

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 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：2014～2015

課題番号：26893273

研究課題名(和文)顎裂部骨移植に代わる神経堤由来細胞による新規顎裂部細胞移植療法の開発

研究課題名(英文)Development of new cell transplantation therapy for cleft alveolar bone

研究代表者

高橋 正皓(TAKAHASHI, MASAHIRO)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：10736713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：成体P0-Cre/CAG-CAT-EGFPマウスの鼻甲介から神経堤由来細胞を分離し、骨芽細胞分化誘導培地を用いて、骨芽細胞への分化誘導を行った。分化誘導した細胞における骨芽細胞誘導・石灰化能を、アルカリホスファターゼ活性染色、アリザリンレッド染色やReal-time PCR法を用いて評価を行った。各種解析から、骨芽細胞への分化誘導能を確認した。また、脂肪細胞分化誘導培地を用いて、脂肪細胞への分化誘導を行った。オイルレッドO染色の結果から、脂肪細胞への分化誘導能を確認した。以上の結果から、鼻甲介から採取した神経堤由来細胞は、多分化能を有する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We isolated neural crest-derived cells from nasal concha of adult P0-Cre/CAG-CAT-EGFP mice and cultured in adhesive cell-culture plates in the presence of BMP-2, an inducer of osteoblastic differentiation. We confirmed osteoblastic differentiation using alkaline phosphatase activity staining, alizarin red staining and real-time PCR analysis. Also, lipid droplets were observed in adipogenic stimulated cultures using oil red O staining. From the above mentioned results, it is suggested that neural crest-derived cells isolated from nasal concha of adult P0-Cre/CAG-CAT-EGFP mice were multipotent and capable of differentiating osteoblasts and adipocytes.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：神経堤由来細胞 硬組織再生 細胞移植

### 1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂患者は、日本において約 1/500 の確率で発生する非常に頻度の高い先天性疾患である。この唇顎口蓋裂の治療においては、口唇形成術、口蓋形成術及び就学前後の顎裂部骨移植術を必要とし、歯槽骨の連続性を保つまでに、最低3度もの手術を経験しなければならない。特に顎裂部骨移植術においては、生体材料として自家骨の腸骨を採取し裂部への補填を行うため、侵襲に関する議論が現在もなされている。

唇顎口蓋裂患者の多くは鼻疾患を併発し、その原因である鼻中隔の湾曲や、鼻甲介の易感染による肥厚、下鼻甲介の下垂を認めることから、鼻甲介の切除が提唱されている。切除される鼻甲介には神経堤由来細胞が局在しており、多分化能を持つ細胞であることも既に明らかとなっている。

### 2. 研究の目的

本研究は、唇顎口蓋裂患者の顎裂部骨移植術に代わる新たな細胞移植療法開発のため、成体顎下腺組織や鼻甲介等に存在する神経堤由来細胞を高純度に分離・回収後、骨芽細胞へ分化誘導して骨組織再生を図ることを目的とする。申請者は、先行研究として成体マウス顎下腺から初めて神経堤由来細胞を分離し、それらの神経堤由来細胞で特徴的に発現している数種類の遺伝子を同定した。本研究は、成体の顎下腺や鼻甲介等に存在する神経堤由来細胞を高純度に分離・回収し、純化した細胞から骨芽細胞への分化誘導、さらに骨欠損モデルマウスに、誘導した骨芽細胞を移植して骨組織再生能について評価する。

### 3. 研究の方法

#### 遺伝子改変動物

神経堤由来細胞が緑色蛍光を発する成体の遺伝子改変マウス[P0-Cre/CAG-CAT-EGFP Tg. マウス] (以下 P0 マウス)を用いた。神経堤細胞のマーカールとして知られているミエリンタンパク質ゼロ(P0)は、胎生初期の神経堤

細胞で一過性に発現し、その後消失する。本マウスは、成体における神経堤由来細胞を解析するため Cre-loxp システムを応用し、P0プロモーター下で Cre が発現するマウスと、floxP 下流に EGFP を配したマウスを交配し、胎生期一次的に P0 を発現した神経堤由来細胞が、出生後も GFP によって緑色蛍光を発する遺伝子改変マウスである。

#### 細胞の培養と分化誘導

- ・成体 P0 マウスの顎下腺と鼻甲介から採取した神経堤由来細胞を培養により増殖させる。
- ・顎下腺と鼻甲介の神経堤由来細胞を分化誘導し、多分化能を解析する。
- ・マウス頭蓋骨部分欠損に対して神経堤由来細胞を移植し、骨誘導能を確認する。

#### 神経堤由来細胞の培養及び誘導条件

##### 培養条件

マウス頭蓋骨を矢状断にし、顎下腺と鼻甲介より細胞を採取した。

採取した細胞は 0.05% Collagenase A (Roche 社)により消化した。

6 cm Collagen-Coated Dish にて後述する SFM 培地を用いて 1 週間培養し、継代した。

継代時に 10 cm Collagen-Coated Dish に変更し 4 日目まで培養した。

##### 誘導条件

培養した NCDCs を 96well Collagen-Coated plate を用い、後述の誘導培地にて最大 21 日間誘導した。

##### 採取細胞の培養培地

SFM: Sphere-forming medium

hEGF:20ng/ml, bFGF:20ng/ml, B27®(Invitrogen)を含んだ D-MEM/Ham 's F12

##### 骨芽細胞への分化誘導培地

ODM : Osteoblast differentiation medium  
-glycerol phosphate 10mM, ascorbic acid  
0.5mM,  $10^{-8}$ M dexamethasone を含んだ 10%FBS  
含有 -MEM

ODM+BMP-2 : 上記 ODM に 200ng/ml の hBMP-2  
を添加。

脂肪細胞への分化誘導培地

ADM : Adipogenic differentiation medium  
Dexamethasone  $10^{-6}$ M, insulin  $2 \times 10^{-6}$ M,  
3-isobutyl-1-methylxanthine  $5 \times 10^{-4}$ M,  
Indomethacin  $2 \times 10^{-4}$ M を含んだ 10%FBS 含有  
D-MEM/Ham 's F12

Scaffold

コラーゲンスポンジ

ウシ真皮由来 型コラーゲンを凍結乾燥し  
たスポンジ状の足場である。

頭蓋骨部分欠損マウスを用いた In vivo 試験  
ICR 系マウスの 5 週齢を用いる。

ソムノペンチル®の腹腔麻酔による全身  
麻酔下で、頭蓋骨を部分的に露出させる。

内径 4 mm のトレフィンバーを用いて、側  
頭骨に部分的な欠損を作成する。

欠損部には以下の 3 種類のアプローチで  
行う。

- ・何も填入しない群
- ・スキャフォールドのみ填入する群
- ・細胞を播種させたスキャフォールドを填入  
する群

頭皮は縫合により閉鎖する。

1 週間ごとに  $\mu$ CT 画像を撮影し、6 週間目  
を最終分析とし評価する。

#### 4 . 研究成果

成体 P0 マウスの鼻甲介から採取した神経  
堤由来細胞の培養

採取した神経堤由来細胞の SFM による培養経  
過では、継代後 4 日目において、ほとんど全  
ての細胞が GFP 陽性であることを認めた。

鼻甲介から採取した神経堤由来細胞の分  
化誘導

BMP-2 を添加し培養した群は、20 日目におい  
て、ALP 染色陽性およびアリザリンレッド染  
色陽性の骨芽細胞様細胞を認めた。オイルレ  
ッド 0 染色においては 21 日目に、細胞質内  
の脂肪滴が陽性を示したことから、脂肪細胞  
様細胞へ誘導された。コントロール群はとも  
に陰性であった。

マウス頭蓋骨部分欠損モデルの  $\mu$ CT 解析  
部分欠損のまま閉鎖した群とコラーゲンス  
ポンジを移植した群とを比較すると、術後 2  
週間において、わずかではあるが、コラーゲ  
ンスポンジを移植した群では、部分的に骨様  
組織の形成が進行した。

#### 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 1 件)

高橋正皓, 小野美樹, 須澤徹夫, 吉田寛,  
宇山理紗, 榎宏太郎, 上條竜太郎: 口腔顎顔  
面領域に存在する神経堤由来細胞の成体にお  
ける分布と細胞分化能 新しい骨再生療  
法の提案

口腔組織培養学会誌, 24(2):1-8, 2015

(査読: 有)

[学会発表](計 3 件)

須澤徹夫, 高橋正皓, 小野美樹, 浦野絵里,  
高見正道, 山田篤, 宮本洋一, 馬場一美, 榎  
宏太郎, 上條竜太郎: 顎口腔組織の神経堤由  
来細胞を応用した骨再生法の開発, 昭和大学  
歯学部文部科学省私立大学戦略的研究基盤  
形成支援事業 平成 26 年度シンポジウム  
プログラム・抄録集, p57, 品川, 2015

高橋正皓, 須澤徹夫, 山田篤, 上條竜太  
郎: 成体マウス顎下腺における神経堤由来細  
胞の解析, 第 32 回日本骨代謝学会学術集会  
抄録集, 273, 大阪, 2014

高橋正皓, 須澤徹夫, 山田篤, 山口徹太郎,  
榎宏太郎, 上條竜太郎: 成体マウス顎下腺か  
ら分離した神経堤由来細胞の解析, 第 51 回  
日本口腔組織培養学会学術大会, 福岡, 2014

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 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 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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 正皓

昭和大学歯学部歯科矯正学講座 助教

研究者番号: 10736713

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

上條 竜太郎

昭和大学歯学部口腔生化学講座 教授

研究者番号: 70233939

須澤 徹夫

昭和大学歯学部口腔生化学講座 講師

研究者番号: 60271285