

令和元年5月29日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15048

研究課題名(和文)ウマにおける移植医療の発展に向けた歯髄幹細胞のバンク化

研究課題名(英文)Banking of dental pulp stem cells for the development of transplantation medicine in horses

研究代表者

帆保 誠二(HOBO, Seiji)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授

研究者番号：60446507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では獣医療における幹細胞移植医療の発展のために、新たな幹細胞源として間葉系幹細胞(MSC)の一種である歯髄幹細胞(DP-MSC)を用いて、幹細胞バンクを設立することを目的とした。ウマDP-MSCの適切な分離・培養法の確立とその細胞機能の解析を行った結果、抜歯2週間後の狼歯からもMSCの特性を有する細胞の分離に成功した。続いて、安全な移植のためにウマにおける主要組織適合抗原(MHC)のハプロタイプについて検討した結果、ヒトでは数万人に一人と言われている、移植医療において有用なホモ型を有する個体が5%以上と高い割合で存在することが分かった。以上から安全なウマ幹細胞バンク設立の基盤が完成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幹細胞移植による運動器疾患の治療は、競走馬だけでなくヒトをはじめとした多くの動物種で期待されている。競走馬はいわば究極のアスリートであり、運動器疾患の罹患率が非常に高いと同時に、多くの罹患馬は若齢である。よって、バンク化された幹細胞の応用検証を、ヒトと比較し極めて短いサイクルで多く行うことが可能である。すなわち、バンク化した細胞の臨床試験結果を短期間のうちに数多く蓄積することが可能であることから、競走馬以外のヒトを含めた動物種においてバンク化された幹細胞の移植医療に対して多くの知見を与えることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, for the development of stem cell transplantation medical treatment in Veterinary Medicine, we aimed to establish a stem cell bank using dental pulp stem cells (DP-MSC), which is a kind of mesenchymal stem cells (MSC), as a new stem cell source. As a result of establishing the appropriate separation and culture method of equine DP-MSC and analyzing the cell function, we succeeded in separating the cells having MSC characteristics from the wolf tooth carries two weeks after tooth extraction. Subsequently, we examined haplotypes of major histocompatibility antigens (MHC) in horses for safe transplantation. As a result, it has been found that as many as 5% or more of individuals having a homomorphism, that are useful in transplantation medicine but only one in tens of thousands in humans. From the above, the foundation for establishing a safe equine stem cell bank has been completed.

研究分野：内科学

キーワード：間葉系幹細胞 髄由来幹細胞 MHCハプロタイプ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 従来の医療では治療困難な疾病に対する汎用的な代替技術として、幹細胞を利用した移植医療が注目されている。ウマにおいても競走馬の屈腱炎に対する間葉系幹細胞を利用した治療法が発展し、その臨床的な有用性について近年報告されるようになってきた。現在多くの症例で、治療に用いるための MSC として骨髄由来幹細胞 (Bone marrow derived mesenchymal stem cell: BM-MSC) が使用されているが、BM-MSC は幾つかの短所、即ち、(1) 加齢とともに採取可能な幹細胞数が減少する、(2) 細胞増殖能が低い、(3) 幹細胞採取には激しい生体侵襲を伴う、がある。

(2) 歯髄には様々な細胞が存在しているが、近年ヒトやマウスにおいて歯髄に強力な幹細胞 (DP-MSC) が存在することが発見され注目を集めている。DP-MSC は次のような長所、即ち、(1) 細胞の増殖能が高い、(2) 遺伝子損傷が少ない、(3) 細胞療法において有用なサイトカインを他の MSC より多く産生する、(4) 採取に追加の侵襲を伴わない、を有していると報告され、ヒトにおいては抜歯した歯から幹細胞を抽出、培養した後に保存しておく歯髄幹細胞バンクが設立され応用が期待されている。ウマにおいて、脱落乳歯や抜歯狼歯は医療廃棄物として処理されることから、これらから DP-MSC が抽出・培養できれば、移植医療の新たな幹細胞源として有用であると考えられる。

2. 研究の目的

ウマ DP-MSC の分離・培養方法を確立する。その性質について解明し、移植医療適応への有用性を検討する。そして、将来的な幹細胞バンク設立・安全な移植実現のためにウマ主要組織適合抗原 (MHC) ハプロタイプングの方法について検討する。

3. 研究の方法

(1) ウマ DP-MSC の適切な分離・培養法の確立とその細胞機能の解析

分離・培養法の確立

- ・抜歯狼歯を処理して細胞を分離・培養する方法について検討した
- ・狼歯の輸送方法を検討した
- ・分離した細胞の保存方法について検討した

細胞機能の解析

- ・分離した細胞のプラスチック接着性およびコロニー形成能について解析した
- ・分離した細胞の表面抗原マーカーの発現を FACS により解析した
- ・分離した細胞の分化能について分化培養によって検討した

(2) ウマ MHC ハプロタイプングについての検討

- ・マイクロサテライトマーカーを用いたウマ MHC ハプロタイプングの方法について検討する
- ・日本のサラブレッドにおける MHC の適合性について検討する

4. 研究成果

(1) ウマ DP-MSC の適切な分離・培養法の確立とその細胞機能の解析

分離・培養法の確立

抜歯狼歯から歯髄組織を摘出し、摘出した歯髄組織をコラゲナーゼおよびディスパーゼを含む酵素消化液を用いて処理し、細胞分散したものを培地 (-MEM) に混和し培養を行った。その結果プラスチックに接着し、コロニーを形成する細胞の分離に成功した。この細胞の P3 における Cell doubling time は 0.7 日と、報告されている骨髄、脂肪由来幹細胞よりも 2 倍近く早かった (図 1)。

抜歯狼歯の輸送方法としては冷蔵下で一般的な細胞培養用培地に浸した状態で輸送することにより抜歯 2 週間後の狼歯からも DP-MSC の分離に成功した。続いて保存法について検討したところ、市販の細胞保存液に保存したもので保存 1 年後において生存率が 90% を超えていた。さらに、その増殖能・分化能についても凍結前の性質が保存されていた。

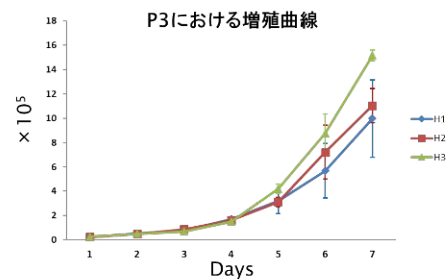
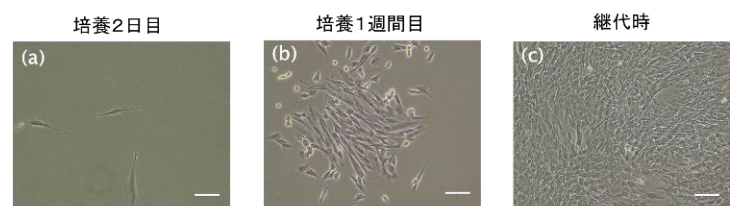


図1 分離細胞のプラスチック接着性と自己複製能

細胞機能の解析

間葉系幹細胞の条件として1. プラスティック接着能があり自己複製する、2. 間葉系幹細胞特有の表面抗原マーカーを発現している、3. 脂肪・骨・軟骨細胞への分化能がある、の3つがあげられる。分離した細胞についてこれらの条件について詳細に解析した。まず、プラスチック接着能と自己複製能については上記の図1のように示された。続いて表面抗原マーカーについて解析した。ウマの間葉系幹細胞は間葉系間質細胞マーカーであるCD11a/CD18, CD44, CD90, CD105が要請、造血性マーカーであるCD34, CD45が陰性であるとの報告がある。今回分離した細胞は図2のように間葉系間質細胞マーカーは陽性、造血性マーカーは陰性であった。また、主要組織適合抗原複合体を強く発現していたため、ハプロタイプが異なる個体間で他家移植を行うと拒絶反応が起こってしまうことが考えられた。

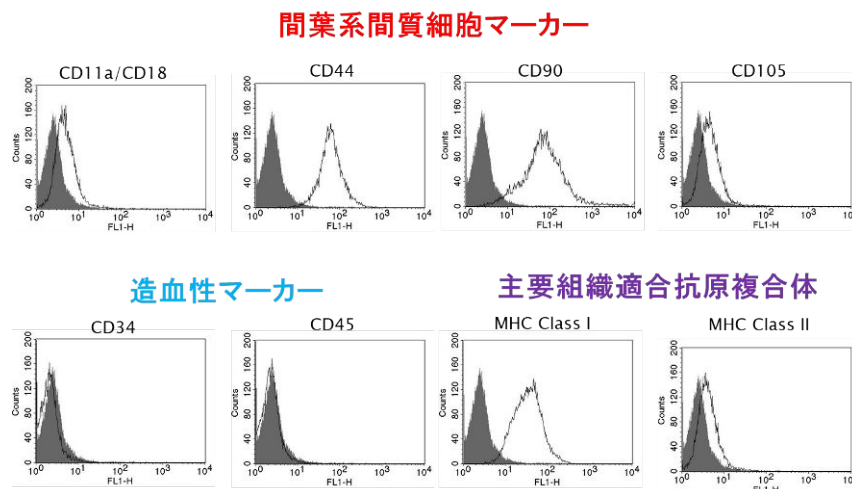


図2 表面抗原マーカー解析

続いて、分離した細胞を骨、脂肪および軟骨誘導培地で分化培養を行い、それぞれ alizarin red 染色、Oil red O 染色、Alcian blue 染色で骨、脂肪および軟骨分化能を確認した。その結果、分離した細胞は骨、脂肪および軟骨分化能を有していることが分かった。よって抜歯狼歯から分離した細胞は間葉系幹細胞としての機能を有していたことから、DP-MSC と呼称することとした。

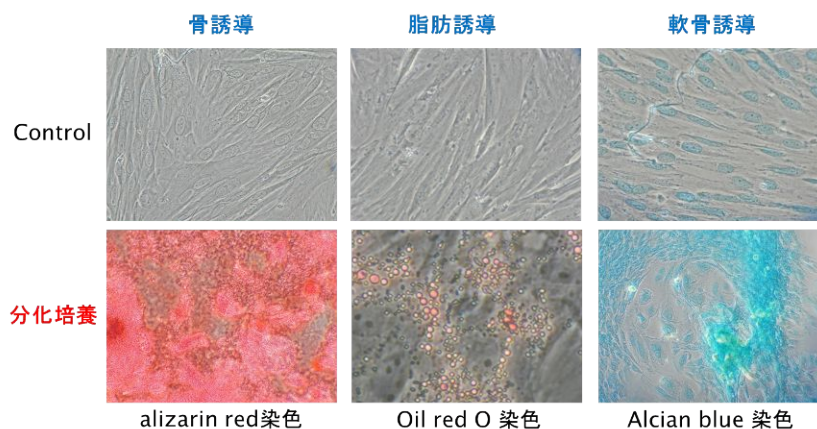


図3 骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能

以上から、DP-MSC の分離・培養・保存方法を確立することができた。

(2) ウマ MHC ハプロタイプングについての検討

Antczacらの報告にある(Tseng and Antczac., 2010 Anim Genet)MHC上に存在する11組のマイクロサテライト(UMN-JH-38, COR110, ABGe9019, UNMe65, ABGe9030, EQMHC1, TKY3324, COR112, COR113, UM011, COR114)を用いて型判別する方法について検討した。上記マイクロサテライトに対応する蛍光標識プライマーを作成し、PCRによってDNA断片を増幅し、キャピラリー電気泳動により型判定する方法を用いた。行った型判定結果からArlequinによりハプロタイプを推定した。その結果、日本のサラブレッドにおいてもMHC領域には多様性が存在するが、ヒトでは数万人に一人と言われている父親と母親から同一のハプロタイプを受け継いだ、移植医療において有用なホモ型ハプロタイプを有する個体が存在する確率が5%以上と高いことが分かった。

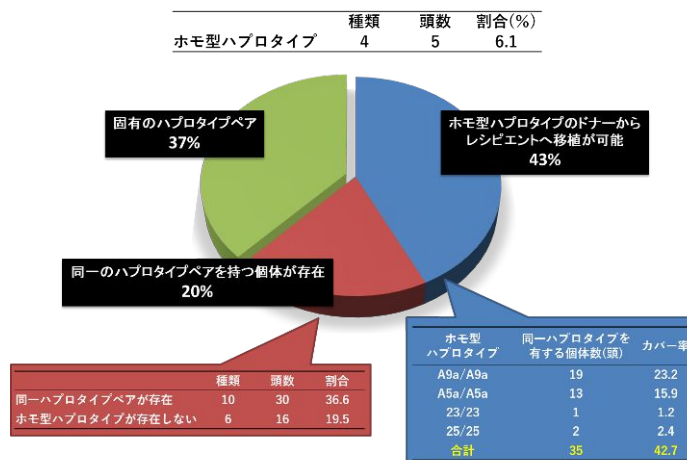


図4 移植拒絶が起こらない他家移植の可能性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) Ishikawa S、Horinouchi C、Murata D、Matsuzaki S、Misumi K、Iwamoto Y、Korosue K、Hobo S、Isolation and characterization of equine dental pulp stem cells derived from Thoroughbred wolf teeth、*Journal of Veterinary Medical Science*、査読有、79(1)、2018、47-51
- 2) Ishikawa S、Horinouchi C、Mizoguchi R、Senokuchi A、Kamikakimoto R、Murata D、Hatazoe T、Tozaki T、Misumi K、Hobo S、Isolation of equine peripheral blood stem cells from a Japanese native horse、*Journal of Equine Science*、査読有、28(4)、2017、153-158

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) 石川真悟、村田大紀、堀之内千恵、松崎翔太、三角一浩、帆保誠二、サラブレッドの狼歯由来歯髄幹細胞培養法の確立とその特性、第 28 回ウマ科学会学術集会、28、東京、2015 年 12 月[最優秀発表賞]
- 2) 石川真悟、村田大紀、堀之内千恵、溝口隆悟、三角一浩、帆保誠二、サラブレッド狼歯由来歯髄幹細胞の簡便かつ安定的な培養法の確立、第 29 回ウマ科学会学術集会、15、東京、2016 年 11 月
- 3) 石川真悟、戸崎晃明、帆保誠二、マイクロサテライトを用いた日本のサラブレッドにおける MHC ハプロタイプの推定、第 30 回ウマ科学会学術集会、20、東京、2017 年 11 月
- 4) 石川真悟、瀬之口明音、戸崎晃明、佐藤文夫、帆保誠二、ウマ炎症性疾病治療のために最適な間葉系幹細胞バンクの検討、第 30 回ウマ科学会学術集会、11、東京、2018 年 11 月

〔図書〕(計 2 件)

- 1) 石川真悟、帆保誠二、馬歯髄幹細胞を用いた再生医療の近未来、BTC ニュース 108、8-11、2017.
- 2) 石川真悟、帆保誠二、馬における幹細胞療法の未来を切り開く!、MP アグロジャーナル 2018.04、33-36. 2018

〔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:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:

国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 石川 真悟

ローマ字氏名: ISHIKAWA Shingo

所属研究機関名: 鹿児島大学

部局名: 農水産獣医学域獣医学系

職名: 助教

研究者番号(8桁): 00755887

研究分担者氏名: 三角 一浩

ローマ字氏名: MISUMI Kazuhiro

所属研究機関名: 鹿児島大学

部局名: 農水産獣医学域獣医学系

職名: 教授

研究者番号(8桁): 10291551

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。