

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463001

研究課題名(和文)動物因子不含ヒト歯髄由来細胞を用いた脊髄損傷治療モデルの作成

研究課題名(英文)Evaluation of animal-free systems in human dental pulp cells using a spinal cord injury model

研究代表者

川口 知子(武田知子)(Kawaguchi, Tomoko)

岐阜大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30509815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまで我々が樹立したヒト歯髄由来細胞(DPC)は、ウシ血清(FBS)が含まれた培地で培養していた。そのためFBS由来のプリオンや外来微生物による汚染は否定できなかった。そこで、動物由来物質・因子を使わない条件を模索してDPCを樹立し、iPS細胞への誘導についても検討した。近年、脊髄損傷モデル動物の損傷部位に細胞を移植すると運動機能を改善することが報告された。我々は独自に検討を重ね、塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF2)で処理したFBSを使用しない条件下で樹立したDPCの移植により脊髄損傷後の運動機能改善効果が認められることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Human dental pulp cells (hDPC) are a promising resource for regenerative medicine and tissue engineering. However, current protocols use reagents of animal origin (mainly fetal bovine serum) that carry the potential risk of infectious diseases and unwanted immunogenicity. Here, we report a chemically defined protocol to isolate and maintain the growth and differentiation potential of hDPCs. The chemically defined culture conditions can be used for the safe establishment of iPSCs and will find utility in applications for cell-based regenerative medicine.

The central nervous system in adult mammals cannot be repaired spontaneously after spinal cord injury (SCI). However, SCI treatment has improved in recent years following the development of cell transplantation therapy. We recently found that basic fibroblast growth factor (FGF2)-pre-treated hDPCs cultured under chemically defined conditions can improve recovery in rat SCI models.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生歯学

1. 研究開始当初の背景

「智歯歯胚からの組織幹細胞の樹立と分化・増殖能の評価」(2006-7年度、萌芽研究)の支援を受け、抜歯後の智歯より250ラインのヒト歯髄由来細胞(Dental Pulp Cells: DPC)を樹立・保有し、個体差の検討を行った。その結果、発生状態が未熟な形成期から得られるDPCは、高い増殖能・分化能を持つが、継代培養により喪失することを示した(Takeda et al. J Dent Res. 2008)。

そして、「ヒト歯髄組織幹細胞の樹立効率向上とiPS細胞化の検討」(2008-9年度、若手研究(スタートアップ))の支援を受け、DPCは低酸素・低密度で培養することでコロニー形成能・増殖能が上がることを明らかにし、今まで樹立が困難であった高齢者からの樹立効率を向上させた(Iida et al. Arch. Oral Biol. 2010)。更には、京都大学山中研究室と共同で、DPCからiPS細胞誘導を試み、iPS細胞の源として活用可能であることを示した(Tamaoki et al. J Dent Res. 2010)。

しかしながら、これらの研究には、細胞の増殖を良好にするためウシ血清を添加して行っている。ウシ血清の使用は、感染リスク、すなわちプリオンや病原性ウイルス等が存在する危険性があるなどの問題が存在している。そこで我々は「動物由来物質・因子を使わない安全なヒト歯髄由来幹細胞の樹立とiPS細胞化の検討」(2010-12年度、基盤研究(C))の支援を受け、通常培養(10%ウシ血清含有)とアニマルフリー培養の増殖能・分化能を比較した。

2. 研究の目的

我々が保有するDPCはウシ血清を添加して樹立・培養を行っている。ウシ血清の使用は、感染リスク(プリオンや病原性ウイルス等)が存在する危険性があるなどの問題が存在している。我々はより安全な動物由来の物質・因子を使わない『アニマルフリー』でのDPCの樹立および安全性について検討する。近年、DPCを移植して、ラット脊髄損傷に伴う運動障害が著明に回復したとの報告がある。そこで、本研究では、再生医療に活用可能なアニマルフリーでのDPCおよびiPS細胞の大量培養法を確立する。アニマルフリーDPCを脊髄損傷動物モデルに用いることで、さらに安全な機能回復を目指す。

3. 研究の方法

(1)岐阜大学医学部附属病院にてインフォームド・コンセントを得て抜歯された智歯より血清含有培地および無血清培地を用いて樹立したDPCの細胞増殖能・分化能および遺伝子発現を比較する。また無血清培地を用いて樹

立したDPCからiPS細胞を誘導し、性状解析を行う。

(2)無血清培地で樹立したDPCの細胞性質および安全性(ウシ血清由来プリオンや外来微生物(病原性ウイルス、マイコプラズマ等)の汚染の有無の検出や染色体異常の有無など)を確認する。

(3)血清含有培地で樹立したDPCの移植により脊髄損傷後の運動機能改善効果が認められることが確認できているので、無血清培地で樹立したDPCをラット脊髄損傷モデルに移植し、神経損傷による運動機能のさらに安全な回復の検証を行う。

4. 研究成果

(1)アニマルフリー条件下でのDPC樹立およびiPS誘導

通常培養(10%ウシ血清含有;MSCGM)とアニマルフリー培養(MSCGM-CD)の増殖能・分化能を比較した。結果は初代培養のコロニー形成率は通常培養で有意に高かったが、長期継代培養では、どちらも高い増殖能を示し、分化能も維持されていることがわかった。一方iPS細胞誘導効率には差がみられなかった。これらの検討により、ヒトDPCの樹立にはウシ血清含有培地のほうが優れていたが一旦樹立してしまえばアニマルフリーでの培養、iPS細胞誘導が充分可能であることを見いだした。

(Takeda-Kawaguchi et al. Plos One 2014)。

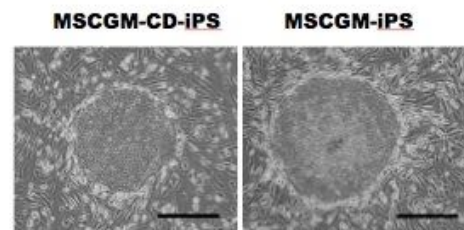


図1 樹立したiPS細胞

(2)アニマルフリーで樹立したDPCの細胞性質および安全性の検討

MSCGMとMSCGM-CD培養したDPCの遺伝子発現をDNA Arrayを用いて比較したところ、発現遺伝子のパターンの大きな違いが見られたが、embryonic stem cell markersの発現パターンは類似していた。MSCGM-CD培養したDPCおよびiPS細胞で染色体異常はみられなかった。

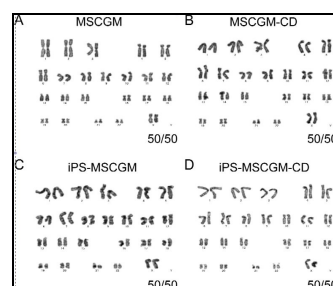


図2 染色体解析

(3) 血清含有培地で培養した DPC と同様に無血清培地で培養した DPC の移植により脊髄損傷後の運動機能改善効果が認められることが確認できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Tomoko Takeda-Kawaguchi, Ken Sugiyama, Shunji Chikusa, Kazuki Iida, Hitomi Aoki, Naritaka Tamaoki, Daijiro Hatakeyama, Takahiro Kunisada, Toshiyuki Shibata, Noemi Fusaki, Ken-ichi Tezuka: Derivation of iPSCs after Culture of Human Dental Pulp Cells under Defined Conditions, PLOS ONE.9(12):e115392.2014.査読有

Naritaka Tamaoki, Kazutoshi Takahashi, Hitomi Aoki, Kazuki Iida, Tomoko Kawaguchi, Daijiro Hatakeyama, Masatoshi Inden, Naoyuki Chosa, Akira Ishisaki, Takahiro Kunisada, Toshiyuki Shibata, Naoki Goshima, Shinya Yamanaka, and Ken-ichi Tezuka The homeobox gene DLX4 promotes generation of human induced pluripotent stem cells, Sci Rep.4: 10.1038/srep07283.2014.査読有

[学会発表](計9件)

杉山健、飯田一規、川口 知子、畠山大二郎、柴田敏之他；脊髄損傷モデルラットにおけるFGF2処理ヒト歯髄細胞移植の回復促進効果：細胞・FGF2単独投与との比較；第16回日本再生医療学会総会；2017年03月07日；宮城

杉山健、川口 知子、手塚建一；FGF2処理ヒト歯髄細胞移植の回復促進効果：細胞・FGF2単独投与との比較；第17回運動器科学研究会；2016年09月02日；大阪
杉山健、飯田一規、川口 知子、畠山大二郎、柴田敏之；脊髄損傷治療を目的としたヒト歯髄細胞のFGF2に対する個人差の検討；第70回日本口腔科学学会学術集会；2016年04月16日；福岡

杉山健、飯田一規、川口 知子、畠山大二郎、柴田敏之他；脊髄損傷治療を目的としたヒト歯髄細胞のFGF2に対するドナー個人差の検討；第15回日本再生医療学会総会；2016年03月17日；大阪

杉山健、飯田一規、川口 知子、畠山大二郎、柴田敏之他；脊髄損傷治療を目的としたヒト歯髄細胞のbFGFに対する応答性のお検討；第60回日本口腔外科学会総会・学術大会；2015年10月16日；愛知
杉山健、川口 知子、手塚 建一；脊髄損傷治療を目的としたヒト歯髄細胞のbFGFに対する応答性のお検討；第16回運動器科学研究会；2015年09月11日；鹿児島
杉山健、川口 知子、手塚 建一；脊髄損傷治療を目的としたヒト歯髄細胞のbFGFに対する応答性のお検討；第33回日本骨代謝学会学術集会；2015年07月23日；東京

杉山 健、飯田 一規、川口 知子、畠山 大二郎、柴田 敏之他；脊髄損傷ラットを用いたヒト歯髄細胞移植におけるドナー個人差の検討；第59回日本口腔外科学会総会；2014年10月17日；千葉

千種 俊士、川口 知子、手塚 建一；Zinc Finger Nucleaseを用いたヒト歯髄細胞におけるHLA-A2の遺伝子改変；第32回日本骨代謝学会学術集会；2014年07月24日；大阪

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

川口 知子(KAWAGUCHI TOMOKO)
岐阜大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：30509815

(2)研究分担者

柴田 敏之(SHIBATA TOSHIYUKI)
岐阜大学・医学(系)研究科・教授
研究者番号：50226172

畠山 大二郎(HATAKEYAMA DAIJIRO)
岐阜大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60377653

飯田 一規(IIDA KAZUKI)
岐阜大学・医学(系)研究科・助教
研究者番号：30585237

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし