

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21024

研究課題名（和文）毛包内神経堤由来幹細胞による広範囲顎骨再建法の創成

研究課題名（英文）Creation of an extensive jawbone reconstruction method using intrafollicular neural crest-derived stem cells

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） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：我々は、毛包内の神経堤由来幹細胞を顎骨欠損部へ移植するための足場の確立と移植後の機能解析により毛包内の神経堤由来幹細胞による広範囲顎骨再建法の創成を行うことを目的として研究を行った。毛包内の神経堤由来幹細胞の移植方法を検討するため、我々が確立した高純度培養方法により増殖した毛包の神経堤由来幹細胞を骨欠損部へ移植する方法を検討した。移植する足場として、コラーゲングル 細胞シート、凍結乾燥スポンジを選定した。マウス頭蓋骨欠損部にそれぞれを足場として毛包の神経堤由来幹細胞を移植した。骨欠損部を修復する足場として凍結乾燥したコラーゲンスポンジの使用が有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究期間内では、増殖した毛包の神経堤由来幹細胞が頭蓋骨欠損部を修復する結果を得ることが出来なかったが、自己の細胞であり、最小限の侵襲で採取できる毛包の神経堤由来幹細胞の利用は、拒絶反応や倫理的問題を回避することができ、従来の自家骨移植では困難であった広範囲の欠損部を低侵襲に修復できる患者にとって非常に受け入れやすい顎骨再建法の開発につながり、社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of our study was to establish a scaffold for transplantation of neural crest-derived stem cells in hair follicles into jaw bone defects and to analyze their function after transplantation in order to create a method for extensive jaw bone reconstruction using neural crest-derived stem cells in hair follicles. To investigate the method of transplantation of neural crest-derived stem cells in hair follicles, we examined the method of transplanting neural crest-derived stem cells in hair follicles, which were grown by our established high-purity culture method, into bone defects. We selected (1) collagen gel, (2) cell sheets, and (3) lyophilized sponges as scaffolds for transplantation. Neural crest-derived stem cells of hair follicles were transplanted into mouse skull defects using each of these scaffolds. Within the period of this study, the proliferated neural crest-derived stem cells of hair follicles failed to result in repair of the skull defect.

研究分野：補綴歯学

キーワード：神経堤由来細胞 骨芽細胞 足場 毛包 幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 神経堤由来細胞の一部は成長後も幹細胞として存在し、多分化能をもつ

神経堤細胞は、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から出現し、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]。このように幹細胞の性質をもつ神経堤由来細胞は、組織再生用の新しい細胞ソースとして期待される。

(2) 申請者は毛包の神経堤由来幹細胞の高純度培養方法を確立し、BMP-2 の刺激による骨芽細胞分化誘導に成功した

申請者は、神経堤由来細胞が蛍光タンパク質で標識される遺伝子改変マウスを用いて毛包内の神経堤由来細胞を解析し、採取した [PLoS One. 6;12(4), 2017]。マウス毛包内に存在する神経堤由来幹細胞を幹細胞用培地にて培養すると、神経堤由来幹細胞が増殖し、その純度は 95%以上に達することを見出し、毛包の神経堤由来幹細胞の高純度培養方法を確立した [PLoS One. 6;12(4), 2017]。さらに増殖した神経堤由来幹細胞を骨形成誘導因子である BMP-2 の存在下で培養すると、骨芽細胞分化マーカーの発現レベルが上昇した。また石灰化誘導培地にて培養すると石灰化物の形成を認め [PLoS One. 6;12(4), 2017]。毛包の神経堤由来幹細胞を BMP-2 の刺激により骨芽細胞へ分化誘導することに成功した [PLoS One. 6;12(4), 2017]。これらの結果は、毛包の神経堤由来細胞が幹細胞としての性質を持ち、BMP-2 の刺激により骨芽細胞に分化することを明らかにしたものであり、毛包の神経堤由来幹細胞を骨再生用の細胞ソースとして利用することで新しい顎骨再建方法の開発につながる可能性を示唆する。

### 2. 研究の目的

骨再生用の細胞ソースに最適な神経堤由来幹細胞について明らかになっておらず、神経堤由来幹細胞による顎骨再建方法の開発は未だ報告されていないため、本研究の極めて独創的な点といえる。さらに自己の細胞であり、最小限の侵襲で採取できる毛包の神経堤由来幹細胞の利用は、拒絶反応や倫理的問題を回避することができ、従来の自家骨移植では困難であった広範囲の欠損部を低侵襲に修復できる患者にとって非常に受け入れやすい顎骨再建法の開発につながる。

### 3. 研究の方法

(1) 毛包内の神経堤由来幹細胞の移植方法の検討

顎骨へ移植した神経堤由来細胞の動向を観察するために全身の組織細胞に置いて緑色蛍光タンパク質 (GFP) で標識された遺伝子改変マウス (グリーンマウス) を用いて組織の細胞を可視化し、実験を行う。申請者が開発した高純度培養方法により、マウス毛包内の神経堤由来幹細胞を増殖させる [PLoS One. 6;12(4), 2017]。増殖後の細胞を移植するための足場の選定、あるいは石灰化誘導培地にて形成されたマウス毛包内の神経堤由来幹細胞の石灰化物を足場とした移植方法を検討する。

最適な移植方法の検討、三次元的骨組織の製作法を確立し、令和 6 年度の実験を行う。

(2) 毛包内の神経堤由来幹細胞による広範囲顎骨再建法の創成

申請者らが開発した歯槽骨吸収モデルマウス [Biol Pharm Bull. 41(4), 2018] を用いて、広範囲顎骨欠損部への修復能を解明する。高解像度  $\mu$ CT により骨再生能を解析後に、骨再生部位の切片を作製し、免疫染色により移植細胞 (GFP 陽性細胞) を染色する。それにより、毛包内の神経堤由来細胞の骨欠損修復における動向を解析し、広範囲顎骨再建後の形状維持に最適な環境を確立する。

### 4. 研究成果

(1) 毛包内の神経堤由来幹細胞の移植方法を検討するため、我々が確立した高純度培養方法により増殖した毛包の神経堤由来幹細胞を骨欠損部へ移植する方法を検討した。移植する足場として、コラーゲンゲル (Matrigel) 細胞シート 凍結乾燥スポンジを選定した。

(2) マウス頭蓋骨に直径 4mm のトレフィンバーにて欠損部を形成し、増殖した毛包内神経堤由来幹細胞含有コラーゲンゲル 増殖した毛包内神経堤由来幹細胞含有細胞シート 増殖した毛包内神経堤由来幹細胞が分化した骨芽細胞によって形成された石灰化物を含む凍結乾燥スポンジを頭蓋骨欠損部に移植した。欠損部の骨修復について  $\mu$ CT にて解析を行った結果を以下に示す。

(3) 増殖した毛包内神経堤由来幹細胞含有コラーゲンゲルの移植

増殖した毛包内神経堤由来細胞をコラーゲンコートディッシュ上で MEM+10%血清 MEM+10%血清+BMP-2(200ng/ $\mu$ l) の条件で、5日間培養した。培養 5 日後、細胞を回収し、頭蓋骨

欠損部に各細胞を移植した。

μCT による観察の結果、移植後 4 週目では、どのマウス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を認めなかった(図 1a)。12 週目においても各マウスにおいて観察を行ったが、同様の結果であった(図 1b)。

(4) 増殖した毛包内神経堤由来幹細胞含有細胞シートの移植

増殖した毛包内神経堤由来細胞を細胞シート作成用 *UpCell* 3.5cm ディッシュに  $5 \times 10^4$  cells 播種し、

MEM+10%血清 MEM+10%血清+BMP-2(200ng/μl)の条件で、コンフルエントになるまで培養(14日間)した。

コンフルエントになった細胞シート(図 2a)を回収し、頭蓋骨欠損部に移植した。移植後 6 週目に μCT にて観察を行った。

μCT による観察の結果、移植後 6 週目では、どのマウス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を認めなかった(図 2b)。

(5) 増殖した毛包内神経堤由来幹細胞が分化した骨芽細胞によって形成された石灰化物を含む凍結乾燥スポンジの移植

増殖した毛包内神経堤由来細胞を 6 cm コラーゲンコートディッシュ上で MEM+10%血清 MEM+10%血清+BMP-2(200ng/μl)+石灰化培地(アスコルビン酸+β-グリセロリン酸+デキサメタゾン)の条件で、5週間培養した。5週間後、cell scraper にてディッシュ上の石灰化物を剥がして回収(コントロールとして MEM+10%血清にて培養した細胞を同様に剥がして回収)した。石灰化物含有凍結乾燥スポンジを作成し、頭蓋骨欠損部に移植した。移植後 2 週目と 4 週目と 6 週目に μCT にて観察を行った。

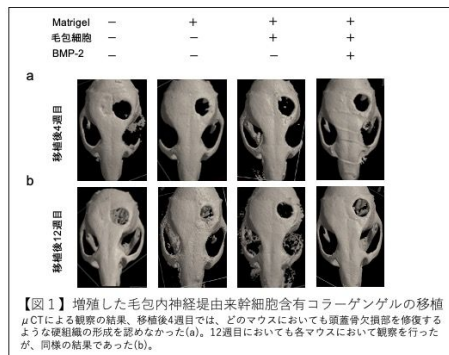
毛包内神経堤由来細胞は、石灰化誘導培地にて培養すると石灰化物を形成し、35 日目にはディッシュ全面を覆う石灰化物の形成が確認された(図 3a)。

μCT による観察の結果、移植後 2 週間目(図 3b 上段)、欠損部に硬組織が形成される様子はどれも認めなかったが、毛包細胞のみを回収した群と毛包細胞由来石灰化物含有コラーゲンスポンジを移植した群では、欠損部周囲と上方に硬組織の存在を認めた。しかし、両者に大きな変化は認められなかった。

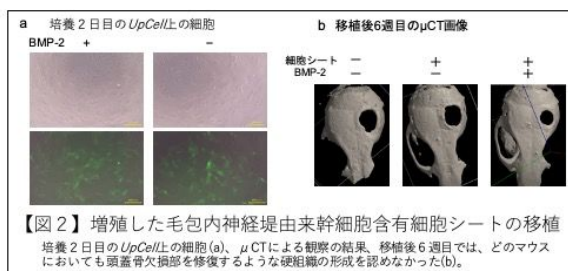
移植後 4 週間目(図 3b 中段)、2 週間目に認められた欠損部上方の硬組織は存在しなかったが、欠損部周囲にはスポンジのみ移植した群に比較して硬組織が存在し、周囲の厚みが増している様子が確認された。しかし、欠損部を架橋するような骨の形成は認めなかった。

移植後 6 週間目(図 3b 下段)においても石灰化物含有スポンジを移植した群では、周囲の骨組織が厚みのある形態であることが観察された。また、6 週目のマウスの凍結乾燥スポンジのみ移植した群において、欠損部を架橋するような骨の形成を認めた。

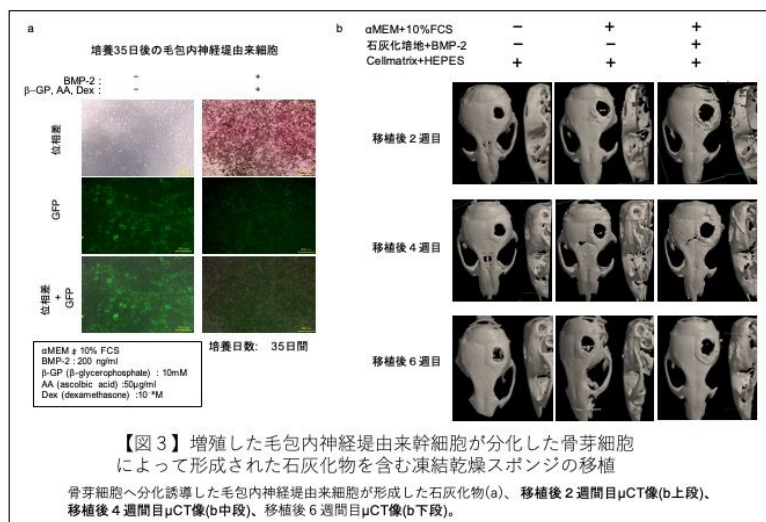
以上の結果から、増殖した毛包の神経堤由来幹細胞が頭蓋骨欠損部を修復する結果を得ることが出来なかったが、移植の足場は 3 種類の中で凍結乾燥したコラーゲンスポンジが有用である可能性が示唆された。



【図 1】増殖した毛包内神経堤由来幹細胞含有コラーゲンゲルの移植 μCT による観察の結果、移植後 4 週目では、どのマウス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を認めなかった(a)、12 週目においても各マウスにおいて観察を行ったが、同様の結果であった(b)。



【図 2】増殖した毛包内神経堤由来幹細胞含有細胞シートの移植 培養 2 日目の *UpCell* 上の細胞(a)、μCT による観察の結果、移植後 6 週目では、どのマウス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を認めなかった(b)。



【図 3】増殖した毛包内神経堤由来幹細胞が分化した骨芽細胞によって形成された石灰化物を含む凍結乾燥スポンジの移植

骨芽細胞へ分化誘導した毛包内神経堤由来細胞が形成した石灰化物(a)、移植後 2 週間目 μCT 像(b 上段)、移植後 4 週間目 μCT 像(b 中段)、移植後 6 週間目 μCT 像(b 下段)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takizawa H, Karakawa A, Suzawa T, Chatani M, Ikeda M, Sakai N, Azetsu Y, Takahashi M, Urano E, Kamijo R, Maki K, Takami M.	4. 巻 146
2. 論文標題 Neural crest-derived cells possess differentiation potential to keratinocytes in the process of wound healing.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomed Pharmacother	6. 最初と最後の頁 112593
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2021.112593.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Osawa T, Yamamori S, Urano E, Iwasa K, Baba K.
2. 発表標題 Mirror-polished surface of Ceria-Stabilized Zirconia/Almina Nanocomposite enhanced the adhesion strength of human gingival fibroblasts.
3. 学会等名 Academy of osseointegration 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大澤昂史, 山森庄馬, 浦野絵里, 岩佐文則, 馬場一美
2. 発表標題 ヒト歯肉線維芽細胞のCe-TZP/Al2O3に対する付着力の定量的評価
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第132回記念学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 瀧澤秀臣, 唐川亜希子, 須澤徹夫, 茶谷昌宏, 池田めぐみ, 坂井信裕, 畔津佑季, 高橋正皓, 浦野絵里, 上條竜太郎, 横 宏太郎, 高見正道
2. 発表標題 神経堤由来細胞は創傷治癒過程においてケラチノサイトへの分化能を有する
3. 学会等名 第7回日本骨免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamamori S, Osawa T, Urano E, Matsumoto T, Hara M, Iwasa F, Baba K.
2. 発表標題 Effect of surface roughness of Ceria-Stabilized Zirconia/Almina Nanocomposites on adhesion of mouse gingival junctional epithelial cells.
3. 学会等名 Academy of osseointegration 2024
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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