

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年9月3日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05535

研究課題名(和文) ヒト多能性幹細胞由来神経堤細胞を用いた歯科用新素材の安全性評価系の開発

研究課題名(英文) Development of toxicity evaluation method for new dental materials using human pluripotent stem cell-derived neural crest cells

研究代表者

古江 美保 (Furue, Miho)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 ヒト幹細胞応用開発室・招へいプロジェクトリーダー

研究者番号：80257310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：口蓋裂は頭部領域でもっとも頻度の高い先天異常のひとつである。実験動物による薬剤毒性予測では種差や系統差が大きく、現状での予測は難しい。申請者らはヒトiPS細胞から頭部神経堤細胞の誘導に成功した。そこで、「歯科用新素材の頭部領域形態形成異常への影響の評価」を目標として、ヒトiPS細胞由来頭部神経堤細胞を用いたin vitro 発生毒性評価アッセイを構築することを本研究の目的とした。アッセイに適した改良をおこない、3種の既存の歯科材料を用いて、各種濃度の細胞毒性を評価した。その結果から、構築したアッセイ系は歯科材料の毒性を評価できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口蓋裂の病因は解明されていないが、妊娠時服用薬剤による影響もその原因のひとつであると考えられている。現状では、実験動物による評価ではヒトにおける口蓋裂発生の予測が難しい。近年、様々な歯科材料が開発されており、歯科材料が口蓋裂の原因となるようなことがあってはならない。この研究により開発したヒトiPS細胞から頭部神経堤細胞の誘導法を用いた毒性評価アッセイにより既存の歯科材料の細胞毒性を評価することができた。新規歯科材料の毒性を評価する方法の一つとして使用されるようさらに研究を進めていきたい。

研究成果の概要(英文)：Cleft palate is one of the most frequent congenital anomalies in the head region. At present, it is difficult to predict drug toxicity using experimental animals. We have successfully induced cranial neural crest cells from human iPS cells. Therefore, the purpose of this study is to develop an in vitro developmental toxicity evaluation assay using human iPS cell-derived craniofacial neural crest cells with the goal of "evaluating the influence of new dental materials on the formation of the maxillofacial region". And in order to conduct the assay properly, the differentiation induction method was improved. The method was used to assess the cytotoxicity of various concentrations of three existing dental materials. The results suggest that the developed assay system can assess the toxicity of dental materials.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：神経堤 神経堤分化 ヒト多能性幹細胞 分化誘導 in vitro 毒性評価 歯科材料

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 口蓋裂は日本人においては1.82~2.06 人/1,000 人の割合で発症する。病因は多因子閾説が有力とされており、妊娠時服用の薬剤による影響も一つとしてあげられる。妊娠時服用薬剤の毒性評価は主に実験動物を用いて行われているが、その感受性は種差や系統差が大きいため、実験動物を用いて薬剤の口蓋裂発生への影響を予測するのは難しいのが現状である。一方、国内外で毒性試験の動物実験代替法が検討されている。特に欧州（EU）では動物実験使用廃止が進んでいる。従来はマウス胚性幹細胞（ES 細胞）から心筋への分化を指標とした*in vitro* 発生毒性試験法であるEmbryonic Stem Cell Test（EST 法）が代替法として利用されてきた。1998 年にヒトES 細胞が開発され、創薬研究におけるヒト由来細胞の利用が現実化し、2007 年、EU は国際競争力・技術力を向上させることを目的に、第7 次研究・技術開発のための枠組み計画（FP7）として、ヒトES 細胞を用いた発生神経毒性法の開発プロジェクトがEU コンソーシアムとして立ち上げられ、2013 年にはその成果が報告されている。しかし、ヒト由来細胞を用いて口蓋裂を誘引する毒性を予測することができる*in vitro* アッセイ系はまだ開発されていない。

2. 研究の目的

(1) 国内で利用しやすく、分化効率の高いヒトiPS 細胞を用いて、試験管内(*in vitro*)にて頭部神経堤を誘導し、化学物質を添加した影響を高感度で検出することができるアッセイ系（Neural Crest Cell(NCC)-based-assay）を構築する。

(2) 構築したアッセイ系で歯科用新素材に含まれる各成分の細胞毒性を検証できることを確認する。

3. 研究の方法

(1) ヒト ES/iPS 細胞は創薬研究において、薬効評価、毒性評価などに応用が期待されている。しかしながら、株間の差が大きく、分化嗜好性も異なることが報告されている。そのため、樹立されてくる多くの細胞株の中から、効率よく分化誘導でき応用に適した細胞株を迅速かつ簡便に選択する方法を開発する必要がある。そこで、これらヒト ES/iPS 細胞株から外胚葉（図1）・内胚葉への分化誘導を行い、その安定性を評価した。

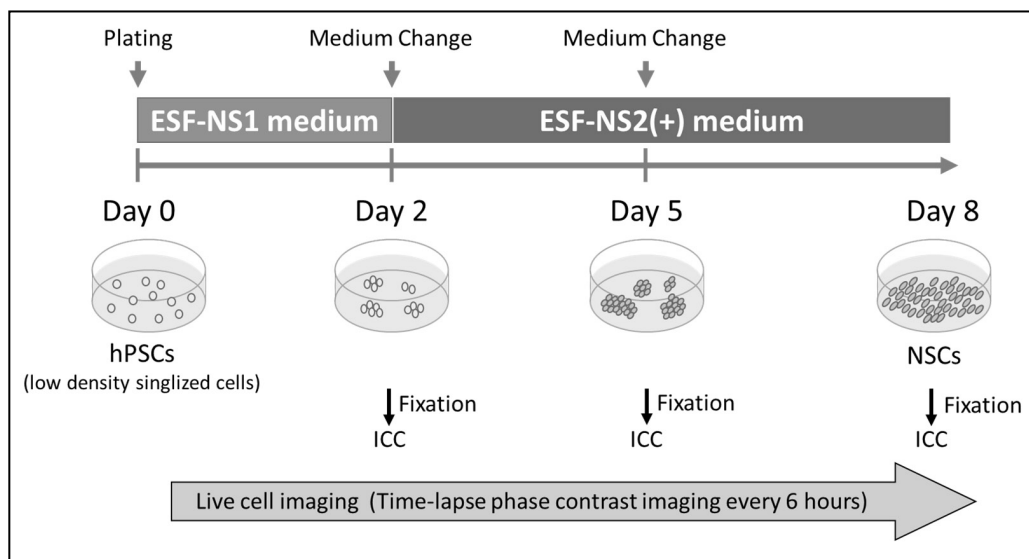
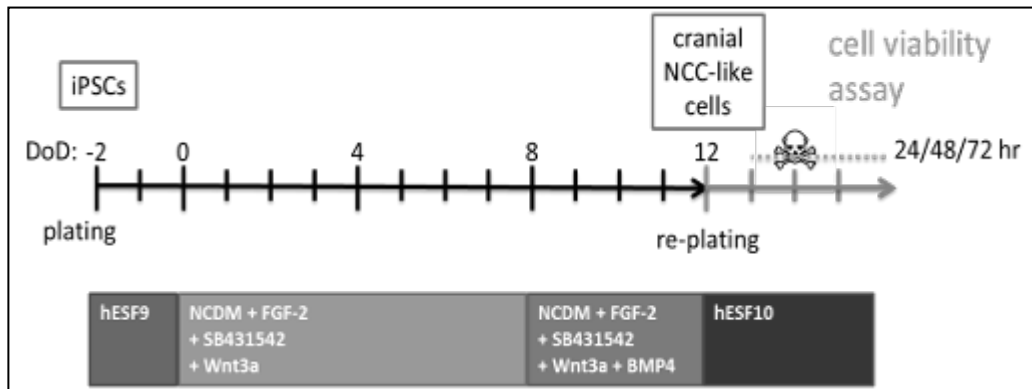


図1. 発表論文 The International Journal of Developmental Biology 2018;62(9-10):613-621.の Fig.1A より転載

(2) 我々が2016年に報告（参考文献A）したiPS細胞から頭部神経堤細胞への分化誘導法を用いて、Tic細胞から頭部神経堤様細胞を誘導した。さらに、我々が2011年に報告した間葉系幹細胞の無血清培地hESF10（参考文献B）を用いて96ウェルプレートに播種した。

種後 24 時間後から試験用化合物 (①チタンイオン (Ti)、②パラジウムイオン (Pd)、及び③2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) の 3 種類の物質) に曝露を開始し、24 時間、48 時間、または 72 時間培養した (図 2)。アラマーブルーを用いて生細胞数を測定し、頭部神経堤様細胞に対する細胞毒性を検証した。また、MRC-5 細胞についても頭部神経堤様細胞と同様の条件で細胞毒性アッセイを実施し、比較検討した。

図 2. iPS 細胞から頭部神経堤へ誘導後、間葉系幹細胞未分化維持培地に培地を変えて、薬剤を添加した。



参考文献

- A) Mimura *et al.* (2016) Bone morphogenetic protein 4 promotes craniofacial neural crest induction from human pluripotent stem cells. *Int J Dev Biol.* 60 (1-3):21-28.
 B) Mimura *et al.* (2011) Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol.* 55(2):181-7

- (3) マウス骨芽細胞や破骨細胞に与える細胞毒性について、ハイスループットアッセイを用いて解析した。(参考文献: Mine *et al.* (2010) Impact of titanium ions on osteoblast-, osteoclast- and gingival epithelial-like cells. *J Prosthodont Res.* 54 (1):1-6. Mine *et al.* (2014) Involvement of ERK and p38 MAPK pathways on Interleukin-33-induced RANKL expression in osteoblastic cells. *Cell Biol Int* 38 (5):655-662.)

4. 研究成果

- (1) ヒト ES/iPS 細胞株 5 種の分化効率を評価した。下記に内胚葉への分化誘導効率を予測遺伝子より数値化してプロファイルしたものを表 1 に示す。その結果、ヒト ES 細胞 H9、胎児肺組織由来正常二倍体線維芽細胞株 MRC-5 から樹立したヒト iPS 細胞 Tic をフィーダーフリー培地で未分化維持した Tic-FX が、分化誘導が再現性が高く、安定していることが分かった。さらに、H9 ならびに Tic-FX を神経幹細胞へ分化誘導したところ、いずれも同等の分化誘導効率を示した(図 3)。用への分化誘導効率もヒト iPS 細胞 Tic (JCRB1331.01) をアッセイに用いることとした。

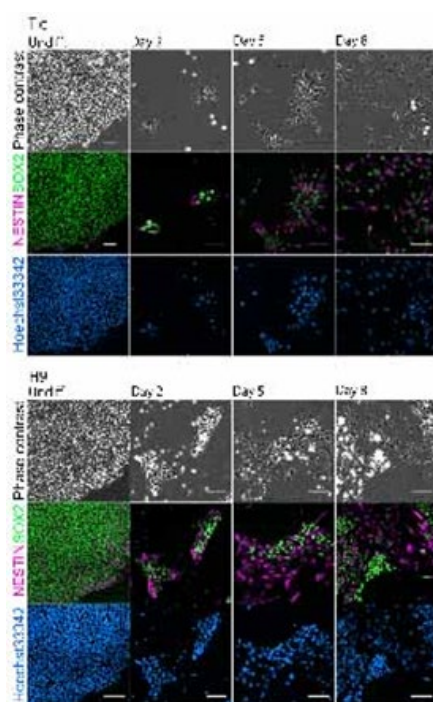


図 3. iPS Tic 細胞、ヒト ES 細胞 H9 細胞から神経幹細胞に分化誘導し、神経幹細胞のマーカである Nestin に対する抗体を用いて染色を行った。発表論文 *The International Journal of Developmental Biology* 2018;62(9-10):613-621. の Fig.1B より転載

表 1. 内胚葉分化誘導予測遺伝子による数値化 (発表論文 Stem Cells Dev 25(24)2016 1884-1897 の Table 3 より転載)

TABLE 3. COMPARISON OF THREE SELECTED GENE EXPRESSION IN UNDIFFERENTIATED STATE OF EACH HUMAN PLURIPOTENT STEM CELL LINE

Culture condition/Cell line	<i>TYMP</i>	<i>FGF-1</i>	<i>RHO</i>	<i>H9 Point</i>	<i>201B7 point</i>	Score
KSR-based medium on feeders						
High scores						
H9	8.5	7.05	7.22	3	0	3
KhES-5	7.85	6.84	6.98	3	0	3
HES4	8.13	7.34	5.41	2	0	2
TIG120-4f1	7.93	8.49	7.13	2	0	2
KhES-2	6.7	7.15	7.63	1	0	1
KhES-4	7.31	8.28	7.31	1	0	1
201B2(subclone)	6.37	9.8	6.78	2	-1	1
Toe	9.56	9.01	6.38	1	0	1
UTA1	8.37	9.67	5.85	2	-1	1
KhES-1	8.32	9.09	7.84	1	0	1
201B6	8.95	8.79	7.76	0	0	0
KhES-3	8.92	8.84	7.54	0	0	0
201B2	8.41	9.76	7.53	1	-1	0
TIG114-4f1	7.56	<i>10.59</i>	7.43	1	-1	0
TIG108-4f3	8.4	9.59	7.64	1	-1	0
Dotcom	9.14	8.11	7.55	0	0	0
Tic	<i>10.55</i>	8.07	7.16	1	-1	0
Low scores						
Squeaky	9.95	7.16	8.36	0	-1	-1
253G1B1	9.69	9.9	<i>9.31</i>	0	-2	-2
201B7	<i>9.94</i>	<i>9.34</i>	8.97	0	-3	-3
hESF-FX medium without feeders						
High scores						
H9	8.08	8.09	4.89	3	0	3
Tic	8.4	<i>11.82</i>	4.74	1	-1	0
Low scores						
253G1B1	<i>9.81</i>	7.86	6.62	1	-2	-1
201B7	<i>9.33</i>	<i>10.01</i>	6.25	0	-3	-3
mTeSR1 medium without feeders						
19-9-7T normal	6.89	9.5	6.43	ND	ND	ND
19-9-7T abnormal	7.3	8.93	7.29	ND	ND	ND

The expression ratios listed in *bold* are lower than that of H9, and the ratios listed in *italic* are higher than that of 201B7. The mean of gene expression levels of three independent experiments were used for the analysis. KSR, knockout serum replacement; ND, not determined.

- (2) 本研究では、ヒト iPS 細胞由来頭部神経堤様細胞を用いて 3 種類の試験化合物の細胞毒性の検出方法について検討した。その結果、チタンイオンの細胞毒性検討においてはこれまでに報告された *in vitro* 試験 (Mine *et al.* 2010, Mine *et al.* 2014) で検出されている濃度よりも低い濃度での影響が検出された。従来は血清を含む細胞培養用培地を使用して細胞毒性が検討されていたが、本研究では無血清培地 hESF10 を使用することにより、これまで報告されたアッセイ方法よりも高い感度で細胞毒性を検出できたと考えられる。当該内容は、現在、論文執筆中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Suga Mika, Kii Hiroaki, Ueda Naoko, Liu Yu-Jung, Nakano Takako, Dan Tomoro, Uozumi Takayuki, Kiyota Yasujiro, Furue Miho K. A morphology-based assay platform for neuroepithelial-like cells differentiated from human pluripotent stem cells. The International Journal of Developmental Biology 2018;62(9-10):613-621. 査読有
doi: 10.1387/ijdb.180161mf.
- ② Suga M, Hayashi Y, Furue MK. In vitro models of cranial neural crest development toward toxicity tests: frog, mouse, and human. Oral Dis. 2017 Jul;23(5):559-565.
doi: 10.1111/odi.12523. Epub 2016 Jul 14.
- ③ Yohei Hayashi and Miho Kusuda Furue, "Biological Effects of Culture Substrates on Human Pluripotent Stem Cells," Stem Cells International, vol. 2016, Article ID 5380560, 11 pages, 2016.
<https://doi.org/10.1155/2016/5380560>.
- ④ Fukuda T, Takayama K, Hirata M, Liu YJ, Yanagihara K, Suga M, Mizuguchi H, Furue MK. Isolation and expansion of human pluripotent stem cell-derived hepatic progenitor cells by growth factor defined serum-free culture conditions. Exp Cell Res 352(2) 2017 333-345 査読有
10.1016/j.yexcr.2017.02.022
- ⑤ Yanagihara K, Liu Y, Kanie K, Takayama K, Kokunugi M, Hirata M, Fukuda T, Suga M, Nikawa H, Mizuguchi H, Kato R, Furue MK. Prediction of Differentiation Tendency Toward Hepatocytes from Gene Expression in Undifferentiated Human Pluripotent Stem Cells. Stem Cells Dev 25(24) 2016

1884-1897 査読有
10.1089/scd.2016.0099

〔学会発表〕(計 4 件)

- ① 菅 三佳、三村 純代、劉 有容、中野 貴子、二川 浩樹、古江美保. ヒト iPS 細胞由来頭部神経堤様細胞を用いた *in vitro* 発生毒性試験法の構築に関する基礎的研究. 日本動物実験代替法第 30 回大会 2017 年
- ② 菅三佳、平井雅子、上田直子、劉有容、中野貴子、福田隆之、末盛博文、古江美保. ヒト多能性幹細胞の培養における増殖因子の生理活性測定法の開発 日本組織培養学会第 90 回大会 2017 年
- ③ 古江・楠田美保 "Development and application of morphological evaluation for human pluripotent stem cells ヒト多能性幹細胞の形態評価測定法開発とその利用." 日本組織培養学会第 89 回大会 2016 年
- ④ Suga M., Mimura S., Okada K., Kinehara M., Nikawa H., and Furue MK. "The Role Of The Signaling Factors On Differentiation Of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Crest Stem Cells " ISSCR 2016 ANNUAL MEETING (国際学会) 2016 年

〔図書〕(計 2 件)

- ① Suga M., Furue M.K. (2019) Neural Crest Cell Models of Development and Toxicity: Cytotoxicity Assay Using Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cranial Neural Crest Cell Model. In: Hansen J., Winn L. (eds) Developmental Toxicology. Methods in Molecular Biology, vol 1965. Humana, New York, NY. doi: 10.1007/978-1-4939-9182-2_4.
- ② 菅三佳、古江美保、技術情報協会出版、ヒト多能性幹細胞の培養における増殖因子の生物活性の測定「動物細胞培養・自動化におけるトラブル発生原因と対策」第 3 章 細胞培養における分析・評価・解析技術 第 1 節 2017 年 I S B N : 978-4-86104-684-1

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：二川 浩樹

ローマ字氏名：Nikawa, Hiroki

所属研究機関名：広島大学

部局名：医系科学研究科 (歯)

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：10228140

研究分担者氏名：菅 三佳 (岸本三佳)

ローマ字氏名：Suga, Mika

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：バイオリソース研究センター

職名：開発研究員

研究者番号（8桁）：00340448

研究分担者氏名：峯 裕一

ローマ字氏名：Mine, Yuichi

所属研究機関名：広島大学 広島大学

部局名：医系科学研究科（歯）

職名：講師

研究者番号（8桁）：60605989

研究分担者氏名：福田 隆之（2016－2017年度まで参加）

ローマ字氏名：Fukuda, Takayuki

所属研究機関名：国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

職名：特任研究員

研究者番号（8桁）：20708771

(2)研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。