

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463226

研究課題名(和文) 歯周組織幹細胞による組織再生・治癒様式の解析と新規再生療法の開発

研究課題名(英文) Development a new regenerative therapy and analysis of tissue regeneration / wound healing system by periodontal tissue stem cells

研究代表者

森川 暁 (Morikawa, Satoru)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00424169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 実際の治療を目的として誘導されたiPS細胞、すなわちヒト治療用iPS細胞を用いることができるようになった。
 (2) 少しでも将来の実用化に向けた治療用iPS細胞を使用することから、培養に用いるフィーダー細胞(動物由来栄養供給細胞)の使用も課題となっていることから本研究課題の重要なステップとして、フィーダーフリー培養法を確立した。フィーダーフリー培養法を確立した後は、同じく臨床実用化の重要なステップになる無血清培養法、すなわちゼノフリー培養法を確立した。
 (3) フィーダーフリー/ゼノフリー培養法でのヒト治療用iPS細胞の維持と、歯周組織の発生的起源である神経堤細胞への誘導を実現させた。

研究成果の概要(英文)：(1) For the purpose of actual treatment, We have become possible to use human therapeutic iPS cells .
 (2) In the future, We suppose the use of human therapeutic iPS cells . In practical application, it is very important problem to use the conventional culture system. Because these system use fetal bovine serum and non human feeder cell to culture of human iPS cells. To overcome these problems, we established non serum / non feeder culture system of human therapeutic iPS cells . We think these steps (feeder free / xeno free culture system) are very notable in this study.
 (3) We succeeded inducing neural crest like cells from human iPS cells. Neural crest is developmental origin of periodontal tissue.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：歯周組織再生 間葉系幹細胞 神経堤細胞 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

現在主に行われている歯周組織再生療法には 1. 歯周組織再生誘導法(GTR 法)、2. エナメルマトリックスタンパク質(EMD)を応用した手術法、3. 骨移植術などがある。これらはすべて歯周組織に内在すると想定される幹細胞(Periodontal tissue stem cell; PTS 細胞と定義する)に依存した治療法と考えられる。つまり、各術式は異なるものの GTR 法は PTS 細胞が増殖・分化する「場」を、EMD は「成長因子」を、そして骨移植術は増殖・分化するための「場」と、自家骨の場合はわずかばかりの PTS 細胞を供給することで、歯周組織の再生現象が誘導されていると考えられる。現行の方法全てがこのわずかに存在する PTS 細胞を頼りにしていることが、各術式における臨床成績にそれほど大きな差がない理由であろう。この状況を打破し、更に有効な歯周組織再生が期待されている組織幹細胞としてこれまで歯根膜幹細胞(Periodontal ligament stem cell; PDLSC)や歯髄幹細胞(Dental pulp stem cell; DPSC)が報告されている。しかしこれらの細胞は培養皿上で付着増殖した細胞を PDLSC あるいは DPSC と定義し、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、前駆細胞の混入や培養による性質変化が生じている雑多な細胞集団を解析していることが否定できず、実際の PTS 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。

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 cell; MSC)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 CD140a(PDGFR⁺)⁺Sca-1⁺CD45⁻Ter119⁻(Morikawa, et al. Nat Protocols 2012, Journal of Experimental Medicine 2009)、ヒトでは CD90(Thy-1)⁺CD271(LNGFR)⁺(Mabuchi, Morikawa et al. Stem Cell Reports 2013)を MSC 特異的マーカーとして同定し、MSC が骨髄に存在しながら造血系幹細胞とは全く異なる幹細胞であることを証明し(Koide, Morikawa et al. Stem Cells 2007)、MSC 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頭頸部の平滑筋・骨格・歯など MSC に非常に似た組織へ分化することが知られているが、申請者らは FCM を使って神経堤幹細胞(Neural crest stem cell; NCSC)を回収することに成功し(Nagoshi Morikawa et al. Cell Stem Cell 2008)、MSC の発生学的起源の 1 つであることも明らかにした(Morikawa et al. Biochemical and Biophysical Research Communications 2009)。そこでこれまで確立した実験系を駆使することでヒトおよびマウスから PTS 細胞を同定・分離し、幹細胞に焦点を当てた新たな歯周組織再生療法確立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、現在行われている歯周組織再生療法による組織修復、組織再生機構のメカニズムを細胞生物学的アプローチによって明らかにし、その知見をもとに新規歯周組織再生療法を確立することである。計画していた具体的な研究項目は

- (1) 現在主に行われている歯周組織再生療法において、組織再生に寄与している歯周組織幹細胞をフローサイトメーターにより分離・同定する。
- (2) これまで報告されている歯根膜幹細胞、歯髄幹細胞、骨髄間葉系幹細胞と(1)で同定した歯周組織幹細胞を遺伝子発現、細胞増殖能、分化能の観点から比較する。
- (3) 野生型マウスや免疫不全マウスに実験的歯周炎を惹起させ、現行の歯周組織再生療法と(1)で同定した歯周組織幹細胞を用いた新規再生療法の組織再生及び治癒様式を解析し、ヒトへの応用方法を検討する。

3. 研究の方法

- (1) 神経堤由来細胞が緑色に発色するトランスジェニックマウス(p75-EGFP)の長管骨/顎およびヒト歯周組織における歯周組織幹細胞(PTS 細胞 = 神経堤由来間葉系幹細胞)の同定・分離法の確立

これまで歯周組織幹細胞と定義されてきた PDLSC や DPSC を同定するための試みは骨髄間葉系幹細胞研究をその見本にしてきた経緯がある。つまり、幹細胞の供給源として、Lindhe が幹細胞の存在を提唱した歯根膜組織、あるいは歯髄組織の接着培養を行い、そこで細胞増殖能と骨・軟骨・脂肪細胞への分化能を示した雑多な細胞集団を歯周組織幹細胞と定義してきた。これでは数日間から数週間の培養操作を経ているため、本当に歯根膜や歯周組織に存在する幹細胞を解析できているかどうか非常に疑問である。そこで以下の方法により培養操作なしでマウス/ヒト PTS 細胞を直接同定・分離する実験系の確立を目指した。

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 MSC マーカーと NCSC 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、あるいは歯周外科手術時に少量の歯槽骨、骨膜、歯根膜を採取し、得られる組織は非常に少量であること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を検討する。

上記マーカーを使って分けられた各細胞集団におけるコロニー形成能や細胞分化能を比較し、PTS 細胞を同定する。

(2) 同定したヒト/マウス PTS 細胞分画とヒト PDLSC/DPSC、あるいは従来法のヒト/マウス MSC の遺伝子発現解析や細胞増殖能、分化能および創傷治癒に必要とされる細胞遊走能を比較する。

(3) 歯周組織における PTS 細胞の局在を明らかにする

(4) 実験的歯周炎発症後の各歯周組織再生療法による組織修復・再生機序の解析

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、それらの細胞が組織破壊を再生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た。また研究計画期間中に本学生理学研究室との共同研究により、ヒト iPS 細胞を用いた新規歯周組織再生療法に向けた研究も開始したことから、こちらの研究成果についても記す。

4. 研究成果

本研究課題の当初予定していたヒト口腔組織から直接、歯周組織を再生させるポテンシャルを有する歯周組織幹細胞の同定を目的としていた。しかしながら、歯周組織に限定せず顎骨や末梢神経の再生も視野に入れた幹細胞が分離あるいは誘導できれば、多くの間葉細胞から構成される歯周組織再生にも大きく寄与することが容易に想像できる。そこで申請者はヒト口腔組織から歯周組織幹細胞を分離・解析する方法を探索すると同時に、iPS 細胞から歯周組織の発生学的起源である外胚葉性間葉組織構成細胞=神経堤細胞を誘導することも研究計画として追加した。

これまでの研究成果は

(1) iPS 細胞は京都大学と提携し、実際の治療を目的として誘導された iPS 細胞、すなわち治療用 iPS 細胞を用いることができるようになった。

(2) 少しでも将来の実用化に向けた治療用 iPS 細胞を使用することから、培養に用いるフィーダー細胞(動物由来栄養供給細胞)の使用も課題となっていることから本研究課題の重要なステップとして、フィーダーフリー培養法を確立した。

(3) フィーダーフリー培養法を確立した後は、同じく臨床実用化の重要なステップになる無血清培養法、すなわちゼノフリー培養法での iPS 細胞の維持と神経堤細胞への誘導を実現させた(右上図)。

現在主に行われている培養方法はウシ血清などが培地に含まれているため、基礎研究段階で将来の臨床応用を見越し、動物由来成分を用いない培養法を確立することは非常に重要である。また、動物成分由来であるがゆえの“ロット差”を無くする意味でもゼノフリー培養法の確立は非常に重要であると考えた。

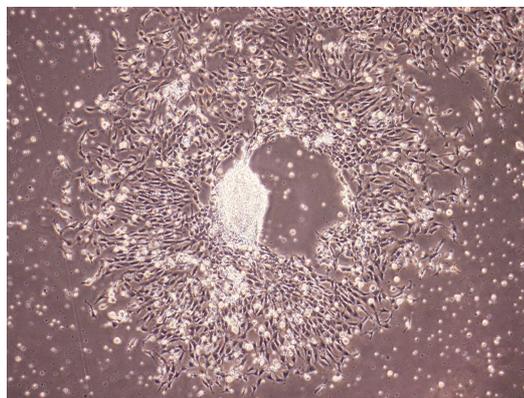


図: フィーダーフリー/ゼノフリー培養法によるヒト iPS 細胞の誘導と神経堤様細胞の誘導

この(1)(2)(3)の結果本研究課題の(研究期間に限定されない)最終的ゴールであるヒト歯周組織再生に向けた非常に重要かつ必須のステップとその成功だったと考えている。現在はフィーダーフリー/ゼノフリーの条件で培養した治療用 iPS 細胞から神経堤様細胞に誘導し、その増殖能や分化能に加え、神経堤細胞の重要な性質の一つである遊走能に関しても in vivo 実験で評価を行っている。その結果として、神経堤細胞の特徴である遊走能を確認することができた。また、現在歯周組織再生の候補として基礎・臨床研究が進んでいる間葉系幹細胞系統への誘導と分化能に関しても確認中である。さらに誘導幹細胞による口腔組織再生に向けた画像評価法の確立も検討している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

1. Ouchi T, Morikawa S, Shibata S, Fukuda K, Okuno H, Fujimura T, Kuroda T, Ohyama M, Akamatsu W, Nakagawa T, Okano H. LNGFR(+)/THY-1(+) human pluripotent stem cell-derived neural crest-like cells have the potential to develop into mesenchymal stem cells. Differentiation. 査読(有).

2016 May 10.

pii: S0301-4681(15)30062-1.

doi: 10.1016/j.diff.2016.04.003.

2. Morikawa S, Ouchi T, Shibata S, Fujimura T, Kawana H, Okano H, Nakagawa T.

Applications of Mesenchymal Stem Cells and Neural Crest Cells in Craniofacial Skeletal Research.

Stem Cells International. 査読(有).

2016;2016:2849879.

doi: 10.1155/2016/2849879.

3. Yasui T, Mabuchi Y, Toriumi H, Ebine T, Niibe K, Houlihan DD, Morikawa S, Onizawa K, Kawana H, Akazawa C, Suzuki N, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y.

Purified Human Dental Pulp Stem Cells Promote Osteogenic Regeneration.

Journal of Dental Research.

2016 Feb. 査読(有).

95(2):206-14.

doi: 10.1177/0022034515610748.

4. Ogawa Y, Morikawa S, Okano H, Mabuchi Y, Suzuki S, Yaguchi T, Sato Y, Mukai S, Yaguchi S, Inaba T, Okamoto S, Kawakami Y, Tsubota K, Matsuzaki Y, Shimmura S.

MHC-compatible bone marrow stromal/stem cells trigger fibrosis by activating host T cells in a scleroderma mouse model.

Elife. 査読(有).

2016 Jan 26.

5:e09394.

doi: 10.7554/eLife.09394.

5. 森川暁.

幹細胞を用いた新規口腔組織再生療法の確立.

Journal of Bio-Integration. 査読(有).

2015.

5(1):9-12.

〔学会発表〕(計8件)

1. Ouchi T, Morikawa S, Okano H, Nakagawa T. A simple method to generate a large amount of developmentally selected mesenchymal stem cells.

第58回秋季日本歯周病学会学術大会

2015 9/12-9/13 (9/12)

アクトシティ浜松(静岡県浜松市).

2. Ouchi T, Morikawa S, Okano H, Nakagawa T. Interaction and Invagination of Odontogenic Epithelial/Mesenchymal Cells Derived from Human iPS Cells.

第36回日本炎症・再生医学会

2015 7/21-7/22

虎ノ門ヒルズフォーラム(東京都港区)

3. Morikawa S, Ouchi T, Nakagawa T. A case report of severe generalized chronic periodontitis in a patient with Behcet's disease. EuroPerio8

(8TH CONFERENCE OF THE EUROPEAN FEDERATION OF PERIODONTOLOGY).

2015 June 3-6.

LONDON (United Kingdom)

4. Ouchi T, Morikawa S, Nakagawa T. Purified-Mesenchymal stem cells in human induced pluripotent stem cells derived from neural crest cells.

EuroPerio8

(8TH CONFERENCE OF THE EUROPEAN FEDERATION OF PERIODONTOLOGY).

2015 June 3-6.

LONDON (United Kingdom)

5. Ouchi T, Morikawa S, Okano H, Nakagawa T. Generation of odontogenic cells from human induced pluripotent stem cells.

第58回春季日本歯周病学会学術大会

2015 5/15-5/16 (5/15)

幕張メッセ(千葉県千葉市)

6. 森川暁. 幹細胞細胞を用いた新規口腔組織再生療法とは. バイオインテグレーション学会 第5回学術大会・総会

2015 3/29

国際医療福祉大学大学院東京青山キャンパス(東京都港区)

7. 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

2015 3/19-3/21

パンフィコ横浜(神奈川県横浜市)

8. 黄地健仁, 森川暁, 石淵智子, 植松明子, 岡原則夫, 井上貴史 ほか. 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

2015 1/22-1/23

犬山国際観光センター(愛知県犬山市).

〔図書〕(計1件)

森川暁, 黄地健仁, 中川種昭, 河奈裕正, 岡野栄之.

クインテッセンス出版

口腔領域における再生医療の最前線 口腔上皮の再生.

the Quintessence 口腔外科 YEAR BOOK 一般臨床家, 口腔外科医のための口腔外科ハンドマニュアル'15.

2015

156-60.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: ヒトiPS細胞から、ヒト歯原性上皮細胞やヒト歯原性間葉細胞を製造する方法

発明者: 黄地健仁、森川暁、中川種昭、岡野栄之

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2016-073957

出願年月日: 2016年4月1日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

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