

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 31 日現在

機関番号：33902

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15724

研究課題名(和文)自己免疫疾患における間葉系幹細胞の免疫寛容機構の解明

研究課題名(英文)Immunomodulatory effect of human dental pulp cells in autoimmune disease

研究代表者

本田 雅規 (Honda, Masaki)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：70361623

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)：この研究では、間葉系幹細胞の一つである歯髄細胞のヘルパーT細胞(Th17)の増殖と分化を抑制し、ナイーブT細胞から制御性T細胞への誘導能があることを確認した。具体的には、抜去歯から採取した歯髄細胞を培養増殖させた。次に、自己免疫疾患である1型糖尿病自然発症モデルマウスの脾臓細胞を取り出して、ヒト歯髄細胞と共培養後に、脾臓細胞の生存数と制御性T細胞数の増加とインターロイキン17産生能力を持つTh17細胞数を減少させることを動物実験モデルにて見出した。次に、その動物モデルを用いて歯髄細胞と共培養後の発現たんぱくと遺伝子を網羅的に解析し、免疫寛容に關与するサイトカインの発現量の変化を確認した。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stromal cells (MSCs) are multipotent progenitors that can be isolated from the connective tissues of most organs. In addition, they exert powerful immunomodulatory effects, including inhibition of proliferation and function of Th17 cells and promotion of Treg differentiation. The objective of this study was to identify immune cell populations that participate in the mechanisms to prevent and reverse type 1 diabetes in the Non-Obese Diabetic (NOD) mouse strain. Co-culture experiments using human dental pulp cells and spleen cells from NOD. These results showed that Treg cells increased the frequency and numbers of interleukin-10 in vitro. The expansion of these cells was a consequence of the proliferation. In contrast, the number of Th17 cells was decreased by co-culture. This study showed that human dental pulp stem cells have a potential to regulate the differentiation into regulatory T cells and Helper T cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：歯髄幹細胞 自己免疫疾患 免疫寛容能 制御性T細胞 ヘルパーT細胞

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞(MSCs)の新規機能として B 細胞やヘルパー T 細胞の増殖・分化の抑制と制御性 T 細胞を誘導することが報告されている。この MSCs の免疫寛容機能はナイーブ T 細胞からヘルパー T 細胞への分化誘導中にその機能が働くことを示す報告と成熟したヘルパー T 細胞の IL17 の発現量も減少させるという報告もあり、MSCs の免疫寛容機能は多彩な機構によって制御されていることが示唆され、全容解明に至っていない。一方で、近年、歯科領域においても、歯髄組織の中に骨髄と類似する間葉系幹細胞(歯髄幹細胞)の存在が報告され、さらに、免疫寛容能も有する報告も散見されるようになってきた。

1型糖尿病は膵細胞に対する自己免疫反応が作用し細胞傷害性 T 細胞などによって惹起される細胞性免疫が膵細胞を破壊しインスリン分泌能の低下・欠乏をきたすことが本態である。

従来、この1型糖尿病に対する治療法として膵島(細胞)移植が有効であると示されてきたが自己免疫疾患患者に細胞を移植しても自己の免疫系によって破壊されることから短期間の効果しか期待できないという大きな問題がある。すなわち、最も効果的な治療法の一つとして、Th17細胞数の減少と制御性 T 細胞数の増加させることで、自己の免疫系を改善させることである。

2. 研究の目的

上記の背景から、我々は1型糖尿病を自然発症するNODマウスの脾臓から採取する脾臓細胞とヒト歯髄組織から分取した歯髄 MSCs とを共培養することで、Th17細胞数の減少と制御性 T 細胞数の増加することを確認し、遺伝子発現レベルにおいても、IL17の発現の低下と IL10の発現が増加することを確認すること。さらに、従来報告されている TGF- β およびマクロファージ(CD11b)の関与を明らかにすることを目的とし研究計画を考えた。

本研究の成果が免疫機構の1型糖尿病を代表とする自己免疫疾患の治療法の開発および歯髄細胞からの新規治療薬への開発に大きな成果を与えることになり、学術的な意義は非常に大きいと考えた。

3. 研究の方法

自己免疫疾患のモデルマウスとなる1型糖尿病自然発症マウス(NOD/ShiJcl)の脾臓細胞を採取し、ヒト歯髄 MSCs と接触状態による共培養を行った。(共培養群)培養後、マウス脾臓細胞の変化について以下の項目について解析した。

細胞生存率

ポピュレーションの変化

遺伝子発現の変化

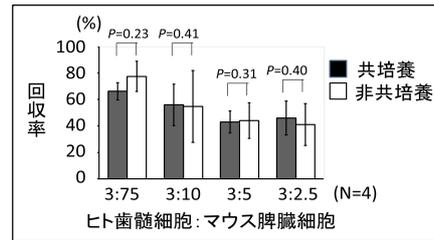
分泌蛋白の発現変化

マウス脾臓細胞単独で培養したものを対照群とした。(非共培養群)

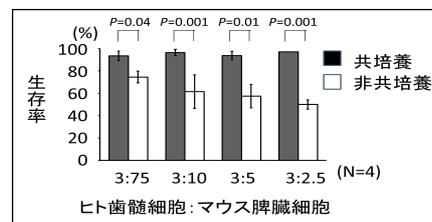
4. 研究成果

(1) 細胞生存率

様々な細胞比率で共培養をし、脾臓細胞を回収した結果、共培養による脾臓細胞の増殖への影響はなく、細胞比による大きな差も認められなかった。(図1)また、共培養によりマウス脾臓細胞の生存率は維持されることがわかった。(図2)



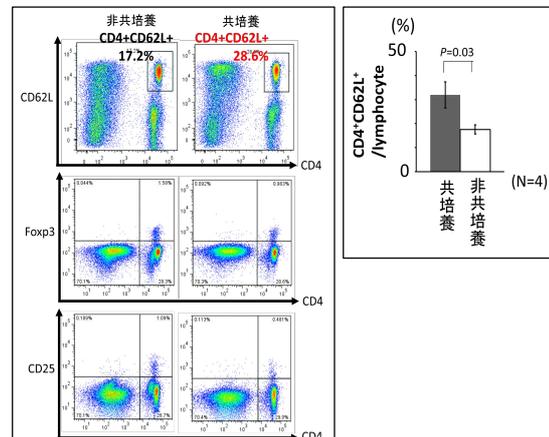
(図1) 共培養後マウス脾臓細胞回収率



(図2) 共培養後マウス脾臓細胞生存率

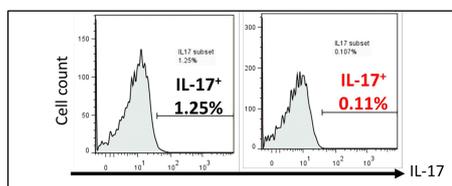
(2) ポピュレーションの変化

共培養後、マウス脾臓細胞を回収し細胞表面マーカーの解析を行った。非共培養群に比べ、共培養したマウス脾臓細胞群には制御性 T 細胞と思われる細胞群 (CD4⁺CD62L⁺)の割合の増加が認められた。(図3)今回、制御性 T 細胞の同定には、過去の文献を参考にし、CD4、CD25、CD127の表面抗原を用いている。制御性 T 細胞のマスター遺伝子である Foxp3 遺伝子の発現は、共培養しても有意な変化は認められなかったため、その点について、いろいろと試みたが、Foxp3の遺伝子発現の増減は変わらなかった。この点においては、研究計画では予想していなかった結果となり、最終年度の研究成果が予定通りに進まなかった原因となっている。



(図3) 共培養後マウス脾臓細胞ポピュレーション・制御性 T 細胞

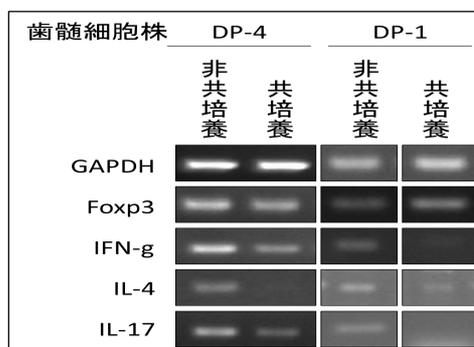
一方で、IL-17 を産生するヘルパーT 細胞のサブセットである Th17 細胞の割合の減少が見られた。(図4)



(図4)
共培養後マウス脾臓細胞ポピュレーション - ヘルパーT 細胞 -

(3) 遺伝子発現の変化

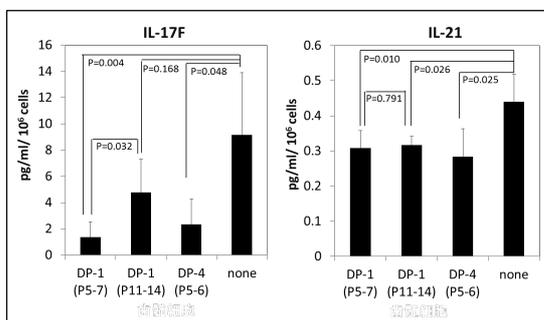
共培養後、マウス脾臓細胞を回収し RT-PCR により炎症に関連する遺伝子の発現を調べた。非共培養群に比べ、共培養したマウス脾臓細胞群は、制御性 T 細胞に発現する Foxp3 の発現が増強する傾向を示した。また活性化 T 細胞が発現する IFN-g およびヘルパーT 細胞のサブセットである Th2 が産生する IL-4 の発現が減少する傾向を示した。さらには、前項で認められた IL-17 の発現が減少する傾向も遺伝子レベルでも確認できた。(図5)



(図5) 共培養後マウス脾臓細胞の遺伝子発現 - RT-PCR

(4) 分泌蛋白の発現変化

共培養後、培養上清を回収しサイトカインアレイにより分泌蛋白質の解析を行った。共培養により、IL-17 の分泌の減少が認められ、その変化は歯髄細胞の継代数でも違いが認められた。(図6)



(図6)
共培養後マウス脾臓細胞の分泌蛋白質の発現 - サイトカインアレイ -

今回の研究費による結果から、次のことが示唆された。

歯髄 MSCs とマウス脾臓細胞との接触培養の結果、マウス脾臓細胞において、制御性 T 細胞と考えられる細胞集団の増加と Th17 細胞と考えられる細胞集団の減少が認められた。さらに、炎症性サイトカインの遺伝子・分泌蛋白質の発現変化も認められた。このことから、歯髄 MSCs には免疫調節能を有する可能性が示唆された。つまり、歯髄 MSCs は、1 型糖尿病に対する根治的治療法の細胞源として有効であることが示唆された(現在執筆中)。

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13件)

Moriguchi K, Hasegawa Y, Higuchi N, Murakami Y, Yoshimura F, Nakata K, Honda M: Energy dispersive spectroscopy-scanning transmission electron microscope observations of free radical production in human polymorphonuclear leukocytes phagocytosing non-opsonized Tannerella forsythia, Microscopy Research Technique, 査読有、2017、in press

Iguchi S, Suzuki D, Kawano E, Mashimo T, Kajiya M, Toriumi T, Kawai T, Kurihara H, Isokawa K, Sato S, Honda M: Effect of local bone marrow stromal cell administration on ligature-induced periodontitis in mice, 査読有、Journal of Oral Sciences, 2017、in press

Tsurumachi N, Akita D, Kano K, Matsumoto T, Honda M: Effect of collagenase concentration for isolating small adipocytes from human buccal fat pad, Journal of Oral Science, 査読有、2017、in press

Suzuki D, Akita D, Tsurumachi N, Kano k, Yamanaka K, Kaneko T, Kawano E, Iguchi S, Toriumi T, Arai Y, Matsumoto T, Sato S, Honda M: Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells into three-wall defects in the rat periodontium induces tissue regeneration, 査読有、Journal of Oral Science, 2017、in press

Kawano E, Toriumi T, Iguchi S, Suzuki D, Sato S, Honda M: Induction of neural crest cells from human dental pulp-derived induced pluripotent stem cells, Biomedical Research, 査読有、Vol.38, No.2, 2017、135-147

DOI:10.2220/biomedres.38.135

木村俊介、泉 雅浩、大野紀和、本田雅規、
小木信美、栗田賢一、顎関節脱臼防止用ミニ
プレート開発のための CT による側頭骨鱗部
の形態計測、愛院大歯誌、査読有、54 巻、4
号、2016、429-436

木村俊介、大野紀和、本田雅規、小木信美、
栗田賢一、顎関節脱臼防止用ミニプレート開
発のための側頭骨鱗部の形態計測、愛院大歯
誌、査読有、54 巻、4 号、2016、391-398

Tsurumachi N, Akita D, Kano K, Matsumoto
T, Toriumi T, Kazama T, Oki Y, Tamura Y,
Tonoji M, Isokawa K, Shimizu N, Honda M:
Small Buccal Fat Pad Cells Have High
Osteogenic Differentiation potential、
Tissue Eng Part C Methods、査読有、Vol.22、
No.3、2016、250-259
DOI: 10.1089/ten.TEC.2015.0420

Akita D, Kano K, Saito-Tamura Y, Mashimo
T, Sato-Shionome M, surumachi N, Yamanaka
K, Kaneko T, Toriumi T, Arai Y, Tsukimura
N, Matsumoto T, Ishigami T, Isokawa K,
Honda M: Use of Rat Mature
Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat
Cells as a Cell Source for Periodontal
Tissue Regeneration、Front Physiol、査読
有、Vol.50、No.7、2016、1-12
DOI:10.3389/fphys.2016.00050

Shino H, Hasuike A, Arai Y, Honda M、
Isokawa K, Sato S: Melatonin enhances
vertical bone augmentation in rat calvaria
secluded spaces、Medicina Oral Patologia
Oral y Cirugia Bucal、査読有、Vol.21、No.1、
2016、e122-126
DOI:10.4317/medoral.20904

Mikami Y, Tsuda H, Akiyama Y, Honda M、
Shimizu N, Suzuki N, Komiya K, Alkaline
phosphatase determines
polyphosphate-induced mineralization in a
cell-type independent manner、J Bone Miner
Metab、査読有、Vol.34、No.6、2015、627-637
DOI:10.1007/s00774-015-0719-6

Ishijima M, Hirota M, Park W, Honda MJ、
Tsukimura N, Isokawa K, Ishigami T, Ogawa
T: Osteogenic cell sheets reinforced with
photofunctionalized micro-thin titanium、
JBiomater、査読有、Vol.29、No.10、2015、
1372-84
DOI:10.1177/0885328214567693

Toriumi T, Takayama N, Murakami M, Sato
M, Yuguchi M, Yamazaki Y, Eto K, Otsu M,
Nakauchi H, Shirakawa T, Isokawa K, Honda

MJ: Characterization of mesenchymal
progenitor cells in the crown and root pulp
of primary teeth、Biomed Res、査読有、Vol.36、
No.1、2015、31-45
DOI:10.2220/biomedres.36.31

〔学会発表〕(計 19 件)

大谷憲司、土屋花織、加藤美咲、本田雅規：
無血清培地にて培養したヒト、髄細胞の特性
と細胞接着の解析。第 16 回日本再生医療学
会総会、2017.3.8、(宮城・仙台市)

Suzuki D, Iguchi S, Kawano E, Tsurumachi
N, Toriumi T, Isokawa K, Arai Y, Sakai A,
Ooshio K, Sugano N, Sato S, Honda M:
Dedifferentiated fat cells for tissue
engineering in rat periodontal defects.
The 102nd Annual Meeting of the American
Academy of Periodontology in
collaboration with the Japanese Society of
Periodontology and Japanese academy of
Clinical Periodontology、2016.9.10-13、
San Diego Convention Center (San Diego、
CA, USA)

Iguchi S, Kawano E, Suzuki D, Tsurumachi
N, Kajiya M, Toriumi T, Isokawa K, Arai Y,
Fukuda T, Fujisaki Y, Sugano N, Sato S,
Honda M: Use of BMSCs prevents alveolar
bone resorption on experimental
periodontitis. The 102nd Annual Meeting of
the American Academy of Periodontology in
collaboration with the Japanese Society of
Periodontology and Japanese academy of
Clinical Periodontology、2016.9.10-13、
San Diego Convention Center (San Diego、
CA, USA)

鳥海 拓、河野英輔、磯川桂太郎、本田雅
規：ヒト iPS 細胞から分化誘導させた神経堤
細胞の特性。第 58 回歯科基礎医学会学術大
会、2016.8.24-26、札幌コンベンションセン
ター(北海道・札幌市)

加藤美咲、大谷憲司、濱村和紀、本田雅規：
無血清培地にて培養したヒト歯髄細胞の特
性の解析。第 58 回歯科基礎医学会学術大会、
2016.8.24-26、札幌コンベンションセン
ター(北海道・札幌市)

大谷憲司、佐久間重光、本田雅規：急性期
ラット脊髄圧挫損傷モデルに対する歯髄細
胞移植による後肢運動回復への効果。第 58
回歯科基礎医学会学術大会、2016.8.24-26、
札幌コンベンションセンター(北海道・札幌
市)

鳥海 拓、河野英輔、岡 篤志、井口慎也、
鈴木大悟、磯川桂太郎、本田雅規：ヒト歯髄

細胞から樹立した iPS 細胞のエナメル芽細胞、象牙芽細胞、セメント細胞への分化。第 25 回硬組織再生生物学会学術大会・総会、2016.8.26-27、日本大学歯学部（東京都・千代田区）

高橋知里、松原庸博、小川法子、盛口敬一、本田雅規、川嶋嘉明、山本浩充：バイオフィルム感染症治療を目的とした高分子ナノ粒子 DDS 製剤設計とその評価。粉体工学会第 52 回夏期シンポジウム、2016.8.8-9、ひょうご共済会館（兵庫県・神戸市）

本田雅規：ヒト iPS 細胞は歯を形成する細胞に分化できる。粉体工学会第 52 回夏期シンポジウム、2016.8.8-9、ひょうご共済会館（兵庫県・神戸市）

本田雅規：ヒト歯髄細胞の特性とその細胞治療、そして今後の課題。第 37 回日本歯内療法学会学術大会、2016.7.23-24、ウインク愛知（愛知県・名古屋市）

Honda M: Dental pulp cells as a cell source for tissue regeneration. International Association for Dental Research (IADR) Pulp Biology Regeneration Group (PBGR) Symposium 2016、2016.6.26-28、Nagoya Congress Center (Nagoya, Japan)

Honda M: Use of human iPS cells for tissue-engineered tooth. 12th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation、2016.6.13-18、Conference Center (Porvoo, Finland)

本田雅、鳥海 拓：iPS 細胞は、エナメル芽細胞、象牙芽細胞、セメント芽細胞に分化する。第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016.3.30、ビッグパレットふくしま（福島県・郡山市）

Honda M、Toriumi T: Human iPS Cells are Capable of Differentiating into Ameloblasts, Odontoblasts, and Cementoblasts. Gordon Research Conference, Bone and Teeth、2016.2.16、Hotel Galvez Texas (Texas, USA)

本田雅規、加藤彰子、水谷 誠、内海倫也、盛口敬一：ラット脊髄圧挫損傷直後の歯髄細胞移植による下肢運動機能への効果。第 87 回愛知学院大学歯学会学術大会、2015.12.6、愛知学院大学（愛知県・名古屋市）

本田雅規：ラット脊髄圧挫損傷モデルへの歯髄細胞移植の有用性の検討。第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2015.10.16、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）

本田雅規、鳥海 拓、岡 篤志、篠田雅路、岩田幸一、磯川桂太郎：下歯槽神経切除モデルにおける細胞移植の効果。第 57 回歯科基礎医学会学術大会、2015.9.11、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター（新潟県・新潟市）

Honda M、Toriumi T: Tooth-tissue engineering - current status and future directions. 4th Tripartite Conference on Tooth and Bone Development & Regeneration、2015.6.13、成田ビューホテル (Narita, Japan)

本田雅規、秋田大輔、加野浩一郎、鶴町仁奈、鳥海 拓、井口慎也、鈴木大悟、河野英輔、松本太郎、磯川桂太郎：脱分化脂肪細胞移植による歯周組織再生の試み。第 58 回春季日本歯周病学会学術大会、2015.5.16、幕張メッセ（千葉県・千葉市）

〔図書〕(計 4 件)

大島勇人、本田雅規、佐藤陽治 他多数、シーエムシー出版、再生医療・細胞治療のための細胞加工物評価技術、2016、239

新井直也、新崎章、飯野光喜、本田雅規 他多数、医学書院、言語聴覚士のための基礎知識 臨床歯科医学・口腔外科学、2016、311

磯川桂太郎、稲井哲一郎、入江一元、本田雅規 他 13 名、わかば出版、カラーアトラス口腔組織発生学、2016、135

Honda MJ、Toriumi T、Oka K、Saito Y、Isokawa K、Elsevier、Stem cell biology and engineering in dental sciences、2015、900

〔産業財産権〕
出願状況（計 0 件）

取得状況（計 2 件）
名称：iPS 細胞の高効率な樹立方法
発明者：本田雅規 鳥海拓
権利者：学校法人日本大学
種類：特許
番号：6128511
取得年月日：平成 29 年 4 月 21 日
国内外の別：国内

名称：脱分化脂肪細胞の製造方法
発明者：本田雅規 鶴町仁奈 他 4 名
権利者：学校法人日本大学
種類：特許
番号：5991687
取得年月日：平成 28 年 8 月 26 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dent.aichi-gakuin.ac.jp/lecture/kokukai bou/>

6．研究組織

(1)研究代表者

本田 雅規 (HONDA, Masaki)

愛知学院大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：70361623

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

渡辺信和 (Watanabe Nobukazu)

東京大学・医科学研究・FACS コアラボラトリ

ー ・特任准教授 研究者番号：10334278

(4)研究協力者

斉藤弘一 (Saito Kouichi)

アイル再生医療研究センター