜、セメント質の形成に直接関与しているのか、あるいは周囲組織に作用して間接的に再生を促進しているのかについては十分に明らかにできていない。移植細胞の追跡解析を行うことにより、再生メカニズムの理解が深まり、より効果的な移植方法や治療戦略の改善につながると考えられる。さらに、iPS-PDLSC への分化誘導機構については、PDL 培養上清中の増殖因子解析にとどまった。培養上清には増殖因子以外にも多様な生理活性因子が含まれるため、今後は他の因子の解析を進め、検出された HGF や VEGF-A を含む候補因子が分化誘導に果たす役割を検証する必要がある。

5. 研究発表

(1)学会誌等

①Wu Y, Iwasaki K, Taniguchi Y, Ishikawa I, Hashimoto Y. Differentiation of iPS cells into periodontal ligament cells. Tissue Eng Part A. 2025 doi.org/10.1177/19373341251389015

(2)口頭発表

①李　昊乾、西浦　亜紀、岩﨑　剣吾、橋本　典也. iPS 細胞由来歯根膜細胞の機能評価. 第587回大阪歯科学会例会. 2025.12.13 枚方市.

②谷口　侑里映、山元　智史、岩崎 剣吾、城　潤一郎、石川　敬彬、橋本　典也、百田　義弘. 歯周組織再生療法への応用に向けたiPS由来歯根膜細胞細胞外小胞の有効性の検討(in vitro). 第12回日本細胞外小胞学会学術集会. 2025.10.14.豊中市.

③Taniguchi Y, Iwasaki K, Jo J, Yamamoto T, Ishikawa H, Momota Y, Hashimoto Y. Enhancement of Periodontal Ligament Cell Proliferation and Migration Using Extracellular Vesicles Derived from iPS-Derived Periodontal Ligament Cells. Asia Pacific Societies for Extracellular Vesicles. 2025.7.3.シンガポール.

④Taniguchi Y, Jo J, Iwasaki K, Hashimoto Y, Momota Y. Characteristics and Functions of Exosomes Derived from iPS-PDL cells. 103th General Session & Exhibition of the IADR. 2025.6.27.スペイン、バルセロナ.
⑤谷口　侑里映、西口　雄祐、上田　衛、前川　穂香、奥　勇人、窪　寛仁、橋本　典也. 歯周組織再生に向けたiPS歯根膜細胞由来エクソソームの生物学的機能評価.第79回日本口腔科学会学術集会. 2025.5.17. 松本市.
⑥谷口　侑里映、岩﨑　剣吾、城　潤一郎、石川　敬彬、橋本　典也、百田　義弘. 歯根膜細胞由来エクソソームとiPS歯根膜細胞由来エクソソームの特性及び機能の比較. 第83回日本歯科理工学会学術講演会. 2025.4.19.名古屋市.

(3)出版物
なし