

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861689

研究課題名(和文) ヒト歯髄細胞スフェロイド由来神経組織と漢方薬剤を用いた新規中枢神経再生法

研究課題名(英文) Human dental pulp cell-derived spheroids and traditional Chinese medicine for central nerve system regeneration

研究代表者

肖 黎 (Xiao, Li)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：80548256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：傷害を受けた中枢神経組織の再生と機能回復において、神経系細胞の新生が重要な役割を果たすことが考えられる。しかし、続発の炎症反応で局所微小環境が過酷であるため、変性や損傷により破綻した中枢神経組織を修復するのは極めて困難である。本研究では、ヒト歯髄由来細胞を用いて、球状細胞凝集塊(スフェロイド)を作製した。このスフェロイドは酸欠や栄養不足など過酷な環境下で生存可能、神経系細胞への分化能があり、*in vitro*において、マウス海馬組織の神経細胞の新生を促進することが明らかになった。将来、歯髄細胞由来スフェロイドは脊髄損傷や神経変性疾患等患者の中枢神経組織の再生と機能回復に応用することができる。

研究成果の概要(英文)：Mammalian adult central nerve system (CNS) injuries are devastating because of the intrinsic difficulties for effective neuronal regeneration. The greatest problem to be overcome for CNS recovery is the poor regeneration of neuronal cells. Because of the harsh micro-environment, it is very difficult to regenerate the damaged neuronal cells, especially neurons. In this study, we made spheroids from human dental pulp-derived cells. The spheroids were able to survive under very harsh environment, such as shortage of oxygen and nutrition. When they were cultivated in neuronal inductive medium, they could be differentiated into neuronal cells. Patch clamp technique indicated that cells derived from the spheroids exhibited the capacity to produce a tetrodotoxin-sensitive (membrane) depolarization suggesting they have potential to be differentiated into functional neurons. The spheroids also improved neuronal cells regeneration in co-cultivated mouse hippocampus slices *in vitro*.

研究分野：再生歯学

キーワード：歯髄細胞 中枢神経再生 スフェロイド

1. 研究開始当初の背景

中枢神経組織は脳虚血、外傷、脊髄損傷等により深刻な打撃を受ける。傷害の直後に多くの神経細胞は死滅し、軸索が断裂し、神経回路は破壊される。続発の炎症反応で変化した局所微小環境が神経細胞(主にニューロン)の再生と軸索の伸展を阻害するため、変性や損傷により破綻した中枢神経組織を修復するのは極めて困難である。iPS 等幹細胞を応用した細胞移植法は次世代の中枢神経再生法として期待されるが、移植後の幹細胞は局所微小環境の影響で生着率が低いことや、未熟でがん化しやすいこと等多くの問題が存在する。

2. 研究の目的

本研究では、安全かつ有効な新規中枢神経再生法を創出するため、(1) ヒト歯髄細胞スフェロイドより移植用成熟な立体神経組織を作製する。(2) *in vitro* において中枢神経損傷病態モデルを構築する。(3) 局所微小環境改善と神経再生に多標的に促進する漢方薬剤を開発する。

3. 研究の方法

(1) 歯髄細胞スフェロイドの作製: ヒト歯髄細胞(DPCs)は日本歯科大学附属病院で抜歯手術を受けた患者(17-26歳、日本歯科大学生命歯学部倫理委員会の承認後、インフォームドコンセントを取得した)の歯髄組織から初代培養することによって得た。抜去後の第三臼歯を割断し、歯髄組織を摘出した後、3 mg/ml のコラゲナーゼ K (Sigma-Aldrich 社、USA) と 4 mg/ml のディスペラーゼ (Sigma-Aldrich) を含有した PBS (-) (和光純薬、大阪) 中に 37 °C、1.5 時間処理した。得られた細胞をストレーナで濾過後、維持培地[MEM- (GIBCO 社、USA) + 20% ウシ胎仔血清(FBS) (NICHIREI Biosciences 社、東京) + 100 μM L-アスコルビン酸りん酸エステルマグネシウム塩 n 水和物 (和光純薬、大阪) + 2 mM L-グルタミン (GIBCO 社、USA) + 100 IU/ml ペニシリン (GIBCO 社) + 100 μg/ml

ストレプトマイシン (GIBCO 社)] 中で培養した。実験には継代 3 代目と 4 代目のものを使用した。スフェロイドの作製は BD Matrigel™ (BD Bioscience 社、USA) 上で行った。Matrigel を 24 ウェルカルチャーインサート (BD Falcon 社、USA) 中にゲル化した後、DPCs を 1×10^6 cells/ml の密度でゲル上に播種し、DPC 維持培地をウェル中に 1 ml、ゲル上に 0.5 ml 添加した。翌日 DPCs はゲル上で長径 100 ~ 300 μm のスフェロイドを形成した。

(2) 歯髄細胞スフェロイドより神経組織への分化: Matrigel で形成されたスフェロイドを単独またはヒトケラチンノサイト HaCaT 細胞と共同で神経分化誘導培地 (B-27® Electrophysiology Kit, Life technologies A1413701) 中に 2 - 4 週間培養した。培地交換を週二回行った。神経細胞の同定は免疫染色法および電気生理学的な手法で行った。

(3) *In vitro* における中枢神経組織損傷病態モデルの作製: 3 週齢 Jcl: ICR マウスを断頭 (苦痛度 B) により安楽死させた後、脳組織を摘出し、海馬組織を分離した。McIlwain Tissue Chopper で海馬組織を 350 μm の厚さにスライスし、単独または歯髄細胞由来スフェロイドと共同で 1 - 3 週間培養した。その後海馬組織中の神経細胞の新生を免疫染色法などで同定した。

4. 研究成果

ヒト歯髄細胞は Matrigel 上に播種されてから 24 時間後、自発的にスフェロイドを形成した。このスフェロイドを石灰化培地中に 4 週間培養すると、スフェロイドの中に管腔が形成され、管腔周辺の細胞集団は自発的に神経系、骨系、軟骨系、内皮系のマーカーを発現する組織塊に分化した (図 1)。

このスフェロイドを市販神経分化培地中に 1 か月以上培養し続けると、神経幹細胞マーカーである Nestin の発現が認められた。また、グリア細胞マーカーである GFAP の発現も確認された。しかし、ニューロンマーカー

ーである TUBB3 の発現が確認されておらず、パッチクランプ法で刺激による膜電位の変化も観察されなかった。つまり、スフェロイドはグリア細胞に分化することができるものの、成熟したニューロンに分化できなかった。それで、我々はスフェロイドをヒトケラチノサイト HaCaT と共培養した上、神経分化誘導を行った。3 週間後、歯髄細胞スフェロイドより遊走した細胞がナトリウム及びカリウムイオンチャンネルを発現し、テトロドトキシン感受性がある成熟した神経細胞に分化したことが、分子イメージング法およびパッチクランプ法等電気生理学的な測定法で確認された。さらに、フローサイトメトリーおよびリアルタイム定量 RT-PCR 法で調べた結果、共培養のスフェロイドは単独培養のスフェロイドより Nestin、TUBB3 を高く発現したことが分かった。

さらに、このスフェロイドをマウス海馬組織スライスと共培養したところ、マウス海馬

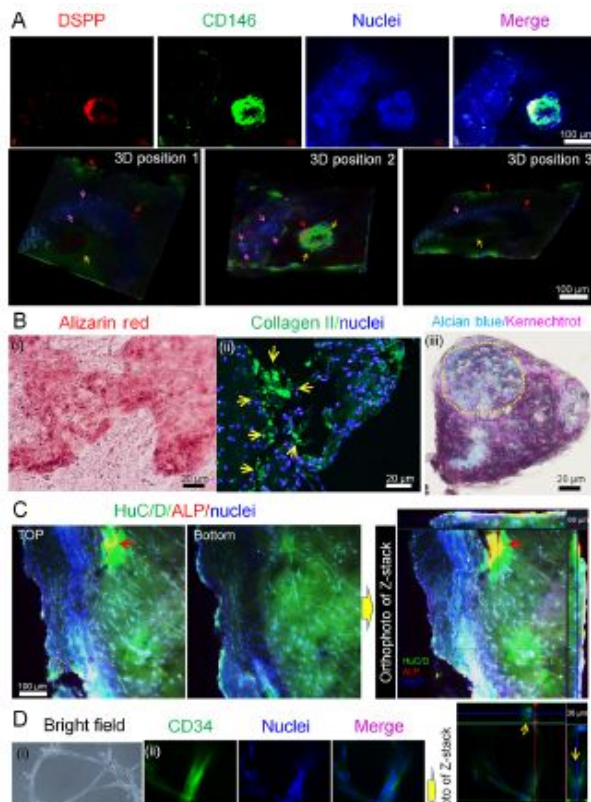


図 1. ヒト歯髄細胞由来スフェロイドは自発的に神経系、骨系、軟骨系、内皮系マーカーを発現する細胞集団に分化した。(Xiao et al., Biol Cell. 2014;106:405-419)

組織中神経系細胞の新生が促進されたことが免疫染色法で確認された。これらの結果により、歯髄細胞由来スフェロイドは HaCaT 細胞との共培養下で機能的な神経細胞に分化する能力があり、共培養したマウス海馬組織中の神経細胞の新生を促進することが示された。将来、ヒト歯髄細胞由来スフェロイドは脊髄損傷や神経変性疾患等患者の中枢神経組織の再生と機能回復に応用することが可能である。

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 7 件)

1. **Xiao L**, Miwa N. Cover Image, J Cell Biochem. Volume 118, Number 2, February 2017 DOI: 10.1002/jcb.25848 (査読有)
2. **Xiao L**, Miwa N. Hydrogen-rich water achieves cytoprotection from oxidative stress injury in human gingival fibroblasts in culture or 3D-tissue equivalents, and wound-healing promotion, together with ROS-scavenging and relief from glutathione diminishment. Hum Cell. 30 (2), 72-87. 2016 Nov 01. IF: 1.907 (Corresponding author) (査読有)
3. **Xiao L**, Miwa N. The Lipophilic Vitamin C Derivative, 6-O-Palmitoylascorbate Protects Human Keratinocytes and 3D-Human Skin Equivalents Against X-Ray-Induced Oxidative Stress and Apoptosis More Markedly Than L-Ascorbic Acid. J Cell Biochem. 2016 Jun 28. doi: 10.1002/jcb.25639. (査読有) IF: 3.446
4. **Xiao L**, Kumazawa Y, **Okamura H**. Cell death, cavitation and spontaneous multi-differentiation of dental pulp stem cells-derived spheroids in vitro: A journey to survival and organogenesis. Biol Cell. 2014;106:405-419. (査読有) IF: 3.872 (表紙採用) (Corresponding author)

5. **Xiao L**, Tsutsui T, Miwa N. The lipophilic vitamin C derivative, 6-o-palmitoylascorbate, protects human lymphocytes, preferentially over ascorbate, against X-ray-induced DNA damage, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *Mol Cell Biochem.* 2014;394(1-2):247-59. (査読有) IF: 2.613
6. **Xiao L**, Nasu M. From regenerative dentistry to regenerative medicine: progress, challenges, and potential applications of oral stem cells. *Stem Cells Cloning.* 2014;7:89-99. doi: 10.2147/SCCAA.S51009. (査読有) Corresponding author)(invited review)
7. **Xiao L**, Saiki C, Ide R. Stem cell therapy for central nerve system injuries:glial cells hold the key. *Neural Regeneration Research.* 2014;9:1253-1260. doi: 10.4103/1673-5374.137570. (査読有) (Corresponding author)(invited review) [学会発表](計3件)
1. **Xiao L**, Miwa N. Protective effects of hydrogen-rich water on free radical initiators-induced oxidative stress injuries in human gingival fibroblasts and three-dimensional gingival tissue equivalents, *J. Oral Biosci.*, 58 (Suppl) : 231 , 2016. 第58回歯科基礎医学会学術大会 札幌コンベンションセンター 札幌市白石区
2. **Xiao L**, Saiki C, Ide R. Dental pulp cells-derived spheroids differentiated into functional neuronal cells under three-dimensional culture conditions. *J. Oral Biosci.*, 57 (Suppl) : 242 , 2015. 第57回歯科基礎医学会学術大会 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター 新潟県新潟市中央区
3. 肖 黎, 熊澤康雄, 岡村 尚: 歯髄幹細胞由来スフェロイドはマトリゲル上に自発的な多分化能を示す, *J. Oral Biosci.*, 56

(Suppl) : 114 , 2014. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会 福岡国際会議場 福岡市博多区

[図書](計0件)

[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 1件)

名称: 細胞または物質の定量用試薬
発明者: 肖 黎, 筒井健機
権利者: 肖 黎
種類: 特許
番号: 特許第 5599669号
取得年月日: 2014年8月22日
国内外の別: 国内

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

肖 黎 (Li Xiao)

日本歯科大学生命歯学部 講師
研究者番号: 80548256

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

三羽 信比古 (Nobuhiko Miwa)
県立広島大学 生命環境学部 名誉教授
研究者番号: 00142141