

出國報告（出國類別：學術研討會與參訪）

第 15 屆國際幹細胞學會年度學術研討會
與
哈佛醫學院合作實驗室參訪

服務機關：台北榮總醫學研究部

姓名職稱：王夢蓮 高級助理研究員/ 鄭彥甫 醫師

派赴國家：美國波士頓

出國期間：106年6月12日至6月21日

報告日期：106年7月17日

摘要

為瞭解全世界在幹細胞相關領域的最新走向及進展，職王夢蓮高級助理研究員及鄭彥甫醫師於本年六月十二日前往美國波士頓參加 2017 年國際幹細胞研究學會年會(Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research, ISSCR)，除參加會前教育訓練(Clinical Advances in Stem Cell Research, CASC)，會中針對神經退化性疾病、眼科神經疾患再生醫學幹細胞研究多所討論與介紹，在大會期間，亦參加多場幹細胞基礎或轉譯研究之演講，除關注與聽覺及其他腫瘤幹細胞分子調控的研究之外，亦涉獵最新研究工具及方法學的進展，期能對研究工作有所助益。會中及會後亦參訪哈佛大學研究室，與多位知名研究學者多所討論並獲得許多研究啟發。

本次至美國波士頓 ISSCR 及哈佛大學實驗室參訪是一次極為成功的國際交流活動，希望在不久的將來可以應用所學，加速突破本院之各式先進醫療的發展。

目次

摘要	1
目次	2
本文	3
目的	3
過程	4
心得	8
建議	22
附錄	24

本文

一、 目的

國際幹細胞學會(ISSCR)年度學術會議是幹細胞研究領域的年度盛會，這次2017年度學術會議在美國麻塞諸塞州波士頓舉行。有來自世界各地從事幹細胞研究的實驗室研究人員齊聚一堂，透過口頭報告和海報的呈現進行科學上的交流。一起討論科學上的突破與新知。並與同儕與會學者討論相關的合作。透過科學交流機會，我們力求激發靈感以及洞察力，以推動這一快速發展的研究領域之進展。參與此盛會目的在與來自世界各地的學術領導和同儕交流，瞭解全世界在相關領域的走向及進展，一方面也與發展幹細胞相關的轉譯尖端科技的公司進行對話，並在自己的研究上獲得一些修正及啟發。

此外，Dr. George Q. Daley 教授醫師是國際公認的幹細胞與慢性粒細胞白血病（CML）研究專家。他目前的研究主要將幹細胞生物學用於對退化性，惡性和遺傳性疾病的細胞療法。他也因探討從成體幹細胞（iPS 細胞）重新編程幹細胞是否等同於從人類胚胎這個最緊迫的問題之一而授予美國國立衛生研究院獎。Daley 醫師的實驗室第一個成功利用小鼠模型體細胞核的胚胎幹細胞的轉移應用來治療遺傳性免疫缺陷疾病，並從胚胎幹細胞第一個創造功能性的精子細胞。而本次參訪哈佛醫學院與波士頓兒童醫院主要目的為提升誘導幹細胞的應用平台、視網膜幹細胞建立3D立體式網膜細胞分化之技術平台、誘導分化視網膜色素上皮細胞與感光細胞治療之臨床應用性及建立基因治療平台，同時針對疾病模型的建立進行交流，以期進一步在幹細胞治療與癌症研究方向上有進一步的修正與發展，並延續雙方的研究合作關係。

二、 過程

預定起迄 年月日	停留地點	行程內容	邀請單位 (參訪對象)
20170613	波士頓大會及展覽中心(BCEC) 地址: 415 Summer St., Boston, MA 02210	2017 ISSCR 會前教育研討會	國際幹細胞研究學會
20170614	波士頓大會及展覽中心(BCEC) 地址: 415 Summer St., Boston, MA 02210	2017 ISSCR 年會	國際幹細胞研究學會
20170615	波士頓大會及展覽中心(BCEC) 地址: 415 Summer St., Boston, MA 02210	2017 ISSCR 年會 (18:00-20:00 研究發表)	國際幹細胞研究學會

20170616	波士頓大會及展覽中心(BCEC) 地址: 415 Summer St., Boston, MA 02210	2017 ISSCR 年會	國際幹細胞研究學會
20170617	波士頓大會及展覽中心(BCEC) 地址: 415 Summer St., Boston, MA 02210	2017 ISSCR 年會	國際幹細胞研究學會
20170618	哈佛醫學院	合作實驗室參訪 (14:00-17:00)	Thorsten Schlaeger, PhD (人類胚胎幹細胞中心研究員)
20170618	哈佛醫學院	學術交流晚餐 18:00-	Dr. Thorsten 實驗室成員
20170619	波士頓兒童醫院	與合作實驗室進行研究計畫討論 (14:00-16:00)	Benoit Laurent, PhD Chih-Hong Hsu, PhD
20170619	波士頓兒童醫院 細胞生物部門	參訪合作實驗室及科學聯網	Benoit Laurent, PhD 和 Chih-Hong Hsu, PhD 之實驗室

20170620	哈佛大學創新實驗室	參訪位於哈佛 Allston 校區的創新實驗室 (Innovation Lab)以及	Dr. Cheng-Ping Yu
----------	-----------	--	-------------------

本次大會於 6 月 13 日於美國波士頓召開。第一天是會前教育訓練課程，包括臨床轉譯研討會(Workshop on Clinical Translation)及幹細胞研究之臨床進展(Clinical Advance in Stem Cell Research)。因為同為感覺器官，且視網膜及內耳感覺上皮的發育及再生過程亦較相似，固選擇參加後者。會中邀請國際知名臨床幹細胞專家，針對眼科範疇，報告並探討目前臨床上臨床的需求(unmet need)、細胞治療研究進展及幹細胞在眼科再生醫學的臨床應用。會中邀請的學界專家包括 UCSF 的 Dr. Kang Zhang、哈佛大學的 Dr. Michael Yong、美國國家眼科研究中心的 Dr. Kapli Bharti，業界則有日本的 Dr. Hardy Kagimoto 及 Dr. Jane Lebkowski，分別介紹了水晶體及視網膜再生研究及臨床應用，以及日本政府如何順應世界潮流，針對再生醫學對幹細胞研究及臨床應用作適度的開放，以扶植相關產業。

正式大會期間多是全體出席的演講(plenary session)，演講者都是在幹細胞研究領域知名學者，演講內容除了以發表的文章以外，還包括了很多未發表的研究成果，這也增加了參加此次大會的實質助益：可以提早知道該領域的研究趨勢，並提早規劃研究方向。大會主題包括：

1. **Session I:** Presidential Symposium: A Decade of Human iPSCs from Discovery to Clinic
2. **Session II:** Organogenesis/Making Tissues and Organs
3. **Session III:** Stem Cells and Cancer
4. **Session IV:** Chromatin and RNA Biology in Stem Cells
5. **Session V:** Stem Cells, Stress, Senescence and Aging
6. **Session VI:** Tissue Regeneration and Homeostasis
7. **Session VII:** Frontiers of Cell Therapy

節錄並報告幾位相關研究者的研究者演講：

Hans Clevers : Stem Cell-grown Organoids as Models for Human Disease

Dr. Clevers 是荷蘭 Utrecht University 大學教授，Hubrecht Institute 所長，也是下屆 ISSCR 學會候任理事長 (President Elect)。他的研究最有名的就是 Wnt 訊號通道及 Lgr5 幹細胞生物標記的發現。Wnt 通道與胚胎發育及癌症有關，可分為經典通道 (Canonical pathway) 及非經典通道 (Non-canonical pathway)，其中經典通道經由刺激 beta-catenin 轉錄因子，進入細胞核與 TCF/LEF 轉錄因子作用並促進下游基因表達。他以腸粘膜為例，腸粘膜細胞是成年哺乳類中自我更新 (self-renewal) 最快的組織，而他研究團隊之前就報導過：Lgr5 是一個 Wnt 下游基因，也是個幹細胞標記，除大腸粘膜以外可發現於其他器官組織：如內耳、毛囊、腎臟、肝臟、乳腺及胃粘膜。透過 3D 立體培養及螢光顯微鏡照攝的縮時影片可知：單一 Lgr5+ 細胞可生成大腸粘膜的類組織 (organoid)，且此一方法亦可應用於其他人類組織的培養，如胃、肝、胰臟、攝護腺及腎臟組織，可加速人類細胞與組織的轉譯研究。

Karl Kohler: Directed Self-Assembly of Neurosensory Inner Ear Organoids from Human

Pluripotent Stem Cells

Dr. Kohler 是 Indiana University 的助理教授，其研究領域為胚胎幹細胞 (ES cells) 及誘導幹細胞 (iPS cells) 的分化。人類內耳包含耳蝸及前庭組織，約有 75,000 個感覺毛細胞，可以感受聲音或移動，將訊號傳遞經由特化的神經元傳至中樞。本次發表講述將人類胚胎幹細胞分化為內耳類器官 (inner ear organoid) 的方法。已知許多訊號通路與內耳發育有關，如 Wnt、TGF、BMP、FGF 等，經由這些通道的適當調節，可以誘導出具有 PAX2、PAX8、SOX10 及 ECAD 陽性的耳泡組織 (otocyst)，並繼續分化為含有 MYO7A 及 BRN3C 陽性毛細胞內耳類器官，可用於研究人類內耳發育及疾病模式。

三、心得

此行主要目的為參加 2017 年國際幹細胞學會的年度學術研討會，除了參加學術研討會議之外，也一併安排了參訪位於波士頓兒童醫院與哈佛醫學院的合作學者及其實驗室。離開波士頓前的空檔臨時安排了參觀哈佛大學 Allston 校區的創新實驗室。

2017 ISSCR Annual Meeting 國際幹細胞學會年度學術研討會

國際幹細胞學會年度學術會議是幹細胞研究領域的年度盛會，這次 2017 年度學術會議在美國麻塞諸塞州波士頓舉行。有來自世界各地從事幹細胞研究的實驗室研究人員齊聚一堂，透過口頭報告和海報的呈現進行科學上的交流。一起討論科學上的突破與新知。並與同儕與會學者討論相關的合作。透過科學交流機會，我們力求激發靈感以及洞察力，以推動這一快速發展的研究領域之進展。參與此盛會讓我們得以與來自世界各地的學術領導和同儕交流，瞭解全世界在相關領域的走向及進展，一方面也與發展幹細胞相關的轉譯尖端科技的公司進行對話，並在自己的研究上獲得一些修正及啟發。

今年的學術研討會共安排有 28 個同時進行的會議主題。包括血液幹細胞，腫瘤與幹細胞，幹細胞治療與臨床應用，誘導室多功能幹細胞技術之進展，以及成體幹細胞等。此次會議的臨床重點項目在於轉譯醫學以及幹細胞研究臨床之進展。旨在讓與會者了解更多關於為臨床及疾病特異性應用而開發的幹細胞衍生療法。大會舉辦了轉譯醫學討論會，著重在創新，孵化，以及潛在的投資性。幹細胞研究的最新進展及其治療潛力成為了 ISSCR 2017 國際幹細胞學會年度學術會議的重點。

目前相較於其他組織內幹細胞的研究，肺部幹細胞仍落後許多。其中一大原因就是肺部乃為一細胞更新緩慢的器官（平均 >100天），且再生性相對較差。雖然面對急性傷害時能產生即時的修復機能，但亦往往易於纖維化。從主氣管到末端的肺泡，其組織特性與細胞型態都有區域性的區隔。在主氣管與較大的支氣管，已知基質細胞（Basal cell）為主要的幹細胞來源，但此細胞在單層外皮組織的末端支氣管與肺泡並不存在。在末端支氣管，Clara Cell具有再生與分化的能力。在肺泡區域則第二型肺泡

細胞為可能的幹細胞來源，但至今仍存在許多爭議。目前為止研究肺部幹細胞仍大多以主氣管與末端支氣管細胞為主，乃因這些部位細胞再生穩定且較容易觀察，反之在肺泡區域則研究相對少很多。然而事實上，肺泡區域佔肺部 >90%的體積，進行重要的氣體交換功能，卻也是最易受損產生纖維化、與再生性最差的部位，應有更多的研究投入這塊領域。由於肺部原生幹細胞（primary stem cell）難以取得、培養，且結果往往不一致，一些研究團隊（e.g. Belloni, European Institute of Oncology, Italy; Voisset, University of Cambridge, UK）嘗試由致癌因子K-Ras基因轉殖鼠的肺部擷取原生細胞，並嘗試從中取得可能的組織幹細胞與肺癌幹細胞來源。這些研究一方面凸顯了正常幹細胞與癌幹細胞間的密切相關性持續受到重視，另一方面亦可窺知肺部正常原生幹細胞在體外培養研究上的困難。

在大會口頭報告的部份，今年並沒有特定的核心主題，而是呈現諸多研究方向並陳交聯。今年 Keynote Speech 由哈佛大學醫學院院長的 Dr. George Daley 主講，內容在於 iPS cell 在疾病研究上的應用平台與技術的重要性與未來性。雖然 iPS cell 在分子生物學的研究上日新月異，但於臨床醫學的實際應用仍有待努力。對於疾病研究方面，iPS cell 的應用反而更快速因為不須嚴格的安全性測試。其中一個重點就是分化的疾病魔形細胞必須能夠表現疾病的特徵與缺陷，須突破的障礙就是反轉錄細胞的選擇與分化條件的控制。Dr. Daley 並列舉其實驗室研發出的多種 iPS cell 分化而成的血液與血球細胞，說明其作為生物材質與疾病模式的發展潛力。

Dr. Yamanaka (Kyoto Univ., Japan)，劃時代的 iPS Cell 創始人，在本屆大會的演講中間單回顧了近幾年在 iPS 研究上的進展。除了最早使用的 fibroblast，肝細胞、胃表皮細胞、角質細胞、神經細胞、周圍血細胞、及臍帶血細胞都陸續被證實亦可用於製造 iPS 細胞。在反轉錄病毒之外，腺病毒、仙台病毒、質體、跳躍子、mRNA、及蛋白質等不需插入細胞 DNA 的基因載體也都成功被應用來製造 iPS 細胞。製造 iPS 最初所使用的 4 個基因，（在特殊環境下）有些可以省略不用，有些可以被化學合成物取代，有些亦可被其他基因取代。例如 L-Myc 可取代 c-Myc 以較高效率的製造 iPS，而同時又有較低的致癌風險。Dr. Yamanaka 實驗室目前致力於讓

iPS Cell 能夠進入臨床應用階段。除了降低癌症風險之外，更進一步研究異體的 iPS Cells 如何能夠互用而不排斥，以利大量製造的 iPS Cells 可以選擇性的廣泛應用，而非每個病人都需要客製化。

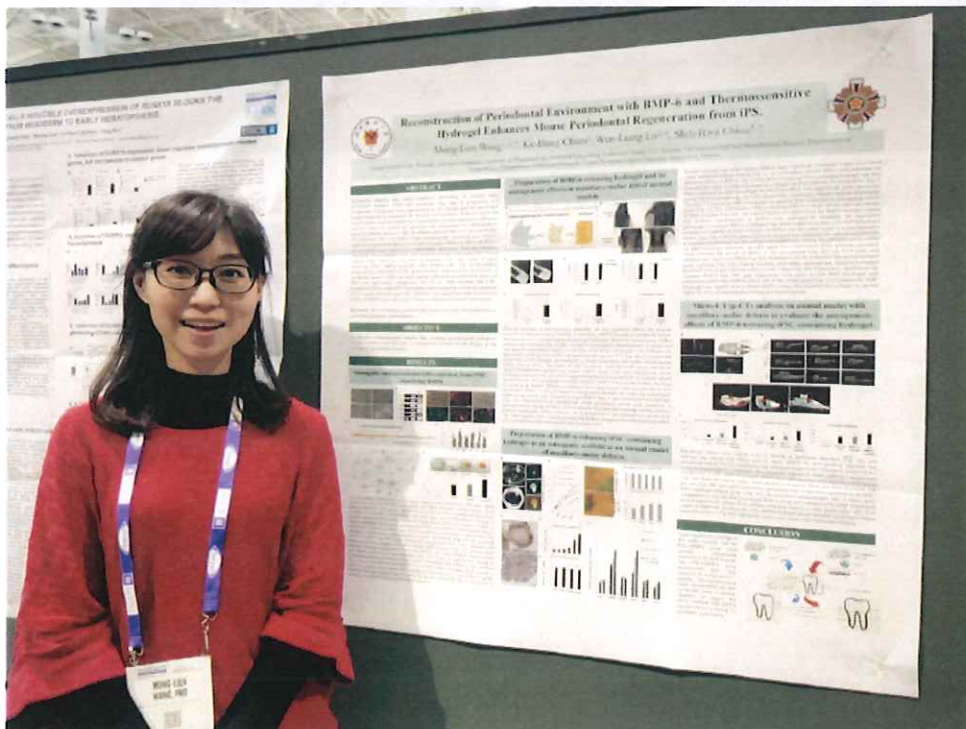
在一年一度的 ISSCR 會議中可以看到來自全世界幹細胞研究領域最尖端且新穎的研究成果。筆者能參加此一盛會深感榮幸，並從中學習到許多新的知識與啟發。希望將來能有機會再參與此一國際盛會。



2017 年國際幹細胞學會年度學術研討會會場



2017 年國際幹細胞學會年度學術研討會 – 學術海報與生技廠商展覽會場



於國際幹細胞學會年度學術研討會發表學術論文海報

Boston Children's Hospital 波士頓兒童醫院

醫院種類： 教學醫院

附屬大學： 哈佛醫學院

波士頓兒童醫院（Boston Children's Hospital）是美國麻塞諸塞州波士頓一所擁有 395 張立案病床的兒童醫院，位於波士頓市內醫療院所林立的 Longwood 醫學區。它是哈佛醫學院的教學醫院之一，並與這醫學研究機構相鄰。2015 年，《美國新聞與世界報導》將波士頓兒童醫院評為全美最佳小兒專科、心臟與心臟外科、神經與神經外科、泌尿科、腎臟科與整型外科醫院，並成為新英格蘭地區醫療品質最佳的醫院。該排行榜第二名則為費城兒童醫院。

作為美國規模最大的兒童醫院之一，波士頓兒童醫院的診治對象僅限 21 歲以下的嬰幼兒、兒童、少年與青少年；除非成人患者有先天性心臟疾病或斜視，才會收診。它的高級胎兒保健中心（Advanced Fetal Care Center）可對 15 周大的胎兒進行干預治療。1956 年，波士頓兒童醫院在其院區內興建柏拉第紀念花園與露天平台（Prouty Memorial Garden and Terrace），供住院病童及其家屬調養身心。該院未來新建醫療大樓時，有可能會佔用部份花園。

此次的參訪重點除了硬體之外，還有合作研究的討論。筆者約去年開始與位在波士頓兒童醫院的 Yang Shi 教授建立作關係，並與其實驗室的兩位博士後研究員，Dr. Benoit Laurent 與 Dr. Chih-Hong Hsu，有密切的討論。我們針對目前進行的癌症相關研究做了約 2 小時的簡報與討論，對於雙方的研究方向與合作模式有進一步的確認與共識。可望在未來一年內有初步成果。

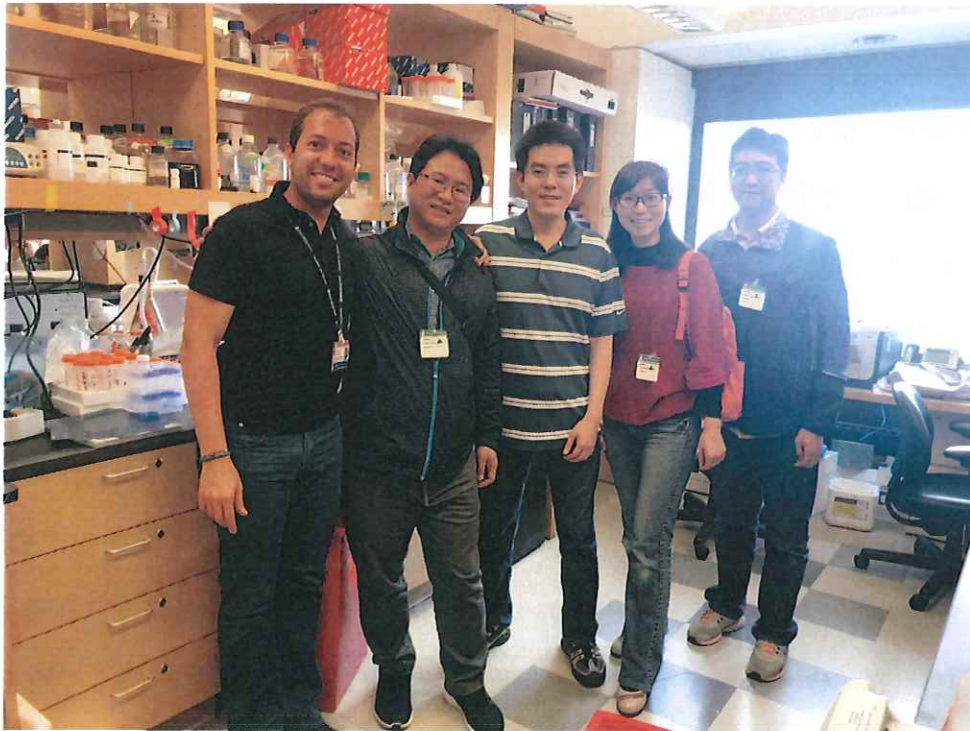


波士頓兒童醫院





與 Dr. Benoit Laurent, Dr. Chih-Hong Hsu, and Dr. Tien-Chun Yang 進行研究合作討論並交換對於目前研究方向的意見。



與 Dr. Benoit Laurent, Dr. Chih-Hong Hsu, and Dr. Tien-Chun Yang 於波士頓兒童醫院

Prof. Yang Shih 實驗室合影。



與 Dr. Benoit Laurent, Dr. Chih-Hong Hsu, and Dr. Tien-Chun Yang 於哈佛醫學院。

Harvard Medical School 哈佛醫學院

哈佛醫學院位於波士頓 Longwood 醫學區，提供各個醫科課程及頒發專業資格證書。哈佛醫學院的醫學本科課程與美國其他大部分的醫學院一樣，只接受已經持有第一個學士畢業證的本科畢業生報讀，而醫學本科則為時四年，畢業的醫科生會獲得「醫學博士」(M.D.) 的銜頭。另外，哈佛醫學院也提供各種醫學研究課程，以培養醫生的生物醫學科研能力。

此次參訪的重點是 Dr. Schlaeger 為於哈佛醫學院的實驗室。Schlaeger 博士是小鼠遺傳學，內皮細胞和造血發育生物學以及多能幹細胞的知名專家。他擁有德國馬爾堡的 Philipps 大學人體生物學博士學位。他在內皮細胞特異性基因調控方面獲得了著名的奧托·哈恩 (Otto Hahn) 獎牌，這項研究是在已故的維爾納·里索博士 (馬克斯·普朗克研究所) 和湯姆·佐藤博士 (Beth Israel Deaconess Hospital, Boston) 的實驗室

進行。

Dr. Schlaeger 的實驗室擁有最先進的 droplet digital PCR 核酸增幅分析儀，與醫研部近期發展的重點項目吻合。透過參觀 Dr. Schlaeger 的實驗室並與其技術員的交流，對於此技術的多方應用有深入的了解。



與交大博士後研究員楊添均博士於哈佛醫學院前(左)及 Dr. Thorsten Schlaenger 實驗室(右)合影。



參訪哈佛醫學院，並與哈 Professor Cynthia Morton 及 Dr. Jun Shen 合影



Dr. Thorsten Schlaenger 實驗室內具有全套 digital droplet PCR 用於精準偵測微量表現的基因以及突變。



Digital droplet PCR 因實驗所需，搭載全自動 96 孔盤樣本準備系統，以求最低的操作誤差與最高實驗操作效率。



Dr. Thorsten Schlaenger 實驗室之細胞培養室。



大量篩選系統搭載自動化精準 96 孔盤藥物處理器以求快速與大量的篩選可能的有效藥物。

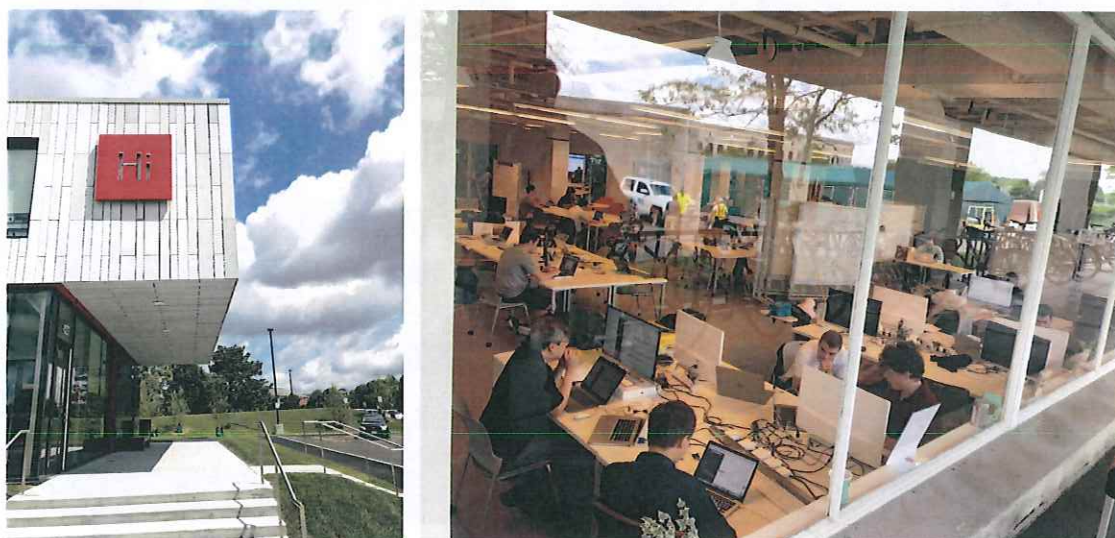
Harvard Innovation Labs (i-LAB) 哈佛創新實驗室

哈佛創新實驗室是一個獨特的協作和教育空間，目的在促進哈佛學生與校友的創業和創新。作為哈佛大學對企業與商業活動影響力的一個主要基石，i-lab 也是通往哈佛大學擴大的 Allston 校區的門戶，是其成為一個真正跨學術研究和商業創新的學習和開發社群的願景。

作為創業中心，i-lab 具有極其獨特的開放性。任何哈佛學校的學生在任何階段有任何創新的想法都可以向 i-lab 申請個人或團隊的創業孵育計劃。I-Lab 的創業孵育計劃是一個為期 12 週的綜合計劃，結合指導，研討會和合作平台，幫助團隊進一步，快速地啟動創業思想。學生畢業後可以選擇申請進入啟動實驗室 (Launch Lab)，這是一個原型的合作工作空間和資助校友企業的計劃。

i-lab 提供了一個五階段的參與模式，側重於基礎和體驗學習，使學生能夠探索創業精神，與有經驗的企業家會面，並參與同樣是第一次創業者的經驗分享與討

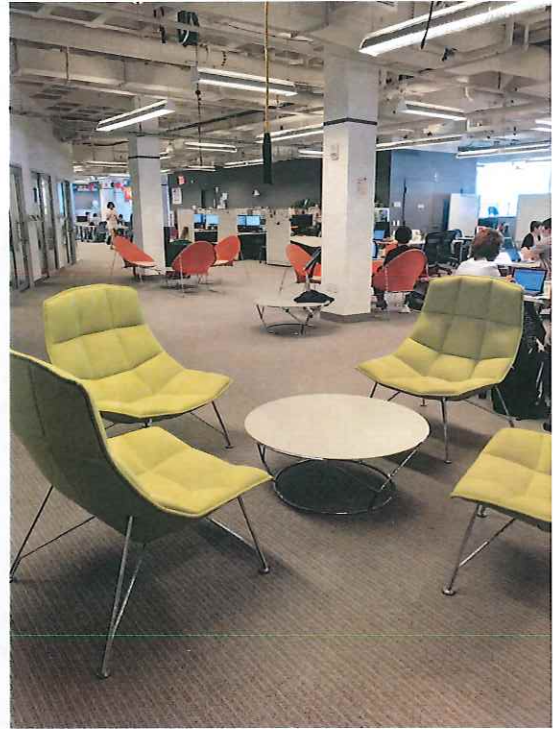
論，以人為中心的方式構建測試他們的願景的實用性，協助發起與發展他們的企業。在孵育計畫中，學生們可以利用 i-lab 與地區或國家的創業網絡連結系統廣泛的聯繫與互動，在多面向的課題和行業領域中獲得專業知識和指導，其中包括健康和科學，技術，文化創業，社會影響和消費品牌。



i-Lab 主要位於哈佛大學 Allston 校區。建築外觀(左)與內部大致狀況(右)。



每一季可以進駐 i-Lab 的團隊都要經過申請與評選，獲選的團隊照片會展是在 i-Lab 中央區的交誼空間牆上(左)。i-Lab 入口處有一面鑼，每當有團隊達成了階段目標，或是募得贊助款項，亦或者容或競賽獎項等，會來此處敲鑼並與大家分享喜悅。



i-Lab 內部一隅。I-Lab 是一個完全開放的空間，除了少處空間如會議室，討論室之外，全部採用開放的非固定座位設計。進駐 i-Lab 的團隊可以自由的選擇坐位，而 i-Lab 在每個座位則提供了方便的網路設備與不可或缺的電源。所有的椅子都可有輪子可移動的，隨處也可見小圓桌與沙發，方便大家移動聚集討論，間接的鼓勵團隊內部甚至是團隊間的互動交流。



夜間的 i-Lab。i-Lab 是 24 小時開放的，在一個高度互動跟熱絡的環境中，i-Lab 幾乎 24 小時都有人在裡面進行 networking, conference call, brain storming, idea exchange, 或是為一些創業競賽作準備。

四、 建議事項

本次與會，除聆聽演講、參觀海報之外，亦與許多國際學者討論研究幹細胞研究議題，尤其是在內耳聽覺再生領域及癌症幹細胞分子調節。同時參加相關領域的演講，如眼科視網膜的研究相關議題。與會者包含學界、醫界、業界及政府單位，尤其有許多生技產業從業人員，其多具有 PhD 或相關研究所學歷，具深厚研究基礎，亦也許多高水準的深度研究。亦有許多醫師科學家，針對其領導之幹細胞臨床測試做報告。

國家別看來，以美國的報告及與會者最多，而日本的學者亦不在少數，也反映了當今幹細胞研究的趨勢：美國政府投入最多的研究資源，配合世界一流的學校及研究機構，吸引了世界一流的研究人才，而創造出無數高水準的研究報告及論文，

這當然也造就出源源不絕的新創公司及業界應用，並配合政府政策及創投基金，創造出向波士頓急救金山-矽谷灣區這樣重量級的學術及生技聚落。

日本方面，在山中彌申教授(Dr. Yamanaka)發表多能型幹細胞(iPSC)的技術，並獲得諾北爾將殊榮之後，日本政府即大力支持幹細胞研究及產業發展，除仿效美國，加強幹細胞研究的資助之外，並由山中教授主持全國性的幹細胞研究機構，並透過法令與監管鬆綁，全力推動臨床測試，加速臨床應用，目前已有許多世界最先進的幹細胞臨床應用，如以 iPSC 治療視網膜黃斑部病變便是一例。

目前我國已將生技產業列為重點發展產業，以美國及日本的例子來看，此產業需要政府、學校、醫院及業界充分配合，政府的政策支持、學校與醫院的研究人才與臨床測試、以及政府與民間業界的資金支援，缺一不可。政府時可參考日本政府的做法，鬆綁法令、放寬監管，鄭和資源，並以政策作多與資金支援學界、醫界與業界，方能創造幹細胞研究及產業蓬勃發展，擠身世界頂尖之林。

附錄-1: 發表論文摘要

Reconstruction of Periodontal Environment with BMP-6 and Thermosensitive Hydrogel Enhances Mouse Periodontal Regeneration from iPSCs.

Mong-Lien Wang^{1,2,5}, Ke-Hung Chien³, Wen-Liang Lo^{2,4}, Shih-Hwa Chiou^{3,5}

¹School of Medicine, ²Institute of Clinical Medicine, ³Institute of Pharmacology, National Yang-Ming University, Taipei 112, Taiwan; ⁴Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Stomatology, ⁵Department of Medical Research, Taipei Veterans General Hospital, Taipei 112, Taiwan

Abstract

Periodontal diseases that cause significant destruction of alveolar bone, periodontal ligament (PDL) and cementum may lead to progressive oral dysfunction. Periodontal tissue regeneration is the ultimate goal for periodontal disease treatment to reconstruct the structure and functions. However, due to the lack of proper microenvironment for transplanted cells, the regenerative efficiency was low. Here we applied an injectable and thermosensitive carboxymethyl-hexanoyl chitosan nanogel (CHC) to enhance stem cell delivery and engraftment. We combined CHC with BMP-6 (bone morphogenetic protein-6) and iPSCs to apply on rat periodontal defect, and found synergistic effects of iPSCs and BMP-6 on periodontal tissue regeneration with notable increase on bone and cementum formation. New connective tissue was observed in groups containing CHC but not without CHC. However, new PDL development was only found in group containing iPSCs, BMP-6 and CHC (iPSC-BMP-6-CHC). The 3D bio-scaffold composed by iPSC-BMP-6-CHC predominantly constructed the architecture of periodontal tissues within one week, and the mRNA levels of POSTN, OPN and CAP were significantly upregulated. An *in vivo* study revealed that CHC-encapsulated iPSCs with BMP-6 promoted mineralization as well as the formation of new connective tissue and PDL. Therefore, we suggest that CHC-encapsulated iPSCs with BMP-6 provides a new strategy to enhance periodontal regeneration.

Keywords: BMP-6, hydrogel, inducible pluripotent stem cell, periodontal disease, periodontal ligament, mineralization.



Reconstruction of Periodontal Environment with BMP-6 and Thermosensitive Hydrogel Enhances Mouse Periodontal Regeneration from iPSC.

Mong-Lien Wang^{1, 2, 5}, Ke-Hung Chien³, Wen-Liang Lo^{2, 4}, Shih-Hwa Chiou^{3, 5}

¹School of Medicine, ²Institute of Clinical Medicine, ³Institute of Pharmacology, National Yang-Ming University, Taipei 112, Taiwan; ⁴Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Stomatology, ⁵Department of Medical Research, Taipei Veterans General Hospital, Taipei 112, Taiwan



ABSTRACT

Periodontal diseases that cause significant destruction of alveolar bone, periodontal ligament (PDL) and cementum may lead to progressive oral dysfunction. Periodontal tissue regeneration is the ultimate goal for periodontal disease treatment to reconstruct the structure and functions. However, due to the lack of proper microenvironment for transplanted cells, the regenerative efficiency was low. Here we applied an injectable and thermosensitive carboxymethyl-hexanoyl chitosan nanogel (CHC) to enhance stem cell delivery and engraftment. We combined CHC with BMP-6 (bone morphogenetic protein-6) and iPSCs to apply on rat periodontal defect, and found synergistic effects of iPSCs and BMP-6 on periodontal tissue regeneration with notable increase on bone and cementum formation. New connective tissue was observed in groups containing CHC but not without CHC. However, new PDL development was only found in group containing iPSCs, BMP-6 and CHC (iPSC-BMP-6-CHC). The 3D bio-scaffold composed by iPSC-BMP-6-CHC predominantly constructed the architecture of periodontal tissues within one week, and the mRNA levels of *POSTN*, *OPN* and *CAP* were significantly upregulated. An *in vivo* study revealed that CHC-encapsulated iPSCs with BMP-6 promoted mineralization as well as the formation of new connective tissue and PDL. Therefore, we suggest that CHC-encapsulated iPSCs with BMP-6 provides a new strategy to enhance periodontal regeneration.

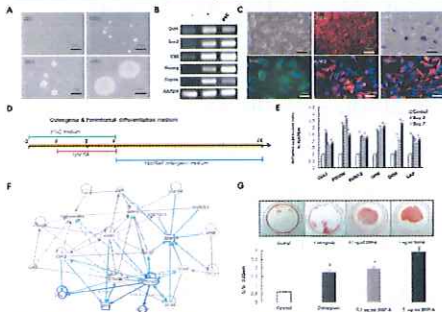
Keywords: BMP-6, hydrogel, inducible pluripotent stem cell, periodontal disease, periodontal ligament, mineralization.

OBJECTIVE

To develop a bioengineered material that combines reconstructed periodontal microenvironment and iPSC cells to enhance the efficacy of cell therapy in the treatment of periodontal diseases.

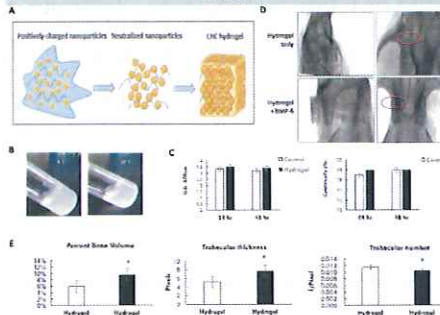
RESULTS

Osteogenic and periodontal differentiation from iPSC – identifying BMP6



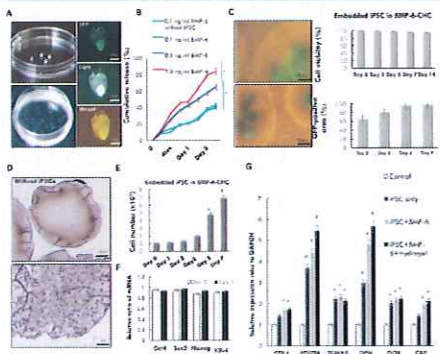
The EB colonies exhibited the typical round shape colony morphology with small, tightly packed cells (Fig. 1A). RT-PCR also showed that iPSCs expressed various stemness genes, such as *Ox44*, *Sox2*, *Klf4*, *Nanog*, and *DPYSL3* (Fig. 1B). We then evaluated the pluripotency of iPSCs by measuring EB formation and three germ layer differentiation. Staining of specific markers showed positive signals for stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1), alkaline phosphatase (ALP), smooth muscle actin (SMA, mesoderm), neuronal marker (Map2), and Nestin (ectoderm) in iPSCs (Fig. 1C). We modified prior formulas to induce iPSCs into osteogenic and periodontal differentiation in a more efficient way (Fig. 1D). The expression levels of *POSTN* and *OPN* were significantly up-regulated after 7-days treatment with induction medium, compared with non-induction iPSC (control) (Fig. 1E). Literature-based Ingenuity Pathway Analysis (IPA) found that BMP-6 was closely linked to several markers and effects involved in bone formation (Fig. 1H). Then, we applied ARS staining to compare the different osteogenic ability of iPSCs after adding three different media. With the 10% (v/v) cerium pyridinium chloride (CPC) in 10 mM sodium phosphate for 15 minutes at room temperature, the strongest ARS staining was observed in the 1 ng/ml BMP-6 group, which had best mineralization ability among the groups, followed by the 0.1 ng/ml BMP-6, osteogenic medium-only and control groups (Fig. 1G).

Preparation of BMP-6-releasing hydrogel and its osteogenesis effects in maxillary-molar defect animal models



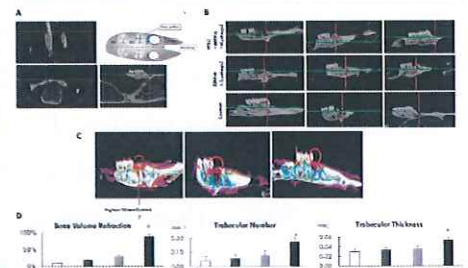
With the advantage of thermosensitive properties, we then examined whether the hydrogel could be an effective carrier of BMP-6 for sustaining BMP-6 function in periodontal defects. We first prepared a hydrogel nanoscale hydrogel containing BMP-6 by incorporating BMP-6 peptides into hydrogels (Fig. 2A-B). The BMP-6-incorporated thermosensitive hydrogel was then applied to periodontal defects in rats. One of the major advantages of the hydrogel was that it could remain gel form at 4°C and transform into liquid at 37°C (Fig. 2B). To evaluate the cytotoxicity of the hydrogel, we conducted a crystal violet assay and lactate dehydrogenase (LDH) assay in iPSCs. The results of both the crystal violet and LDH assays showed no significant differences between the control (mESC media only) and experimental groups (hydrogel extraction) (Fig. 2C), which suggested that the hydrogel had little cytotoxicity toward the iPSCs. Next, we evaluated the osteogenic ability of BMP-6 in periodontal defects. We chose 10 ng/ml as an optimal BMP-6 concentration to be incorporated into hydrogel for *in vitro* experiments. After 6 weeks of treatment, osteogenesis identified by α -BSPs was significantly higher in rats treated with 10 ng/ml hydrogel/BMP-6 than in rats treated only with hydrogel (Fig. 2D). Measurements in osteogenesis within periodontal defects were conducted to determine the percentage of bone volume, trabecular thickness and trabecular number, and they were all significantly different between the hydrogel/BMP-6 and hydrogel-only groups (Fig. 2E). Taken together, these findings showed that BMP-6-conjugated hydrogel presented greater efficiency for promoting osteogenesis than hydrogel alone.

Preparation of BMP-6-releasing iPSC-containing hydrogel as an osteogenic scaffold in an animal model of maxillary-molar defects.



Periodontal defects were created over rat maxilla as previously described (Fig. 3A), and hydrogel was mixed with iPSCs and 10 ng/ml BMP-6 for post-operative injection into periodontal defects. The 3D reconstructed and sectioned images were collected by micro-CT at 6 weeks post-operation to investigate the osteogenic inductivity under different experimental settings, such as iPSC-BMP-6-hydrogel, BMP-6-hydrogel, hydrogel only and the control group (Fig. 3B). From the section views, more detailed information about new bone formation was provided (Fig. 3C), and significantly more regenerated bony tissues were identified in the iPSC-BMP-6-hydrogel-treated group (Fig. 3C). In qualitative measurements after 6 weeks post-transplantation, only the iPSCs-combined BMP-6 group and hydrogel (iPSC-BMP-6-hydrogel) showed significantly greater bone volume fraction relative to other groups (Fig. 3D). With respect to trabecular numbers, the iPSC-BMP-6-hydrogel group provided significantly higher trabecular numbers (Fig. 3D), and similar results were observed for trabecular thickness.

Micro-CT (μ -CT) analysis on animal model with maxillary-molar defects to evaluate the osteogenesis effects of BMP-6-releasing iPSC-containing hydrogel.



Periodontal defects were created over rat maxilla as previously described (Fig. 4A), and hydrogel was mixed with iPSCs and 10 ng/ml BMP-6 for post-operative injection into periodontal defects. The 3D reconstructed and sectioned images were collected by micro-CT at 6 weeks post-operation to investigate the osteogenic inductivity under different experimental settings, such as iPSC-BMP-6-hydrogel, BMP-6-hydrogel, hydrogel only and the control group (Fig. 4B). From the section views, more detailed information about new bone formation was provided (Fig. 4C), and significantly more regenerated bony tissues were identified in the iPSC-BMP-6-hydrogel-treated group (Fig. 4C). In qualitative measurements after 6 weeks post-transplantation, only the iPSCs-combined BMP-6 group and hydrogel (iPSC-BMP-6-hydrogel) showed significantly greater bone volume fraction relative to other groups (Fig. 4D). With respect to trabecular numbers, the iPSC-BMP-6-hydrogel group provided significantly higher trabecular numbers (Fig. 4D), and similar results were observed for trabecular thickness.

CONCLUSION

Taken together, the findings in this study revealed that the iPSCs+BMP-6 group could promote bone formation compared to the BMP-6 group. The iPSCs+BMP-6 group demonstrated new bone formation by using micro-CT imaging. Histomorphological results demonstrated the new periodontal tissue formation. Therefore, we suggest that iPSCs combined with BMP-6 may provide a new strategy for periodontal regeneration.