

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32710

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670836

研究課題名(和文)臍帯由来間葉系細胞中Muse細胞の特性解析と歯周組織再生医療応用への展開

研究課題名(英文)An analysis of the characteristics of Muse cells in mesenchymal cells obtained from umbilical cords, and the development of periodontal regenerative therapy applications

研究代表者

金指 幹元 (KANAZASHI, Mikimoto)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：80339811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト葉系組織中に多分化能を有するものの、造腫瘍性を持たないMuse細胞が報告された。本研究では医療廃棄物である臍帯組織中のMuse細胞とゼラチンハイドロゲルを用いた組織工学的歯周組織再生療法開発を目指した。

我々の過去に報告した方法で臍帯より細胞を得て、それを東北大学大学院医学系研究科細胞組織学分野のプロトコルに従いSSEA-3、CD105でソーティングした結果、臍帯組織に多分可能を有するMuse細胞は認められた。またゼラチンハイドロゲルはヒト臨床研究の結果その有効性が示された。本研究は鶴見大学歯学部倫理審査委員会の承認のもと行った(受付番号：1203号)

研究成果の概要(英文)：It has been reported that human stem tissues contain Muse cells, which have multilineage potential but do not have neoplasm generating characteristics. The purpose of this study is the development of tissue-engineering, periodontal regenerative therapy by using Muse cells in umbilical cord tissue, which is medical waste, and a gelatine hydrogel.

As a result of sorting the cells, which were obtained from an umbilical cord by a method that we have reported on in the past, using SSEA-3, CD105 according to cytohistology protocols at the Graduate School of Medicine, Tohoku University, it was observed that the umbilical cord tissue had Muse cells with multilineage potential. In addition, the effectiveness of a gelatine hydrogel was confirmed as a result of human clinical studies. This study was performed under the authorization of the ethical review committee of the Faculty of Dentistry, Tsurumi University (receipt number: No.1203).

研究分野：歯周組織再生

キーワード：Muse細胞 臍帯 臍帯由来間葉系細胞 歯周組織再生 再生医学・医療 歯学 再生医工学 ゼラチンハイドロゲル

1. 研究開始当初の背景

現在臨床研究されている自己細胞を用いた歯周組織再生療法は、骨髄、歯根膜、歯肉、骨膜などその“細胞ソース(源)”を得るために身体に大きな侵襲が加わるという欠点がある。

研究代表者はトロント大学に留学し医療廃棄物である“臍帯”に注目し、すでに科学研究費補助金・若手研究(B)(19791625:研究代表者)において臍帯由来間葉系細胞の基本特性は解析し報告した。また科学研究費補助金・基盤研究(C)(22592200:研究代表者)において臍帯由来間葉系細胞の骨分化誘導に対する細胞内シグナル伝達についても報告した。

しかし臍帯より得られる細胞は単一の細胞種ではなく複数の種類の細胞から構成されるため、分化誘導に際して同一の安定した結果が得られなかった。そこで近年報告された Muse 細胞(Multilineage-differentiating stress enduring)に着目し、臍帯より体性幹細胞としての Muse 細胞を用いた歯周組織再生療法開発を計画した。

また組織工学的歯周組織再生療法を考えた場合、細胞、足場、成長因子の3大因子が必要であるため、今回足場材料としてゼラチンに着目した。すなわち我々はウシ皮を強アルカリ、高温処理する事で抽出、精製される高度精製品であり生物由来原料基準の適用対象外となっている“ゼラチン”に着目した。

本ゼラチンはすでに特殊処理することで2週間にわたり持続的に多血小板血漿中の各成長因子を放出(徐放化)可能なゼラチンハイドロゲルを調整し、歯周組織再生に関する臨床研究を行ったものと同等の物を使用した。

2. 研究の目的

近年、ヒト間葉系組織、間葉系培養細胞において多分化能を有するが腫瘍性を持たない Muse 細胞が報告された。我々もすでに予備的検討から、臍帯由来間葉系細胞および歯周組織関連細胞(歯肉、歯根膜および歯髄細胞)中に一定程度の Muse 細胞の存在を確認している。

本研究は、医療廃棄物であり身体への侵襲を加えることなく得られ、その有用性が期待される臍帯より Muse 細胞を分離・培養を行い、Periodontal Tissue Engineering(歯周組織工学)の技法を応用することで、現在臨床応用されている歯周組織再生療法では対応が不可能な重度の歯周疾患、および水平的欠損などへの適応拡大を目指し新規歯周組織再生療法へ展開することを最終目標とする。すなわち細胞源として Muse 細胞、足場

としてゼラチンハイドロゲルを用いた組織工学を用いた。

3. 研究の方法

<平成 25 年度>

本研究は鶴見大学歯学部倫理審査委員会の審査と承認(受付番号1112)のもとに行った。臍帯は連携医療機関より臍帯を受け入れ我々の方法(日歯保誌 51:25-32,2010)に従った方法(以下1st.)。さらにそれを改良した frozen vessel explant(以下2nd.)、そして臍帯をすべて細切する(以下full explant)初代臍帯由来間葉系細胞を得た。同様に歯周組織関連細胞は脱落歯(乳歯)さらには矯正学見地から便宜抜歯された“歯”より、それぞれ目的とする歯根膜組織、歯髓組織を Gronthos S(J Bone Miner Res. 18:696-704, 2003)らの方法に準じ酵素処理する事で得た。

これら各初代細胞を通常培養し、3~6継代の細胞から Muse 細胞に関する各種プロトコールに準じて染色、ソーティングを行い96ウェルプレートにシングル細胞で播種した。

(<http://www.stemcells.med.tohoku.ac.jp/protocol/index.html>)

臍帯組織は7検体(1st=2、2nd =3、full explant=2)、歯髓組織は6検体、歯根膜組織は3検体についてSSEA-3、CD105ダブルポジティブの陽性率、5~10日後のクラスター形成率を求めた。このうち歯根膜と歯髓の3検体は同一検体より得られた細胞であった。

またゼラチンは臨床研究で用いているハイドロゲルをスポンジ状、粒径を3種類にすることに決定した。

<平成 26 年度以降>

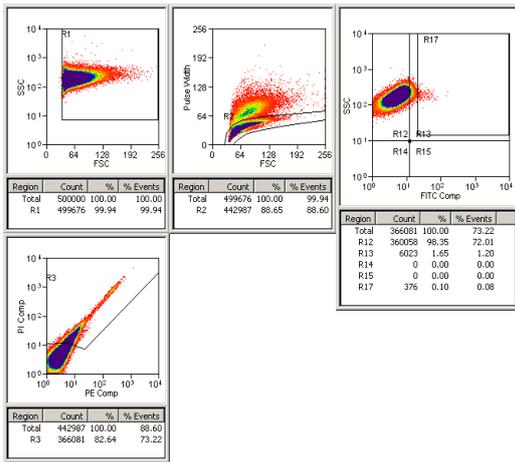
平成25年度の結果から臍帯よりSSEA-3陽性率が高くとれる初代細胞取得方法がfull explantであったので、2検体についてSSEA-3、CD105ダブルポジティブの陽性率、5~10日後のクラスター形成率を調べた。その後分子生物学的に3胚様分化を確認した。

さらにセルソーターを用いず、磁気ビーズを用いた Muse 細胞の採取方法も確立した。

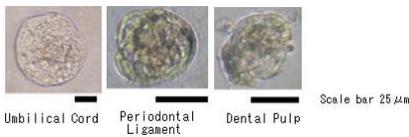
また3種類のゼラチン粒子を用いて Live/Dead assay を計画した。

4. 研究成果

臍帯組織から CD105、SSEA-3 ダブルポジティブの初代細胞を得るためには full explant の方法で最も効率よく得られる事が判明したため本研究では臍帯組織より初代細胞を得る方法にこれを用いた。



横浜市立大学臓器再生医学講座にてセルソーティングを行った。



ソーティング後ポリヘマコーティングした96ウェルプレートにシングルセルで播種、5~10日後に臍帯、歯根膜、歯髄組織由来細胞から観察できたのクラスター形成。

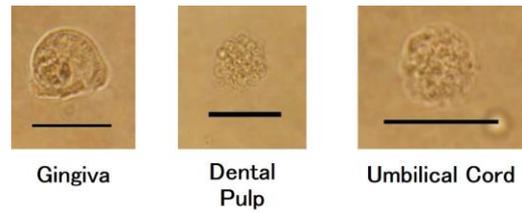
臍帯組織は2検体、歯髄組織は6検体、歯根膜組織は3検体について SSEA-3, CD105 ダブルポジティブの陽性率、5~10日後のクラスター形成率を求めた。このうち歯根膜と歯髄の3検体は同一検体より得られた細胞であった。

臍帯 MSC の SSEA-3 陽性率 0.54±0.02
 クラスター形成率 0.22±0.01
 歯根膜 MSC の SSEA-3 陽性率 0.40±0.22
 クラスター形成率 51.5±14.5
 歯髄 MSC の SSEA-3 陽性率 0.98±0.89
 クラスター形成率 21.0±4.7
 であった。

さらに磁気ビーズ法によってもクラスター形成を確認した。



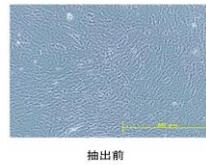
ミルテニー社製磁気細胞分離キット



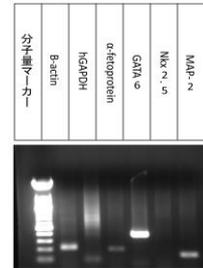
磁気分離法により形成されたクラスター（歯肉、歯髄、臍帯組織由来。スケールバーは25 μm）

3胚葉分化を RT-PCR にて確認したところ、ソーティングしていない細胞においても3胚葉分化が観察されたため、東北大学のプロトコルに記載されている市販の細胞（正常ヒト骨髄細胞、正常ヒト皮膚線維芽細胞）をコントロールに同様なソーティングを行ったところ両者でもソーティング無しでも3胚葉分化を確認した。

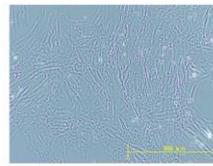
C30(臍帯) P5 nonsorting



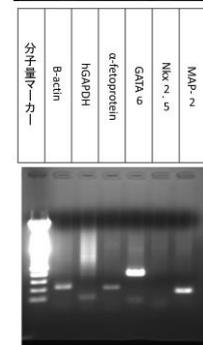
抽出前



LONZA-BMMSC P3 nonsorting



抽出前



LONZA-NHDF P7 nonsorting

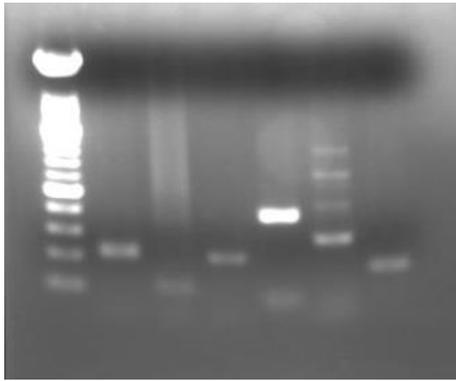


抽出前



上段より、臍帯、市販の正常ヒト骨髄細胞、正常ヒト皮膚線維芽細胞の RT-PCR の結果

そこで、研究分担社出澤真理教授と検討を重ね、プライマーの設計をしたところ、上記の事象は無くなり、臍帯組織中、歯周組織関連細胞中に3胚葉へ分化する Muse 細胞が存在することを証明できた。



プライマー設計変更後の RT-PCR

左から ACTB、GAPDH、AFP、GATA6、Nkx2.5、MAP-2

このようにソーティングを行わない細胞でも3胚葉分化が確認されたため、改善するまでに時間を要してしまい、ゼラチンハイドロゲルとのLive dead assayは行うことができなかった。

しかしながら、ゼラチン粒子の調整、 β TCP含有ゼラチンスポンジを形成することはできた。



β TCP 含有ゼラチンスポンジ



粒径 $20\mu\text{m}$ 以下、 $20\sim 32\mu\text{m}$ 、 $32\sim 53\mu\text{m}$ に調整されたゼラチンハイドロゲル

また、本研究結果の一部を日本歯科保存学会にて発表した結果、優秀ポスター賞を受賞することができた。

現在も本研究は進行中であり、医療廃棄物という新たな細胞源から第3の幹細胞、すなわちES細胞、iPS細胞に変わるMuse細胞の有用性を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① 金指幹元、宮本正章、長野孝俊、日下輝雄、田畑泰彦、五味一博
「薬物送達システム徐放化多血小板血漿を用いた歯周組織再生療法の確立と安全性検証」
2014年：臨床薬理の進歩 2014：138～147

〔学会発表〕(計6件)

- ① 船津太一郎、金指幹元、松島友二、五味一博
「磁気細胞分離法により得られた臍帯組織中 Muse 細胞の発現」
2015年5月14日～15日：第58回春季日本歯周病学会学術大会幕張メッセ（千葉県・千葉市）
- ② 金指幹元
「DDS-PRPを用いた歯周組織の再生」(招待講演)
2014年12月6日：第4回DDS再生医療研究会東京歯科大学生命歯学部100周年記念館（東京都・千代田区）
- ③ 金指幹元
「薬物送達システム徐放化多血小板血漿を用いた歯周組織再生療法の確立と安全性検証」(招待講演)
2014年11月11日：第7回臨床薬理研究振興財団研究大賞受賞式クラブ関東（東京都・千代田区）
- ④ 金指幹元、出澤真理、若尾昌平、船津太一郎、松島友二、長野孝俊、日下輝雄、五味一博
「種々のヒト間葉系組織から得られる Muse 細胞の発現」優秀ポスター賞受賞
2014年10月30日～31日：第141回日本歯科保存学会秋季学術大会山形テルサ（山形県・山形市）
- ⑤ 金指幹元、宮本正章、日下輝雄、長野孝俊、松島友二、白川 哲、田畑泰彦、五味一博
「薬物伝達システム徐放化多血小板血漿を用いた歯周組織再生療法の確立」
2014年4月5日：第13回日本再生医療学会総会京都国際会館（京都府・京都市）
- ⑥ 金指幹元
「ゼラチンハイドロゲル徐放化多血小板血漿による歯周組織再生の現状と骨造成の可能性」(招待講演)
2014年3月27日：International them for implantology 第1回 SC 横浜 鶴見大学（神奈川県・横浜市）

5. 研究組織

(1) 研究代表者

金指 幹元 (KANAZASHI, Mikimoto)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号：80339811

(2) 研究分担者

田畑 泰彦 (TABATA, Yasuhiko)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：50211371

出澤 真理 (DEZAWA, Mari)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50272323