

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04411

研究課題名(和文) 成熟機能細胞の分化転換能(分化可塑性)を利用した新たな組織再生療法の可能性

研究課題名(英文) Possibility of new tissue regeneration therapy utilizing the transdifferentiation ability (differentiation plasticity) of mature functional cells

研究代表者

里村 一人 (SATOMURA, Kazuhito)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：80243715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：失われた組織や臓器の再生を目指す再生医療実現のための細胞源として、現在幹細胞を用いた研究が進められているが、生物学的制約や倫理的問題、遺伝子導入の安全性などいまだ克服すべき点が多い。そこで本研究では、細胞源を生体内において最終分化した細胞とし、これらに遺伝子導入を行うことなく、周囲環境の変化のみにより分化転換させ、目的とする再生医療を実現できる可能性につき検討した。その結果、最終分化した骨芽細胞から神経細胞への分化転換と考えられる現象を確認したが、その他の細胞については細胞の変化は認められるものの、明らかな分化転換とは断言できなかった。今後さらにこの事象について解析を進める予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により想定された結果が得られ、最終分化した機能細胞が実際に分化転換し、直接別の細胞として機能することが確認されたことから、再生医療実現のための新しい細胞供給源が確保されることとなり、まったく新たな観点からの再生医療の実現が可能となることが期待され、さらには現在熾烈な国際競争が繰り返されている再生医療分野において、わが国が強いリーダーシップをとることが可能になるものと考えられる。ただし、さらに様々な系統を異にする細胞を用いて、分化転換が可能か否かについて検討する必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Research using stem cells is currently underway as a cell source for the realization of regenerative medicine aiming at regeneration of lost tissues and organs, but biological constraints, ethical issues, safety of gene transfer, etc. are still overcome. There are many things to do. Therefore, in this study, we investigated the possibility of achieving the target regenerative medicine by using terminally differentiated cells in vivo as the cell source and transdifferentiating only by changes in the surrounding environment without introducing genes into these cells. As a result, a phenomenon considered to be transdifferentiation from terminally differentiated osteoblasts to nerve cells was confirmed, but it was not possible to assert that the transdifferentiation was apparent in other cells, although cell changes were observed. We plan to further analyze this phenomenon in the future.

研究分野：口腔外科学一般、再生医療

キーワード：分化転換 再生医療 脊髄損傷 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

現在行われている生体臓器移植や人工臓器移植などの先端医療には、それぞれ拒絶反応や耐久性、機械的強度などのさまざまな問題点や限界があり、Quality of Life の向上を目指す上で再生医療の果たす役割は大きい。このような状況の中で、安定した組織再生のための細胞の供給源を確保することはきわめて重要と考えられ、現在胚性幹細胞 (ES 細胞) や成体幹細胞、あるいは人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いた再生研究が進められている。しかし、細胞の安定性等の生物学的制約や倫理的問題、分離・同定法の未確立、さらには遺伝子導入に伴う安全性の確保など、安全で確実な再生医療実現のためには未だ克服すべき点が多い。一方、近年、骨髄間質細胞が中胚葉系の骨芽細胞や筋細胞のみならず外胚葉系機能細胞である神経細胞 (Exp. Neurol. 149:411-423, 2000) や内胚葉系の肝細胞 (Science284:1168-1170, 1999) にも分化し得ることが示され、細胞が従来考えられていたよりもはるかに幅広い分化能 (分化の可塑性) を有していることが明らかとなってきている (Nature418:41-49, 2002)。事実、われわれも骨髄間質細胞の再生医療への応用を目的とした研究の過程で、複数の骨髄間質由来成体幹細胞を分離し、それらの分化能につき詳細に検討した結果、培養条件のみを変更することにより、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などの中胚葉系機能細胞のみならず、外胚葉系機能細胞である神経細胞や内胚葉系機能細胞の肝細胞に分化する能力を有していることを確かめ、それぞれの機能細胞への *in vitro* における分化誘導法の確立に成功した。また、この一連の研究の中で、マウス骨芽細胞株として知られる MC3T3-E1 細胞を遺伝子導入を行うことなく、培養条件を変更することのみにより、神経細胞へ分化転換させることに成功した。MC3T3-E1 細胞をわれわれが開発した培養条件下で培養すると、培養後数時間で細胞形態が変化し始め、神経細胞様の形態を呈し、神経細胞にのみ認められる、Neurofilament200 や Tuj-1、Sodium Channel などを発現するようになることを確認し、さらに、神経細胞に特徴的な自発放電が認められることも確認した。これらの事実は、細胞が実際に分化の可塑性を有していることを示すものである。このことから、細胞の本来持つポテンシャルを活かし、分化転換させるためには、細胞のおかれる環境が重要なのではないかとこの着想に至った。そこで、骨芽細胞株である MC3T3-E1 を脊髄損傷モデルマウスの脊髄切断部分に直接移植したところ、切断部の神経再生が誘導されるのみならず、切断部より尾側の脊髄の萎縮を抑制し、マウスの下肢運動が回復することを見出した。このことは、生体において一旦成熟した機能細胞でも、環境を適切に整えることで、他の機能細胞へと分化転換できることを示唆するとともに、再生医療の細胞源として幹細胞以外の細胞を用いることができる可能性を示唆するものである。幹細胞の分離・培養には先に述べたような制限があげられるが、成熟機能細胞であれば生体内のいずれの部位においても採取、分離、培養がより簡便で安全に行えることは明白で、この方法が実現すれば、患者負担の少ない再生医療実現の大きな一歩になることが予測される。非常に大きな意味のある検討であると考えている。しかし、その一方で、iPS 細胞などで広く認知されてきている様に、iPS 細胞の樹立方法や細胞起源、コロニー間や、コロニー内でも、細胞によって分化誘導に対する反応性に細胞間で差があることがわかっている。この細胞の品質に関しては、今後臨床応用実現に向けて、簡便な品質管理方法の確立が課題となっている中で、われわれは再生を目指す組織・臓器の凍結切片上で培養することで細胞を目的とする環境におき、分化誘導効率の差を見出す新たな方法を確立してきた (第60回日本口腔外科学会優秀発表賞、第14回日本抗加齢医学会優秀発表賞)。これらの経験から、今回、成熟機能細胞を細胞源とした再生医療の実現に向けて、各種成熟機能細胞間での分化環境による分化転換への反応性の差について検討が必要であると考えた。そこで、本研究では、これまでに得られた知見をもとに、各種機能細胞を分離・培養し、それぞれにおける分化環境による反応性の違いを脊髄損傷の再生に重点を絞り検討することで、脊髄損傷に適した成熟機能細胞の選定及び、分化転換効率の各種細胞間での差を明白にするとともに、脊髄損傷以外の環境における再生についても併せて検討することで、どのような再生を必要とする生体環境に、いずれの部位の成熟機能細胞が適しているのかについて明らかにすることを目的とするものである。本研究により想定される成果が得られれば、従来の再生医療に応用が想定されてきた幹細胞に変わる全く別の視点による新たな細胞源の応用が可能となり、全く新しい視点からの再生医療実現が可能となるとともに、わが国国民のQOLの向上に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では従来のような幹細胞ではなく、生体内において本来最終分化したと考えられる種々の機能細胞 (骨芽細胞に加え、口腔粘膜上皮細胞、皮膚線維芽細胞、軟骨細胞、血管内皮細胞、脂肪細胞) を対象に、それらの細胞株及び初代培養細胞の両者を用いて、様々な環境において再生が可能であるか否かについて検討することで、どの再生環境にいずれの成熟機能細胞が適しているかについて検討した。ただし、本研究ではこれまでにわれわれが、環境変化のみで機能細胞による分化転換により再生可能であることを示してきた脊髄損傷における再生にまず着目し、骨芽細胞以外の成熟機能細胞による再生医療の実現の可否、細胞選定の可否について明らかにし、細胞間での環境変化による分化転換に対する反応性の差を明らかにするとともに、その研究成果を見ながら随時他の組織・臓器再生環境における、適した成熟機能細胞の選択へとその研究範囲

を拡げていくこととした。これにより、生体内に存在する種々の機能細胞を、直接他の臓器・組織の再生に利用できる可能性について検討するとともに、各種の臓器・組織の再生医療実現のための新たな細胞源の選定と確保を目指した。

3. 研究の方法

(1) マウス骨芽細胞株MC3T3-E1 および初代培養骨芽細胞を用いた脊髄損傷への応用

これまでにわれわれが報告してきた、骨芽細胞株MC3T3-E1を用いた脊髄損傷の再生実験と同様に、初代培養骨芽細胞を用いても脊髄損傷後の神経再生、下肢運動機能回復などが可能か否かについて検討した。具体的には、マウスの第10胸椎の椎弓切除後、脊髄を切断し、脊髄損傷モデルマウスを作製した。同部にマトリゲルと混和したMC3T3-E1を移植した群、マトリゲルと混和した初代培養骨芽細胞(マウス大腿骨より分離・培養)を移植した群、マトリゲルのみを注入した群、切断のみ行ったコントロール群の4群を作製し、各群間でその後のマウス下肢運動を経時的に観察しBasso, Beattie and Bresnahan(BBB) locomotor rating scale(BBB Scale)にて比較検討した。また、脊損後3日目、5日目、7日目、2週目、4週目、8週目、12週目、16週目に組織を採取し、脊髄切断部、切断部頭側、切断部尾側のそれぞれにおける脊髄組織の組織学的検索を詳細に行い、それぞれの細胞移植に関連した組織修復・再生の有無につき検討した。また、これらの組織において、神経細胞関連分子を指標として、RNAレベル、タンパク質レベルでその発現につきreal-time PCR、免疫組織化学的手法を用いて検索し、移植細胞の動向、発現分子の変化、周囲細胞への分化誘導の有無、分化転換の有無について確認した。これらの脊髄損傷に対する再生治療効果を確認することで、骨芽細胞株MC3T3-E1と同様に初代培養骨芽細胞でも脊髄損傷の再生が可能か否か、再生を目指す環境に細胞を置くことによる分化転換を利用した再生医療が不死化細胞株・初代培養細胞にかかわらず共通して認められる現象なのかを明らかにし、両者が脊髄損傷における再生医療の細胞源として応用可能か否かを検討した。

(2) 骨芽細胞以外の各種成熟機能細胞を用いた脊髄損傷への応用

これまでにわれわれが見出してきた、成熟機能細胞の一つである骨芽細胞株による脊髄損傷の再生医療と同様に、他の組織・臓器由来の様々な成熟機能細胞を用いてもそれらによる同様の脊髄損傷への再生治療が可能か否かにつき検討することで、周囲環境による分化転換現象を利用した再生医療が、どのような成熟機能細胞でも普遍的に可能であるか、または各種成熟機能細胞それぞれにより周囲環境による分化転換誘導の反応性に差があるのか否かを検討した。この検討により、再生医療に用いる細胞は目的となる組織・臓器により選定すべきかあるいはどの細胞にも分化転換するポテンシャルがあるのかを確認し、臨床応用に際し、より安全かつ確実な細胞源の確保を目指すことを目的としたものである。具体的にはまず、比較的手が容易あるいは臨床を想定して患者負担が少ないと考えられる以下のような細胞を用いて、前項1と同様に脊髄損傷部への移植を行い、検討した。

口腔粘膜上皮細胞

初代培養口腔粘膜上皮細胞(CRCから購入)および申請者らにより樹立・維持されている口腔粘膜上皮細胞株(hTERTおよびHPV16 E7遺伝子導入により樹立)

皮膚線維芽細胞

初代培養皮膚線維芽細胞(CRCから購入)および不死化皮膚線維芽細胞株(APBから購入)

軟骨細胞

初代培養軟骨細胞(RIKENから購入)および不死化軟骨細胞株(APBから購入)

血管内皮細胞

初代培養血管内皮細胞(SCRから購入)および不死化血管内皮細胞(APBから購入)

脂肪細胞

初代培養脂肪前駆細胞(SCRから購入)および不死化脂肪細胞(APBから購入)

4. 研究成果

(1) マウス骨芽細胞株MC3T3-E1 および初代培養骨芽細胞を用いた脊髄損傷への応用

これまでにわれわれの得ている知見として、マウス骨芽細胞株MC3T3-E1を用いて脊髄損傷部へ移植を行うと、コントロール群に比較して細胞(MC3T3-E1)移植群では、1)切断部に移植細胞あるいは周囲より誘導された細胞が密に存在する、2)切断部より尾側で脊髄組織の変性が抑制される、3)移植細胞以外の周囲の細胞にも神経細胞への誘導効果が見られる、という所見がある。これに基づき、今回、初代培養骨芽細胞を用いて同様に脊髄損傷部へ移植を行った結果、MC3T3-E1を移植した時と同様にBBB Scaleにて後肢を動かせる程度までの回復が認められるとともに、組織学的検討の結果、切断後5日目で脊髄損傷部及びその尾側に多くのついで円形の細胞が認められた(図1)。細胞数を計測し、比較検討すると、有意に多くの細胞が認められた。この尾側においてニューロフィラメント(NF)200タンパク質の発現について検討すると、MC3T3-E1移植時と同様に初代培養骨芽細胞移植群でも尾側組織の移植細胞の周囲の細

胞にNF200 タンパク質の発現が認められた。さらに切断後12週になると、MC3T3-E1 移植時と同様に、初代培養骨芽細胞移植群でも、切断部尾側の脊髄組織が正常に維持されている像が確認でき(図2)、同部においては移植細胞周囲にNF200に加えてミエリンベースックプロテイン(MBP)の発現も認められた(図3)。以上の結果から、初代培養骨芽細胞は骨芽細胞株MC3T3-E1と同様に、神経細胞様細胞への分化転換能を有していること、脊髄損傷モデルにおいて初代培養骨芽細胞を移植することで後肢運動機能障害が改善すること、初代培養骨芽細胞を移植することで損傷部より尾側の脊髄の変性が抑制されること、移植した初代培養骨芽細胞がGFAPやMBPを発現し、その周囲の細胞でNF200の発現がみられるようになること、が確認できた。これらのことから、初代培養骨芽細胞の移植によって後肢運動機能が改善したメカニズムとしては、MC3T3-E1の移植時と同様に、移植骨芽細胞がアストロサイトやオリゴデンドロサイトに分化することにより、損傷部周囲の組織に対し保護効果をもたらすとともに、ニューロトロフィックファクターなどの産生・分泌による神経再生へのサポート的な効果をもたらしたことによる可能性が考えられた。これらの結果から、これまでに報告してきた細胞株に加えて、初代培養骨芽細胞でも同様の分化転換を促すことにより、再生医療におけるより安全な細胞源の確保にまた一歩近づいたと考えられた。

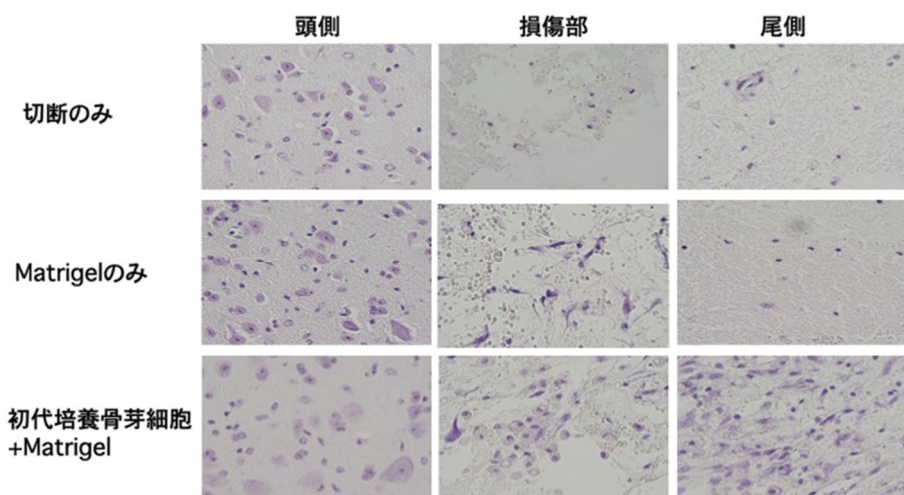


図1 切断後5日目の脊髄損傷部およびその頭側、尾側における細胞動態(HE染色)

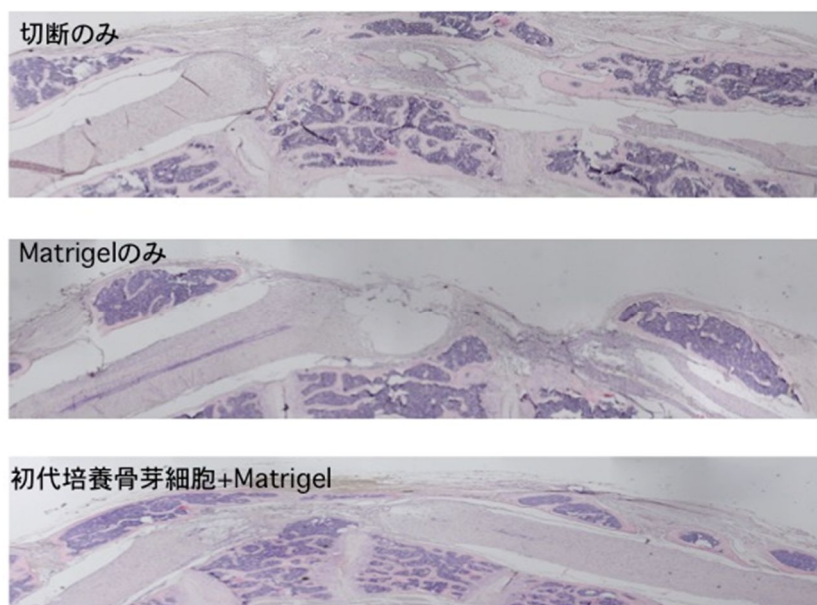


図2 切断後12週における脊髄損傷部及びその周囲の組織像(HE染色)

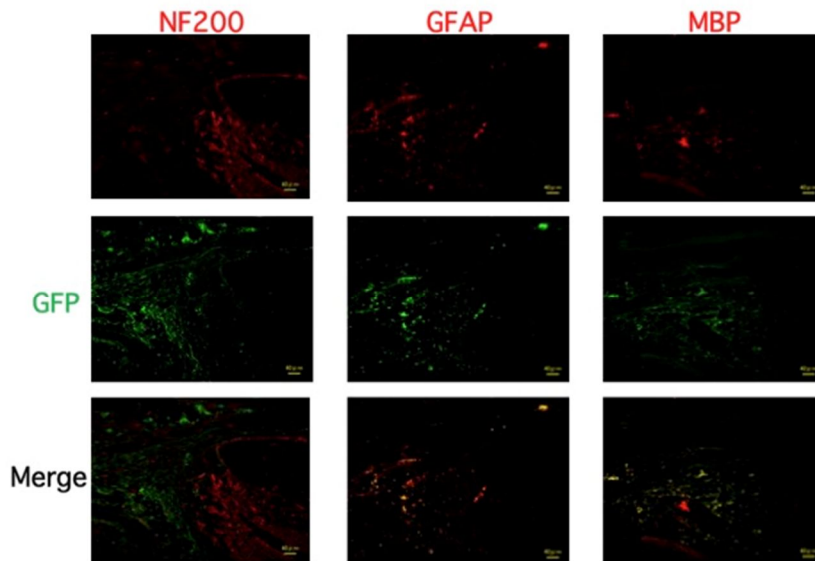


図3 切断後12週における初代培養骨芽細胞移植群における脊髄損傷部尾側の細胞に対する免疫組織化学的検討

(2) 骨芽細胞以外の各種成熟機能細胞を用いた脊髄損傷への応用

次に、他の組織・臓器由来の様々な成熟機能細胞を用いてもそれらによる同様の脊髄損傷への再生治療が可能か否かにつき検討することで、周囲環境による分化転換現象を利用した再生医療が、どのような成熟機能細胞でも普遍的に可能であるか、または各種成熟機能細胞それぞれにより周囲環境による分化転換誘導の反応性に差があるのか否かを検討した。口腔粘膜上皮細胞、皮膚線維芽細胞、軟骨細胞、血管内皮細胞、脂肪細胞を対象として、それらの細胞株及び初代培養細胞の両者を用いて前項1と同様に脊髄損傷部への移植実験を行った。その結果、BBB Scaleにおいて回復するマウスは認められず、また、組織学的にも、コントロール群と比較すると移植群において細胞数が多く、また、尾側での組織の維持も多少あるように見えるが、骨芽細胞移植時のような劇的な回復や、組織の維持は認められなかった。加えて、*in vitro*においても神経様細胞への分化転換が可能か否か検討したが、その結果、いずれの細胞においても細胞形態に差は見られ、通常の成熟最終分化細胞の形態とは異なる動態を示すものの、骨芽細胞移植時のような神経細胞様突起の伸長がみられる細胞は少なく、また、明らかな神経関連タンパク質の発現にも各細胞における差が激しく、分化転換しているとは言えない結果となった。以上のことから、分化転換については、それぞれの細胞における特性があり、そもそも分化転換しやすい細胞、あるいは分化転換する目的細胞によりその反応性に差があるなど、普遍的なものではないことが示唆された。しかし、今後の検討によっては、それぞれの成熟細胞が、どの組織に分化転換しやすいのか、あるいは、どの組織にでも分化転換しやすい細胞が存在するのかなど、今後の再生医療の細胞源としての成熟期脳細胞にはまだまだ検討の余地があると考えられた。また、骨芽細胞を用いての神経再生には一定の評価が得られたと自負している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 井出 次次、戸田（徳山）麗子、梅木泰親、田所 晋、竹部祐生亮、寺田知加、福島龍洋、館原誠晃、里村一人 |
| 2. 発表標題 新規口腔粘膜治療薬としてのナノウマプラセンタの可能性について |
| 3. 学会等名 第27回日本口腔内科学会・第30回日本口腔診断学会合同学術大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 SATOMURA Kazuhito |
| 2. 発表標題 Establishment of a fluorescence-based diagnostic method using 5-ALA for the detection of early oral cancer |
| 3. 学会等名 Indi-Japanese Multidisciplinary Symposium (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 徳山 麗子 (TOKUYAMA Reiko) (20380090) | 鶴見大学・歯学部・学内講師 (32710) | |
| 研究分担者 | 梅木 泰親 (UMEKI Hirochika) (10552408) | 鶴見大学・歯学部・非常勤講師 (32710) | |

6. 研究組織 (つづき)

| | 氏名 (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|-------------------------------|----|
| 研究分担者 | 井出 信次 (IDE Shinji) (00611998) | 鶴見大学・歯学部・助教 (32710) | |
| 研究分担者 | 田所 晋 (TADOKORO Susumu) (70552412) | 鶴見大学・歯学部・非常勤講師 (32710) | |
| 研究分担者 | 館原 誠晃 (TATEHARA Seiko) (90380089) | 鶴見大学・歯学部・講師 (32710) | |