

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659830

研究課題名(和文)疾患原因究明と再生医療への応用を目指した未同定の神経堤由来細胞の探索

研究課題名(英文) Identification of neural crest-derived cells to use for the analysis of disease mechanism and regenerative medicine

研究代表者

高見 正道 (Takami, Masamichi)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：80307058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経堤細胞は胚発生の過程で出現し、様々な種類の細胞に分化することが可能であり、成体においても一部は幹細胞としてその多分化能を維持している。これらの細胞を単離培養することができれば再生医療の有望な細胞ソースとして役立つと考えた。しかし、成体の皮膚組織に神経堤由来の細胞が存在するか詳細は不明であったため、神経堤由来細胞が蛍光タンパク質で標識されるように遺伝子を組み換えたマウスを用いて、新たな神経堤由来細胞の同定を試みた。その結果、上皮由来と考えられてきた頬粘膜や表皮などのケラチノサイトの一部が神経堤に由来することを発見した。これは上皮組織の細胞が再生医療の細胞ソースとして有用であることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Neural crest cells appear during embryogenesis and differentiate into various kinds of cells, which reside as stem cells even after growth. Thus, neural crest stem cells are expected to be used as cell source for regenerative medicine. However, precise localization of neural crest-derived cells has not been known. In this study, we tried to identify new cell populations that derived from neural crest by using double transgenic mice in which neural crest-derived cells are labeled with a green fluorescence protein. We found that a part of keratinocytes are derived from neural crest cells but not epidermal stem cells. These findings suggest that neural crest-derived cells in the epidermal tissues may be useful for regenerative medicine.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：再生 神経堤 骨 細胞分化 幹細胞 骨芽細胞 上皮細胞 マウス

## 1. 研究開始当初の背景

1) 神経堤細胞と疾患との関係：胚発生過程で出現する神経堤細胞は、胚内を活発に遊走した後、遊走先で様々な細胞に分化して組織の形成や維持を担う。神経堤細胞の異常は奇形、免疫疾患、癌などの発症に密接に関係し、その医学的重要性は極めて高い。

2) 新しい再生医療用細胞としての価値：

神経堤細胞は成長後も幹細胞の性質を維持し歯髄細胞、象牙芽細胞、骨芽細胞等への多分化能をもつため再生医療の新しい細胞ソースとして期待される。

3) 神経堤細胞研究の有望性と課題：神経堤細胞がどのような細胞種に分化するのか未だに不明な部分が多く残されている。したがって、未知の神経堤細胞由来の細胞を同定できれば、神経堤細胞の研究の発展に寄与するだけでなく、難治疾患の原因究明や再生医療用の細胞ソースとして役立つ。そのためには、成体のどの組織にどのような種類の細胞として存在するのか詳細に解析する必要がある。

## 2. 研究の目的

神経堤細胞は胚発生過程で出現する細胞集団であり、胚の中を活発に遊走した後、遊走先の環境に応じて様々な細胞に分化する。この細胞は癌などの疾患発症に関与する一方、高い多分化能は再生医療材料として最適である。しかし、成体では神経堤由来細胞がどのような組織に、どのような細胞種として存在するのか詳細は不明である。本研究では神経堤細胞が蛍光タンパク質で標識される遺伝子改変マウスを用いて、成体に潜む未知の神経堤由来細胞を探索する。すでに申請者は一部のケラチノサイトが外胚葉ではなく神経堤細胞に由来することを発見した(未発表)。これは神経堤細胞が皮膚の発生や疾患に関与することを示唆する。すなわち本研究は、最新技術を駆使して未同定の神経堤由来細胞の所在や性質を解明し、その結果に立脚した疾患原因究明と再生医療方法の開発を目指すものである。

## 3. 研究の方法

本研究には細胞分化を専門とする申請者と、4名の協力者(癌専門:1名,神経堤細胞専門:2名,遺伝子改変動物専門:1名)が参画する。H25年度は、神経堤細胞が蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変マウスを用いて未知の神経堤由来細胞を探索した。H25~H26年度は、骨粗鬆症や皮膚疾患(乾癬)、癌などの病態モデル動物を用いて、同定した神経堤細胞と疾患との関連性および再生医療への応用について検討した。この時、申請者が開発した骨欠損再生促進方法に神経堤細胞を応用した。解析には、迅速DNAマイクロアレイや幹細胞ソーター、高分解能 $\mu$ CT、

生体内蛍光検出装置などの最新機器や RNAi、遺伝子改変マウス作出、各種病態誘導モデルなど、最先端の手法を駆使して取り組んだ。

### 1. 神経堤細胞を標識したマウスの解析

#### (1) 用いた遺伝子改変マウスの特徴

P0-Cre/GFP ダブルトランスジェニックマウス(図7)では、胚発生時期の神経堤細胞特異的に活性化する P0 遺伝子のプロモーターにより Cre recombinase が発現し、遺伝子組み換えがおこる。その結果、神経堤細胞がその後分化しても GFP が産生され各組織に存在する神経堤細胞由来は GFP 陽性細胞として検出できた。

#### (2) 生組織中の神経堤細胞イメージング

実体蛍光顕微鏡を用いて組織中の神経堤細胞を可視化し、顎口腔での局在や形態を解析した。

#### (3) 神経堤細胞の三次元マップの作成

画像解析ソフト(RATOC社:導入済)を用いて顎口腔組織の連続切片と、その蛍光画像データから神経堤細胞の画像を構築した。

#### (4) フローサイトメトリーによる細胞同定

顎口腔より採取した組織から細胞を分散させ、幹細胞をソーティングできる FACS Aria II (BD社:導入済)で GFP 陽性細胞から幹細胞を単離する。さらに神経堤および各種細胞の表面分化マーカーの標識抗体を用いてそれらの細胞の種類や形質の解析をおこなった。

### 2. 同定した神経堤細胞の性質解析

#### (1) 幹細胞性質の検討: Sphere(細胞塊)形成能

同定した神経堤細胞を非接着状態で培養し、幹細胞特有の Sphere 形成を検討した。多分化能:同定した細胞の骨芽細胞、脂肪細胞、象牙芽細胞への分化能を検討した。

#### (2) 増殖能の検討:同定した細胞が再生医療の細胞ソースとして求められる高い増殖能を持つか検討した。

### 3. 神経堤細胞の遺伝子・特性解析

(1) 神経堤細胞の網羅的遺伝子発現解析:神経堤細胞(GFP 陽性細胞)と通常の組織細胞(GFP 陰性細胞)の遺伝子発現の違いについて、DNA マイクロアレイ解析システム(アジレント社, Affimetrix 社:設置済)により解析した。

(2) 神経堤細胞の特性解析:遺伝子解析結果から神経堤細胞特異的に発現する遺伝子(特に転写因子)を選抜し、RNAi で発現を抑制するとともに、それらを非神経堤細胞に強制導入し細胞分化能への影響について検討した。

## 4. 研究成果

遺伝子改変マウスの顎顔面口腔組織では、鼻甲介、口蓋、上顎/下顎切歯部歯肉、上下顎臼歯部歯肉、および頬粘膜に GFP 陽性細胞の存在が認められた。さらに頬粘膜の真皮では、GFP 陽性細胞が線維状の組織とその周辺

組織の一部を構成していた。また頬粘膜から回収した EGFP 陽性細胞は増殖可能で、未分化細胞に特徴的な細胞塊（スフェア）を形成し、それらは神経堤細胞マーカーである p75、Twist、Snail のほか神経幹細胞マーカーである MUsashi1 などの遺伝子を発現していた。またそれらの細胞を骨芽細胞誘導培地で培養し ALP 染色を行なったところ陽性細胞が検出された。

顎顔面口腔組織では様々な部位に神経堤由来細胞が存在していた。また、スフェア形成能と遺伝子発現解析の結果から GFP 陽性細胞の中に神経堤幹細胞が含まれる可能性が示唆され、これらの細胞が再生医療技術の細胞ソースとなる可能性が示唆された。

#### 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 10 件)

Matsunaga A, Takami M, Irie T, Mishima K, Inagaki K, Kamiyo R: Microscopic study on resorption of  $\beta$ -tricalcium phosphate materials by osteoclasts. *Cytotechnology*, February 12, 2015. [Epub ahead of print] (査読有)

森澤絵里, 高見正道, 須澤徹夫, 馬場一美, 大隅典子, 上條竜太郎: 毛包に存在する神経堤由来細胞を用いた骨芽細胞分化誘導. *口腔組織培養学会誌*, 23(1): 100-101, 2014 (査読無)

Shin B, Yu J, Park ES, Choi S, Yu J, Hwang JM, Yun H, Chung YH, Hong KS, Choi JS, Takami M, Rho J: Secretion of a truncated osteopetrosis-associated transmembrane protein 1 (Ostm1) mutant inhibits osteoclastogenesis through downregulation of the B lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp1) - nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1) axis. *J. Biol. Chem.* published online October 30, 2014 (査読有)

Akiyama T, Miyamoto Y, Yoshimura K, Yamada A, Takami M, Suzawa T, Hoshino M, Imamura T, Akiyama C, Yasuhara R, Mishima K, Maruyama T, Kohda C, Tanaka K, Potempa J, Yasuda H, Baba K, Kamiyo R: Porphyromonas gingivalis-derived Lysine Gingipain Enhances Osteoclast Differentiation Induced by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin-1 $\beta$  but Suppresses That by Interleukin-17A: IMPORTANCE OF PROTEOLYTIC DEGRADATION OF OSTEOPROTEGERIN BY LYSINE GINGIPAIN.

*J Biol Chem.* 30;289(22):15621-15630, 2014. (査読有)

Maruyama T, Miyamoto Y, Yamamoto G, Yamada A, Yoshimura K, Suzawa T, Takami M, Akiyama T, Hoshino M, Iwasa F, Ikumi N, Tachikawa T, Mishima K, Baba K, Kamiyo R: Downregulation of Carbonic Anhydrase IX Promotes Col10a1 Expression in Chondrocytes. *PLoS ONE* 8(2): e56984, 2013 (査読有)

Shibuya I, Yoshimura K, Miyamoto Y, Yamada A, Takami M, Suzawa T, Suzuki D, Ikumi N, Hiura F, Anada T, Suzuki O, Kamiyo R: Octacalcium phosphate suppresses chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *Cell Tissue Res*, 2013, in press: DOI 10.1007 (査読有)

高見正道: 抗 RANKL モノクローナル製剤デノスマブの開発とその薬理学的作用. *日本臨床免疫学会誌*, 36: 162-169, 2013 (査読無)

高見正道: 最新の骨粗鬆症学 -骨粗鬆症の最新知見- RANKL と OPG. *日本臨牀* 2013 年 4 月増刊号, 71: 150-155, 2013 (査読無)

高見正道, 松永朗裕, 稲垣克記, 上條竜太郎: 抗 RANKL 抗体の開発と臨床応用. *THE BONE*, 27 (4): 429-437, 2013 (査読無)

〔学会発表〕(計 29 件)

榎本拓哉, 高見正道, 山本松男, 上條竜太郎: 骨髓、脾臓および血液より分離した破骨前駆細胞の性質. 昭和大学歯学部文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成 26 年度シンポジウム プログラム・抄録集, p34, 2015 (昭和大学歯学部文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成 26 年度シンポジウム, 東京, 2015 年 3 月)

須澤徹夫, 高橋正皓, 小野美樹, 浦野絵里, 高見正道, 山田 篤, 宮本洋一, 馬場一美, 榎 宏太郎, 上條竜太郎: 顎口腔組織の神経堤由来細胞を応用した骨再生法の開発. 昭和大学歯学部文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成 26 年度シンポジウム プログラム・抄録集, p57, 2015 (昭和大学歯学部文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成 26 年度シンポジウム, 東京, 2015 年 3 月)

森澤絵里, 高見正道, 須澤徹夫, 馬場一美, 上條竜太郎: 毛包由来の神経堤細胞を用いた

骨芽細胞分化誘導．昭和大歯学部文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業平成 26 年度シンポジウム プログラム・抄録集，p60，2015

（昭和大歯学部文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成 26 年度シンポジウム，東京，2015 年 3 月）

秋山智人，宮本洋一，吉村健太郎，山田 篤，高見正道，安原理佳，今村隆寿，秋山知恵，星野真理江，幸田 力，田中和生，美島健二，馬場一美，上條竜太郎：歯周病原菌毒素プロテアーゼによる炎症性骨破壊．昭和大歯学部文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成 26 年度シンポジウム プログラム・抄録集，p75，2015

（昭和大歯学部文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成 26 年度シンポジウム，東京，2015 年 3 月）

松永朗裕，高見正道，稲垣克記，上條竜太郎：破骨細胞による象牙質および -TCP 製人工骨補填剤の吸収．昭和大歯学部文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成 26 年度シンポジウム プログラム・抄録集，p76，2015

（昭和大歯学部文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成 26 年度シンポジウム，東京，2015 年 3 月）

高見正道：中部大学応用生物学部応用生物化学科公開セミナー「破骨細胞制御による骨疾患治療の最前線」

（中部大学，春日井市，2014 年 4 月）

高見正道：昭和大歯学部スペシャルニーズ口腔医学講座口腔衛生学部門公開講座「骨吸収抑制剤と顎骨壊死」

（昭和大，東京，2014 年 6 月）

高見正道，榎本拓哉，山本松男，上條竜太郎：破骨細胞の前駆細胞形成における骨芽細胞と炎症性刺激の役割．第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会サテライトシンポジウムプログラム抄録集，p39，2014

（第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会，福岡，2014 年 9 月）

榎本拓哉，高見正道，上條竜太郎，山本松男：骨髄，脾臓および血液中存在する破骨前駆細胞の解析．

（第 317 回昭和大歯学部学術大会，東京，2014 年 6 月）

森澤（浦野）絵里，高見正道，須澤徹夫，上條竜太郎，馬場一美：毛包の神経堤由来細胞を用いた骨芽細胞分化誘導．

（第 317 回昭和大歯学部学術大会，東京，2014 年 6 月）

松永朗裕，高見正道，上條竜太郎，稲垣克記：培養破骨細胞による -TCP 製人工骨補填剤オスフェリオンの吸収．第 32 回日本骨代謝学会学術集会プログラム抄録集，p247，2014

（第 32 回日本骨代謝学会学術集会，大阪，2014 年 7 月）

榎本拓哉，高見正道，山本松男，上條竜太郎：骨髄，脾臓，血液中存在する破骨細胞分化能をもつ細胞の解析．第 32 回日本骨代謝学会学術集会プログラム抄録集，p257，2014

（第 32 回日本骨代謝学会学術集会，大阪，2014 年 7 月）

渋谷 勲，高見正道，松本光史，榎本拓哉，松永朗裕，浦野絵里，上條竜太郎：骨巨細胞腫細胞に対する Denosumab の効果．第 32 回日本骨代謝学会学術集会プログラム抄録集，p318，2014

（第 32 回日本骨代謝学会学術集会，大阪，2014 年 7 月）【三共(株)ニュースターに紹介】

榎本拓哉，高見正道，山本松男，上條竜太郎：骨髄，脾臓および血液より分離した破骨前駆細胞の性質．第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会プログラム抄録集，p55，2014

（第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会，福岡，2014 年 9 月）【優秀ポスター受賞】

唐川亜希子，坂井信裕，栗谷未来，高見正道，諸橋富夫：ワルファリンナトリウム投与ラットの動脈および骨出血に対するヘムコンデンタルドレッシング(R)の止血効果．第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会プログラム抄録集，p58，2014

（第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会，福岡，2014 年 9 月）

松永朗裕，高見正道，稲垣克記，上條竜太郎：破骨細胞による象牙質および -TCP 製人工骨補填剤の吸収．口腔組織培養学会誌，24

（1）：3-4，2014

（第 51 回日本口腔組織培養学会学術大会，福岡，2014 年 11 月）

浦野（森澤）絵里，高見正道，須澤徹夫，大隅典子，馬場一美，上條竜太郎：毛包内神経堤由来細胞は骨芽細胞様細胞への分化能を持ち破骨細胞の分化を支持する．第 37 回日本分子生物学会年会プログラム，p238，2014

（第 37 回日本分子生物学会年会，横浜，2014 年 11 月）

唐川亜希子，坂井信裕，栗谷未来，井澤基樹，船津敬弘，井上美津子，高見正道，諸橋富夫：ワルファリンナトリウム投与ラットの動脈および骨出血に対するヘムコンデンタルドレッシング (R) の止血効果．第 37 回日本分子生物学会年会プログラム，p348，2014

(第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014年11月)

唐川亜希子, 坂井信裕, 諸橋富夫, 高見正道: ワルファリンナトリウム投与ラットの動脈出血および骨出血に対するキトサン含有止血材の効果. 第61回昭和大学学生会総会プログラム抄録集, p45, 2014

(第61回昭和大学学生会総会, 東京, 2014年12月)

松永朗裕, 高見正道, 入江太郎, 美島健二, 上條竜太郎, 稲垣克記: 破骨細胞による-TCP 製人工骨補填剤の吸収機構. 第61回昭和大学学生会総会プログラム抄録集, p57, 2014

(第61回昭和大学学生会総会, 東京, 2014年12月)

松永朗裕, 高見正道, 山田 篤, 上條竜太郎, 稲垣克記: 骨形成タンパク質 BMP-2, 4, 6, 7 が有する異所性骨形成誘導活性の解析. 第61回昭和大学学生会総会プログラム抄録集, p57, 2014

(第61回昭和大学学生会総会, 東京, 2014年12月)

森澤絵里, 高見正道, 須澤徹夫, 上條竜太郎, 馬場一美: 毛包に存在する神経堤由来細胞を用いた骨芽細胞の分化誘導 (第122回 社団法人日本補綴歯科学会 設立80周年記念 第122回学術大会, 福岡, 2013年5月)【優秀ポスター賞(デンツプライ賞)】

松本光史, 高見正道, 館 慶太, 上條竜太郎, 馬場一美: 菌体成分が BMP-2 と TGF- $\beta$  1 が誘導する異所性骨形成に与える影響とそのメカニズム. 日本補綴歯科学会誌, 5 (122回特別号):284, 2013

(日本補綴歯科学会 第122回学術大会, 福岡, 2013年5月)

松本光史, 高見正道, 馬場一美, 上條竜太郎: TGF- $\beta$  1 と菌体が BMP-2 の異所性骨形成誘導作用に及ぼす影響. 日本口腔科学会雑誌, 63 (1): 102, 2014

(第67回日本口腔科学会学術集会, 宇都宮, 2013年5月)

森澤絵里, 高見正道, 須澤徹夫, 馬場一美, 大隅典子, 上條竜太郎: 神経堤由来の毛包細胞を用いた骨芽細胞分化誘導. 日本口腔科学会雑誌, 63 (1): 181, 2014

(第67回日本口腔科学会学術集会, 宇都宮, 2013年5月)

森澤絵里, 高見正道, 須澤徹夫, 馬場一美, 上條竜太郎: 毛包の神経堤由来細胞は骨芽細胞への分化能を有し, RANKL の発現を介して破骨細胞分化を支持する. 第31回日本骨

代謝学会学術集会プログラム抄録集, p.90, 2013

(第31回日本骨代謝学会学術集会, 神戸, 2013年5月)

Matsumoto A, Takami M, Tachi K, Kamijo R, Baba K: Effects of bacterial infection on ectopic bone formation induced by BMP-2. Dent Med Res, 33 (3): 282-283, 2013

(第33回昭和歯学会総会, 東京, 2013年7月)

望月文子, 高見正道, 宮本洋一, 井上富雄, 上條竜太郎: 破骨細胞の前駆細胞における接着シグナルは分化誘導受容体(RANK)の発現を誘導する. J Oral Biosci, 2013(Suppl): 159, 2013

(第55回歯科基礎医学会学術大会, 岡山, 2013年9月)

森澤絵里, 高見正道, 須澤徹夫, 馬場一美, 大隅典子, 上條竜太郎: 毛包に存在する神経堤由来細胞を用いた骨芽細胞分化誘導. 日本口腔組織培養学会設立50周年記念学術大会・総会プログラム・抄録集, p.54, 2013

(日本口腔組織培養学会設立50周年記念学術大会, 東京, 2013年11月)

〔図書〕(計2件)

Takami M, Miyamoto Y, Matsumoto A, Mochizuki A, Tachi K, Baba K, Inoue T, Mijung Y, Shibuya I, Zhao B, Kamijo R: Functions of Toll-like receptors in osteoclast differentiation induced by receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand. In The New Frontiers in Research for Oral Cancer. Tachikawa T (Eds), MARUZEN. CO. LTD, Tokyo, pp35-49, 2013

Yamada A, Matsumoto T, Suzuki D, Funato S, Takami M, Aizawa R, Suzawa T, Miyamoto Y, Suzuki W, Yoshimura K, Nakayama M, Maki K, Yamamoto M, Baba K, Kamijo R: Screening for regulators of osteoblast differentiation induced by BMP-2. The New Frontiers in Research for Oral Cancer. Tachikawa T (Eds), MARUZEN. CO. LTD, Tokyo, pp82-89, 2013

〔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 0 件）

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

〔その他〕  
ホームページ等

昭和大学歯学部  
歯科薬理学講座ホームページ  
<http://www10.showa-u.ac.jp/~dpharmc/>

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

高見 正道 (TAKAMI MASAMICHI)  
昭和大学・歯学部・教授  
研究者番号：80307058

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：