

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670813

研究課題名(和文) 毛包に存在する神経堤由来細胞による低侵襲骨再生法の開発

研究課題名(英文) The development of minimally invasive bone regeneration strategy using neural crest-derived cells of hair follicles.

研究代表者

上條 竜太郎 (Kamijo, Ryutaro)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：70233939

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)：胚発生の過程で神経堤から遊走した神経堤由来細胞の一部は、成長後も幹細胞の性質を維持し体内に潜伏することから、再生医療の新しい細胞ソースとして期待されている。本研究では、神経堤由来細胞をGFPで標識できる遺伝子改変成体マウスを用い、毛包の毛乳頭とバルジ領域に神経堤由来細胞が局在するのを明らかにした。毛包から採取した細胞はFGF含有培地によりGFP陽性細胞が選択的に増殖し、間葉系幹細胞マーカーの発現も上昇した。一方、BMP含有の誘導培地によって骨芽細胞様細胞へと分化した。低侵襲で容易に採取できる毛包の神経堤由来細胞は、骨組織再生の有効な細胞ソースとなり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neural crest cells migrate extensively within the embryo as neural crest-derived cells (NCDCs) to reach target sites. Some NCDCs are maintained in an undifferentiated state throughout the life of primate. Therefore, it is considered that NCDCs are a useful cell source for regenerative medicine and stem cell therapy. To analyze the osteoblastic differentiation potential of NC-derived hair follicle cells (NCDFCs) of adult tissues, we utilized an established line of double transgenic mice in which NCDCs express green fluorescent protein throughout their life. NCDCs were observed in the bulge, which contains adult stem cells, and dermal papilla in adult mice. NCDFCs have high proliferative potential and that many proliferative cells expressed the mesenchymal stem cells marker. NCDFCs differentiated into osteoblast-like cells and support osteoclast differentiation. These results indicate that NCDFCs may be an ideal candidate cell source for bone regenerative medicine.

研究分野：口腔生化学

キーワード：神経堤由来細胞 毛包 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

胚発生の過程で神経管癒合部から出現する神経堤細胞は、胚内を広範囲に遊走した後、定着先の環境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様々な細胞に影響するため、その医学的重要性は極めて高い。神経堤から体内を遊走し目的組織に辿り着いた神経堤由来細胞の一部の細胞は、成長後も幹細胞の性質を維持し骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、神経細胞等への多分化能をもつことから再生医療の新しい細胞ソースとして期待される。近年の研究から神経堤由来細胞は、角膜、毛包、脊髄後根神経節など成体組織各所に存在することが明らかになった〔*Stem Cells* 24:2714-2722, 2006; *Cell Stem Cell* 2:392-403, 2008〕。今回、成体に存在する神経堤由来細胞の中で特に、低侵襲に採取できる毛包の神経堤由来細胞を再生医療の細胞ソースとして着目した。患者自身の神経堤由来細胞を利用した再生法は、腫瘍化の危険性、倫理的な問題、免疫拒絶反応の問題などを危惧することなく応用できることから、ES細胞やiPS細胞と比べ再生医療において理想的な細胞ソースと成り得る。従って、分化誘導法の確立と成体レベルでの基礎データが必要である。

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。高い多分化能は、再生医療材料として最適である。さらに、毛包など体表組織に存在する神経堤由来細胞は、低侵襲にアクセスできるため臨床に応用する上で細胞ソースとして価値が高い。本研究では神経堤由来細胞が蛍光タンパク質で標識される遺伝子改変成体マウスを用いて、毛包細胞に存在する神経堤由来細胞の細胞ソースとしての品質特性について最新技術を駆使して解明し、結果に立脚した効果的な低侵襲骨再生法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 神経堤由来細胞を標識したマウス毛包

の解析

本研究で用いる P0-Cre/GFP ダブルトランスジェニックマウスは、胚発生時期の神経堤細胞特異的に活性化するミエリンプロテインゼロ(P0)遺伝子のプロモーターにより Cre リコンビナーゼが発現し、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る。

フローサイトメトリーによる細胞同定：遺伝子改変マウスより採取した毛包組織から細胞を単離する。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、毛包に存在する神経堤由来細胞の細胞種、分化の程度など形質と各々細胞の割合について解析する。

(2) 毛包神経堤由来細胞の性質解析

幹細胞の性質について検討(多分化能)：毛包神経堤由来細胞の骨芽細胞、脂肪細胞への分化能を検討する。

増殖能の検討：毛包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する。

骨芽細胞分化の検討：効率的な骨芽細胞の分化誘導法について検討する。BMP の作用による骨芽細胞分化関連遺伝子の発現解析と、骨芽細胞としての破骨細胞形成支持能について、骨髄細胞と共存培養系を用いて解析する。

(3) 神経堤由来細胞を用いた骨組織誘導・骨再生解析

骨再生誘導：骨形成誘導因子である BMP-2 は、硬組織の再生医療に有用な因子である。今回は、遺伝子改変マウスから神経堤由来細胞を培養後に純化して、コラーゲンスポンジに混入する。マウス頭頂骨に自然修復しない欠損を作り、神経堤由来細胞を混入したコラーゲンスポンジを骨欠損部位に移植して、組織形態学的評価と、高解像度 μ CT により骨欠損再生における神経堤由来細胞の役割について解析する。

4. 研究成果

本研究で用いた P0-Cre/CAG-CAT-EGFP 遺伝

子改変マウスは、胚発生時期の神経堤細胞特異的に活性化するミエリンプロテインゼロ (P0) 遺伝子のプロモーターにより Cre リコンビナーゼが発現し遺伝子組換えによって、神経堤細胞がその後分化しても GFP が産生されるため、各組織に存在する神経堤由来細胞は GFP 陽性細胞として検出できる。毛包の組織解析から毛乳頭と、ケラチノサイトの幹細胞が存在するバルジ領域に GFP 陽性細胞が局在した。遺伝子改変マウスより採取した毛包の全細胞数の僅か 10%以下であった GFP 陽性細胞は、FGF と EGF 含有の幹細胞培地で培養すると割合が高くなり、培養 2 週間にはおよそ 95%を GFP 陽性細胞が占めた。同時にフローサイトメーターで解析すると、間葉系幹細胞マーカー発現の割合も増加した。以上の結果、毛包から未分化な神経堤由来細胞を、選択的に増殖させることに成功した。

増殖させた神経堤由来細胞を BMP 含有の骨芽細胞誘導培地で培養すると、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性が上昇し、その活性は BMP の濃度依存的に促進した。石灰化の指標であるアリザリンレッド染色、Von Kossa 染色共に陽性を示し、Osteocalcin と Osterix の遺伝子発現も上昇した。さらに骨髓細胞との共存培養で破骨細胞形成を支持することから、毛包の神経堤由来細胞は骨芽細胞様細胞へ分化したことが明らかになった。また、脂肪細胞誘導培地によって脂肪細胞様細胞に分化したことから、多分化能をもつことも証明された。神経堤由来細胞による骨誘導の適正条件について、現在検討を加えている。これらの結果から、低侵襲で容易に採取できる毛包の神経堤由来細胞は、骨組織再生の極めて有効な細胞ソースとなり得ることが示唆された。

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 17 件)

1) Saito A, Yoshimura K, Miyamoto Y, Yamamoto M, Kamijo R: Enhanced and suppressed mineralization by acetoacetate and β -hydroxybutyrate in

osteoblast cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 473: 537-544, 2016 (査読有)

2) Maruyama, N., Shibata, Y., Mochizuki, A., Yamada, A., Maki, K., Inoue, T., Kamijo, R., Miyazaki, T: Bone micro-fragility caused by the mimetic aging processes in *a-Klotho* deficient mice: *in situ* nanoindentation assessment of dilatational bands. *Biomaterials*, 47:62-71, 2015 (査読有)

3) Kurosawa T, Yamada A, Takami M, Suzuki D, Saito Y, Hiranuma K, Enomoto T, Morimura N, Yamamoto M, Iijima T, Shirota T, Itabe H, Kamijo R: Expression of Nephronectin is inhibited by Oncostatin M via both JAK/STAT and MAPK pathways. *FEBS Open Bio*, 5: 303-307, 2015 (査読有)

4) Wurihan, Yamada A, Suzuki D, Shibata Y, Kamijo R, Miyazaki T: Enhanced *in vitro* biological activity generated by surface characteristics of anodically oxidized titanium the contribution of the oxidation effect. *European Cells & Materials* 29: 290-302, 2015 (査読有)

5) Saito Y, Yamada A, Suzuki D, Tanaka J, Nagahama R, Kurosawa T, Maki K, Mishima K, Shirota T, Kamijo R: Association of aging with gene expression profiling in mouse submandibular glands. *Genomics Data* 5: 115-119, 2015 (査読有)

6) Ono M, Suzawa T, Takami M, Yamamoto G, Hosono T, Yamada A, Suzuki D, Yoshimura K, Watahiki J, Hayashi R, Arata S, Mishima K, Nishida K, Osumi N, Maki K, Kamijo R: Localization and osteoblastic differentiation potential of neural crest-derived cells in oral tissues of adult mice. *Biochem Biophys Res Commun* 464: 1209-1214, 2015 (査読有)

- 7) Ikumi N, Suzawa T, Yoshimura K, Kamijo R: Bone Response to Static Compressive Stress at Bone-Implant Interface: The Pilot Study of Critical Static Compressive stress. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 30: 827-833, 2015 (査読有)
- 8) Wang X, Suzawa T, Miyauchi T, Zhao B, Yasuhara R, Anada T, Nakamura M, Suzuki O, Kamijo R: Synthetic Octacalcium Phosphate Enhanced Reparative Dentin Formation via Induction of Odontoblast Differentiation. *J Tissue Eng Regen Med* 9: 1310-1320, 2015 (査読有)
- 9) Oshima-Nakayama M, Yamada A, Kurosawa T, Aizawa R, Suzuki D, Saito Y, Kasai H, Sato Y, Yamamoto M, Shirota T, Aiba A, Maki K, Kamijo R: Cdc42 is crucial for facial and palatal formation during craniofacial development. *Bone Reports* 5: 1-6, 2016 (査読有)
- 10) Nagahama R, Yamada A, Tanaka J, Aizawa R, Suzuki D, Kassai H, Yamamoto M, Mishima K, Aiba A, Maki K, Kamijo R: Rho GTPase protein Cdc42 is critical for postnatal cartilage development. *Biochem Biophys Res Commun* 470: 813-817, 2016 (査読有)
- 11) Yu, J., Murakami, M., Aoki, T., Jiang, B., Jin Z, Koizumi, T., Kusano, M., Kamijo, R., Miyamoto, Y., Enami, Y., Watanabe, M., Otsuka, K: Oxygenated Static Preservation of Donation after Cardiac Death Liver Grafts Improves Hepatocyte Viability and Function. *Eur Surg Res*, 56: 1-18, 2015 (査読有)
- 12) Suzuki H, Mochizuki A, Yoshimura K, Miyamoto Y, Kaneko K, Inoue T, Chikazu D, Takami M, Kamijo R: Bropiramine inhibits osteoclast differentiation through production of interferon- γ . *Biochem Biophys Res Commun* 467: 146-151, 2015 (査読有)
- 13) Suzuki W, Yamada A, Aizawa R, Suzuki D, Kassai H, Harada T, Nakayama M, Nagahama R, Maki K, Takeda S, Yamamoto M, Aiba A, Baba K, Kamijo R: Cdc42 is critical for cartilage development during endochondral ossification. *Endocrinol.* 156: 314-322, 2015 (査読有)
- 14) Akiyama T, Miyamoto Y, Yoshimura K, Yamada A, Takami M, Tetsuo Suzawa T, Hoshino M, Imamura T, Akiyama C, Yasuhara R, Mishima K, Maruyama T, Kohda C, Tanaka K, Potempa J, Yasuda H, Baba K, Kamijo R: *Porphyromonas gingivalis*-derived lysine gingipain enhances osteoclast differentiation induced by tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β but suppresses that by interleukin-17A. Importance of proteolytic degradation of osteoprotegerin by lysine gingipain. *J Biol Chem* 289: 15621-15630, 2014 (査読有)
- 15) Takahashi M, Suzawa T, Yamada A, Yamaguchi T, Mishima K, Osumi N, Maki K, Kamijo R: Identification of gene expression profile of neural crest-derived cells isolated from submandibular glands of adult mice. *Biochem Biophys Res Commun* 446: 481-486, 2014 (査読有)
- 16) 高橋正皓、小野美樹、須澤徹夫、吉田寛、宇山理紗、榎宏太郎、上條竜太郎：口腔顎顔面領域に存在する神経堤由来細胞の成体における分布と細胞分化能 -新しい骨再生療法の提案-、*口腔組織培養学会誌* 24 (4): 1-8, 2015 (査読無)
- 17) 宮本洋一、上條竜太郎：骨代謝とH₂S・RSSシグナル．*細胞工学* 34 (4): 379-383, 2015

(査読無)

[学会発表] (計 61 件)

- 1) Nagahama R, Yamada A, Suzuki D, Maki K, Kamijo R: Cdc42 is critical for cartilage development during endochondral ossification at postnatal stage. 2015 cell biology ascb annual meeting poster guide p35 2015 (2015 Cell Biology ASCB Annual Meeting, San Diego, December 12-16)
- 2) Hiranuma K, Yamada A, Suzuki D, Iijima T, Kamijo R: Regulation of nephronectin gene expression by β 1, 25-Dyhydroxyvitamin D₃. 2015, Cell Biology ASCB Annual Meeting • Poster Guide, p110, 2015 (2015 Cell biology ASCB Annual Meeting, San Diego, California, United States of America, December 2015)
- 3) Izumida E, Miyamoto Y, Yamada A, Saito T, Otsu M, Yamaguchi T, Maki K, Kamijo R: Missense mutations in parathyroid hormone 1 receptor found in patients having primary failure of tooth eruption cause decreased response to parathyroid hormone. (2015 Cell biology ASCB Annual Meeting, San Diego, California, United States of America, December 2015)
- 4) Funato S, Yasuhara R, Miyamoto Y, Yoshimura K, Mishima K, Baba K, Kamijo R: Phagocyte-type NADPH oxidase-derived reactive oxygen species is crucial for activation of hyaluronidase and degradation of extracellular matrix in chondrocytes stimulated by interleukin-1 . (2015 Cell biology ASCB Annual Meeting, San Diego, California, United States of America, December 2015)
- 5) Oshima M, Yamada A, Suzuki D, Maki K, Kamijo R: Cdc42 in neural crest derived cells is essential for palatal development. ANZBMS 25th Annual Scientific Meeting Handbook, p43, 2015, ANZBMS 25th Annual Scientific Meeting, Tasmania, Australia, November, 2015
- 6) 長濱諒、山田篤、榎宏太郎、上條竜太郎: “Cdc42 is critical for postnatal cartilage development.” 第63回国際歯科研究学会 日本部会総会・学術大会 抄録集, p95 (第63回国際歯科研究学会、福岡、2015年10/30.31)
- 7) 平沼克洋、山田篤、飯島毅彦、上條竜太郎: “Expression of nephronectin is regulated by β 1, 25-Dyhydroxyvitamin D₃.” 第63回国際歯科研究学会 日本部会総会・学術大会 抄録集, p95 (第63回国際歯科研究学会、福岡、2015年10/30.31)
- 8) 大島睦子、山田篤、鈴木大、榎宏太郎、上條竜太郎: 神経堤由来細胞に発現するRhoファミリー低分子量Gタンパク質Cdc42は口蓋形成に必須である . 第57回歯科基礎医学会学術大会・総会プログラム・抄録集 ,p263 , 2015 (第57回歯科基礎医学会学術大会・総会、新潟、2015年9月)
- 9) 井汲憲治、須澤徹夫、吉村健太郎、上條竜太郎: 骨/インプラント界面の静的圧縮応力に対する骨の反応 -静的圧縮の限界応力に関する研究- . 第57回歯科基礎医学会学術大会プログラム集 ,p65 , 2015 (第57回歯科基礎医学会学術大会・総会、新潟、2015年9月)
- 10) 山田篤、鈴木大、上條竜太郎: Rhoファミリー低分子量Gタンパク質Rac1およびCdc42の骨・軟骨形成における機能解析 . 第1回日本骨免疫学会プログラム・抄録集 ,p107 , 2015 (第1回日本骨免疫学会、沖縄 宮古島、2015年6-7月)
- 11) 鈴木大、Bush J、上條竜太郎、Beier F :

軟骨形成における恒常活性化型Rac1の機能解析．第1回日本骨免疫学会プログラム・抄録集，p67，2015（第1回日本骨免疫学会、沖縄 宮古島、2015年6-7月）

12) 星野真理江、宮本洋一、金子児太郎、赤池孝章、近津大地、馬場一美、上條竜太郎：8-ニトロ-cGMPは骨伸長を促進する新規内因性シグナル分子である．（第1回日本骨免疫学会、沖縄 宮古島、2015年6-7月）

13) 大島睦子、山田篤、鈴木大、槇宏太郎、上條竜太郎：低分子量Gタンパク質Cdc42は口蓋形成において重要な遺伝子である．第33回日本骨代謝学会学術集会プログラム・抄録集、p185，2015(第33回日本骨代謝学会学術集会、東京、2015年7月)

14) 星野真理江，金子児太郎，宮本洋一，近津大地，馬場一美，上條竜太郎：内因性活性イオウ種はマウス軟骨細胞の増殖と骨の伸長を促進した．（第33回日本骨代謝学会学術集会、東京、2015年7月）

15) Hoshino M, Miyamoto Y, Yoshimura K, Suzuki D, Akaike T, Mishima K, Baba K, Kamijo R: 8-Nitro-guanosine 3',5'-cyclic monophosphate mediates elongation of the growth plate cartilage in mice. (The 2014 ASCB/IFCB Meeting, Philadelphia, PA, USA, 2014年12月)

16) 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，横浜，2014年11月）

17) 高橋正皓，須澤徹夫，山田篤，山口徹太郎，槇宏太郎，上條竜太郎：成体マウス顎下腺から分離した神経堤由来細胞の解析．（第51回日本口腔組織培養学会学術大会、福岡、2014年11月）

18) 鈴木航、山田篤、相澤怜、鈴木大、竹田秀、山本松男、馬場一美、上條竜太郎：Cdc42は軟骨分化とそれに続く軟骨内骨化に必須である．第32回日本骨代謝学会学術集会プログラム・抄録集，p258，2014（第32回日本骨代謝学会学術集会、大阪、2014年7月）

19) 高橋正皓，須澤徹夫，山田篤，槇宏太郎，上條竜太郎：成体マウス顎下腺から分離した神経堤由来細胞の遺伝子発現解析．（第32回日本骨代謝学会学術集会、大阪、2014年7月）

20) 宮本 尚，宮本洋一，吉村健太郎，槇宏太郎，上條竜太郎：グルココルチコイド系ステロイドは骨芽細胞によるアパタイト含有石灰化物形成とそのかたさを向上させる．（第32回日本骨代謝学会学術集会，大阪，2014年7月）

〔その他〕

ホームページ

<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/>

6．研究組織

(1)研究代表者

上條 竜太郎 (KAMIJO Ryutaro)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：70233939

(2)研究分担者

片桐 岳信 (KATAGIRI Takenobu)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：80245802

(3)連携研究者

大隅 典子 (OSUMI Noriko)

東北大学大学院・医学系研究科・教授

研究者番号：00220343

(4)研究協力者

井関 祥子 (ISEKI Sachiko)

東京医科歯科大学大学院・歯学総合研究科・教授

研究者番号：80251544