

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03767

研究課題名(和文)口腔内ミューズ細胞から分化誘導した大脳原基を用いた新規再生医療法の開発

研究課題名(英文)Development of a new Regenerative Medical Treatment using the cerebrum anlage derived from Muse cells in oral mesenchymal tissue

研究代表者

沖 明典 (Oki, Akinori)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60334067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯髄には幹細胞の多いことが判明したので、歯髄から神経系細胞を分化誘導し、脳梗塞モデル動物や末梢神経欠損部に移植し、機能の回復を確認した。次に歯髄幹細胞を天蓋培養して胚様体を作製し、我々が作製した胚子成長因子(EmbGF)含有培養液で還流培養して胚子様構造体を得た。胚子様構造体には心拍動する心原基、神経管(中枢神経原基)、網膜原基、呼吸器原基、消化管原基、骨、軟骨、歯胚等、様々な器官臓器の原基が存在していた。そこで、ここから神経管を採取し、消化酵素で細胞を解離したところ、小型球形細胞が多数採取できた。この細胞を神経維持培地で静置培養すると、神経細胞とグリア細胞が出現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍形成、倫理的問題、免疫の問題、感染の問題の無い、器官・臓器の原基を移植し十分な機能を長期間維持する再生医療を開発することが本研究の目的である。各器官・臓器は決して1種類の細胞から構成されているわけではなく、多種類の細胞が互いにパラクリン的に作用しあって機能を営んでいる。したがって幹細胞から目的の細胞を分化誘導して移植しても、十分な機能を長期間維持することは難しい。この問題を解決するため、歯髄幹細胞から胚子様構造体を作製し、この中に存在する各種器官・臓器の原基(構成細胞をone set含んでいる)を採取し移植する再生医療を提供する。これに成功すれば、学術的意義や社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Nerve lineage cells were induced to differentiate from the dental pulp stem cells and transplanted into cerebral infarction model animals and peripheral nerve defects, and recovery of function was confirmed. Next, dental pulp stem cells were cultured by hanging drop method to prepare embryoid bodies, which were then perfused with the embryonic growth factor (EmbGF)-containing culture medium we prepared to obtain embryoid-like structures. Primordia of many organs such as the heart, central nervous system, retina, and gastrointestinal tract et al. existed in the embryo-like structures. Therefore, when neural tubes were collected from embryoid-like structures and the cells were dissociated with digestive enzymes, a large number of small spherical cells could be collected. When these cells were statically cultured in a nerve maintenance medium, nerve cells and glial cells differentiated.

研究分野：再生医療

キーワード：歯髄幹細胞 ミューズ細胞 胚様体 胚子様構造体 各種器官・臓器の原基 神経管 小型球形細胞 神経系幹細胞

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

再生医療の基礎研究の細胞源として、骨髄、皮膚、皮下脂肪が使用されることが多い (Nomura Y. et al. Regen Ther 2018,46-55)。一方、皮膚の細胞に遺伝子導入して作出する iPS 細胞は、全能性細胞ではあるが、腫瘍を形成する可能性が高く、また遺伝子を導入することによって既存の遺伝子が変化してしまい、これがどのような作用をもたらすか不明な点がある。ES 細胞は欧米で用いられているが、日本人では倫理的問題が大きい。また、動物実験では 1/4 割球まで、うまくやっても 1/8 割球までしか借り腹で個体を作成することはできないという。したがって、胚盤胞の内細胞塊 (100 割球以上) から作る ES 細胞には全能性を持たない ES 細胞も存在することになる。申請者らは口腔内間葉である頬脂肪体幹細胞を神経系細胞に分化誘導し、パーキンソン病モデル動物の内側前脳束に移植し症状の改善に成功している (Takahashi H. Ishikawa H, et al. Human Cell 2017 ; 30 : 60-71) 日本ヒト細胞学会最優秀講演賞受賞、2016)。(図 1、図 2)

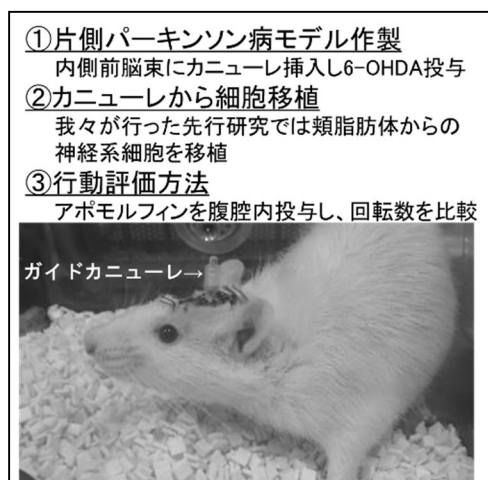


図 1

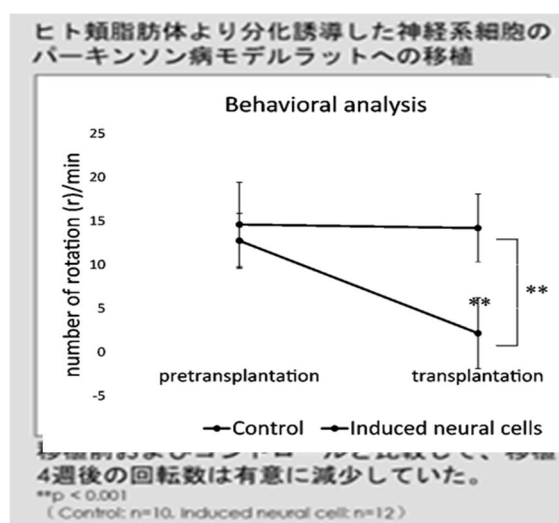


図 2

体性(組織)幹細胞から分化誘導した細胞は ES 細胞や iPS 細胞とは異なり、移植しても腫瘍を形成しないので安全性が高い。我々は体制幹細胞のなかでも、歯髄は骨髄、皮下脂肪、リンパ節等に比べ、はるかに幹細胞の比率が高いことを発見したので (Ishikitev N, Ishikawa H, et al. Tissue Eng Part A 2015;21:586-93)。我々はこれを再生医療の細胞源にしようと考えた。また、器官や臓器を構成する細胞は 1 種類ではなく、多種類の細胞が互いにパラクリン調節しあって安定した機能を営んでいる。しかし、ES 細胞、iPS 細胞、体制幹細胞から分化誘導して作製した目的の細胞は、多くは 1 種類の細胞であるため、モデル動物に移植しても十分な機能を長期間維持することは難しい。このような背景から我々は、幹細胞を多く含む歯髄には出澤先生が命名したミューズ細胞が存在することを想定し、歯髄幹細胞から胚子様構造体を育成させ、ここから各種の器官臓器を採取すれば、それらを構成する細胞を one set 得ることができ、再生医療に最適な細胞群を得られると考えた。

2. 研究の目的

本研究は腫瘍形成、倫理的問題、免疫の問題、感染の問題のない、器官・臓器の原基(構成細胞のすべてを one set 含んでいる)の細胞を移植し、長期間、十分な機能を有する再生医

療を提供することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト歯髄を細切し、0.1%トリプシン/0.25% EDTA/PBS(-)液で細胞を解離した。解離した細胞を静置培養し、confluent になった後、薄播き法(1x10⁴ 細胞/10cm シャーレ)で歯髄幹細胞(Nanog, oct3/4, sox2 を発現)を分離した。つぎに1x10⁶ 細胞/75 μlの培養液(MEM)を6 cm シャーレの蓋の内側に滴下し、シャーレには乾燥を防ぐためPBS液を入れ、シャーレの蓋を元に戻して天蓋培養を行った。1週間後、シャーレの蓋の内面をHanks液で洗い、胚様体を回収した。形の良い胚様体を選んで、Roseのchamber内に入れ、我々が新たに作製したEmbGFを含有した培養液で還流培養した。胚様体は徐々に発育し、1か月後には1~1.5 cmの胚子様構造体を成育させた。

4. 研究成果

1) 歯髄幹細胞は紡錘形の細胞で、ときに幹細胞かは節のある突起を伸ばしている。胚様体は細胞塊と単層の細胞からなるバルーンで大きさは50ミクロンから200ミクロンとさまざまであった。また細胞塊の大きさも均一ではなかった(図3)。正円形に近い胚様体を選びローズのチャンパーに入れ、胚子発育因子(EmbGF)含有の培養液で還流培養した。初めは1ml/分、生育する過程で還流速度を速め、チャンパーの内面に付着しないようにした。付着せず成育した胚子様構造体には体腔があり、80回/分の心拍動が認められた。この胚子様構造体には各種器官臓器の原基が存在していた(図4)。**特許準備中「各種器官・臓器の採取法」**。本実験では、この胚子様構造体から中枢神経(大脳・脊髄)の原基である神経管を採取した(図5)。この神経管の内腔に接する細胞に細胞分裂像が観察された。神経管を構成する細胞はsmall oval cell(SOC)で(図6)、これを培養で成育させると細胞は大きくなり神経様細胞が観察できた(図7)。このSOCが下記の神経管の構成細胞であるSOCと同じものであるか否かは検討中である。

2) 歯髄初代培養細胞を我々が開発した神経系分化誘導培地で培養すると、小型球形細胞(SOC)が出現する。この細胞を採取し神経維持培地でsingle cell cloningしたところ、ひとつのSOCから、神経細胞とグリア細胞が分化した。このことからSOCは神経系細胞のstem cellであることが判明した。

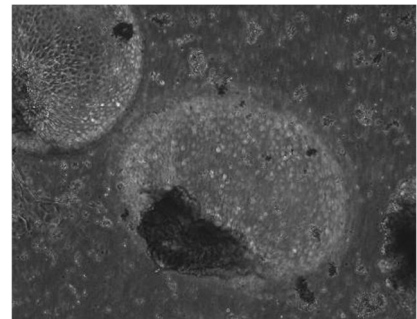


図3 胚様体

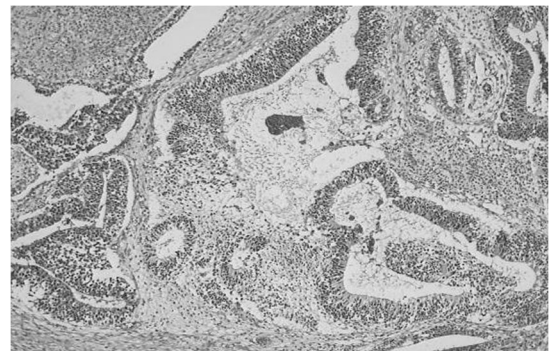


図4 大脳原基の神経管



図5 採取した神経管

3) ヒト間葉系幹細胞は、脳卒中の治療のための有望な細胞源です。それらの主要な作用機序は、栄養因子による神経保護効果、抗炎症効果、および免疫調節を介して発生します。ただし、細胞移植による損傷した神経回路網の再生は挑戦的なままです。我々は、神経系統に誘導された細胞がニッチに適合し、病変を置き換え、幹細胞自体と比較して症状を改善するのにより効果的であると仮定した。ヒト歯髄組織から誘導された神経細胞の特性を調査し、これらの誘導された神経細胞と誘導されていない歯髄幹細胞との間の移植効果を比較した。分化誘導された神経細胞または歯髄幹細胞は、免疫不全マウスにおける永久的な中大脳動脈閉塞によって誘発された脳梗塞の5日後に脳内移植された。機能回復への影響も、行動テストを通じて評価した。免疫組織化学とニューロン追跡を使用して、分化、軸索伸長、および移植された細胞の宿主の神経回路への接続性を分析した。ヒト歯髄から分化誘導した神経細胞の移植は、歯髄幹細胞と比較して、脳梗塞後の機能回復

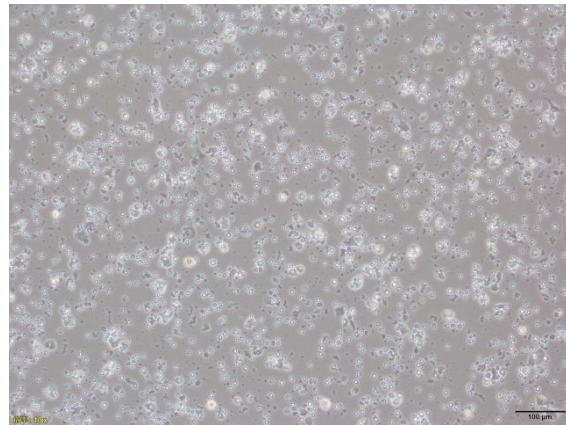


図6：神経管を解離して得られる小型球形細胞 (SOC)

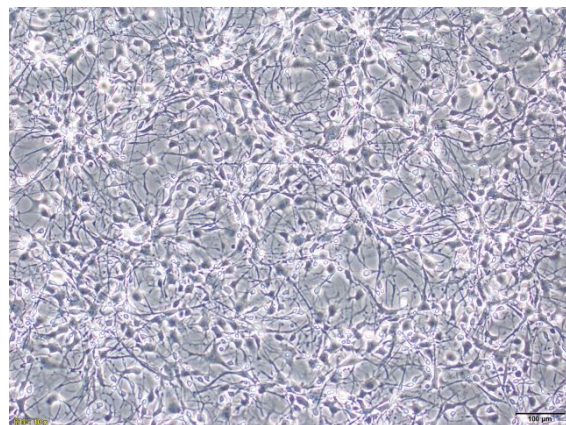


図7：SOCからの神経系細胞

を改善した。誘導した神経細胞はニューロンとグリアの両方を含み、機能的電位を発現し、トランスクリプトミクスの観点から神経新生との関連性が高かった。分化誘導した神経細胞は、低酸素培養において歯髄幹細胞よりも高い生存率を示した。我々は、歯髄組織から分化誘導した神経細胞が、脳梗塞後の回復のための新しい治療アプローチを提供することを示した (Induced neural cells from human dental pulp ameliorate functional recovery in a murine model of cerebral infarction. Matsumura H, Marushima A, Ishikawa H. et al. Stem Cell Rev Rep.2022. 18(2):595-608. doi: 10.1007/s12015-021-10223-w)。

末梢神経損傷の細胞治療は、神経機能を回復させる再生医療として有望な戦略です。しかし、神経再生を促進するための適切かつ十分な量の自家細胞を生産することには課題が残っています。この研究は、歯髄幹細胞 (DPSC) から分化誘導した神経系細胞 (NLC) の特性を特定し、神経ガイド導管を使用して免疫不全ラットに細胞移植した後の機能回復と神経再生に対するそれらの効果を明らかにすることを目的とした。NLC を 10 mm の坐骨神経欠損を伴う免疫不全ラットモデルに移植し、細胞の生存と分化を in vivo で調べた。神経再生の結果はまた、再ミエリン化された軸索数、ミエリン鞘の厚さ、電気生理学的活動、および腓腹筋量を使用して評価した。NLC は、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、および神経堤系統細胞で構成されていた。NLC は、in vitro でパラクリン依存的に内皮細胞、シュワン細胞、ニューロンの活動を強化した。移植後 2 週間で、血小板由来成長因子受容体アルファ (PDGFRα) +オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) に分化した多数の移植 NLC と、OPC に由来する少数の PDGFRα+p75 ニューロトロフィン受容体+シュワン細胞様細胞が観察された。移植後 12 週間で、ヒトシュワン細胞様細胞が生存し、軸索

の成長、髄鞘再形成、電気生理学的活動、および筋萎縮が改善した。この研究は、DPSC の神経誘導のプロトコルの幅広い適用を示し、末梢神経再生の有望な戦略として、ヒト DPSC に由来する NLC の移植の有効性を示した(Transplanted neural lineage cells derived from dental pulp stem cells promote peripheral nerve regeneration. Takaoka S, Ishikawa H, Marushima A, Bukawa H. *Human Cell* 2022;35(2):462-471. doi: 10.1007/s13577-021-00634-9)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsumura Hideaki, Marushima Aiki, Ishikawa Hiroshi, Toyomura Junko, Ohyama Akihiro, Watanabe Miho, Takaoka Shohei, Bukawa Hiroki, Matsumura Akira, Matsumaru Yuji, Ishikawa Eiichi	4. 巻 18
2. 論文標題 Induced Neural Cells from Human Dental Pulp Ameliorate Functional Recovery in a Murine Model of Cerebral Infarction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reviews and Reports	6. 最初と最後の頁 595 ~ 608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12015-021-10223-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takaoka Shohei, Uchida Fumihiko, Ishikawa Hiroshi, Toyomura Junko, Ohyama Akihiro, Watanabe Miho, Matsumura Hideaki, Marushima Aiki, Iizumi Seiichiro, Fukuzawa Satoshi, Ishibashi-Kanno Naomi, Yamagata Kenji, Yanagawa Toru, Matsumaru Yuji, Bukawa Hiroki	4. 巻 35
2. 論文標題 Transplanted neural lineage cells derived from dental pulp stem cells promote peripheral nerve regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 462 ~ 471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-021-00634-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石川 博 (Ishikawa Hiroshi) (30089784)	筑波大学・医学医療系・研究員 (12102)	
研究分担者	丸島 愛樹 (Marushima Aiki) (40722525)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松丸 祐司 (Matsumaru Yuji) (70323300)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
研究分担者	松村 明 (Matsumura Akira) (90241819)	筑波大学・医学医療系・客員教授 (12102)	
研究分担者	豊村 順子 (Toyomura Junko) (80645630)	筑波大学・医学医療系・研究員 (12102)	削除：2019年10月7日
研究分担者	大山 晃弘 (Ohyama Akihiro) (90538232)	筑波大学・医学医療系・研究員 (12102)	削除：2019年10月7日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関