

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18612

研究課題名(和文) 神経堤由来幹細胞を用いた硬組織再生方法の開発

研究課題名(英文) Development of hard tissue regeneration method using neural crest-derived stem cells

研究代表者

浦野 絵里 (Urano, Eri)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：20756225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経堤由来細胞がEGFP標識された口蓋創傷治癒モデルマウスにて治癒経過を観察した。創傷後2日目より神経堤由来細胞を含む粘膜の新生が認められ、28日目には全体が新生粘膜で覆われた。新生粘膜の神経堤由来細胞には幹細胞マーカーおよびケラチノサイトマーカーが発現していた。培養前の口蓋粘膜細胞は約40%の神経堤由来細胞を含んでいたが、幹細胞用培地で培養すると約90%に増殖した。そのうち約70%が幹細胞マーカーを発現し、これらの細胞はケラチノサイトおよび骨芽細胞に分化した。口蓋には神経堤由来幹細胞が存在し、それらが創傷治癒過程でケラチノサイトに分化することで口蓋粘膜再生が進行すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口蓋は菲薄な粘膜が骨組織に結合した神経堤由来の組織であり、唇顎口蓋裂治療の口蓋形成術等に伴う創傷治癒過程では、神経堤由来細胞が重要な役割を担うと予想されるが、詳細は不明である。本研究ではマウスの口蓋創傷治癒過程における神経堤由来細胞の役割を解析し、口蓋には神経堤由来幹細胞が存在し、それらが創傷治癒過程でケラチノサイトに分化することで口蓋粘膜再生が進行することが考えられた。以上から神経堤由来細胞は口腔内の創傷治癒過程においても重要な役割を担うことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Healing progress was observed in palatal wound healing model mice in which neural crest-derived cells were labeled with EGFP. Two days after wounding, new mucosa containing neural crest-derived cells was observed, and on the 28th day, the entire wound was covered with new mucosa. Neural crest-derived cells of the new mucosa expressed stem cell and keratinocyte markers. The palatal mucosal cells before culture contained about 40% neural crest-derived cells, but when cultured in the medium for stem cells, they proliferated to about 90%. Approximately 70% of them expressed stem cell markers and these cells differentiated into keratinocytes and osteoblasts. Neural crest-derived stem cells exist in the palate, and they are thought to differentiate into keratinocytes during the wound healing process to promote regeneration of the palatal mucosa.

研究分野：補綴歯学

キーワード：神経堤由来細胞 骨芽細胞 ケラチノサイト 再生 創傷治癒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 広範囲の顎骨吸収は義歯の安定を妨げ、インプラント埋入を困難にさせる

広範囲の顎骨吸収を有する患者は義歯の維持安定を妨げ、インプラント埋入が困難であるため、前処置として骨造成を必要とする。従来の患者の自家骨を用いた骨造成法に代わる治療法として幹細胞を用いた骨造成法の開発が期待されている。患者自身の幹細胞を利用すれば、拒絶反応の問題を避けることができ、高い増殖能をもつ幹細胞を利用する事で広範囲の骨欠損部を補う骨造成が可能になると考える。

(2) 神経堤由来細胞の一部は成長後も幹細胞として存在し、多分化能をもつ

神経堤細胞は、胎生初期に神経管癒合部から出現する。脊椎動物特有の細胞集団である神経堤から出現し、発生過程で胚内を遊走した後、遊走先で様々な細胞に分化する。神経堤由来細胞の一部は成長後も未分化のまま存在し、多分化能を維持していることが報告されている [Dev Dyn 236: 3242-3254, 2007]。このように幹細胞の性質をもつ神経堤由来細胞は、組織再生用の新しい細胞ソースとして期待される。

2. 研究の目的

我々はこれまで、神経堤由来幹細胞が成体においても多分化能を維持していることに着目し、細胞ソースとしてマウス頬部の毛包内に存在する神経堤由来幹細胞を解析し、これらが骨芽細胞様細胞に分化誘導する方法を確立した。しかしながら、これらが顎骨を再建するためにどのような環境が最適であるのか、移植時にどのように機能するのかについては明らかになっていない。本研究では、毛包内の神経堤由来幹細胞にとって最適な環境を探索するために、顎骨欠損部へ移植するための足場の確立と移植後の機能を解析し、毛包内の神経堤由来幹細胞を細胞ソースとした顎骨再建方法の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 毛包内の神経堤由来幹細胞の高純度培養方法の最適化

顎骨へ移植した神経堤由来幹細胞の動向を観察するために全身の組織細胞において緑色蛍光タンパク質 (GFP) で標識された遺伝子改変マウス (グリーンマウス) を用いて組織の細胞を可視化し、実験を行う。申請者が開発した高純度培養方法により、マウス毛包内の神経堤由来幹細胞を増殖させる [PLoS One. 6;12(4), 2017]。この方法による神経堤由来幹細胞の純化に最適な培養日数と培養皿について検討を行い、毛包内の神経堤由来幹細胞にとって最適な高純度培養方法の確立を行う。

(2) 毛包内の神経堤由来幹細胞を用いた骨再生用スキャフォールドの選定

毛包内の神経堤由来幹細胞が骨再生を行うために最適な環境を確立するため、各種スキャフォールドの選定と細胞定着解析を行う。適正な高純度培養環境の検討と移植用スキャフォールドの選定を行い、顎骨再建環境を確立し、令和3年度の実験を行う。

(3) 毛包内の神経堤由来幹細胞を用いた三次元的骨組織の製作

マウスに形成した頭蓋骨欠損部を高解像度 μ CT により解析する。そのデータを元に骨欠損部に適合したスキャフォールド用の型を設計し、3D プリンターにより型を製作する。製作した型を用いて欠損部に適合したスキャフォールドを製作し、この中で神経堤由来幹細胞を増殖、定着させ、個々の欠損部に適合したテーラーメイド型三次元的骨組織を製作する。

(4) 毛包内の神経堤由来幹細胞による顎骨再建法の開発

製作した三次元的骨組織を頭蓋骨欠損モデルマウスに移植し、テーラーメイド型骨再生誘導を検討する。高解像度 μ CT を用いて骨再生を解析する。申請者が開発した歯槽骨吸収モデルマウス [Biol Pharm Bull. 41(4), 2018] を用いて、同様にテーラーメイド型骨再生誘導を検討し、骨再生を解析する。高解像度 μ CT により骨再生能を解析後に、骨再生部位の切片を製作し、免疫染色により移植細胞 (GFP 陽性細胞) を染色する。それにより、毛包内の神経堤由来細胞が骨欠損修復部にどのように機能しているのかを解析する。

4. 研究成果

本研究チームにおいて神経堤由来細胞の動態を探索する中で口蓋粘膜の神経堤由来細胞において興味深い解析結果が得られたので報告する。

口蓋は菲薄な粘膜が骨組織に結合した神経堤由来の組織であり、唇顎口蓋裂治療の口蓋形成術等に伴う創傷治癒過程では、神経堤由来細胞が重要な役割を担うと予想されるが、詳細は不明である。本研究ではマウスの口蓋創傷治癒過程における神経堤由来細胞の役割を解析した。

(1) 口蓋粘膜には神経堤由来細胞が存在した。

神経堤由来細胞がEGFP 標識された遺伝子改変マウスの左側口蓋粘膜をラウンドバーで切除した口蓋創傷治癒モデルにて治癒経過を観察した。創傷後 2 日目より GFP 陽性細胞（神経堤由来細胞）を含む粘膜の新生が認められ、28 日目には全体が新生粘膜で覆われた。新生粘膜を免疫染色、RT-PCR、およびフローサイトメトリーで分化マーカーを解析したところ、新生粘膜の神経堤由来細胞には幹細胞マーカー（Sca-1 + , SSEA3 + ）およびケラチノサイトマーカー（K13 + , K14 + ）が発現していた（図 1）。

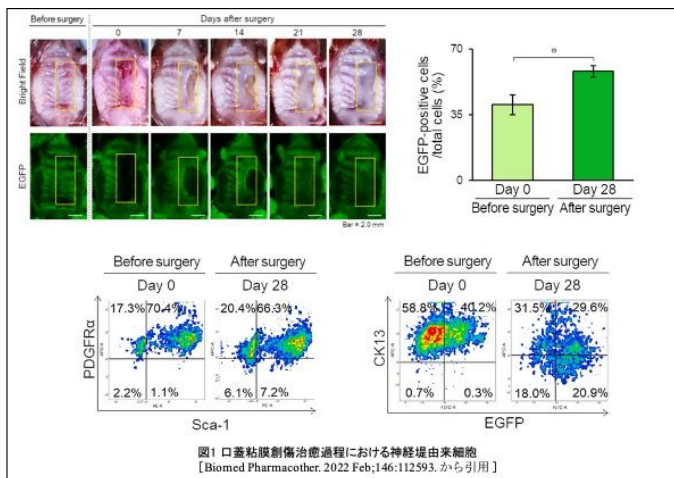


図1 口蓋粘膜創傷治癒過程における神経堤由来細胞
[Biomed Pharmacother. 2022 Feb;146:112593. から引用]

(2) 口蓋粘膜の神経堤由来細胞は毛包内神経堤由来細胞と同様に幹細胞用培地にて高い増殖能を認めた。我々が確立した毛包内の神経堤由来幹細胞の高純度培養方法について、他の組織に存在する神経堤由来細胞においても同様な結果が得られるのか否かを検証するため、我々は歯科治療で身近な口蓋粘膜に着目して解析を行なった。口蓋粘膜の細胞を採取し、幹細胞用培地にて培養した結果、培養 0 日目に 20.9%であった GFP 陽性細胞（神経堤由来細胞）は 14 日目に 88.4%を占め、高い増殖能を示した。またそれらの 72.6%は幹細胞マーカーである PDGFR と Sca-1 を発現していた（図 2）。

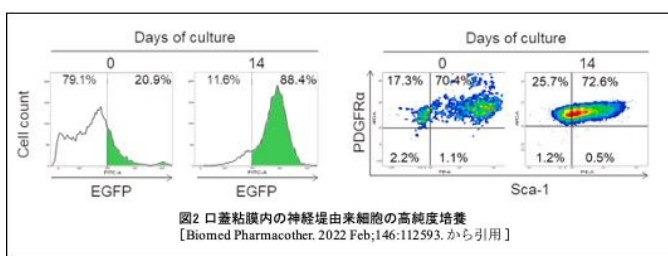


図2 口蓋粘膜内の神経堤由来細胞の高純度培養
[Biomed Pharmacother. 2022 Feb;146:112593. から引用]

(3) 口蓋粘膜の神経堤由来細胞は毛包内神経堤由来細胞と同様に BMP-2 存在下で培養すると骨芽細胞様細胞に分化した。毛包内の神経堤由来細胞と同様に、幹細胞用培地における高い増殖能を認めた口蓋粘膜内の神経堤由来細胞の骨芽細胞分化能について解析を行なった。増殖した口蓋粘膜内の神経堤由来細胞を BMP-2 存在下の骨芽細胞分化誘導培地にて 18 日間培養すると骨芽細胞分化マーカーである ALP, Runx2, Osterix, Col1a1 の発現が上昇した。またそれらの細胞はアリザリンレッドに陽性な石灰化物の形成を認めた（図 3）。

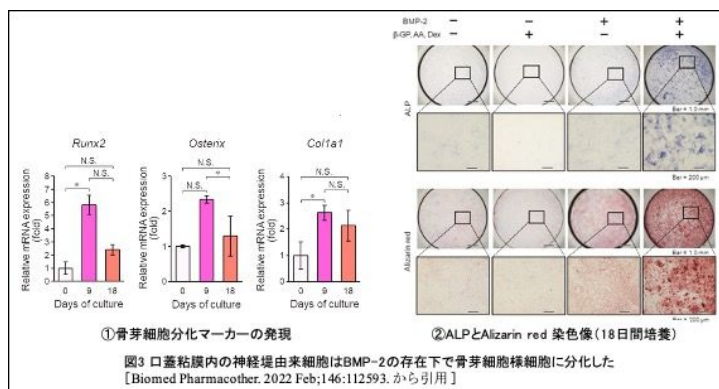


図3 口蓋粘膜内の神経堤由来細胞はBMP-2の存在下で骨芽細胞様細胞に分化した
[Biomed Pharmacother. 2022 Feb;146:112593. から引用]

(4) 口蓋粘膜の神経堤由来細胞は、ケラチノサイトに分化した。口蓋粘膜内の神経堤由来細胞をEGFを含むケラチノサイト分化誘導培地にて培養するとこれらの細胞はケラチノサイト（p63 + , CD81 + , K13 + , K14 + ）に分化した。また、これらの細胞を 21 日間メンブレン上で 3 次元培養を行うと CK13 + と CK14 + を示す上皮組織様の構造を形成した（図 4）。

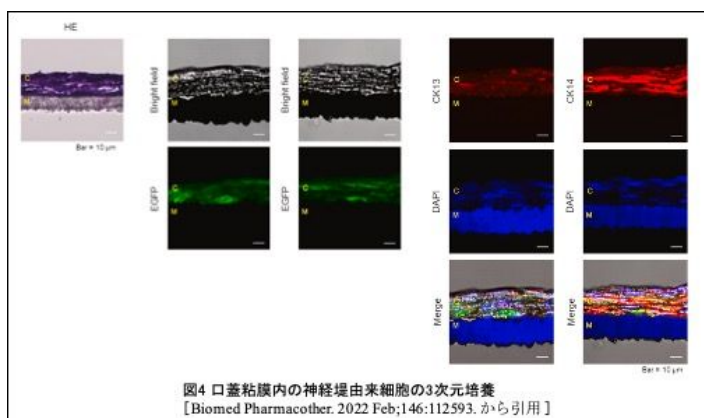


図4 口蓋粘膜内の神経堤由来細胞の3次元培養
[Biomed Pharmacother. 2022 Feb;146:112593. から引用]

以上の結果から、口蓋粘膜には神経堤由来幹細胞が存在しており、それらは口蓋創傷治癒過程や in vitro の細胞培養系においてケラチノサイトや骨芽細胞に分化することが示唆された。すな

わち、神経堤由来細胞は口蓋の外科治療において上皮や骨の新生を担う重要な細胞集団といえる。

引用文献：Takizawa H, Takami M, et al. Neural crest-derived cells possess differentiation potential to keratinocytes in the process of wound healing. *Biomed Pharmacother.* 2022 Feb;146:112593.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takizawa Hideomi, Karakawa Akiko, Suzawa Tetsuo, Chatani Masahiro, Ikeda Megumi, Sakai Nobuhiro, Azetsu Yuki, Takahashi Masahiro, Urano Eri, Kamiyo Ryutaro, Maki Koutaro, Takami Masamichi	4. 巻 146
2. 論文標題 Neural crest-derived cells possess differentiation potential to keratinocytes in the process of wound healing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 112593 ~ 112593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2021.112593	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 瀧澤秀臣, 唐川亜希子, 茶谷昌宏, 須澤徹夫, 坂井信裕, 畔津佑季, 浦野絵里, 上條竜太郎, 横宏太郎, 高見正道
2. 発表標題 口蓋創傷治癒過程における神経堤由来細胞の役割.
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀧澤秀臣, 唐川亜希子, 茶谷昌宏, 須澤徹夫, 坂井信裕, 畔津佑季, 池田めぐみ, 高橋正皓, 浦野絵里, 上條竜太郎, 横宏太郎, 高見正道
2. 発表標題 口蓋創傷治癒過程における神経堤由来細胞の役割.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀧澤秀臣, 唐川亜希子, 茶谷昌宏, 須澤徹夫, 坂井信裕, 畔津佑季, 池田めぐみ, 高橋正皓, 浦野絵里, 上條竜太郎, 横宏太郎, 高見正道
2. 発表標題 口蓋創傷治癒過程における神経堤由来細胞の機能解析.
3. 学会等名 第68回昭和大学学士会総会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------