

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09606

研究課題名(和文) 高純度歯髄MSC・誘導神経堤細胞・誘導歯原性間葉細胞による歯周組織再生療法の実践

研究課題名(英文) Practical periodontal tissue regeneration therapy using highly purified dental pulp MSCs, induced neural crest cells, and induced odontogenic mesenchymal cells

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯髄組織由来LNGFR^{Low}+THY-1^{High}+ hDPSCs (human Dental Pulp Stem Cells; hDPSCs)、に集中した研究を行った。ゼノフリー間葉系幹細胞培地で培養した結果、hDPSCsにおいても、従来型培地と同様の細胞増殖能を確認できた。この実験結果によって、従来型の細胞の不均一性という問題を、特異的細胞表面マーカーによる均一な幹細胞分離を行うことで克服でき、また「異種動物由来の血清成分」を使用しない「ゼノフリー培養」が可能であることも示唆された。本研究課題によってhDPSCsの臨床応用の可能性が広がったと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゼノフリー間葉系幹細胞培地で培養した結果、LNGFR^{Low}+THY-1^{High}+ hDPSCsにおいても、従来型培地と同様の細胞増殖能を確認できた。これによって将来的には動物由来の血清を含まない培養液を用いる可能性が示唆された。この実験結果によって、従来型の付着培養分離型、あるいは浮遊培養分離型間葉系幹細胞のように「培養操作による細胞の不均一性」という問題を「特異的細胞表面マーカーによる均一な幹細胞分離」で克服でき、また「異種動物由来の血清成分」を使用しない「ゼノフリー培養」が可能であることも示唆されたことから、本研究課題によって、hDPSCsの臨床応用の可能性が広がったと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we concentrated on human dental pulp tissue-derived LNGFR^{Low}+THY-1^{High}+ hDPSCs (human Dental Pulp Stem Cells; hDPSCs). The results of culturing the cells in Xenofree Mesenchymal Stem Cell Medium showed that the cell proliferation ability of the hDPSCs was similar to that of the conventional medium. The results of this experiment suggest that (1) the problem of heterogeneity of conventional cells can be overcome by uniform separation of stem cells using specific cell surface markers and (2) "xeno-free culture" without "serum components of foreign animal origin" is possible. We believe that this research project has expanded the possibility of clinical application of hDPSCs.

研究分野：歯周病学

キーワード：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) やリコンビナントヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (リグロス) などの成長因子に依存した方法や骨移植術などがある。EMD は「成長因子のカクテル」を、そしてリグロスは単一ではあるものの、リコンビナント成長因子を補充することで、歯周組織に内在する幹細胞を刺激した方法である。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。MSCs は骨髄細胞を付着培養することによって分離する多種多様な細胞集団である。そのため、この細胞集団の中から“本当の幹細胞の性質をもつ MSCs”のみを分離する特異的なマーカーが同定されていなかった。これまで 40 年以上もの歴史を持つ 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や動態の解析はほとんど行われていないのが現状であった。また近年では組織幹細胞の他に、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、ほとんどがマウスを用いたデザインに終始していること、目的細胞への誘導評価は *in vitro* での免疫組織学的手法や遺伝子発現解析のみで行っていること、組織幹細胞の供給源として漠然と MSCs が使用されており、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こと、移植実験に関しては再生組織の定量的評価や長期にわたる安全性の評価方法はほとんど報告されていない、などの問題点がある。

2. 研究の目的

本研究では先の述べた①～④の問題点を克服するため、これまで国内外で研究されてきている多種多様な細胞集団からなる MSCs は使用しない。代わりに、これまでの研究で幹細胞としての必要十分条件を満たすことが明らかとなった、ヒト歯髄組織由来 $\text{LNGFR}^{\text{Low+}}\text{THY-1}^{\text{High+}}$ hDPSCs (human Dental Pulp Stem Cells; hDPSCs) ヒト人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem Cells; iPSCs) から神経堤細胞に誘導した hiPS-LT-NCLCs ($\text{LNGFR}^{\text{+}}\text{THY-1}^{\text{+}}$ Neural Crest like cells derived from human iPSCs; hiPS-LT-NCLCs) そして歯原性間葉細胞に誘導した hiPS-OMCs (Odontogenic Mesenchymal Cells derived from human iPSCs; hiPS-OMCs) を用いる。そしてこれらの細胞を開発した光硬化型ゼラチンへ組み込み、オリジナルかつ効果的な歯周組織再生療法の実現を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 組織幹細胞 $\text{LNGFR}^{\text{Low+}}\text{THY-1}^{\text{High+}}$ hDPSCs のゼノフリー培養法の確立、フィーダーフリー/ゼノフリー条件下でのヒト神経堤様細胞 hiPS-LT-NCLCs ($\text{LNGFR}^{\text{+}}\text{THY-1}^{\text{+}}\text{HNK-1}^{\text{+}}$) と歯原性間葉細胞 hiPS-OMCs (DSPP⁺) 分化誘導法確立。

本研究課題で使用する細胞はそのまま臨床応用可能な質が担保されなければならない。その目的を達成するために以下の実験を計画した。

(1)- . 申請者らはこれまでの研究によってフィーダーフリー/ゼノフリー培養法を経験している。 $\text{LNGFR}^{\text{Low+}}\text{THY-1}^{\text{High+}}$ hDPSCs に関してはゼノフリーシステムを、hiPS-LT-NCLCs と hiPS-OMCs のフィーダーフリー培養についてはマトリゲルやラミニンを用いた方法を用いることとした。神経堤細胞への誘導は LNGFR と THY-1 および $\text{HNK-1}^{\text{+}}$ の発現で確認し、歯原性間葉細胞への誘導はその特異的タンパク質である象牙質シアロリントタンパク質 (DSPP) の発現で確認することとした。

(1)- . 歯周組織の起源は歯原性間葉である。 $\text{LNGFR}^{\text{Low+}}\text{THY-1}^{\text{High+}}$ hDPSCs はヒト歯髄組織由来であるため、歯周組織再生の観点から発生学的起源として矛盾しない。ヒト iPS 細胞を用いる場合はフィーダーフリー/ゼノフリーで増殖させた後に神経堤様細胞への誘導 (hiPS-LT-NCLCs= $\text{LNGFR}^{\text{+}}\text{THY-1}^{\text{+}}\text{HNK-1}^{\text{+}}$) と、歯原性間葉への誘導を試みる (森川暁, 中川種昭. 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 特願 2016-073957) iPS 細胞から誘導したこれらの細胞には GSI による腫瘍化抑制処置を予定した。

(2)- 歯周囲の絹糸結紮による歯周病モデルマウスの作製およびミニブタの歯周病モデル作製と移植方法の確立。

これまでの歯周病モデルは“歯槽骨吸収”を再現するために外科的骨削除による方法が一般的であったが、Hajishengallis らは 2013 年に歯の周囲に 5-0 絹糸を巻きつけることで、バイオフィルム蓄積による炎症性骨吸収を引き起こすモデルの作製に成功した。本研究課題ではこの Hajishengallis らの方法を再現できるようにすることを目的とした。

(2)-

マウス歯周病モデルに対する $\text{LNGFR}^{\text{Low+}}\text{THY-1}^{\text{High+}}$ hDPSCs 治療の可能性を評価・検討することとした。

4. 研究成果

研究方法(1)- 、(1)- の成果

ヒト歯髄組織由来LNGFR^{Low}+THY-1^{High}+ hDPSCs (human Dental Pulp Stem Cells; hDPSCs)、ヒト人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem Cells; iPSCs) から神経堤細胞に誘導したhiPS-LT-NCLCs (LNGFR+THY-1+ Neural Crest like cells derived from human iPSCs; hiPS-LT-NCLCs)、そして歯原性間葉細胞に誘導したhiPS-OMCs (Odontogenic Mesenchymal Cells derived from human iPSCs; hiPS-OMCs) を用いる予定としていた。しかしながら研究環境と状況によって、iPS細胞を使用した研究が困難な状況になったことから、LNGFR^{Low}+THY-1^{High}+ hDPSCsに集中した研究を行った。従来方法である基本培地に10-20%FBSを添加した間葉系幹細胞メディアウムと、ゼノフリー間葉系幹細胞培地で培養した結果、LNGFR^{Low}+THY-1^{High}+ hDPSCsにおいても、従来型培地と同様の細胞増殖能を確認できた。現在再現性を確認している。これによって将来的には動物由来の血清を含まない培養液を用いる可能性が示唆された。この実験結果によって従来型の付着培養分離型、あるいは浮遊培養分離型間葉系幹細胞のように「培養操作による細胞の不均一性」という問題を「特異的細胞表面マーカーによる均一な幹細胞分離」で克服でき、また「異種動物由来の血清成分」を使用しない「ゼノフリー培養」が可能であることも示唆されたことから、本研究課題によってヒト歯髄細胞由来LNGFR^{Low}+THY-1^{High}+ hDPSCsの臨床応用の可能性が広がったと考えている。

研究方法(2)- 、(2)- の成果

「歯周囲の絹糸結紮による歯周病モデルマウスの作製と移植方法の確立」と「LNGFR^{Low}+THY-1^{High}+ hDPSCsによる治療効果の評価」に取り組んだ。この実験を通して、マウス歯周病モデル作製が可能になったこと、また組織学的解析およびマイクロCTによる画像解析においても、重度の歯槽骨吸収を認めていることから、ヒトの臨床モデルと極めて類似していることを確認できた。最終年度はヒト歯髄組織からのLNGFR^{Low}+THY-1^{High}+ hDPSCsを分離し、2次元培養、スフェロイド培養を含む3次元培養を行い、歯周病モデル作成と骨欠損部への移植を行い、従来MSCとの比較を行っている。さらに本研究課題の進展および発展的拡大を目指して、最終年度より歯科・口腔外科領域特有の炎症性骨疾患として「薬剤関連性顎骨壊死」に注目し、LNGFR^{Low}+THY-1^{High}+ hDPSCsによる治療効果の可能性を探求するために疾患モデルマウス作成にも取り組んだ。歯周病モデルマウスの作製と同じ手技を応用することが多く、本疾患モデルへのLNGFR^{Low}+THY-1^{High}+ hDPSCsの適応拡大が可能となる結果を得ることができそうである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中川種昭 森川暁
2. 発表標題 組織幹細胞による再生治療戦略と難治性疾患の病態生理解明
3. 学会等名 第37回日本ヒト細胞学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森川暁
2. 発表標題 組織幹細胞による再生治療戦略と難治性疾患の病態生理解明
3. 学会等名 第19回 日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔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	森川 暁 (MORIKAWA Satoru) (00424169)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	

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
---------	---------