

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 4 月 20 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19077

研究課題名(和文) 幹細胞様口腔粘膜ケラチノサイトを応用した新規神経再生療法の試み

研究課題名(英文) A novel technique for nerve regeneration with adult human epithelial progenitor/"stem cells" keratinocyte

研究代表者

宮澤 敦子 (Miyazawa, Atsuko)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：00706997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：in vitroでのヒト口腔粘膜より単離したケラチノサイトから産生されたePUKs (epithelial Pop Up Keratinocytes)の生物学的評価において、ePUKsは単層培養ケラチノサイトと比較してより幹細胞に近いという結果を得た。ePUKsの細胞サイズは単層培養ケラチノサイトと比較して小さく、また細胞生存率も高い結果となった。それらのePUKsを免疫蛍光染色で検討したところ、単層培養ケラチノサイトと比較して有意に多くの幹細胞マーカーの発現を認めた。またePUKsが培養上清中に産生した細胞増殖因子の量は通常の口腔粘膜由来ケラチノサイトと比較して有意に高い値を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床現場で必要となる質の高い十分量の幹細胞を採取、また生産することは難しい。本研究では口腔粘膜から、より幹細胞に近いヒト口腔粘膜由来のケラチノサイト"epithelial pop-up keratinocytes (ePUKs)" を獲得する事が出来た。今後in vivoでのさらなる評価・検討が必要となるが、再生医療に注目が集まる骨髄や歯髄等の幹細胞に比べて、採取が容易で、かつ一度に大量の幹細胞様ケラチノサイトを生産・培養することができるこのePUKs培養方法は多くの可能性を秘めており、将来の臨床現場でその他の多能性幹細胞に代わる上皮や神経の再生医療の即戦力となるのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the properties of ePUKs (epithelial Pop Up Keratinocytes) by cell size, cell viability, and immunocytofluorescence biomarker staining. The cell size was the smallest and the cell viability was the highest around day4 or 5 after starting cell culture. The growth factors (Epidermal Growth Factor, vascular endothelial growth factor and Fibroblast Growth Factor 2) in the spent media were evaluated by ELISA. In addition, the ePUKs were cultured in the neuronal differentiation media, but the typical structure of neuron could not be detected in the culture. However, our results showed that these ePUKs appear to be progenitor cells, which are small in size, undifferentiated, and have a high proliferative capacity. We believe that ePUKs are suitable for use in medical applications which are like a therapeutic agent for spinal cord injury in the future.

研究分野：再生医療

キーワード：幹細胞 再生医療 ケラチノサイト 幹細胞様細胞 口腔粘膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、再生医療の現場では骨髄や歯髄等の多能性幹細胞の有用性に注目した様々な研究が行われている。最近では Marynka-Kalmani らが 口腔粘膜から採取した細胞の中にも多能性幹細胞が存在するという報告をしている(Stem Cells,28:984-955,2010)。そこで我々は口腔粘膜ケラチノサイトから産生される ePUKs (epithelial Pop Up Keratocytes) に注目した。我々は、ミシガン大学顎顔面口腔外科学分野の Feinberg 研究室との共同研究で人の口腔粘膜や皮膚組織より単離したケラチノサイトから幹細胞様ケラチノサイト(ePUKs)を独自の方法で生産・培養し、その生物学的評価を行っており、ePUKs には多分化能があると考えている。現在、ESCs (embryonic stem cells)や iPSCs (induced pluripotent stem cells)を筆頭に増殖・分化をしていない細胞(幹細胞や幹細胞様細胞)の採取・生産方法、およびそれらを使った臨床研究などが数多く行われている(N Engl J Med:377(8):792-793,2017)が、ESCs や iPSCs の実用化に際しては、倫理面や移植安全性、分化細胞の低い作出効率、治癒効果の不安定性、幹細胞採取における生体侵襲性など多くの問題を抱えているのが現状である。また、治療に必要な十分量の細胞を獲得するために培養を続けると、細胞を継代することによって分化・増殖してしまうなどの臨床応用に向けた実用化には数多くの問題点が残っている。しかし臨床現場で必要となる質の高い十分量の幹細胞を採取、また生産することは難しい。ePUKs は再生医療に注目が集まる骨髄や歯髄等の幹細胞に比べて、採取が容易で、かつ一度に大量の幹細胞様ケラチノサイトを生産・培養することが可能であり、将来の臨床現場でその他の多能性幹細胞に代わる上皮や神経の再生医療の即戦力となるのではないかと考えている。そこで、口腔外科手術後の運動神経麻痺や知覚神経麻痺の治療に、この ePUKs を応用した神経再生を目指した新たな再生医療の道を開く画期的な研究を計画立案した。

2. 研究の目的

Feeder Cell を必要としない独自の培養方法を用いることによってヒト口腔粘膜由来ケラチノサイトから産生される ePUKs (epithelial Pop Up Keratocytes) が将来神経再生医療に有用な手段になるのではないかと考えている。そのため、本研究では ePUKs の生物学的評価とその神経細胞分化評価を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト口腔粘膜を採取し、通常の方法でヒト口腔粘膜由来ケラチノサイトを単離した。単離した細胞は 0.06M calcium chloride および Epilife™ Defined Growth Supplement (EDGS)添加 Epilife 培地で培養した。培地交換は 2 日に一度行った。その後、約 80%コンフルエントになった時点で培地を 2 倍量にし、毎日培地交換を行うことで初代ヒト口腔粘膜由来ケラチノサイトモノレイヤーから ePUKs を産生させた。この際、プライマリーヒト口腔粘膜由来ケラチノサイトのコンフルエント率と ePUKs の産生量の相関を評価するために、産生された ePUKs 数とその生存率を毎日 Countess® (invitrogen)で測定した。加えて、ePUKs の細胞サイズも計測した。

(2)ePUKs 培養における培地上清中の epidermal growth factor (EGF)および basic fibroblast growth factor (FGF 2)の発現量は培養後、3、5、7、9、11 日目に Quantikine® ELISA (R&D SYSTEMS)を用いて測定した。また、比較対象群として回収した ePUKs をフラスコに播種し ePUKs と同様の培養方法で pop-pop 細胞 (ePUKs をモノレイヤーとしその培養上清中に産生

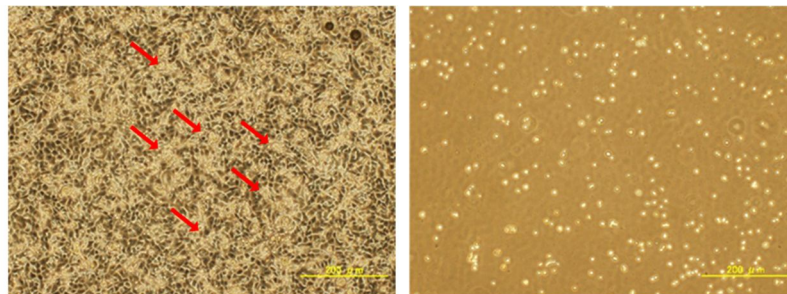
された細胞)も同様の評価を行った。

(3) ePUKs と pop-pop 細胞の産生数と生存率が高い培養日数を検討し、その培養日数に採取した ePUKs と pop-pop 細胞を免疫蛍光化学染色に使用した。スライドの作製にはスライド塗抹標本キットの Smear Gell® (Geno Staff) を用いた。1 次抗体は幹細胞マーカーである Lgr5 (abcam:ab273092) を使用し、2 次抗体には Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 488®) (abcam:ab150077) を使用した。作製したスライドは倒立型リサーチ顕微鏡 (Olympus IX71) で観察した。

(4) 免疫蛍光染色に使用した ePUKs と同日に回収した細胞を bFGF 添加の神経幹細胞維持/神経分化培地である RHB-A® で培養し神経分化誘導を行った。培地は 2 日ごとに交換し、培養開始 3、5、7、14、21 日目に Human Transcription factor SOX-2 (SOX2) ELISA Kit (ABclonal Inc.:RK06786) を用いて神経分化の指標となる SOX-2 の発現量を評価した。

4. 研究成果

(1) 口腔粘膜から単離したプライマリーヒト口腔粘膜由来ケラチノサイト (コントロール群) を培養し 80% コンフルエント後から培養上清中に産生され始めた ePUKs を採取した (図 1)。培養日数と ePUKs の産生数との関係性を評価したところ培養 3~5 日後で急激に産生数が増加し、その後徐々に減少していき、6 日後以降は激減した (図 2)。また、細胞生存率も同様に培養後 3 日目から上昇し始め、4、5 日目でピークとなりその後徐々に減少していった。10 日目以降での生存率は 50% 以下となった。細胞のサイズは培養開始後 3 日目から減少し始め、4、5 日目で最小となり、その後徐々に増大していった。7 日目以降はコントロールと同程度のサイズとなった (図 3)。



モノレイヤーから産生されているePUKs (矢印)

播種直後のePUKs

図 1

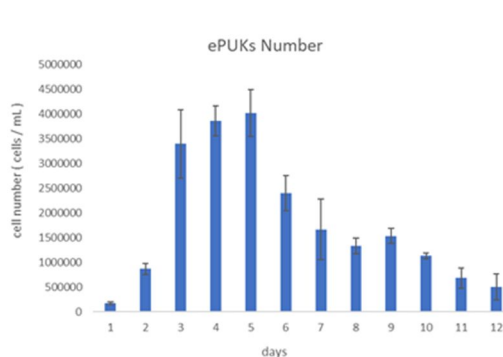


図 2

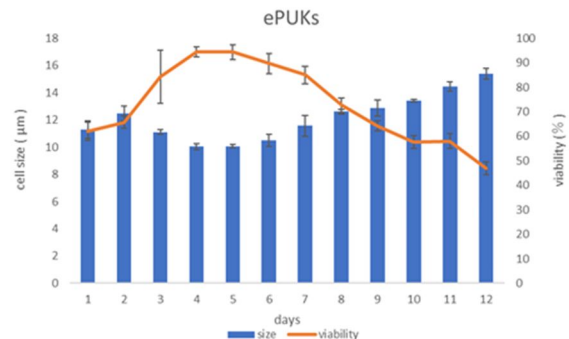


図 3

(2) epidermal growth factor (EGF)発現量は3日目ではePUKs群とコントロール群の間に有意差は認められなかったが、5日目以降ではePUKs群が他群と比較して有意に高い結果となった。ePUKs群はコントロール群と比較すると早期に上昇し始め、その後減少傾向にあるもの9日目まで有意に高い値であった(図4)。basic fibroblast growth factor (FGF2)は3日目から11日目までを通してpop-pop細胞群は他群と比較して有意に高い値であった。コントロール群では全体を通して他群と比較すると発現量は極めて少なく、9日目で最高値を示したものの他群と比較すると有意に低い値となった(図5)。

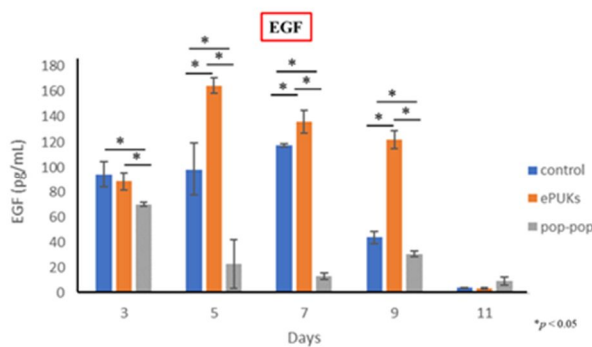


図4

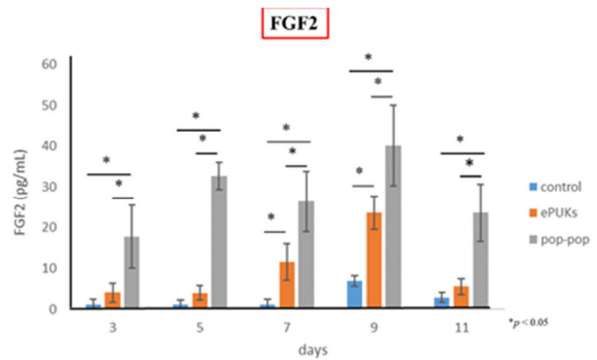


図5

(3) 培養開始後、80%コンフルエントを確認してから4日目、5日目に産生されたePUKsとpop-pop細胞を幹細胞マーカーであるLgr5を用いて免疫蛍光化学染色を行ったところePUKs群およびpop-pop細胞群でコントロール群と比較して有意に高い値となった。また、ePUKs群はpop-pop細胞群と比較して高い傾向にあった(図6)。

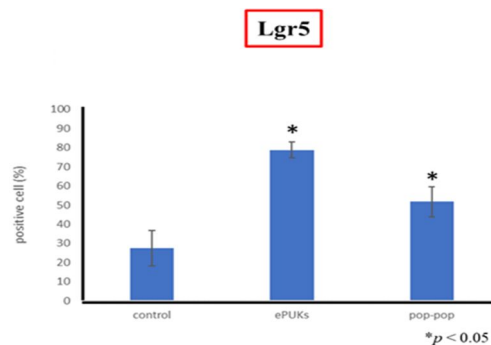


図6

(4) 培養開始後4日目および5日目に産生されたePUKsをbFGF添加の神経幹細胞維持/神経分化培地であるRHB-A®で培養し神経分化誘導を行った。顕微鏡下で培養開始初期には細胞増殖傾向がみられたが神経細胞に特徴的な構造は確認されなかった。また培養開始後7、14、21日目に神経分化の指標となるSOX-2の発現量を評価したがコントロール群と比較して有意な差は見られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|