

平成 30 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11221

研究課題名(和文)ゼノフリー治療用ヒトiPS細胞による霊長類歯周組織再生療法への展開

研究課題名(英文)Development for primate periodontal tissue regenerative therapy by human iPS cells for xeno-free system

研究代表者

中川 種昭(Nakagawa, Taneaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：00227745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではフィーダーフリー・ゼノフリーiPS培養法から、歯周組織の起源である神経堤細胞への誘導を実現させた。マウスの歯根膜組織には神経堤細胞が存在し、その一部は間葉系幹細胞マーカーであるPDGFR やCD44が発現していることを確認した。そのため神経堤由来間葉系幹細胞は歯周組織再生療法の有力な細胞供給源になる可能性が示唆された。これらの細胞を実際の歯周病モデルマウスに移植するべく、その疾患モデルマウスの作製とその評価を行った。マウスの大臼歯に絹糸を結紮することで骨破壊を誘導するというきわめて臨床の歯周病に近い歯周病誘発モデルの再現実験を行い、その技術的再現性を確認し移植実験の準備をしている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we realized the induction of neural crest cells, which was feeder-free, xeno-free iPS culture method. It was confirmed that neural crest cells existed in the periodontal ligament tissue of the mouse and some of them expressed PDGFR and CD44 which are mesenchymal stem cell markers. This suggested that neural crest derived mesenchymal stem cells may be a potential source of cells for periodontal tissue regeneration therapy. In order to transplant these cells into real periodontal disease model mice, the disease model mice were prepared and evaluated. Periodontal disease induction model induced bone destruction by ligating 5-0 silk thread to mouse molar tooth. To confirm the technical reproducibility. Now, we have been preparing for transplantation.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周組織再生 神経堤細胞 間葉系幹細胞

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エナメルマトリックスタンパク質(EMD)を用いた方法や骨移植術などがある。これらは歯周組織に内在すると想定される幹細胞に依存した治療法である。つまり、EMDは「成長因子のカクテル」を供給することで歯周組織に内在すると考えられる幹細胞を刺激し、骨移植術については、人工骨の場合は移植部周囲からの細胞が増殖・分化するための「場」を、そして自家骨の場合は「場」に加えて、わずかな幹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。近年では更に有効な歯周組織再生が期待される組織幹細胞として、間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells; MSCs)の移植治療が報告されている。これは以前より歯根膜の細胞成分に未分化間葉細胞が存在し、組織恒常性の維持のために新しい細胞の供給源になっているという理論に立脚した新規再生療法と考えられる。この方法に用いられている骨髄MSCsは骨・軟骨・脂肪・などへの分化能を持ち、試験管内で容易に培養可能であることから臨床応用の報告も多い。しかしこのMSCsは特異的なマーカーが同定されておらず、これまで30年もの歴史を持つMSCs研究は純度の低い培養細胞集団を用いた*in vitro*解析を主体に行われ、MSCsが本来持つ生理的な役割、すなわち生体内における機能・動態の解析はほとんど行われていないのが現状である。また近年ではiPS細胞を骨細胞や歯根膜細胞に誘導することで新しい再生療法へ向けた研究も行われている。しかしながらこれらの先行研究は(1)ほとんどがマウス細胞を用いたデザインであること。(2)目的細胞への誘導評価は*in vitro*での免疫組織学的手法やPCRのみで行っていること。(3)歯周組織細胞への確実な分化誘導方法は示されていない。(4)移植実験に関しては再生組織の定量的評価や安全性の評価方法はほとんど報告されていない。つまりヒトiPS細胞を用いた安全で有効性のある口腔領域再生療法の確立にはまだ超えなくてはならないいくつかの課題がある。そこで申請者はヒトiPS細胞を用いた新規歯周組織再生療法を確実かつ安全に臨床応用へ展開するための基盤研究を行うことを目標とした。

2. 研究の目的

本研究ではヒトiPS細胞を用いたマウス実験に加え、霊長類コモンマーモセットも用いて組織再生メカニズムを免疫組織学的手法と画像解析によって明らかにし、安全・確実な歯周組織iPS細胞再生療法を確立することであった。計画していた具体的な研究項目は、(1)京都大学から治療用ヒトiPS細胞の提供を受け、将来の移植治療を見据えたフィーダーフリー・ゼノフリーの培養方法で間葉系幹細胞、歯および歯周組織の起源細胞である

歯原性上皮細胞/間葉細胞への誘導と、そこから歯周組織構成細胞への分化方法を構築する。(2)マウスとコモンマーモセットの歯周組織および骨欠損モデルを作製する。(3)このモデルマウスに移植治療を行い、マイクロCT・MRI・発光イメージングを駆使して組織再生様式を解析し、有効性と安全性を評価する、の3つであった。

3. 研究の方法

(1)ヒト臨床応用が可能なレベルで安全性が担保された治療用iPS細胞樹立方法の確立
京都大学iPS細胞研究所(CiRA)からヒトiPS細胞の供給を受けフィーダーフリー/ゼノフリー条件下で安全性が確保されたiPS細胞培養方法を確実に行える実験系を確立する。

(2)歯原性上皮細胞・歯原性間葉細胞および純化間葉系幹細胞の培養樹立方法の確立
歯および歯周組織を構成する細胞は頭頸部神経堤細胞由来の歯原性上皮細胞と歯原性間葉細胞である。しかしながら生体からこれらの細胞を同定あるいは分離することは、その存在の有無や頻度を考えると、かなり困難であることが考えられる。そこで分化への万能性を有する(1)で樹立したヒトiPS細胞を利用し、これら歯原性細胞への分化誘導法の確立を試みる。さらに申請者がヒト骨髄組織から同定した純化MSCsもiPSから大量に誘導し、歯周組織および骨欠損モデルへの移植治療の可能性を探る。

(3)霊長類コモンマーモセットおよびマウスの歯・歯周組織・骨欠損病態モデルの作製
マウスを用いた歯・歯周組織欠損病態モデルの作製や、それに対する組織幹細胞を利用した移植研究はこれまでも数多く報告されている。しかし、マウスやラットは系統樹の上でヒトと大きく離れているために病態モデルやヒト疾患治療モデルとして考えた場合、げっ歯類の研究結果を霊長類ヒトに応用するのはかなり飛躍がある。すなわち、治療効果や安全性を検討するためにもヒトと同じ霊長類を用いた細胞移植治療研究は必須であると考えている。そこで公益財団法人実験動物中央研究所と協力し、コモンマーモセットにおける上顎骨・下顎骨・歯齢を含めた歯・歯周組織の正常解剖を詳細に把握した後、ヒト口腔疾患を模倣した歯・歯周組織・および骨欠損モデルを作製する。移植細胞の動態評価を行う上でレポーター遺伝子の導入も考えていることから、マウスへのヒト細胞移植実験も同時に計画した。

(4)移植治療の安全性とマイクロCT/発光イメージングを用いた画像解析評価方法の確立

ホタル由来の酵素であるルシフェラーゼの遺伝子をヒト培養細胞に導入すると、ルシ

フェリンのBioluminescent Imaging(BLI; 発光イメージング)が可能である。また動物用マイクロCTも同時に利用し、発光量やCT値を用いることで治療移植細胞の評価が非侵襲的かつ定量的に可能となる。すなわち生体内における局在と動態、再生組織、あるいは移植細胞の非腫瘍原性を評価する仕組みを確立することを目指した。

4. 研究成果

本研究ではヒト iPS 細胞を用いた組織再生メカニズムを免疫組織学的手法と画像解析によって明らかにし、安全・確実な歯周組織 iPS 細胞再生療法を確立することを目的とした。初年度の研究成果からフィーダーフリー・ゼノフリー iPS 培養法から、歯周組織の発生学的起源である神経堤細胞への誘導を実現させた。この方法は iPS 細胞の一般的な培養方法であるマウス支持細胞を使うことなく(フィーダーフリー培養)、かつ血清成分も使用しないことから(ゼノフリー培養)本課題の核となる培養技術である。その基盤となる培養方法を初年度に確立し、安定した技術に昇華できたことは本課題を進めていく上で大きな成果だった。2016年度はマウスの歯根膜組織には神経堤細胞が存在し、その一部は間葉系幹細胞マーカーである PDGFR や CD44 が発現していることを確認した。これは間葉系幹細胞の一部が神経堤にその由来の一部を持つとする申請者らの過去の報告とも一致している。そのため神経堤由来間葉系幹細胞は歯周組織再生療法の有力な細胞供給源になる可能性が示唆された。またヒト iPS 細胞から神経堤細胞を介することで LNGFR(+)/THY-1(+)細胞の誘導にも成功した(Morikawa, Nakagawa et al., Differentiation, 2016)。LNGFR(+)/THY-1(+)細胞は骨髄における間葉系幹細胞のマーカーとして報告しているものである(Mabuchi, Morikawa et al., Stem Cell Reports, 2013)。2017年度はこれらの細胞を実際の歯周病モデルマウスに移植するべく、その疾患モデルマウスの作製とその評価を行った。これまでの歯周病モデルは骨を削ることで骨欠損を作製し、そこに移植材料を入れて評価するというものが多かった。しかしながら細菌感染症による骨破壊が歯周病の実態であるため、申請者らは 2013年に報告されたマウスの大臼歯に絹糸を結紮することでバイオフィルムを蓄積させ、骨破壊を誘導するというきわめて臨床の歯周病に近い歯周病誘発モデルの再現実験を行い、その技術的再現性を確認している。また、炎症性骨破壊も H-E 染色で確認できていることから、神経堤誘導間葉系幹細胞の移植実験を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)
すべて査読有り

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. 2016. 92(5):270-280. doi: 10.1016/j.diff.2016.04.003 Epub 2016 May 10. PubMed PMID: 27178356.

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 Int. 2016;2016:2849879.doi:10.1155/2016/2849879. Epub 2016 Feb 24. Review. PubMed PMID: 27006661; PubMed Central PMCID: PMC4783549.

〔学会発表〕(計13件)

1.Ouchi T, Shibata S, Kimura H, Nagoshi N, Fujimura Y, Morikawa S, Sato K, Kawana H, Fukuda K, Nakamura M, Nakagawa T, Okano H. LNGFR(+)/THY-1(+) multipotent stem cells derived from human induced pluripotent stem cells. 18th International Congress of Developmental Biology 2017.

2.Ouchi T, Morikawa S, Nakagawa T, Kawana H. Neural Crest Cells Derived from Human iPS Cells: Differentiation, Multilineage Potential and Dramatic Fate. 第62回(公社)日本口腔外科学会総会 2017.

3.Ouchi T, Morikawa S, Nakagawa T, Kawana H. Neural Crest Cells Derived From Human iPS Cells: Differentiation, Multilineage Potential And Dramatic Fate. 第62回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会. 第2回 日中口腔顎顔面外科合同シンポジウム. Young Doctor's Competition 2 2017.

4. 森川暁. 高純度間葉系幹細胞の研究展開および臨床応用への可能性. 第60回春季日本歯周病学会学術大会 2017.

5.Ouchi T, Morikawa S, Nakagawa T. LNGFR+THY-1+ neural crest like cells have potential of mesenchymal stem cells. 102nd Annual Meeting of the American Academy of Periodontology 2016.

6.Ouchi T, Kawana H, Morikawa S, Okano H, Nakagawa T. Application of human induced pluripotent stem cell to craniofacial developmental biology and regenerative medicine. 66 Kongress & Praxisführungsseminar der Deutschen

Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie 2016.

7.黄地健仁, 森川暁, 芝田晋介, 福田公子, 奥野博庸, 藤村匠, 大山路, 赤松和土, 中川種昭, 岡野栄之. ヒト多能性幹細胞由来 LNGFR+THY-1+神経堤様細胞は間葉系幹細胞の性質をもつ. 第 37 回日本炎症・再生医学会 2016.

8.黄地健仁, 森川暁, 芝田晋介, 奥野博庸, 大山路, 赤松和土, 岡野栄之, 中川種昭. ヒト ES/iPS 細胞由来 LNGFR+THY-1+神経堤様細胞は間葉系幹細胞の性質をもつ. 第 15 回日本再生医療学会総会 2016.

9.黄地健仁, 森川暁, 岡野栄之, 中川種昭. ヒト iPS 細胞と霊長類コモンマーモセットを用いた新規歯周組織再生療法の試み. 第 59 回春季日本歯周病学会学術大会 2016.

10.黄地健仁, 森川暁, 堀江伸行, 河奈裕正, 中川種昭. バイオイメージング技術とカラーゲン及びスフェロイド形成を用いた in vivo トレーシングシステムの確立. 第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会 学術集会 2016.

11.Uchi T, Morikawa S, Nakagawa T. Purified-Mesenchymal stem cells in human induced pluripotent stem cells derived neural crest cells (P0605). EuroPerio8 (8TH CONFERENCE OF THE EUROPEAN FEDERATION OF PERIODONTOLOGY) 2015.

12.黄地健仁, 森川暁, 石淵智子, 植松明子, 岡原則夫, 井上貴史, 岡原純子, 中川種昭, 佐々木えりか, 岡野栄之. 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.

13.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.

〔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 : 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 : 学校法人慶應義塾
種類 : 特許
番号 : 2016-192962
取得年月日 : 平成 28 年 11 月 17 日
国内外の別 : 国内

〔その他〕

6 . 研究組織

- (1)研究代表者
中川 種昭 (NAKAGAWA, Taneaki)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・教授
研究者番号 : 00227745
- (2)研究分担者
森川 暁 (MORIKAWA, Satoru)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・専任講師
研究者番号 : 00424169