

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：15401  
 研究種目：基盤研究(B) (一般)  
 研究期間：2018～2020  
 課題番号：18H02977  
 研究課題名(和文) 神経堤細胞由来間葉系幹細胞と細胞集塊培養技術を用いた新規歯周組織再生療法開発

研究課題名(英文) Development of periodontal tissue regenerative therapy by using neural crest-derived MSCs and cell clumps culture technique

研究代表者  
 栗原 英見 (Kurihara, Hidemi)  
 広島大学・医系科学研究科(歯)・名誉教授

研究者番号：40161765  
 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)：これまでに研究代表者らは、骨髄由来間葉系幹細胞(MSCs)と細胞自身が産生する細胞外基質(ECM)を利用して間葉系幹細胞集塊(Clumps of MSCs/ECM complexes (C-MSCs))を樹立していた。直径1mmほどの三次元的細胞塊であるC-MSCsは、培養条件によって細胞性質を調整後、人工材料を用いることなく欠損部に移植可能で、組織再生を誘導する。本研究では、顎顔面の発生に関する

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

神経堤細胞は第4の胚葉と呼ばれるほどの多分化能を有し、歯周組織の起源となる細胞であるため、歯周組織再生療法にとって最適な細胞といえる。しかし、発生期のごく限られた時期にのみ見られる細胞であるため、患者から分離して利用することは難しい。そこで本研究では、iPS細胞から誘導した神経堤細胞由来MSCsを樹立し、さらにその細胞性質を適切に発揮させるために、研究代表者らの独自技術である細胞集塊培養技術を応用した細胞治療法の開発を行った。本研究成果は、これまでにない効果的な歯周組織再生療法の実現につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：By using bone marrow (BM)-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and self-produced extracellular matrix (ECM), three-dimensional clumps of MSCs/ECM complexes (C-MSCs) were established. C-MSCs can be transplanted into a defect area with no artificial scaffold to induce tissue regeneration. Since there is a fact that craniofacial tissues, including such as periodontal tissue, are originated from neural crest cells (NCC)-derived MSCs, NCC-MSCs can be a better candidate for the periodontal tissue regenerative cell therapy compared to BM-MSCs. Accordingly, in this present study, we aimed to establish novel promising periodontal tissue regenerative therapy by using NCC-MSCs and the cell clumps culture technique.

研究分野：歯周治療

キーワード：間葉系幹細胞集塊 C-MSCs 神経堤細胞由来間葉系幹細胞 iPS細胞 立体複合化

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄や脂肪組織中に存在する間葉系幹細胞(MSCs)は自己増殖能・多分化能を有するため、不可逆的状态に陥った重度歯周炎患者に対して有効な組織再生細胞療法の細胞ソースといえる。研究代表者らは、骨髄由来 MSCs と細胞自身が産生する ECM を利用して 3 次元間葉系幹細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complex (C-MSCs)を開発した。C-MSCs は直径 1mm ほどの細胞集塊であり、in vitro で細胞機能を調節した後に、人工足場材料無しで欠損部に移植可能で歯周組織再生を促進する(Kittaka et al., 2015, Cytotherapy; Takewaki et al., 2017, J Dent Res)。

一方、歯周組織を含む顎顔面骨格の形成には、胎生期の限られた時期に発生する神経堤細胞(NCC)から分化した MSCs が中心的役割を担うことが報告されている。すなわち、神経堤細胞由来 MSCs を用いれば、骨髄由来 MSCs や脂肪由来 MSCs と比較して高い歯周組織再生効果が得られるものと予想できる。

神経堤細胞は胎生期のごく限られた時期にのみ出現するため、これまでは再生医療に用いる細胞源としては利用困難であった。しかし、近年になって、山中 4 因子の導入によって得られる人工多能性細胞(iPS 細胞)から NCCs を誘導する技術が確立されつつあるため、歯周組織再生療法に応用できる可能性が高い。

さらに、主に I 型コラーゲンで形作られる C-MSCs は互いに接触した状態で培養すると結合することを見出していた。そこで、この性質を利用して、欠損部に正確に合致する大型組織を生体外で作製することも可能と考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが開発した集塊培養技術と iPS 細胞から誘導した NCC-MSCs を組み合わせることで、これまで治療困難であった重度歯周炎患者にも対応可能な新規の歯周組織再生療法の開発を目的とする。

特に、安全かつ有効な細胞治療のために、ゼノフリー・血清フリー・フィーダー細胞フリーの条件(XF 条件)でヒト iPS 細胞から NCC を経て MSCs(iNCC-MSCs)に高効率に誘導する方法を樹立し、さらにそれらの集塊化(C-iNCC-MSCs)を達成する。その得られた細胞集塊の骨再生能および造腫瘍性の有無を確認する。また、細胞集塊が互いに結合する性質を生かし、3D バイオプリンターによる大型組織への賦形技術の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### 実験 1) XF 条件での C-iNCC-MSCs 作製プロトコルの確立

研究分担者の池谷(京都大学)らがすでに、血清不含の条件でヒト iPS 細胞から NCC を経て MSCs を誘導する多段階誘導法をすでに確立していた(Fukuta et al., 2014, Plos One)。そこで、この過程を全て XF 培地に変更し、適宜サイトカイン添加などを行いながら、iNCC-MSCs 誘導の確認を行った。さらに得られた iNCC-MSCs をやはり XF 条件でヒト MSCs で樹立済みの細胞集塊作製法(Takeshita et al., 2017, Stem Cell Res Ther)に準じて集塊化を目指した。その評価は、NCC マーカー、MSCs マーカーの発現を FACS で定量し、各々の細胞の多分化能を確認し、各段階での RNAseq 解析を行った。さらに得られた細胞集塊 C-iNCC-MSCs の組織学的観察を HE 染色で行い、更に XF 条件での骨分化能を in vitro で確認した。

### 実験 2)C-iNCC-MSCs の骨再生能と造腫瘍能についての検討

実験 1)で得られたヒト C-iNCC-MSCs を免疫不全動物である SCID マウス頭蓋冠欠損に移植し、その移植による骨再生効果をマイクロ CT 及び HE 染色にて確認した。さらにヒト特異 vimentin 抗体を用いた免疫染色によって、移植されたヒト細胞の振る舞いを観察した。比較対照として、骨髄由来 MSCs から XF 条件で作製した C-MSCs を移植し、同様の解析を行った。

### 実験 3)C-iNCC-MSCs とバイオ 3D プリンターによる大型組織の作製

C-iNCC-MSCs とバイオ 3D プリンターであるレジェノバ®を用いて、任意の形の cm 単位の大型組織作製を行った。培養条件はすべて XF 条件とし、筒状、ブロック状などに賦形した。この大型化の過程を RNAseq にて経時的に評価した。さらに、得られた筒状の大型組織の有効性について、ヌードラット末梢神経切断モデルに対する神経導管としての移植実験を行った。評価は神経の組織学的及び機能的回復程度で行った。

#### 4. 研究成果

実験 1) の結果、XF 条件でヒト PS 細胞から NCC マーカーを強く発現し、高い増殖能を示す NCC へ高効率に誘導することに成功した。この NCC の段階で、神経細胞、視細胞、メラノサイトなどへ分化可能であることを確認した。さらに、得られた NCC の培養を継続し、MSCs 誘導への最適な継代数を確定した。そこから、やはり XF 条件で、MSCs マーカーを高発現し、軟骨・骨・脂肪の三分化能を発揮できる iNCC-MSCs への誘導に成功した。この多段階誘導法について、逐次 RNAseq 解析を行い、生体の発生段階等に相当している分化であることを明らかにした。

また、iNCC-MSCs からの集塊化については、Takeshita らの方法を改変しフィブロネクチンコーティングを併用した XF 培養で行った。その結果、直径 1mm 程の、I 型コラーゲンを主な構成成分とする ECM から構築される細胞集塊 C-iNCC-MSCs を得た。さらに、XF 骨分化培地で培養すると、骨分化マーカーの向上とミネラルの沈着が生じた。

実験 2) として上記の通り得られた C-iNCC-MSCs を SCID マウス頭蓋冠欠損部に移植したところ、骨髄由来 MSCs から作製した C-MSC 移植と同等の骨再生効果が確認された(図 1A,1B)。興味深いことに、ヒト vimentin 特異抗体を用いた免疫染色の結果、移植されたヒト細胞は、新生骨表面には存在するものの、内部で骨細胞に分化しているものは観察されなかった(図 1C)。このことは、C-iNCC-MSCs 移植による組織再生効果はパラクライン効果が主である可能性を示唆していた。また、移植された動物を長期観察しても、全身的に腫瘍形成することはなかった。

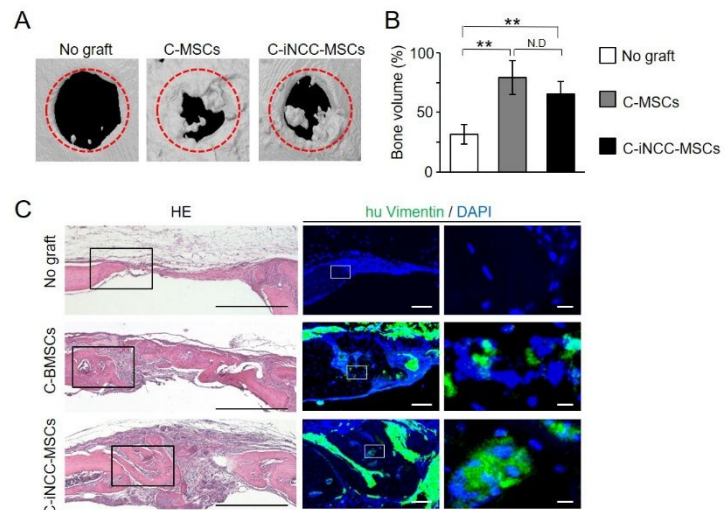


図1. C-iNCC-MSCs移植による骨再生効果

A. 移植4週後のマイクロCT像 B. CTの骨定量データ

C. 移植4週後のHE染色及びヒトvimentin免疫染色(緑)

実験 3) では複数個の C-iNCC-MSCs をバイオ 3D プリンターであるレジェノバ®によって、2 cm を超える筒状の大型組織を得た。さらに、この筒状の大型組織は、神経導管として効果的に神経切断モデルの治癒を促進させることをヌードラットを用いた検討の結果明らかとした。また、C-iNCC-MSCs から大型化への各段階での RNAseq 解析の結果から、培地は変更していないものの、基質関連遺伝子群や、血管新生促進因子群が経時的に上昇していくことを見出した。このことは大型化にともなう立体的な微小環境が細胞性質に影響を与えることを示唆していた。

以上の実験 1,2,3) の成果として、本研究では、XF 条件で iPS 細胞から NCC-MSCs を誘導し、集塊化させることに成功した。その細胞集塊 C-iNCC-MSCs は十分な骨再生効果を有しているとともに、バイオプリンターによる任意の形での大型化が可能になったことから、新規の歯周組織再生療法の基盤技術となりうる事が示された。

C-iNCC-MSCs の樹立とその組織再生効果について現在論文投稿中である。さらに、本研究の遂行中に比較対照として設定していた C-MSCs について得られたメカノシグナル (Komatsu et al, 2018, Stem Cell Ret Ther: Komatsu et al., 2020, Biochem Biophys Res Commun) や、骨再生効果 (Motoike et al., 2019, Int J Mol Sci) について論文発表を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Komatsu Nao, Kajiya Mikihiro, Morimoto Shin, Motoike Souta, Yoshii Hiroki, Iwata Tomoyuki, Ouhara Kazuhisa, Matsuda Shinji, Mizuno Noriyoshi, Kurihara Hidemi	4. 巻 530
2. 論文標題 Cox2-mediated PGE2 production via p38/JNK-c-fos signaling inhibits cell apoptosis in 3D floating culture clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 448 ~ 454
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.05.100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Motoike Souta, Kajiya Mikihiro, Komatsu Nao, Horikoshi Susumu, Ogawa Tomoya, Sone Hisakatsu, Matsuda Shinji, Ouhara Kazuhisa, Iwata Tomoyuki, Mizuno Noriyoshi, Fujita Tsuyoshi, Ikeya Makoto, Kurihara Hidemi	4. 巻 20
2. 論文標題 Clumps of Mesenchymal Stem Cell/Extracellular Matrix Complexes Generated with Xeno-Free Conditions Facilitate Bone Regeneration via Direct and Indirect Osteogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3970 ~ 3970
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20163970	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Komatsu N, Kajiya M, Motoike S, Takewaki M, Horikoshi S, Iwata T, Ouhara K, Takeda K, Matsuda S, Fujita T, Kurihara H.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Type I collagen deposition via osteoinduction ameliorates YAP/TAZ activity in 3D floating culture clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Res Ther	6. 最初と最後の頁 342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.intimp.2018.12.045.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	加治屋 幹人  (Kajiya Mikihiro)  (00633041)	広島大学・医系科学研究科(歯)・助教    (15401)	
研究分担者	池谷 真  (Ikeya Makoto)  (20442923)	京都大学・iPS細胞研究所・准教授    (14301)	
研究分担者	水野 智仁  (Mizuno Noriyoshi)  (60325181)	広島大学・病院(歯)・講師    (15401)	
研究分担者	藤田 剛  (Fujita Tsuyoshi)  (80379883)	広島大学・医系科学研究科(歯)・准教授    (15401)	削除：2020年1月7日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関