

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20515

研究課題名(和文)硬組織再生を目的とした神経堤由来幹細胞の生体内分布解析とその培養方法の確立

研究課題名(英文) Biodistribution analysis of neural crest-derived stem cells for hard tissue regeneration and establishment of the culture method

研究代表者

浦野 絵里 (Urano, Eri)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：20756225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント等の歯科治療時にインプラントを埋入するための骨量が不足している場合、あるいは入れ歯の製作時に入れ歯を支える歯ぐきが高度に減っている場合は、インプラントや義歯が安定するための十分な骨量を確保するために事前に骨を増やす骨造成術が必要となる。従来の人工骨や他家の骨を使用した骨造成術に変わる治療法として自家の細胞を用いる患者自身の幹細胞を利用した骨造成術の開発が期待されている。我々は、幹細胞の中でも、低侵襲に採取しやすい毛包に着目し、成人になった後も幹細胞の性質をもつと報告されている神経堤由来細胞の幹細胞を用いた骨造成術の開発を目指し、解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全ての解析は、神経堤由来幹細胞が緑色蛍光に標識される遺伝子改変マウスを用いて行った。我々の開発した神経堤由来幹細胞の高純度培養方法によって純化された細胞は間葉系幹細胞マーカーを発現しており、その性質を解明すべく、先行研究で行った骨芽細胞分化誘導の他に脂肪細胞、軟骨細胞への分化誘導を行った。その結果、脂肪細胞への分化は確認されたが、軟骨細胞への分化は研究期間内に解析出来なかった。今回、研究計画の途中で研究機関が終了したが、毛包内の神経堤由来細胞は、とても魅力的な細胞で、適切な培養方法を確立し、この細胞を用いた骨造成法を開発すれば、侵襲性が低く患者に受け入れやすい治療になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：If the bone volume for implant placement is insufficient during dental treatment such as implants, or if the gums that support dentures during the production of dentures are highly reduced, there is sufficient stability for implants and dentures. In order to secure the bone mass, bone augmentation to increase the bone in advance is required. It is expected that the bone augmentation using the patient's own stem cells using autologous cells will be developed as a treatment method which replaces the conventional bone augmentation using artificial bone or allogeneic bone. Among the stem cells, we focused on hair follicles that are minimally invasive and easy to collect, and developed a bone augmentation technique using neural crest-derived stem cells that are reported to have stem cell properties even after becoming adults. Our research is intended to development of new bone augmentation technique using neural crest-derived stem cells in hair follicle.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：神経堤由来幹細胞 硬組織再生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 広範囲の顎骨吸収は義歯の安定を妨げ、インプラント埋入を困難にさせるインプラント等の歯科治療では、歯槽骨の骨量が不足している患者に対する前処置として、骨造成を実施する場合がある。機械的負荷に耐えうる機能的な骨組織を再建するには、腸骨などの自家骨組織を採取し、それを骨欠損部に移植する必要があるが、その際、患者への重度の外科的侵襲は避けられない[Clim Orthop Relat Res 329: 300-309, 1996]。この問題を解決する1つの方策として、低侵襲性に採取可能な組織から幹細胞を採取・培養し、骨芽細胞に分化させた後、骨欠損部に移植する方法が考えられる。しかし、骨芽細胞に分化する能力をもつ幹細胞を、低侵襲性に組織から採取し効率的に培養する技術は未だ確立されていなかった。そこで本研究では、他の組織に比べ細胞採取に伴う侵襲性が低い毛包に着目した。

(2) 毛包を構成する細胞の一部は、神経堤に由来する

毛包を構成する細胞の一部は、胎生初期に神経管癒合部から出現する脊椎動物特有の細胞集団である神経堤に由来する[The Neural Crest: Second ed, 1999]。神経堤細胞は、発生過程で胚内を遊走した後、遊走先で様々な細胞に分化する。神経堤由来細胞の一部は成長後も未分化のまま存在し、多分化能を維持していることが報告されている[Dev Dyn 236: 3242-3254, 2007]。我々は、毛包に存在する神経堤由来細胞が GFP(緑色蛍光タンパク質)を発現するダブルトランスジェニックマウスを使用することで他の細胞と識別し、幹細胞用培地を用いて幹細胞を高純度で増殖させることに成功した。さらに、骨誘導因子である BMP-2 でそれらの細胞を刺激すると骨芽細胞に分化した。

2. 研究の目的

広範囲の顎骨吸収に対して、自家骨移植に代わる骨造成法として幹細胞による骨造成法が挙げられるが、この細胞ソースとしてどの細胞を使用するかが重要な課題となっている。我々はこれまで、神経堤由来幹細胞が成体においても多分化能を維持していることに着目し、マウス類髭の毛包内に存在する神経堤由来幹細胞を増殖させ、それらを骨芽細胞様細胞に分化誘導する方法を確立した。しかし、成体内には毛包以外にも様々な組織に神経堤由来幹細胞が存在し、それらが全く同じ性質をもつかは明らかになっていない。そこで本研究では、どの組織の神経堤由来幹細胞が顎骨再生用の細胞ソースとして適しているのかを明らかにし、神経堤由来幹細胞の増殖能や骨芽細胞への分化能を解明し、神経堤由来幹細胞を用いた顎骨再建方法の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 神経堤由来細胞を標識した遺伝子改変マウスの解析

実体蛍光顕微鏡を用いて、各組織に存在する神経堤由来細胞が GFP 陽性細胞として検出可能な P0-Cre/GFP ダブルトランスジェニックマウスの各組織中の神経堤由来細胞を可視化し、生体内での神経堤由来細胞の局在や形態を解析する。

(2) 神経堤由来幹細胞の純化、培養方法の確立

申請者らが開発した高純度培養方法を用いて、各組織から採取した細胞を培養し、神経堤由来幹細胞の高純度培養方法を行い、この培養法によって純化された神経堤由来幹細胞を各種培養皿(低付着性培養皿、コラーゲンコート培養皿等)と幹細胞用培地を用いて培養し、神経堤由来幹細胞として最適な培養、継代方法を確立する。

(3) 神経堤由来幹細胞の性質解析

培養した神経堤由来幹細胞の増殖能また幹細胞の性質である多分化能を検討する。骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、血管系細胞、神経系細胞への分化誘導について検討を行う。

(4) 神経堤由来幹細胞を用いた三次元的骨組織の製作

神経堤由来幹細胞が定着するスキャフォールドの選定を行い、適切なスキャフォールドを用いて三次元的骨組織の製作を行う。

4. 研究成果

(1) マウス類髭毛包内の神経堤由来細胞の局在
P0-Cre/GFP ダブルトランスジェニックマウスを用いて、マウスの各組織中の神経堤由来細胞を可視化し、解析を行った。免疫組織学的解析の結果、類髭毛包内では、Anti-Alexa Fluor®594 によって赤色に染色された GFP 陽性細胞が幹細胞の存在するバルジ領域と発毛の起源である毛乳頭に存在することが明らかとなった(図1)。

(2) マウス類髭毛包内の神経堤由来細胞の高純度培養方法による純化

研究者らが開発した幹細胞用培地(B27, EGF, FGF 含有培地)を用いた高純度培養方法にて、毛包内の神経堤由来幹細胞を増殖させ、培養日数による変化を解析した。その結果、培養日数が経過するにつれて、全細胞数に対する神経堤由来細胞数の割合は増加し、研究者らが報告していた結果と同様に培養 14 日目には 95%以上の割合に増加

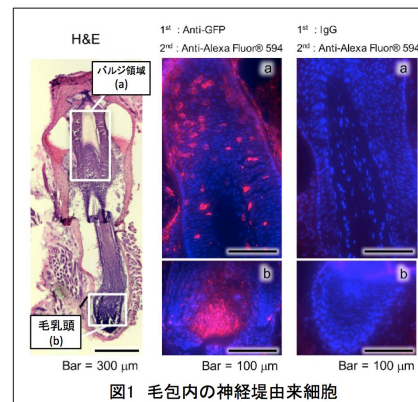


図1 毛包内の神経堤由来細胞

した(図2)。また、これらをフローサイトメトリーにて解析すると、増殖した神経堤由来幹細胞は間葉系幹細胞マーカである PDGFR と Sca-1 を発現していた(図3)。

(3) 増殖したマウス頬髭毛包内神経堤由来細胞の幹細胞の性質解析

増殖した神経堤由来細胞の間葉系幹細胞の性質解析を行うため、脂肪細胞分化誘導と軟骨細胞分化誘導を行った。脂肪細胞分化誘導培地にて培養すると脂肪細胞分化マーカーであるリポプロテインリパーゼの発現レベルが上昇した。またオイルレッド O 染色によって赤く染まった脂肪滴が検出された(図4)。軟骨細胞分化誘導培地にて増殖した神経堤由来細胞の軟骨細胞分化誘導を試みたが、軟骨細胞への分化は

認められなかった。軟骨細胞分化誘導時は細胞をペレット状にして培養を行うが、その細胞を回収し、RNA 抽出を行う過程で、細胞を溶解させるのが難しく、RNA 抽出の時点でエラーがあったことも考えられた。

(4) 増殖した神経堤由来幹細胞にとって適切なスキャフォールドの選定を行った。

患者個々の欠損形態に沿ったスキャフォールドを作成し、そこに増殖させた神経堤由来幹細胞を増殖させ、個々の患者に合ったテーラーメイド型骨造成術を開発すべく、予備実験を行った。

頭蓋骨欠損部モデルマウスを用いて実験を行った。マトリゲル、細胞シートをスキャフォールドとして解析を行った。コラーゲンコートディッシュ上で高純度培養方法により、毛包内神経堤由来幹細胞を増殖させ、5日間培養した細胞を回収し、各種スキャフォールド(マトリゲル、細胞シート)をマウス頭蓋骨欠損部に移植した。各々、コントロール群(各種スキャフォールド(-)、増殖した毛包内神経堤由来幹細胞(-)、BMP-2(-))、各種スキャフォールドのみ群(各種スキャフォールド(+)、増殖した毛包内神経堤由来幹細胞(-)、BMP-2(-))、各種スキャフォールドと増殖した毛包内神経堤由来幹細胞群(各種スキャフォールド(+)、増殖した毛包内神経堤由来幹細胞(+))、BMP-2(-))、各種スキャフォールドと増殖した毛包内神経堤由来幹細胞および BMP-2 添加群(各種スキャフォールド(+))、増殖した毛包内神経堤由来幹細胞(+))、BMP-2(+))にて比較検討を行った。移植後4週目と12週目の変化を μ CTにて観察した。移植後4週目の μ CTによる観察の結果、どの群においても頭蓋骨欠損部を修復するような硬組織の形成は認められなかった。移植後12週目においても同様の結果であった。マトリゲルは、移植の作業中も動きやすく、頭蓋骨欠損部上に定着させるのが難しいように感じた。また細胞シート上では、細胞をコンフルエントにすることが難しく、シートが菲薄な状態で移植することとなった。この結果から患者個々の欠損形態に沿ったスキャフォールドを作成前に細胞数、スキャフォールドの材料、移植方法について検討する必要があることが示唆された。本研究の計画の一つであった適切なスキャフォールドの選定は、本研究費の期間内に終わることができなかった。また適切なスキャフォールドの選定後の三次元的骨組織製作についても行うことができなかった。

(5) 今回得られた成果と今後の展望

本研究の結果、毛包内の神経堤由来細胞は高純化培養方法によって純化することが可能で、それらは間葉系幹細胞マーカを発現しており、純化した細胞は骨芽細胞への分化に加えて脂肪

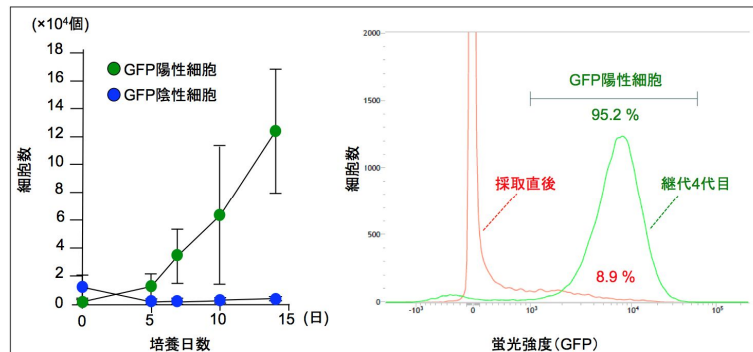


図2 高純度培養方法による毛包内の神経堤由来細胞数の変化

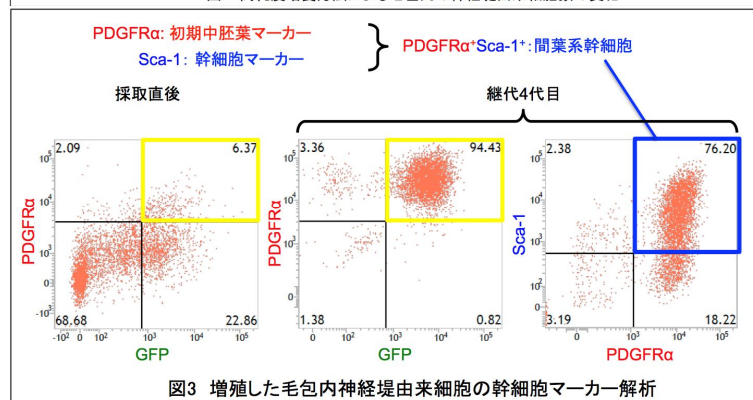


図3 増殖した毛包内神経堤由来細胞の幹細胞マーカー解析

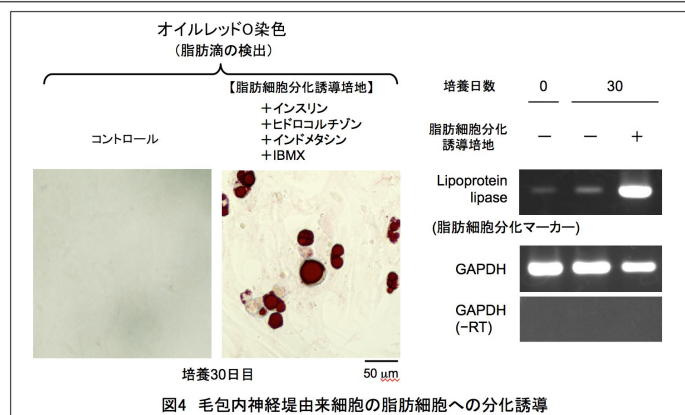


図4 毛包内神経堤由来細胞の脂肪細胞への分化誘導

細胞へも分化することが示唆された。本研究で解析を完了することが出来なかった軟骨細胞の分化誘導や移植用スキャフォールドの選定について、反省点を踏まえて結果が出るまで何度も解析を試みる必要があった。これは、研究機関中に研究者が第2子の妊娠と出産を経て、2人の子育てを行いながら研究を行うことに困難を感じ、うまく進めることができなかったことも要因である。研究者がテーマとしている毛包内の神経堤由来細胞は、とても魅力的な細胞で、適切な培養方法を確立し、この細胞を利用した再生医療を開発すること出来れば、侵襲性が低く患者にとって受け入れやすい治療になることが期待される。研究時間に制約があるとはいえ、今後も根気強く、解析を進め、この細胞の未知の部分を探明していきたい。今後は、スキャフォールドに定着させる細胞数を更に増やすこと、移植したスキャフォールドが移植部位に定着し、骨造成を促すか否かを解析し、スキャフォールドの選定を確実にし、各々の欠損部に合ったテラーメード型スキャフォールドの開発を進めていきたい。

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Urano-Morisawa E, Takami M, Suzawa T, Matsumoto A, Osumi N, Baba K, Kamijo R.	4. 巻 12
2. 論文標題 Induction of osteoblastic differentiation of neural crest-derived stem cells from hair follicles.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0174940
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0174940.	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 該当する

1. 著者名 Urano-Morisawa E, Takami M, Suzawa T, Matsumoto A, Osumi N, Baba K, Kamijo R.	4. 巻 12
2. 論文標題 Induction of osteoblastic differentiation of neural crest-derived stem cells from hair follicles.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 —
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0174940.	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Urano E, Suzawa T, Baba K, Kamijo R, Masamichi T
2. 発表標題 Induction of osteoblast differentiation using hair follicle derived from neural crest.
3. 学会等名 29th annual and international meeting of the japanese association for animal cell technology. (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 秋山友里, 大嶋瑤子, 浦野絵里, 堀田康弘, 岩佐文則, 宮崎隆, 馬場一美
2. 発表標題 Ce-TZP/Al2O3の表面粗さは歯肉繊維芽細胞の形態と機能を制御する.
3. 学会等名 第127回日本補綴歯科学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋山友里, 岩佐文則, 大澤昂史, 松本貴志, 浦野絵里, 大嶋瑤子, 小沢 徹彦, 鈴木満, 馬場一美
2. 発表標題 セリア安定化ジルコニアアルミナナノ複合体 (Ce-TZP/Al2O3) の表面粗さがヒト歯肉繊維芽細胞 (HGF-1) に与える影響.
3. 学会等名 日本補綴歯科学会 第23回東京支部総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本骨代謝学会ホームページ内、1st author http://www.jsbmr.jp/1st_author/266_eurano.html
--

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