

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592965

研究課題名(和文) 歯周組織幹細胞からみた慢性歯周炎組織破壊と組織リモデリング機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of chronic periodontitis tissue destruction and tissue remodeling mechanism as seen from the periodontal tissue stem cells

研究代表者

中川 種昭 (Nakagawa, Taneaki)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：00227745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯周組織の恒常性は局所の歯根膜細胞や歯槽骨細胞によってなされているが、移動してきた幹細胞様細胞が歯周組織の修復と再生に寄与している可能性があることが報告された。これらの細胞は骨髄間葉系幹細胞のマーカー(PDGFRα)を発現していた。歯周組織は発生学的に神経堤細胞にその起源を持つことからiPS細胞から神経堤細胞に誘導し、歯および歯周組織再生療法へつなげることを本研究課題の目標とし、以下の成果を得た。(1)ヒトiPSからの神経堤細胞誘導方法の確立。(2)誘導した神経堤細胞由来間葉系幹細胞の増殖能と骨・軟骨・脂肪・末梢神経系への分化能の確認。(3)誘導した幹細胞が遊走能を有していることが確認できた。

研究成果の概要(英文)：Homeostasis of periodontal tissue have been made by local periodontal ligament cells and alveolar bone cells. It has been reported that stem cell-like cells from the trunk migrate to periodontal tissue, and contributes to the regeneration and repair of periodontal tissue. Furthermore, these cells express the specific marker (PDGFRα) of bone marrow mesenchymal stem cells. Mesenchymal stem cells present in the periodontal tissue. The developmental origin of periodontal tissue is neural crest cells. We tried to induce neural crest cells from human iPS cells. It is the goal of this study aims to connect to periodontal tissue regeneration therapy, and obtained the following results. (1) We succeeded establishment of a method to generate human iPS cells derived human neural crest cells. (2) We conformed induced neural crest cells differentiated into osteo, chondro, fat, and peripheral nerve cells. (3) We verified that induced neural crest cells have highest migration potency.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周組織 再生医療 再生医学 間葉系幹細胞 神経堤細胞 iPS細胞

### 1. 研究開始当初の背景

歯周組織を再生させる能力がある組織幹細胞としてこれまで歯根膜幹細胞(Periodontal ligament stem cells: PDLSCs)や歯髄幹細胞(Dental pulp stem cells: DPSCs)が報告されている。歯周組織再生療法である GTR 法では、歯根膜周囲あるいは歯槽骨に存在すると想定される内在性幹細胞が、炎症によって失われた歯周組織の再生現象を誘導することからその存在が示唆されている。これまで研究されている PDLSCs や DPSCs は、歯髄あるいは歯根膜組織を培養皿上で接着培養していく過程で、附着増殖した細胞を PDLSCs あるいは DPSCs と定義し、その幹細胞としての性質が調べられてきた経緯がある。そのためこれまで得られた知見は、前駆細胞の混入や培養による性質変化の可能性が否定できず、実際の歯周組織幹細胞の本質を明らかにするには不十分であると考えられる。これらの幹細胞が歯周組織のどこに存在し、炎症に罹患していない状態ではどのように恒常性を維持しているのか、あるいは歯周病に罹患し始めたステージ、更には感染・炎症が進展し、高度な骨吸収が起こっている状態ではどのような挙動・動態を示しているのかについてはこれまでほとんど証明されていない。

申請者らはこれまでにフローサイトメーター(FCM)による細胞分離技術を活用した組織幹細胞分離に関する研究を精力的に行ってきた。再生医療の分野で注目されている骨髄間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells: MSCs)は、これまで有効な抗原マーカーが知られていなかったために、生体内での動態を詳細に解析することが不可能であった。このような問題点を解決するため、申請者らはマウスでは CD140a(PDGFR<sup>+</sup>)<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup> (Morikawa, Nakagawa et al. JEM 2009)、さらにヒトでは CD90(Thy-1)<sup>+</sup>CD271(LNGFR)<sup>+</sup>(Mabuchi, Morikawa et al. Stem Cell Reports 2013、特願 2007-231298)を MSCs 特異的マーカーとして同定し、MSCs およびその他の間葉系細胞分画を直接生体から分離する技術を確立した。また、頭頸部筋骨格系の起源である神経堤細胞は、脊椎動物の初期発生において全身の様々な組織原基へ移動し、末梢神経系の神経細胞や頭頸部の平滑筋・骨格・歯など MSCs に非常によく似た組織へ分化することが知られている。申請者らのグループは FCM を使って、皮膚に加えてこれまで報告のないマウス成体骨髄からも神経堤幹細胞(Neural crest stem cells: NCSCs)を回収することに成功し(Nagoshi Morikawa et al. Cell Stem Cell 2008)、MSCs の発生学的起源の 1 つであることも明らかにした(Morikawa, Nakagawa et al. BBRC 2009)。そこで申請者らが確立した FCM による神経堤由来 MSCs を解析する実験系を駆使することで、歯根膜内在性幹細胞を生体内で直接視覚化する実験系の構築に挑戦する。これによって歯周組織

幹細胞を生理的状態、あるいは炎症や骨吸収を誘発したときの状態をリアルタイムに解析することが可能になると考えている。幹細胞に焦点をあて、炎症による組織破壊と治癒機構に MSCs がどのように関与するのかを解析し、慢性歯周炎や侵襲性歯周炎の新たな治療戦略への足がかりをつかみたいと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、マウスおよびヒト歯周組織幹細胞を特異的細胞表面マーカーによって、フローサイトメトリーで直接分離し、歯周組織の恒常性維持に関与する、あるいは炎症によって破壊された組織を再生させる可能性を有する細胞を明らかにすることであった。計画している具体的な研究項目は(1)歯根膜幹細胞、歯髄幹細胞を間葉系幹細胞および神経堤幹細胞マーカーを指標にフローサイトメーターにより分離し、その性状を解析する実験系を構築する。(2)実験的慢性歯周炎発症後の全身および局所における血液細胞と間葉系細胞の動態を解析する。(3)実験的歯周炎を惹起させたときの組織破壊と治癒様式を歯周組織幹細胞の視点からその動態を解析する、の3つであった。

### 3. 研究の方法

本研究では慢性歯周炎による組織破壊と組織再生の様子を幹細胞に焦点をあてて明らかにすることで、新たな歯周組織再生治療の開発への展開を目指し、以下の研究項目を予定した。

(1) p75-EGFP マウス顎骨およびヒト抜去歯における歯周組織幹細胞のマーカーを同定する。具体的には 歯周組織幹細胞の存在を確認するために、マウスおよびヒト MSCs マーカーと NCSCs マーカーを用いて、培養操作なしで直接分離する実験系を確立する。具体的にはマウス顎骨とヒト抜去歯から細胞生存率の高い(機械的)細胞調整法やコラゲナーゼ濃度、処理時間等の条件を設定する。

最もわかりやすく細胞分画を分けることができる細胞表面マーカー(CD45、Ter119、PDGFR、Sca-1、p75、CD90)と蛍光色(FITC、PE、APC等)の組み合わせの条件検討を予定した。

本方法で得られた純度の高い細胞集団の生物学的特性(増殖能、分化能、遺伝子発現)をこれまでに報告がある PDLSCs や DPSCs と比較する

(2) マウス長管骨・顎骨やヒト抜去歯検体における神経堤由来 MSCs の局在を明らかにする。具体的には従来の培養樹立方法では PDLSCs や DPSCs を実際の歯根膜や歯髄組織で確認する方法がなかったが、歯周組織幹細胞のマーカーが同定されれば生体内でどこに存在するのかを直接確認できる。生理的条件における MSCs、神経堤由来 MSCs の局在を血管内皮や線維芽細胞などの他の間質細胞マーカーと同時に ICH にて確認する。この実験から、

これまで接着培養操作でしかその存在が確認できなかった歯周組織幹細胞の存在を明らかにできると考えた。

(3) 実験的歯周炎を HSCs/MSCs 骨髄移植マウスや p75-EGFP マウスに惹起させる方法を確認し、慢性炎症における MSCs の自然免疫における役割や、組織再生への役割を明らかにする。具体的には、

造血系幹細胞を CAG-RFP、間葉系幹細胞を CAG-GFP トランスジェニックマウスから各特異的マーカーを用いてそれぞれ分離後、野生型マウスに移植することにより血液系細胞が RFP、間葉系細胞が GFP とそれぞれ別の蛍光色素でマーキングされた骨髄移植モデルマウスを準備し、顎骨吸収の誘導と LPS の全身投与による実験的慢性歯周炎モデルマウスを作成する。各モデルマウスにおける実験的慢性歯周炎発症後の長管骨骨髄と末梢血に存在する GFP<sup>+</sup>細胞を FCM と IHC にて調べる。つまり、炎症急性期と慢性期での MSCs の炎症巣、損傷組織への遊走と生着を経時的に観察する。また近年生体内での MSCs の動態を可視化するモデルマウスとして Nestin-GFP マウスが報告されており、われわれが実験的に作製した骨髄移植モデルマウスだけではなく、移植という実験的操作を加えないマウスで慢性歯周炎を惹起させ、GFP<sup>+</sup>MSCs のふるまいを移植モデル同様に解析したいと考えている。申請者らの予備実験ではマウス、ヒトともに正常末梢血中に MSCs はほとんど存在しないことを確認していた。

主要な歯周病原性細菌である *P.g.* 菌 (*Porphyromonas gingivalis*) から産生される LPS は細胞に作用すると、多彩な生物活性を発現することが知られている。また慢性炎症性疾患研究において LPS の生理作用発現は、宿主細胞の細胞膜表面に存在する Toll 様受容体 (Toll-like Receptor, TLR)4 を介して行われると示唆されている。最近になって TLR4 を MSCs も発現し、単球走化性因子を産生することで自然免疫に関与することが報告された。研究代表者らは MSCs を直接解析できる実験系をすでに構築していることから、慢性歯周炎における MSCs に焦点を絞って、生理的条件下にあるマウスと慢性歯周炎を惹起した HSCs/MSCs 移植マウスを用いて TLRs、MCP1 の発現を解析する。

上記で作製した各モデルマウスの顎骨における組織修復機構を IHC にて組織リモデリングの様子を観察する。これによって炎症の消退時に GFP<sup>+</sup>MSCs は組織修復に寄与しているか、すなわち、歯周組織の再生能力を有しているかを明らかにしようとした。

実験的歯周炎発症後の長管骨骨髄・末梢血・顎骨における HSCs、MSCs や神経堤由来 MSCs の動態を、組織破壊時から組織修復時にかけて FCM、IHC で経時的に解析する。具体的には p75-GFP トランスジェニックマウスに顎骨骨吸収と LPS の投与を組み合わせた実験的歯周炎を惹起させ、顎骨に存在する

p75<sup>+</sup>NCSCs や PDGFR<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>MSCs の局在、組織修復への関与の有無について IHC で確認する。組織の修復に関与する内在性幹細胞が、Lindhe が提唱するように歯根膜に存在し、組織を修復する能力を有するのか、周囲の顎骨骨髄から組織再生が起こるのか、あるいは MSCs が組織欠損部位に遊走し、修復機構が働くのか。いずれかの結果が得られると予想している。歯周組織の再生能力を有する幹細胞が、特異的マーカーを指標に生体から直接分離・同定でき、それらの細胞が歯周炎による組織破壊を修復させることが実験的に証明出来れば、新規歯周組織再生療法研究を飛躍的に推し進めるきっかけになると考えていた。

#### 4. 研究成果

研究開始当初は研究項目(1)を重点的にを行い、マウスの長管骨と顎骨には神経堤由来 MSCs が存在し、その割合は歯周組織を含んだ顎骨の方が高いことを確認した。このことから長管骨や歯周組織には神経堤由来 MSCs やそこから派生した間葉系細胞が、血管・骨・脂肪・末梢神経・線維芽細胞等への分化能を有することで、複雑な歯周組織の恒常性を維持し、バイオフィーム由来の慢性炎症に対し、組織破壊と組織再生の仲介役を担っていると予想している。その際に学会にて歯周組織の恒常性を維持している組織は局所の歯根膜細胞や歯槽骨細胞によってなされているが、実験的歯周炎が発症すると、体幹から移動してきた幹細胞様細胞が歯周組織の修復と再生に寄与している可能性があることが報告された。しかもこれらの細胞はわれわれがこれまで骨髄の間葉系幹細胞の特異的マーカーとして同定していた PDGFR $\alpha$  を発現していることがわかった。また、ヒトの間葉系幹細胞を分離するために本学倫理委員会に申請書を申請し、受理されたこと。歯周組織局所に存在する間葉系幹細胞は、発生学的観点から歯や歯周組織を構成する神経堤細胞にその起源を持つこと。ヒト iPS 細胞を用いた研究も行える環境にあったことから、マウスからヒトに焦点を当て、間葉系細胞を分離することのみならず、iPS 細胞から神経堤細胞に誘導し、そこから組織幹細胞としての間葉系幹細胞特異的細胞表面抗原を指標に間葉系幹細胞を誘導し歯および歯周組織再生療法へつなげることを本研究課題の目標とした。

#### (1) ヒト iPS からの神経堤細胞誘導方法の確立

歯周組織は発生学的に外胚葉、中胚葉、内胚葉に続く第四の胚葉である外胚葉性間葉 = 神経堤細胞に由来することがこれまでの研究で明らかにされていた。われわれのグループも神経堤由来の細胞が緑色に光るトランスジェニックマウスを用いた実験において、これらの細胞がエナメル質を除く歯および

歯周組織を構成していることを証明していた。そこで、ヒト多能性幹細胞(ES細胞、iPS細胞)から歯周組織を構成すると考えられている神経堤細胞の誘導を試みた。一方で現在臨床研究もされている間葉系幹細胞は、

1. プラスチック培養シャーレに付着・増殖する。
2. 特異的分化誘導培地にて骨・軟骨・脂肪に分化する。この2つを持って定義されてきた経緯がある。なぜかこれまでの10年間、この間葉系幹細胞を歯周組織の再生に用いようとする基礎および臨床研究が国内外で盛んに行われている。しかしながら、この間葉系幹細胞は発生学的に歯周組織を構成する能力を有するののかについてはほとんど議論がされてこなかった。なぜならこの従来型間葉系幹細胞は、組織幹細胞を含んでいるものの、そのほとんどが線維芽細胞や骨芽細胞、骨細胞、脂肪細胞、血液細胞等からなる非常に雑多な細胞集団であったことがその理由としてあげられる。この現状を打破するためにマウスおよびヒト間葉系幹細胞の特異的細胞表面抗原を同定することに挑戦し、マウス間葉系幹細胞、ヒト間葉系幹細胞の特異的細胞表面抗原の同定に成功した。さらにわれわれのグループとTakashimaらのグループは間葉系幹細胞の発生学的起源の一部が神経堤細胞であることを明らかにした。そこで、ヒトiPS細胞から誘導した神経堤細胞にヒト間葉系幹細胞が存在するのかを調べたところ、ヒト間葉系幹細胞の特異的マーカーであるLNGFRとTHY-1を発現している細胞があることを明らかにした。以上のことから雑多な細胞集団である可能性が否定できない従来型間葉系幹細胞ではなく、純化間葉系幹細胞が発現しているマーカーを指標に、ヒト多能性幹細胞から誘導した神経堤細胞中に存在する真の間葉系幹細胞を誘導することに成功した。

#### (2) ヒトiPS細胞から誘導した神経堤細胞由来間葉系幹細胞の解析

ヒトiPS細胞から誘導したヒト間葉系幹細胞の特異的細胞表面抗原であるLNGFR(+)THY-1(+)細胞は神経堤幹細胞マーカーであるAP2a, SOX10, Nestinを発現していた。また、同じく神経堤幹細胞マーカーであるHNK-1を発現していた。一方で多能性幹細胞マーカーであるNanog, Oct3/4の発現は認められなかった。さらに血液細胞マーカーであるCD3, CD14, CD19, CD20, CD31, CD56や上皮マーカーであるCD326は発現していなかった。

#### (3) ヒトiPS細胞から誘導した神経堤細胞由来間葉系幹細胞の増殖能と分化能

LNGFR(+)THY-1(+)細胞は間葉系幹細胞の定義に1つとされている骨・軟骨・脂肪への分化能を有することが確認された。また神経堤細胞の分化能である末梢神経・シュワン細胞・平滑筋細胞への分化能も同時に有することが明らかとなった。またこれらの細胞はプ

ラスチックシャーレ上で細胞増殖することも確認できた。しかしながら誘導間葉系幹細胞であるLNGFR(+)THY-1(+)細胞はヒト骨髄に存在するLNGFR(+)THY-1(+)細胞=組織幹細胞としての間葉系幹細胞よりも、幹細胞特性の1つであるコロニー形成効率がやや劣っていることがわかった。

(4) ヒトiPS細胞から誘導した神経堤細胞由来間葉系幹細胞の機能解析  
LNGFR(+)THY-1(+)細胞の機能解析をマイグレーションアッセイにて行った。その結果、誘導元となるiPS細胞の種類(Cell line)によって、LNGFR(+)THY-1(+)細胞の移動能は異なり、最もLNGFR(+)THY-1(+)細胞が移動したのはH1 iPS細胞由来であった。また、この結果はLNGFR(+)THY-1(+)細胞の誘導効率と一致していた。

以上の結果を現在論文投稿準備中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1. Ariki R, Morikawa S, Mabuchi Y, Suzuki S, Nakatake M, Yoshioka K, Hidano S, Nakauchi H, Matsuzaki Y, Nakamura T, Goitsuka R. Homeodomain transcription factor Meis1 is a critical regulator of adult bone marrow hematopoiesis. *PLoS One*. 2014 Feb 3;9(2):e87646.

(査読あり) doi:

10.1371/journal.pone.0087646.

2. Mabuchi Y, Morikawa S, Harada S, Niibe K, Suzuki S, Renault-Mihara F, Houlihan DD, Akazawa C, Okano H, Matsuzaki Y. LNGFR(+)THY-1(+)VCAM-1(hi+) Cells Reveal Functionally Distinct Subpopulations in Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2013 Jul 11;1(2):152-65.

(査読あり) doi:

10.1016/j.stemcr.2013.06.001.

3. Araki D, Kawamura Y, Niibe K, Suzuki S, Morikawa S, Mabuchi Y, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y. Primary evaluation of induced pluripotent stem cells using flow cytometry. *Inflammation and Regeneration*. 2013 Jan;33(1):3-12. (査読あり)

4. Houlihan DD, Mabuchi Y, Morikawa S, Niibe K, Araki D, Suzuki S, Okano H, Matsuzaki Y. Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR-. *Nat Protoc*. 2012 Dec;7(12):2103-11. (査読あり) doi: 10.1038/nprot.2012.125.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Takazumi Yasui, Yo Mabuchi, Haruki Toriumi, Daisuke Araki, Kunimichi Niibe, Satoru Morikawa, Takeshi Karube, Katsuhiko Onizawa, Hiromasa Kawana, Yutaka Tomita, Norihiro Suzuki, Taneaki Nakagawa, Hideyuki Okano, Yumi Matsuzaki: Prospective Isolation of Dental Pulp Stem Cells. 91st General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research (IADR), Seattle, USA, 2013, 3.20-23 (Poster)

2. Satoru Morikawa, Yo Mabuchi, Chie Fukaya, Junya Ota, Kunimichi Niibe, Shunsuke Kasai, Yuichiro Ihara, Yasuo Hosaka, Hideyuki Okano, Yumi Matsuzaki, Taneaki Nakagawa: LNGFR and Thy-1 based prospective isolation of human mesenchymal stem cells reveal functionally distinct subpopulations. American Academy of periodontology (AAP) 98th ANNUAL MEETING, Los Angeles, USA, 2012, 9.29-10.2 (Poster)

3. Yo Mabuchi, Satoru Morikawa, Seiko Harada, Kunimichi Niibe, Sadafumi Suzuki, Hideyuki Okano, Yumi Matsuzaki: LNGFR and Thy-1 based prospective isolation of human mesenchymal stem cells reveal functional distinct subpopulations. International Society for Stem Cell Research (ISSCR), 10th ANNUAL MEETING, Yokohama, Kanagawa, Japan 2012, 6.13-16 (Poster)

4. 森川 暁 . 幹細胞細胞を用いた新規口腔組織再生療法とは . 第 5 回バイオインテグレーション学会学術大会・総会, 東京都港区, 国際医療福祉大学大学院東京青山キャンパス, 2015.3.29 (教育講演)

5. 黄地 健仁, 森川 暁, 新部 邦透, 奥野 博庸, 赤松 和土, 中川 種昭, 岡野 栄之 . ヒト iPS 細胞由来神経堤細胞群における効率的な純化間葉系幹細胞の回収 . 第 14 回日本再生医療学会総会, 神奈川県, 横浜, パシフィコ横浜, 2015, 3.19-21 (口頭)

6. 黄地 健仁, 森川 暁, 石淵 智子, 植松明子, 岡原 則夫, 井上貴史, 岡原 純子, 中川 種昭, 佐々木 えりか, 岡野 栄之 . コモン・マーモセットにおける歯科口腔解剖及び疾患 . 第 4 回マーモセット研究会大会, 愛知県犬山市, 犬山国際観光センター, 2015, 1.22/23 (ポスター)

7. 森川暁, 吉田重之, 岩崎良太郎, 河奈裕正, 中川種昭: *in vivo* において PDGFBB は

PDGFR 陽性細胞の遊走を促進させる . 第 56 回春季日本歯周病学会学術大会, 東京都江戸川区, タワーホール船堀, 2013, 5.31-6.1 (口頭)

8. 森川暁, 新部邦透, 馬淵洋, 松崎有未, 岡野栄之, 中川種昭: ヒト間葉系幹細胞の予期的分離と機能解析 . 第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 栃木県宇都宮市, 栃木県総合文化センター, 2013, 5.22-24 (口頭)

9. 新部邦透, 森川暁, 中川種昭 . 中胚葉系細胞を起源とする間葉系幹細胞の分化能 . 第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 栃木県宇都宮市, 栃木県総合文化センター, 2013, 5.22-24 (ポスター)

10. 荒木大輔, 新部邦透, 森川暁, 中川種昭 . 間葉系幹細胞の低酸素培養下における Notch シグナルを介した未分化性維持機構の解明 . 第 56 回春季日本歯周病学会学術大会, 東京都江戸川区, タワーホール船堀, 2013, 5.31-6.1 (ポスター)

11. 森川暁: 新規歯周組織再生療法への挑戦と課題 . 第 2 回日本歯周病学会関東 9 大学・臨床歯周病学会関東支部合同研修会, 東京文京区, 東京医科歯科大学 M&D タワー, 2013, 3.10 (口頭)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ  
<http://dent-os.med.keio.ac.jp/KEI10/>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

中川 種昭(Nakagawa Taneaki)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：00227745

### (2) 研究分担者

森川 暁(Satoru Morikawa )  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：00424169