

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11267

研究課題名(和文)フィーダーフリー・ゼノフリー治療用ヒトiPS細胞による下歯槽神経再生への挑戦

研究課題名(英文)Challenge to inferior alveolar nerve regeneration by human iPS cells for feeder-free and xeno-free system

研究代表者

河奈 裕正(Kawana, Hiromasa)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：50224803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題はiPS細胞から神経堤細胞を誘導し、損傷神経組織の機能回復を目指す戦略を立てた。将来的な細胞治療を念頭に置き、動物由来の成分を使用しないフィーダーフリー、ゼノフリーでのiPS細胞培養法と、その状態から神経堤細胞への誘導方法を確立した。誘導した神経堤細胞集団が実際に末梢神経損傷を回復させるポテンシャルを有するかどうかを検証するため、坐骨神経切断モデルの作製とその機能評価に着手した。移植した誘導神経堤細胞は間葉系幹細胞の性質も持っていることがわかっており、移植実験においても末梢神経マーカーを発現しつつ、血管内皮細胞も再生神経組織内に誘導できていることを確認できた。

研究成果の概要(英文)：The present study aims to induce neural crest cells from iPS cells and restore function of damaged nerve tissue. We established iPS cell culture method with feeder-free, xeno-free system for inducing neural crest cells. In order to investigate whether the induced neural crest cell population actually has the potential to restore peripheral nerve injury, we started the creation of the sciatic nerve cutting model and its functional evaluation. We found that transplanted induced neural crest cells possess the properties of mesenchymal stem cells and vascular endothelial cells that could also be induced into regenerating nerve tissues. These cells expressed peripheral nerve markers in transplantation tissues.

研究分野：口腔外科学

キーワード：末梢神経再生 神経損傷

1. 研究開始当初の背景

インプラント治療における神経損傷は、口腔機能を高めるはずのインプラント治療が逆に患者に苦痛を与え、著しいQOLの低下を招く。末梢神経の損傷は神経切断部から末梢の神経線維がすべて Waller 変性するだけでなく、終末受容器も変性し、最終的には消失してしまう。そのため、神経切断が確実であると診断されれば外科的修復手術が適応となっている。しかし神経縫合術や神経移植術は3~6か月以内に修復処置を試みなければ、神経線維や終末受容器は消失し、慢性期においては確実な神経再生を期待するのは困難なことが多い。そこで研究代表者は現在有効な治療法がない下歯槽神経断裂症例に対して、治療用ヒト iPS 細胞を用いた下歯槽神経誘導再生療法の確立を試みる。近年では組織幹細胞において最も臨床応用研究が行われている間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells; MSCs) の末梢神経損傷モデルへの移植や、iPS 細胞から末梢神経再生を目指した研究も報告されている。しかしながらこれらの研究は (1) ほとんどがマウスやラットの細胞を用いたものであり、これらの研究結果からヒトへの応用は著しい飛躍があること。(2) MSCs 移植においては複数回の継代培養を経て樹立された純度の低い培養細胞集団を用いた実験であること。(3) 発生学的に考察しても継代培養で樹立した従来型 MSCs から末梢神経への分化誘導は困難であることが予想されること。(4) ヒト iPS 細胞の下歯槽神経細胞への誘導方法は未だ確実な方法はほとんど示されておらず、報告されているものはマウスフィーダー細胞やウシ血清が用いられていること。(5) 移植実験に関しては定量的評価や安全性の評価方法はほとんど報告されていないことが問題点として挙げられる。そこで研究代表者はヒト iPS 細胞を用いた下歯槽神経再生療法を確実かつ安全に臨床応用へ展開するための基盤研究を提案する。末梢神経は「神経堤細胞」と呼ばれる細胞群からつくられ、これらはできたばかりの脊髄から遊走を始め、胚内を広く移動して末梢神経 (神経細胞とグリア細胞) に分化する。この発生学的事実をもとに、本研究を進めていく上で我々はこれまで次のような研究結果、を得て、本研究計画を遂行していく準備をした。

マウス MSCs の特異的マーカーが PDGFR⁺ Sca-1⁺ CD45⁻ Ter119⁻ (Morikawa et al. Nat Protoc. 2012, JEM 2009) であり、この純化 MSCs は神経堤に由来することを明らかにした (Morikawa et al. BBRC 2009)。

ヒトでは CD271⁺ CD90⁺ CD106^{hi} (Mabuchi, Morikawa et al. Stem Cell Reports 2013) が MSCs 特異的マーカーであり、神経細胞とグリア細胞への分化能を有することを示した。

2. 研究の目的

本研究では治療用ヒト iPS 細胞を用いたマウス移植実験に加え、霊長類コモンマーモセットも用いて下歯槽神経組織再生メカニズムを免疫組織化学的手法と画像解析によって明らかにし、安全・確実な下歯槽神経再生療法を確立することである。計画している具体的な研究項目は、(1) 京都大学からヒト iPS 細胞の提供を受け、将来の移植治療を見据えたゼノフリー・フィーダーフリーの培養方法で下歯槽神経の発生学的起源である神経堤細胞への誘導とそこから下歯槽神経への分化方法を構築する。(2) マウスとコモンマーモセットの下歯槽神経損傷 (神経断裂) モデルを作製する。(3) (2) の下歯槽神経断裂モデルに移植治療を行い、マイクロ CT・MRI・発光イメージングを駆使して末梢神経組織再生様式を解析し、有効性と安全性を評価する、の3つであった。

3. 研究の方法

(1) ヒト臨床応用が可能なレベルで安全性が担保された iPS 細胞樹立方法の確立

京都大学からヒト iPS 細胞の供給を受け、フィーダーフリー (マウス支持細胞なし) / ゼノフリー (ヒト以外の動物由来成分不含有) の安全性が確保された iPS 細胞培養方法を確実に行える実験系を確立する。

(2) 頭部神経堤細胞と三叉神経下歯槽神経への分化誘導培養方法の確立

神経堤は発生期の神経管が閉鎖するときその背側に存在し、神経管から出て広く周囲の組織に遊走し、様々な細胞に分化することが知られている。またそのほとんどが頭部間葉組織の源になっており、一般的な結合組織・骨・軟骨・血管の周皮細胞・平滑筋・象牙芽細胞、そして脳神経節の発生に関与する。分化への万能性を有する上記1で樹立した治療用ヒト iPS 細胞を利用して三叉神経の発生を模倣する分化誘導系を確立し、下歯槽神経への分化誘導法の確立を試みる。

(3) 霊長類コモンマーモセットおよびマウスの下歯槽神経切断モデル (Neurotmesis model) の作製

マウスやラットを用いた神経切断モデルや、それに対する細胞移植研究はこれまでも報告されている。しかし系統樹の上ではヒトと大きく離れているために、病態モデルとしてはげっ歯類マウス・ラットから霊長類ヒトへの応用はかなり飛躍があり、ヒトと同じ霊長類を用いた細胞移植治療研究は治療効果や安全性を検討するためにも必須であると考えている。そこでコモンマーモセットにおける上顎骨・下顎骨、特に三叉神経系を含めた正常解剖を詳細に把握した後、下歯槽神経切断モデルを作製する。移植細胞の動態評価を行う上でレポーター遺伝子の導入も考えていることから、免疫不全マウスへのヒト細胞移植実験も同時に計画した。

(4) 移植治療の安全性とマイクロ CT/MRI/発光イメージングを用いた画像解析評価方法の確立

ホタル由来の酵素であるルシフェラーゼの遺伝子をヒト培養細胞に導入すると、ルシフェリンのBioluminescent Imaging (BLI; 発光イメージング) が可能となる。また動物用マイクロ CT や MRI も同時に利用し、発光量やCT値・MRI信号を用いることで治療移植細胞の評価が非侵襲的かつ定量的に可能となる。すなわち生体内における局在と動態、再生組織、あるいは移植細胞の非腫瘍原性を評価する仕組みを確立することを目指す。

4. 研究成果

本研究課題は解剖学的に特殊な環境下にある下歯槽神経損傷後の細胞治療による機能回復を目標としていた。具体的には下歯槽神経の発生学的起源である外胚葉性間葉 = 神経堤細胞を用いることが理想的であると考えられるが、生体内から神経堤細胞を分離する方法はまだ確立されていないため、iPS細胞から神経堤細胞を誘導し、損傷神経組織の機能回復を目指す戦略を立てた。初年度は将来的な細胞治療を念頭に置き、動物由来の成分を使用しないフィーダーフリー、ゼノフリーでのiPS細胞培養法と、その状態から神経堤細胞への誘導方法を確立した。2016年度は誘導した神経堤細胞集団が実際に末梢神経損傷を回復させるポテンシャルを有するかどうかを検証するため、坐骨神経切断モデルの作製とその機能評価に着手した。マウス坐骨神経束を、切断後にスキャフォールドと一緒に神経断端部に移植する方法を採用した。2017年度は細胞治療後の組織学的評価と機能評価をおこなった。これまでの研究結果から、移植した誘導神経堤細胞は間葉系幹細胞の性質ももっていることがわかっており、移植実験においても末梢神経マーカーを発現しつつ、血管内皮細胞も再生神経組織内に誘導できていることを確認できた。iPS細胞から誘導した間葉系幹細胞の性質を有する神経堤細胞はシュワン細胞に分化し、神経栄養因子とミエリネーションを誘導していることが示唆された。一方、間葉系幹細胞の性質も示していることからシュワン細胞と同じく神経栄養因子とVEGFを分泌し、周囲から血管内皮細胞を誘導していることも示唆された。すなわちiPS細胞から誘導された神経堤細胞はシュワン細胞への分化と間葉系幹細胞の性質を併せ持つことで、神経栄養因子の分泌・ミエリネーション・血管内皮細胞誘導を実現することで、末梢神経再生に寄与しうることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

すべて査読有り

1. Ouchi T, Morikawa S, Shibata S, Fukuda K, Okuno H, Fujimura T, Kuroda T, Ohyama

M, Akamatsu W, Nakagawa T, Okano H. LNGFR(+)THY-1(+) human pluripotent stem cell-derived neural crest-like cells have the potential to develop into mesenchymal stem cells. *Differentiation*. 2016 Dec;92(5):270-280. doi: 10.1016/j.diff.2016.04.003 Epub 2016 May 10. PubMed PMID: 27178356.

2. Morikawa S, Ouchi T, Shibata S, Fujimura T, Kawana H, Okano H, Nakagawa T. Applications of Mesenchymal Stem Cells and Neural Crest Cells in Craniofacial Skeletal Research. *Stem Cells Int*. 2016;2016:2849879. doi: 10.1155/2016/2849879. Epub 2016 Feb 24. Review. PubMed PMID: 27006661; PubMed Central PMCID: PMC4783549.

〔学会発表〕(計13件)

1. Ouchi T, Shibata S, Kimura H, Nagoshi N, Fujimura Y, Morikawa S, Sato K, Kawana H, Fukuda K, Nakamura M, Nakagawa T, Okano H. LNGFR(+)THY-1(+) multipotent stem cells derived from human induced pluripotent stem cells. 18th International Congress of Developmental Biology 2017.

2. 森川 暁. 高純度間葉系幹細胞の研究展開および臨床応用への可能性. 第60回春季日本歯周病学会学術大会 2017.

3. Ouchi T, Morikawa S, Nakagawa T, Kawana H. Neural Crest Cells Derived from Human iPS Cells: Differentiation, Multilineage Potential and Dramatic Fate. 第62回(公社)日本口腔外科学会総会 2017.

4. Ouchi T, Morikawa S, Nakagawa T, Kawana H. Neural Crest Cells Derived From Human iPS Cells: Differentiation, Multilineage Potential And Dramatic Fate. 第62回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会. 第2回 日中口腔顎顔面外科合同シンポジウム. Young Doctor's Competition 2 2017.

5. Ouchi T, Morikawa S, Nakagawa T. LNGFR+THY-1+ neural crest like cells have potential of mesenchymal stem cells. 102nd Annual Meeting of the American Academy of Periodontology 2016.

6. Ouchi T, Kawana H, Morikawa S, Okano H, Nakagawa T. Application of human induced pluripotent stem cell to craniofacial developmental biology and regenerative medicine. 66 Kongress & Praxisführungsseminar der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie 2016.

7.黄地健仁, 森川暁, 芝田晋介, 福田公子, 奥野博庸, 藤村匠, 大工学, 赤松和土, 中川種昭, 岡野栄之. ヒト多能性幹細胞由来 LNGFR+THY-1+神経堤様細胞は間葉系幹細胞の性質をもつ. 第 37 回日本炎症・再生医学会 2016.

8.黄地健仁, 森川暁, 芝田晋介, 奥野博庸, 大工学, 赤松和土, 岡野栄之, 中川種昭. ヒト ES/iPS 細胞由来 LNGFR+THY-1+神経堤様細胞は間葉系幹細胞の性質をもつ. 第 15 回日本再生医療学会総会 2016.

9.黄地健仁, 森川暁, 岡野栄之, 中川種昭. ヒト iPS 細胞と霊長類コモンマーモセットを用いた新規歯周組織再生療法の試み. 第 59 回春季日本歯周病学会学術大会 2016.

10.黄地健仁, 森川暁, 堀江伸行, 河奈裕正, 中川種昭. バイオイメージング技術とカラーゲン及びスフェロイド形成を用いた in vivo トレーシングシステムの確立. 第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会 学術集会 2016.

11.Uchi T, Morikawa S, Nakagawa T. Purified-Mesenchymal stem cells in human induced pluripotent stem cells derived neural crest cells (P0605). EuroPerio8 (8TH CONFERENCE OF THE EUROPEAN FEDERATION OF PERIODONTOLOGY) 2015.

12.黄地健仁, 森川暁, 石淵智子, 植松明子, 岡原則夫, 井上貴史, 岡原純子, 中川種昭, 佐々木えりか, 岡野栄之. コモン・マーモセットにおける歯科口腔解剖及び疾患. 第 4 回マーモセット研究会大会 2015.

13.黄地健仁, 森川暁, 新部邦透, 奥野博庸, 赤松和土, 中川種昭, 栄之 岡. ヒト iPS 細胞由来神経堤細胞群における効率的な純化間葉系幹細胞の回収. 第 14 回日本再生医療学会総会 2015.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 1 件)

名称：ヒト iPS 細胞から、ヒト歯原性上皮細胞やヒト歯原性間葉細胞を製造する方法

発明者：黄地健仁、森川暁、中川種昭、岡野栄之

権利者：学校法人慶應義塾

種類：特許

番号：2016-192962

取得年月日：平成 28 年 11 月 17 日

国内外の別：国内

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河奈 裕正 (KAWANA, Hiromasa)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・准教授

研究者番号：58224803

(2)研究分担者

森川 暁 (MORIKAWA, Satoru)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・専任講師

研究者番号：00424169