

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21029

研究課題名（和文）新規細胞ビーズ法による歯髄幹細胞を用いた血管網内在末梢神経オルガノイドの構築

研究課題名（英文）Construction of vascular network-intrinsic peripheral nerve organoids using dental pulp stem cells by a novel cell bead method

研究代表者

高岡 昇平（Takaoka, Shohei）

筑波大学・附属病院・医員

研究者番号：30958567

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト歯髄幹細胞から多種神経系統細胞から構成される細胞群（神経系細胞）を得ることに成功した。単一細胞RNAシーケンス解析では、神経系細胞は神経前駆細胞、ニューロン、アストロサイト、少数の非神経系統細胞から構成されており、神経前駆細胞はまずニューロンを産み出し、その後自らがアストロサイトへと分化していた。さらに、極少数の神経堤細胞も存在していることを示した。神経系細胞ビーズと血管内皮細胞ビーズを、孔同士を直線でつないだPDMSプレート内で灌流培養を行うことで直線部に軸索伸長を促すことに成功した。軸索はほとんどがシュワン細胞による髄鞘を形成し、管腔を持つ血管網が存在していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯髄幹細胞を含む間葉系幹細胞の神経誘導は、神経関連たんぱくや遺伝子の発現によって特徴づけられることが多い。本研究は歯髄幹細胞の神経誘導の結果は単一細胞RNAシーケンス解析によってニューロンとアストロサイトを生み出す神経前駆細胞を特定した。これは中枢神経系疾患への細胞移植治療に大きな意味を持つ。さらに末梢神経オルガノイド構築において、歯髄幹細胞の神経誘導の結果存在していた少数の神経堤細胞がシュワン細胞へ分化し髄鞘を形成したと考えられる。本研究で構築された血管網を内在した末梢神経オルガノイドは末梢神経をターゲットとした再生医療や創薬研究等に应用可能な実験モデルとなり得る。

研究成果の概要（英文）：We have successfully obtained neural lineage cells (NLCs) from human dental pulp stem cells. Single-cell RNA sequencing analysis showed that the NLCs consisted of neural progenitors, neurons, astrocytes, and a few non-neuronal lineage cells, and that the neural progenitors first produced neurons and then differentiated into astrocytes. In addition, a very small number of neural crest cells were also shown to be present. NLC beads and endothelial cell beads were successfully cultured in perfusion in PDMS plates with straight lines connecting the holes to each other to promote axon elongation in the straight sections. Most of the axons formed myelin sheaths by Schwann cells, revealing the presence of a vascular network with a lumen.

研究分野：口腔再生医学

キーワード：間葉系幹細胞 歯髄幹細胞 神経誘導 シングルセルRNAシーケンス オルガノイド 末梢神経

1. 研究開始当初の背景

(1) iPS 細胞や ES 細胞の神経誘導法とその結果は十分に特徴づけられており、様々な神経系統細胞を得ることが可能となっている。しかしながら歯髄幹細胞を含む間葉系幹細胞の神経誘導の結果は主に神経関連タンパクや遺伝子の発現変化によって特徴づけられることが多く、その細胞型や分化の状況を詳細に捉えることができていない。

(2) 近年、より生体に近いオルガノイド構築のために、オルガノイドに血管構造を内在させる研究が広く行われている。中枢神経系において、大脳皮質オルガノイドと血管オルガノイドを共培養することで管腔構造を持つ胚性神経血管発生モデルが示された。末梢神経はシュワン細胞、ニューロン、血管内皮細胞の細胞間相互作用によって構成されるユニットである。しかしながら末梢神経オルガノイドはシュワン細胞とニューロンの共培養における髄鞘形成を示すものであり、発生学的に血管新生とともに起こる軸索伸長や髄鞘形成を模倣できていない。

2. 研究の目的

(1) 歯髄幹細胞を神経誘導し、シングルセル RNA シーケンス解析を中心とした評価で得ることができた細胞の分化を同定する。

(2) 独自の培養技術を用いて血管網を内在した末梢神経オルガノイドを構築、評価することによって末梢神経をターゲットとした再生医療や創薬研究等に应用可能な実験モデルの創出を目指す。

3. 研究の方法

(1) 筑波大学附属病院で得た抜去歯から単離した歯髄幹細胞を、以前から報告を行っている方法で神経誘導を行った。得ることができた細胞(神経系細胞)と歯髄幹細胞との遺伝子発現について、マイクロアレイのデータから IPA を用いた生物学的機能解析を行った。神経系細胞に対してシングルセル RNA シーケンス解析を行いその細胞構成を明らかにした。さらに疑似時間軸改正によって細胞集団の分化を示した。また、免疫細胞染色にて細胞集団ごとのマーカーたんぱくの確認と、シーケンスでとらえることができなかった神経堤系統細胞について評価した。

(2) マイクロ流路デバイスとして、PDMS プレートに 5 mm 径、深さ 5 mm の孔を 3cm 間隔で 2 か所あけ、孔と孔との間に径と深さそれぞれ約 100 μm の溝を作製した。孔と孔との間の溝に線維芽細胞を播種し、接着後にその上に血管周皮細胞を播種した。各孔には、神経系細胞ビーズと血管内皮細胞ビーズ(ビーズ内に 1x10⁶ 個/mL の末梢血球)を混和して入れた。PDMS プレートを神経維持培養液にて還流培養で 2-3 週間培養した。各孔から続く溝に伸長する軸索を採取し、複数個の軸索束を線維芽細胞シートで束ねることで末梢神経束を作製し、免疫組織学的染色を用いてその組成を評価した。

4. 研究成果

(1) 歯髄幹細胞由来神経系細胞のシングルセル RNA シーケンス解析

ヒト歯髄幹細胞を神経誘導することで、様々な細胞の大きさで多層からなる神経細胞を得ることに成功した。シングルセル RNA シーケンスを用いて神経系細胞を解析すると、神経前駆細胞、ニューロン、アストロサイト、その他少数の非神経系細胞から構成されることが明らかになった(図1)。さらに、疑似時間軸解析では神経前駆細胞はまずニューロンを産み出し、さらに自らがアストロサイトに分化していることを示した(図2)。

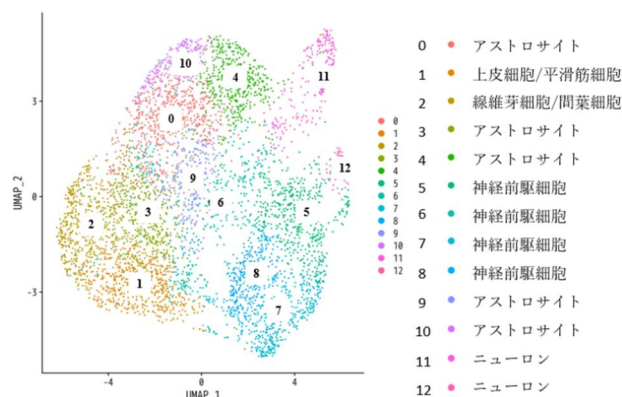


図1 UMAP

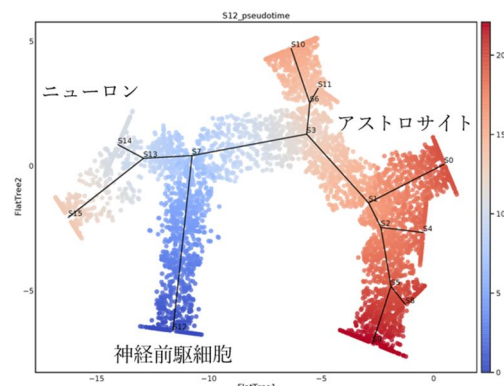


図2 疑似時間軸解析

(2) 歯髄幹細胞由来神経系細胞の免疫細胞染色

神経系細胞はそのほとんどが GFAP や Nestin、PAX6、FABP7、SOX 2 などの神経幹細胞マーカーに陽性であり、DCX、MAP2 陽性ニューロンがそれらの細胞の上に存在していた。また、SMA 陽性非神経系統細胞の存在も少数認められた。さらに、p75NTR 陽性の神経堤系統細胞の存在も確認した。

(3) 神経網内在神経束

PDMS プレートの各孔で形成された組織をつなぐように直線部に軸索様組織の伸長を認めた(図3)

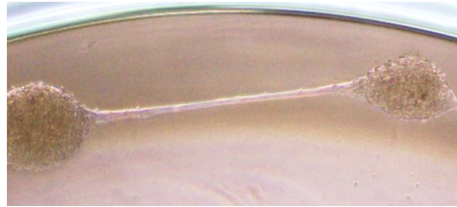


図3 両端の組織から伸長する軸索様組織

(4) 末梢神経オルガノイド

軸索様組織を複数個束ねることで任意の太さの末梢神経オルガノイドの構築することが可能とした(図4)。末梢神経オルガノイドの免疫組織学的評価では、ほとんどの軸索は S100 や peripherin といった髄鞘マーカーで被覆されており、軸索に沿って VWF 陽性の血管内皮細胞の走行を認めた。さらに CD31 陽性の血管内皮細胞により内腔を持った血管構造の構築も認められた(図5)

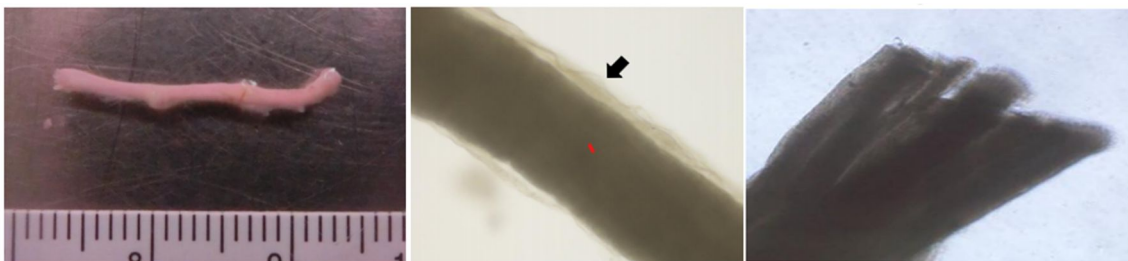


図4 末梢神経オルガノイド 黒矢印：線維芽細胞シートによる被覆

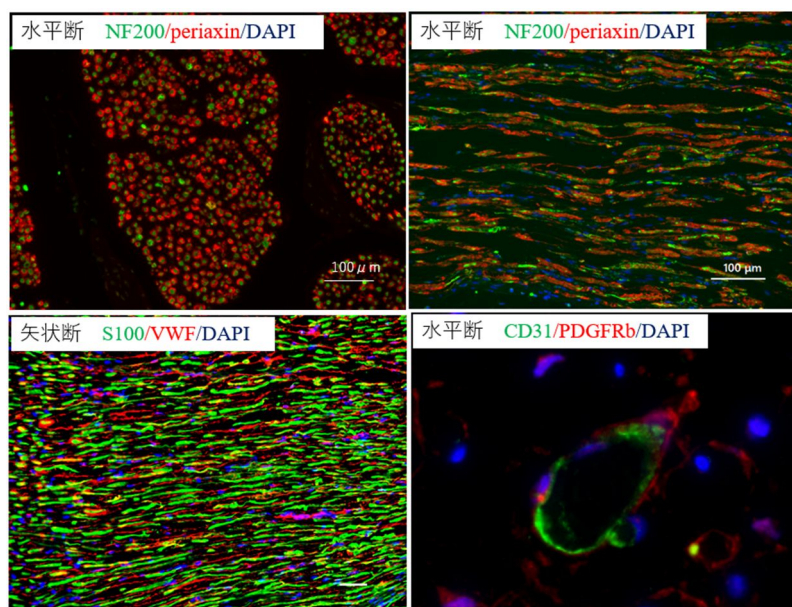


図4 末梢神経オルガノイドの免疫組織学的評価

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hirata Koji, Marushima Aiki, Nagasaki Yukio, Ishikawa Hiroshi, Matsumura Hideaki, Mujagic Arnela, Hirayama Aki, Toyomura Junko, Ohyama Akihiro, Takaoka Shohei, Bukawa Hiroki, Matsumura Akira, Ishikawa Eiichi, Matsumaru Yuji	4. 巻 36
2. 論文標題 Efficacy of redox nanoparticles for improving survival of transplanted cells in a mouse model of ischemic stroke	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 1703 ~ 1715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-023-00940-4	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 高岡昇平、福澤智、内田文彦、菅野直美、柳川徹	4. 巻 19
2. 論文標題 シングルセルRNA-seqによって同定されたヒト歯髄幹細胞由来神経細胞	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本外傷歯学会雑誌	6. 最初と最後の頁 21-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高岡昇平
2. 発表標題 血管網内在末梢神経オルガノイドの構築と新規末梢神経再生治療
3. 学会等名 第67回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 高岡昇平
2. 発表標題 歯髄幹細胞の神経誘導と歯髄幹細胞由来神経系細胞を用いた末梢神経再生
3. 学会等名 第40回日本ヒト細胞学会 学術集会
4. 発表年 2022年 ~ 2023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
---------	---------