

令和元年6月15日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11703

研究課題名(和文) iPS細胞由来神経堤細胞が軸索再生に及ぼす効果と作用機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of action and effects of induced pluripotent stem cell-derived neural crest cells on axonal regeneration

研究代表者

鳥海 拓 (TORIUMI, Taku)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：40610308

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)：ヒトiPS細胞由来神経堤細胞(NCC)を損傷末梢神経へ移植し、感覚機能の回復と軸索再生への有効性を検討した。NCCまたはラットシュワン細胞を中空性担体に播種し、ラット下歯槽神経欠損部へ移植すると、3日目にNCC群では下唇の侵害機械刺激に対する逃避反射閾値が低下した。また14日目にNCC群の再生軸索中央部で、ヒトミトコンドリアとS-100の共陽性細胞を認めた。また、ニューロフィラメント200陽性線維数は、NCC群とシュワン細胞群で有意な差はなかった。以上より、iPS細胞由来NCCは移植部で生着して軸索再生を誘導し、シュワン細胞と同等に感覚機能の回復に有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経欠損部位ではその軸索断端から神経誘導因子が放出されると考えられており、移植したiPS細胞由来神経堤細胞は生体内の場の環境に適応し、シュワン細胞へ分化する可能性が本研究成果により示唆された。現在、京都大学iPS研究所では『再生医療用iPS細胞ストックプロジェクト』を進めており、臨床応用を踏まえ、高頻度のHLA型を持つ個人からiPS細胞を作製・保存している。iPS細胞を利用した再生医療は今後さらなる進展が期待されており、利用が困難なヒトシュワン細胞に代わり、ヒトiPS細胞由来神経堤細胞は末梢神経損傷のための細胞治療ソースとなり得る可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the effectiveness of human induced pluripotent stem cell-derived neural crest cells (NCC) transplantation in the recovery of sensory function and regeneration after peripheral nerve injury. Inferior alveolar nerve transection was performed in rats, and the gap was bridged using NCC or rat Schwann cell-seeded collagen tube. In the NCC group, the threshold of head-withdrawal reflex to mechanical stimulation of the lower lip began decreasing on day 3 post-transplantation. Immunofluorescence analysis revealed human mitochondria and S-100 double-positive cells in regenerating axons in the middle of the NCC-seeded tubes on day 14 post-transplantation. In addition, the number of neurofilament 200-positive fibers was not significantly different between the NCC and rat Schwann cell transplantation group. These findings suggest that human iPS cell-derived NCC might contribute to guiding axonal regeneration and sensory function recovery.

研究分野：再生歯学，幹細胞生物学

キーワード：ヒトiPS細胞 神経堤細胞 末梢神経損傷 下歯槽神経

1. 研究開始当初の背景

末梢神経損傷に対する自家神経移植は正常神経の採取を伴い、新たな知覚麻痺が生じるなど機能障害は避けられない。そこで自家神経移植の代替えとして中空性の担体の開発が行われてきたが、残存した神経の再生能力に依存するため、再生範囲には限界がある。そこで細胞移植治療と組み合わせれば、神経断端の近位から伸長する再生軸索が移植細胞の効果によって効率良く遠位へとガイドされ、末梢神経の再生が促進すると考えられる。その細胞ソースとしては末梢神経グリアであるシュワン細胞が候補として挙げられる。しかし、シュワン細胞の単離には新たな神経片の採取が必要であり、また大量培養が困難であるため、臨床応用を目指す場合には新たな細胞ソースの探索が求められている。

現在、体細胞へ特定の遺伝子を導入することで、未分化な induced Pluripotent Stem Cells (iPS 細胞) を作製することが可能になった。iPS 細胞は多能性と自己複製能を有し、大量培養が可能である。また、シュワン細胞は神経堤細胞から分化することが明らかになっている。そこで、iPS 細胞から分化誘導した神経堤細胞を、末梢神経損傷治療の細胞ソースとして利用できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

歯科口腔外科領域では、手術や外傷により末梢神経が損傷されることも少なくない。末梢神経が損傷されると、末梢性神経グリアであるシュワン細胞が再生軸索の誘導を担うことから、損傷末梢神経再生に対するシュワン細胞移植の有効性が報告されている (Hadlock et al., Tissue Eng 2000)。しかし、シュワン細胞を採取するには神経組織の摘出が必要であり、ドナーへの新たな犠牲を払う。そこで、本研究課題では末梢神経再生に有効な細胞ソースとして、iPS 細胞から分化誘導した神経堤細胞 (シュワン細胞の前駆細胞) に着目し、場の環境による生体内での分化能と軸索再生効果の作用機序を解明することを目的とした。本研究により末梢神経の再生に真に有効な細胞ソースが同定され、臨床応用に使用できる可能性が高まる。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞から神経堤細胞への誘導

胚性幹細胞から神経堤細胞への分化誘導法 (Bajpai et al., Nature 2010) を応用し、iPS 細胞 (253G1; Nakagawa et al., Nat Biotechnol 2008、および乳歯歯髄細胞由来 iPS 細胞; Toriumi et al., Biomed Res 2015) を神経堤細胞へ分化させた。iPS 細胞をシングルセルとし、神経堤細胞誘導培地で 8 日間浮遊培養してニューロスフェア (NS) を作製した。そして、フィブロネクチンコートしたディッシュへ移し、接着した NS から外生した細胞を神経堤細胞とした (図 1)。

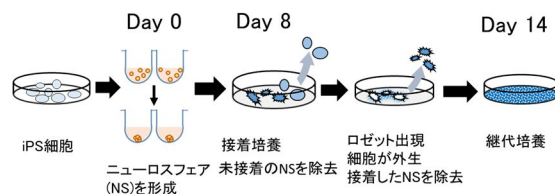


図1. iPS細胞から神経堤細胞への誘導法

(2) 中空性担体への細胞播種

ヒト iPS 細胞(253G1)から誘導した神経堤細胞またはコントロールとしてのラットシュワン細胞各 1.0×10^6 個を I 型コラーゲン製中空性担体(長さ 5 mm) 1 本の内壁に播種し、2 日間培養した。なお、ラットシュワン細胞は、10 週齢雌性 SD ラットの坐骨神経を結紮・切除してワーラー変性させ、2 週間後に摘出した神経片を酵素処理して採取した。

(3) ラット下歯槽神経切除モデルへの移植

7 週齢雄性 SD ラットの右側咬筋を剥離後、露出した下顎骨をラウンドバーで一層除去し下顎管を開窓した。そして下歯槽神経を露出・切除し、神経断端を担体内に収め、4 mm の欠損を作成することで下歯槽神経切除モデルとした。なお、術前日から術後 14 日目まで免疫抑制剤であるシクロスポリンを毎日腹腔内に投与した。

(4) ラット下歯槽神経再生の評価

感覚機能評価では、2%イソフルランの吸入麻酔で半覚醒状態のラットを、electronic von Frey anesthesiometer (Bioseb)を用いて術前、術後 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 日と経日的に下唇の侵害機械刺激に対する疼痛反射閾値を測定した。また、術後 14 日目にラットを安楽死させ、移植担体部を摘出、パラフィン切片を作成して組織学および免疫組織学的に検討した。

(5) 神経堤細胞からシュワン細胞への誘導

神経堤細胞の特性のひとつとして、シュワン細胞への分化能を有するため、*in vitro*において検討した。神経堤細胞を L-オルニチン/ラミニンコートしたウェルに播種し、growth-factor-reduced medium で 10 週間培養した。

4. 研究の成果

(1) ヒト iPS 細胞由来神経堤細胞の特性

接着した NS から外生した細胞は、蛍光抗体法で神経堤細胞マーカーの AP2- β , Nestin および p75NTR のいずれにも陽性であり、ES 細胞マーカーの SSEA-4 には陰性を示した。また、フローサイトメトリーで神経堤細胞マーカーの HNK-1, p75NTR および間葉系幹細胞マーカーの CD73 の発現を認めた。これらの細胞は神経堤細胞の特性を有しており、iPS 細胞から神経堤細胞が誘導できることが確認できた。

(2) 感覚機能の解析

術前での下唇への侵害機械刺激による逃避反射閾値を 100%とし、閾値の割合が 150%を超えたものを反応無しとした。術後 1 日目では、神経堤細胞移植群およびコントロールであるシュワン細胞移植群共に、閾値の割合が 150%であったため、下歯槽神経が損傷され、知覚麻痺が出現していることが確認できた。神経堤細胞移植群では、シュワン細胞移植群と比較して、術後 3 日

目から逃避反射閾値の低下が確認された。術後 9-13 日目では、両群共に閾値の割合はほぼ一定であった。また、測定最終日である術後 13 日目では、両群ともに、Sham 群の閾値の割合まで低下することはなかった。臨床応用の実現のためには、下歯槽神経損傷前と変わらぬ閾値になる必要があり、今後の展望としては、長期に渡り観察し、それに合わせた超微細構造の解析を行いたい。

(3) 再生軸索の組織学・免疫組織学的解析

術後 14 日目で移植した中空性担体を摘出し、パラフィン切片を作成した。中空性担体の縦断像を観察すると、下歯槽神経の切断近位と遠位が連結した組織像が観察され、神経堤細胞移植群とシュワン細胞移植群共に軸索が再生したことが確認できた。神経堤細胞移植群の再生軸索中央部横断切片において、ヒトミトコンドリアとシュワン細胞のマーカーである S-100 の抗体による二重染色で陽性を示す細胞を認めた。つまり、ヒト iPS 細胞由来神経堤細胞は移植部で生着し、シュワン細胞様細胞へと分化し、軸索再生を誘導した可能性が示唆される。また、神経堤細胞移植群で軸索マーカーであるニューロフィラメント 200 に陽性を示す再生軸索数は、シュワン細胞移植群と比較して有意な差はなかった。この結果は、iPS 細胞由来神経堤細胞が末梢性グリアであるシュワン細胞と同等の軸索誘導能を有する細胞へと分化した可能性を示唆するものである。

(4) ヒト iPS 細胞由来神経堤細胞からシュワン細胞への分化

In vivo の結果より、*in vitro* における神経堤細胞が有するシュワン細胞への分化能を検討した。growth-factor-reduced medium で培養した神経堤細胞は、細長い突起をもつシュワン細胞様の形態に変化し、誘導 5 週目でシュワン細胞マーカーである GFAP と S100 に陽性、誘導 10 週目で Myelin P2 に陽性を示した。この *in vitro* での実験結果は、ヒト iPS 細胞由来神経堤細胞がシュワン細胞への分化能を有することをさらに支持するものである。

(5) 神経堤細胞へ緑色蛍光タンパクの導入

移植細胞のトラッキングを可能にするために、レンチウイルスベクターを用いて緑色蛍光タンパク ZsGreen1 を神経堤細胞へ導入した。ZsGreen1 陽性神経堤細胞は Nestin に陽性を示し、その特性に変化が無いことを確認した。今後の研究には、ZsGreen1 陽性神経堤細胞の活用を考えている。

< 引用文献 >

Hadlock T, Sundback C, Hunter D, Cheney M, Vacanti JP. A polymer foam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng.* 2000, 6:119-127.

Bajpai R, Chen DA, Rada-Iglesias A, Zhang J, Xiong Y, Helms J, Chang CP, Zhao Y,

Swigut T, Wysocka J. CHD7 cooperates with PBAF to control multipotent neural crest formation. *Nature*. 2010, 463:958–62.

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2008, 26:101–106.

Toriumi T, Takayama N, Murakami M, Sato M, Yuguchi M, Yamazaki Y, Eto K, Otsu M, Nakauchi H, Shirakawa T, Isokawa K, Honda MJ. Characterization of mesenchymal progenitor cells in the crown and root pulp of primary teeth. *Biomed Res*. 2015, 36:31–45.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

Okuwa Y, Toriumi T, Nakayama H, Ito T, Otake K, Kurita K, Nakashima M, Honda M. Transplantation effects of dental pulp-derived cells on peripheral nerve regeneration in crushed sciatic nerve injury, *J Oral Sci*, 査読有, Vol.60, 2018, 526–535

DOI: 10.2334/josnusd.17-0462.

Toriumi T, Kawano E, Yamanaka K, Kaneko T, Oka A, Yuguchi M, Isokawa K, Honda M. Odontogenic tissue generation derived from human induced Pluripotent Stem cells using tissue engineering application, *J Hard Tissue Biol*, 査読有, Vol.27, 2018, 257–268

DOI: 10.2485/jhtb.27.257.

Kawano E, Toriumi T, Iguchi S, Suzuki D, Sato S, Honda M. Induction of neural crest cells from human dental pulp-derived induced pluripotent stem cells, *Biomed Res*, 査読有, Vol. 38, 2017, 135–147, 2017

DOI: 10.2220/biomedres.38.135.

〔学会発表〕(計24件)

伊藤 発明、鳥海 拓、田中 翔、普天間 拓、大竹 啓太、大桑 雄太、栗田 賢一、本田 雅規 . 臨床症例に即したラット下歯槽神経損傷モデルへの細胞投与方法の開発、第18回日本再生医療学会総会、2019年

鳥海 拓、本田 雅規 . ヒト iPS 細胞から誘導した神経堤細胞による硬組織再生、第72回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、2018年

Toriumi T., Kawano E., Yuguchi M., Isokawa K., Honda M. Dentin and cementum engineering from neural crest cells derived from human induced pluripotent stem cells, The 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2017

鳥海 拓、渡辺 雅弘、篠田 雅路、普天間 拓、岩田 幸一、磯川 桂太郎、本田 雅規 . ラット下歯槽神経切除モデルにおける iPS 細胞由来神経堤細胞の移植効果、第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017 年

鳥海 拓、渡辺 雅弘、岡 篤志、篠田 雅路、磯部 仁博、佐久 太郎、岩田 幸一、磯川 桂太郎、本田 雅規 . iPS 細胞由来神経堤細胞を利用した下歯槽神経の再生、第 37 回日本歯科薬物療法学会学術大会、2017 年

鳥海 拓、河野 英輔、磯川 桂太郎、本田 雅規 . ヒト iPS 細胞から分化誘導させた神経堤細胞の特性、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 1 件）

名称：iPS 細胞の高効率な樹立方法

発明者：本田 雅規、鳥海 拓

権利者：学校法人日本大学

種類：特許

番号：特許第 6128511 号

取得年：平成 29 年

国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：本田 雅規

ローマ字氏名：(HONDA, masaki)

所属研究機関名：愛知学院大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号（8 桁）：70361623

研究分担者氏名：磯川 桂太郎

ローマ字氏名：(ISOKAWA, keitaro)

所属研究機関名：日本大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号（8 桁）：50168283