

201006015A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

歯髄幹細胞の神経分化能の検証とその治療応用

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 上田 実

平成23(2011)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

- 歯髄幹細胞の保存・バンキング法の最適化に関する研究----- 1
研究代表 上田 実／研究協力 梅村 恵理

II. 分担研究報告

1. 歯髄幹細胞移植による脊髄損傷治療に関する研究----- 4
研究分担 山本朗仁／研究協力 酒井 陽
2. 細胞移植を伴わない、歯髄幹細胞の無血清培養上清を用いた
脊髄損傷治療に関する研究----- 7
研究分担 山本朗仁／研究協力 松原 弘記
3. 歯髄幹細胞の分化誘導と神経疾患モデルへの移植に関する研究---- 12
研究分担 山本朗仁／研究協力 中村 祥子
4. 歯髄幹細胞移植による脳室周囲白質軟化症治療に関する研究----- 20
研究分担 山本朗仁／研究協力 山形 まり

III. 研究成果の刊行物・別刷

歯髄幹細胞の保存・バンキング法の最適化に関する研究

研究代表 上田 実

研究協力者 梅村 恵理

名古屋大学大学院医学系研究科 頭頸部感覚器外科学講座 顎顔面外科学

研究要旨

再生医療は、治療法が未だ見いだせない難治性神経疾患の新しい治療法として注目を集めている。我々は、再生医療で中心的役割を果たす幹細胞の供給源として「医療廃棄物である乳歯、歯列不正治療のための抜去歯牙、埋伏智歯由来の歯髄幹細胞」に注目している。非侵襲的に採取できるヒト歯髄細胞には、多分化能・増殖能に富んだ幹細胞が含まれている。本研究では、脱落乳歯などから採取した自己由来の歯髄幹細胞を安全かつ効率的に凍結保存する「細胞バンキング技術の最適化」を目標としている。解凍後の細胞生存率、細胞増殖活性、SEM像による細胞形態の変化、細胞表面マーカーの発現変化などの指標によって歯髄幹細胞の凍結保護材およびスキャホールドの最適化を行った結果、凍結保護材は10%EG/ 1M Su/ 0.75mM PVP。スキャホールドは2%アルジネート：100mM CaCO₃：200mM glucono- δ -lactoneを4：1：1が最適であるとの結論を得た。

【再生医療実用化に向けた意味合い】凍結保存法の最適化によって、解凍後の培養操作なしで、直接患部に移植できるようなシステムを構築する。これにより幹細胞移植による、迅速な急性期治療を可能にする。

A. 研究目的

中枢神経は脊髄損傷、脳虚血、神経変性疾患などにより深刻なダメージを受ける。これまでこれら難治性神経疾患に対する有効な治療法はなかった。最近になってヒト胎児の神経幹細胞、ES・iPS細胞、さらには骨髄由来間葉系幹細胞を用いた移植治療が現実性のある治療法として認識されはじめているが、倫理性、移植細胞の腫瘍形成能や免疫拒絶問題等の安全性、細胞採取時の激しい生体侵襲、不十分な治療効果のなど様々な問題を抱えており、実用化の可能性は極めて不透明である。本研究は、難治性神経疾患の再生治療の実用化の障壁となっているこれら課題の多くを解決し得る「脱落乳歯や親知らずなど医療廃棄物から採取可能な自己幹細胞：歯髄幹細胞を用いた難治性神経疾患の再生医療」の実現を目指す。本研究課題の達成には2つの個別研究：①

採取した歯髄幹細胞の保存・バンキング法の最適化、②歯髄幹細胞の難治性神経疾患治療における治療有用性の確立とその最適化に成果を上げることが必要である。本研究は①採取した歯髄幹細胞の保存・バンキング法の最適化を検討した。

B. 研究方法 (図1参照)

幹細胞を患者の治療ニーズに合わせて増やし、細胞機能を発揮しやすい三次元的スキャホールドに埋め込む操作は、大掛かりで、効率が悪く、急性疾患などに対応するのが難しい。我々は、歯髄幹細胞の凍結とスキャホールド(封入材料)の最適化を試みた。最適化が達成できれば、凍結保存した歯髄幹細胞を必要に応じて解凍し、迅速に患部へ移植できるようになる。

スキャホールドとしては移植安全性、安価、生体内分解性、操作の容易性の要

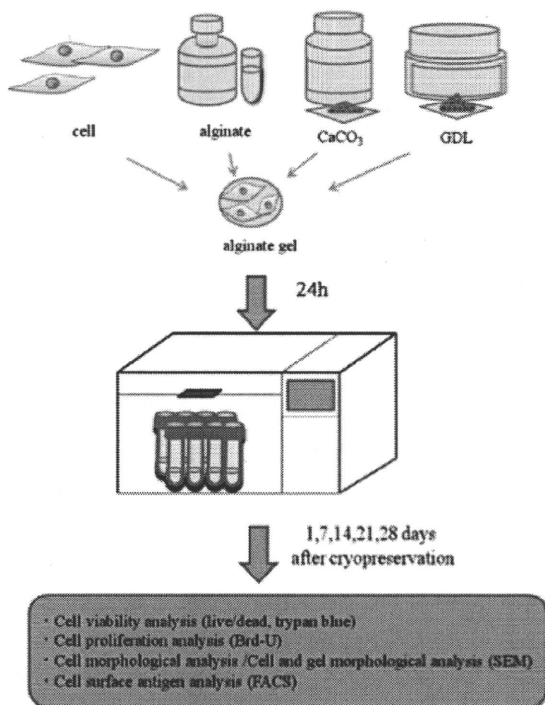
件を満たすアルジネートを用いた。凍結保護材としては dimethyl sulfoxide (DMSO)が一般的に用いられているが細胞障害性が高いため今回の検討からは除外した。

凍結条件を評価する指標は、①解凍後の細胞生存率、②細胞増殖活性、③SEM像による細胞形態の変化、④フローサイトメトリーによる細胞表面マーカーの発現変化とした。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト組織の取り扱いについては、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得て、口腔外科外来で医療廃棄物となった脱落乳歯や永久歯親知らずから、患者の同意を得て採取した。ヒト幹細胞の採取および管理は、ヘルシンキ宣言、厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する倫理指針」に従って行った。動物実験は、名古屋大学医学部の動物実験ガイドラインに従った。

図1 実験の流れ



C. 研究結果

スキャホールドの最適化

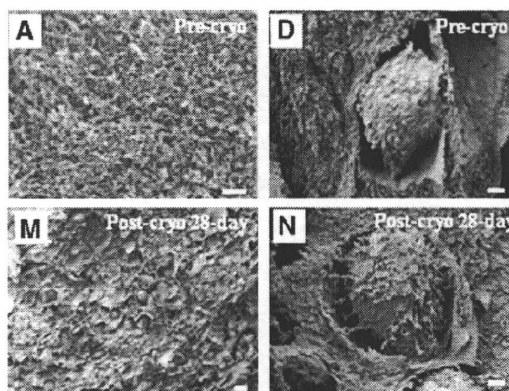


図2 10%EG/ 1M Su/ 0.75mM PVPでは、凍結・解凍後の細胞形態の変化が極めて少なかった。

ゲルの均一性と封入された細胞の生存率を指標として評価した。三つの試薬 2%アルジネート : 100mM CaCO₃ : 200mM glucono- δ -lactone を1~6 : 1 : 1の割合で混合した。アルジネートの良好なゲル化が得られ、細胞の生存率が良い条件は4 : 1 : 1の混合比率であった。

凍結保護材の最適化

解凍後の歯髄幹細胞の生存率と SEM 像を指標として評価した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に ethylene glycol (EG), sucrose (Su) and polyvinylpyrrolidone (PVP)を混合した。細胞の状態が最も良かったのは、10%EG/ 1M Su/ 0.75mM PVPであった(図2参照)。細胞表面抗原の発現や細胞増殖率に大きな変化は検出されなかった。

D. 考察

今回の研究結果によって、細胞凍結保護剤の性状によって解凍後の生存率、増殖率に大きな変化が生じることが明らかとなった。今後さらに材料の改変を行い、至適化を進める。

評価項目に神経再生に関わる解析項目が含まれていなかった点も改善する。これまでの研究で5~10継代の歯髄幹細胞は、切断した神経軸索の再生を促進する因子や、神経損傷によって引き起こされるニューロン、アストロサイト、オ

リゴデンドロサイトのアポトーシス細胞死を効率的に抑制する因子を分泌することを見いだしている。さらに神経損傷や変性に伴う免疫的反応に対しても神経保護効果を示す解析結果を得ている。これらの多面的な歯髄幹細胞の神経再生活性が凍結保護材等の性状変化で影響を受けるのか極めて重要な解析項目であると考ええる。

また、凍結保護材が歯髄幹細胞の神経幹細胞としての性情に与える影響を解析することも重要である。

E. 結論

解冻後の細胞生存率、細胞増殖活性、SEM像による細胞形態の変化、細胞表面マーカーの発現変化などの指標によって歯髄幹細胞の凍結保護材およびスキャホールドの最適化を行った。結果、凍結保護材は10%EG/1M Su/0.75mM PVP。スキャホールドは2%アルジネート：100mM CaCO₃：200mM glucono- δ -lactoneを4：1：1が最適であるとの結論を得た。

F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生していない。

G. 研究発表：論文発表

1. E. Umemura, Y. Yamada, S. Nakamura, K. Ito, K. Hara and M. Ueda, "Viable cryopreserving tissue-engineered cell-biomaterial for cell banking therapy in an effective cryoprotectant", *Journal of Tissue Engineering*, Part C, Methods (2011).
2. M. Ueda, Y. Nishino, "Cell based cytokine therapy for skin rejuvenation", *The Journal of Craniofacial Surgery*, Vol. 21, No. 6, (2010), pp.1861-1866.
3. Y. Yamada, S. Nakamura, K. Ito, T. Sugito, R. Yoshimi, T. Nagasaka, M. Ueda, "A Feasibility of Useful

Cell-Based therapy by Bone Regeneration with Deciduous Tooth Stem Cells, Dental Pulp Stem Cells, or Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Clinical Study Using Tissue Engineering Technology", *Tissue Engineering Part A*, Vol. 16, No. 6, (2010), pp.1891-1900.

4. W. Katagiri, Y. Yamada, S. Nakamura, K. Ito, K. Hara, H. Hibi, and M. Ueda, "Regulation of the canonical Wnt signaling pathways during cell culture of human mesenchymal stem cells for efficient bone regeneration", *Oral Science International*, Vol. 7, No.2, (2010), pp.37-46.
5. M. Sugiyama, K. Iohara, H. W. H. Hattori, M. Ueda, K. Matsushita, M. Nakashima "Dental Pulp Derived CD31-/CD146- Side Population Stem/Progenitor Cells Enhance Recovery of Focal Cerebral Ischemia in Rats", *Tissue engineering part A*, In press.
6. Y. Nishino, K. Ebisawa, Y. Yamada, K. Okabe, Y. Kamei, and M. Ueda, "Human Deciduous Teeth Dental Pulp Cells (hDPC) with Basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF) Enhance Wound Healing of Skin Defect", *Journal of Craniofacial Surgery*, In press.
7. Y. Nishino, Y. Yamada, K. Ebisawa, S. Nakamura, K. Okabe, E. Umemura, K. Hara, and M. Ueda, "Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) enhance wound healing and possibility of novel cell therapy", *Cytotherapy*, In press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. M. Ueda, H. Hattori, M. Sugiyama, T. Inoue, "Using culture conditioned medium for cerebral infarction and brain regeneration" 61/437,697(US), Jan. 31, 2011.

2. M. Ueda, A. Yamamoto, R. Shohara
“Umbilical cord derived mesenchymal stem cells composition”, Patent application number 2010-174161, Aug. 3, 2010.
3. M. Ueda, A. Yamamoto, K. Sakai,
“Dental pulp stem cells derived composites for neuronal disease treatment”, Patent application number 2010-092585, May. 6, 2010.
4. M. Ueda, A. Yamamoto, K. Sakai, K Matsubara, “Conditioned medium derived from Dental pulp stem cells composites for neuronal disease treatment”, Patent application number 2010-267962, Dec. 1, 2010.

歯髄幹細胞移植による脊髄損傷治療

分担研究者 山本 朗仁
研究協力者 酒井 陽

名古屋大学大学院医学系研究科・頭頸部外科学講座

研究要旨

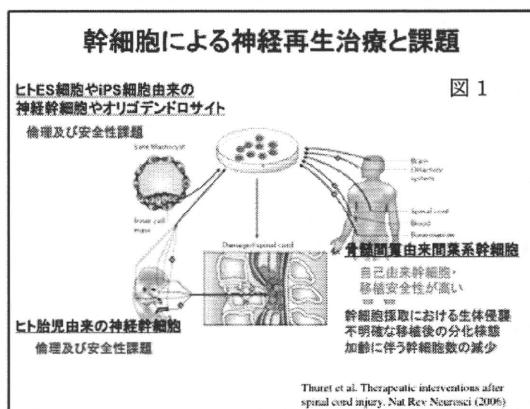
本邦における外傷性脊髄損傷患者の発生率は、年間 100 万人あたり 30-40 人であり、毎年 5000 人程度の患者が新たに発生している。急性期管理の向上により、その死亡率は劇的に減少したものの、永続的な四肢麻痺や感覚障害を中心として、膀胱直腸障害、褥創、痙縮などの合併症に苦しんでいる患者総数は 10 万人以上とされている。残念ながら、現時点で有効な治療法は開発されていない。一方で、近年の幹細胞生物学の急速な発展により、これまで治療が不可能と考えられていた脊髄損傷などの中枢神経疾患に対しても幹細胞による再生医療の期待が高まっている。近年、ヒト胎児の神経幹細胞やヒト ES・iPS 細胞由来の神経幹細胞、オリゴデンドロサイトの移植治療が、神経疾患治療に有用であることが報告されている。しかしながら、倫理性や安全性に大きな問題を抱えており、実用化への道筋は未だ不透明である。そこでわれわれは組織採取が簡便であり、神経堤由来の細胞である脱落乳歯および智歯由来の歯髄幹細胞に注目した。本研究では、歯髄幹細胞を完全切断したラット脊髄に移植し、その治療有効性を検討した。

【再生医療実用化に向けた意味合い】本研究は、脊髄損傷治療に有用な新しい細胞リソースの発見し、その治療有用性を具体的に示した。さらに「医療廃棄物の有効利用のモデルケース」を提示するとともに、低侵襲・安全性の高い自己幹細胞を用いた再生医療の実現を可能にする試みである。

A. 研究目的

脊髄損傷や脳梗塞、神経変性疾患などで運動機能を失う患者数は高齢化に伴い増えているが、残念ながら現時点で有効な治療

法は開発されていない。このような病気の治療方法として幹細胞などを移植し、神経再生を促す方法が模索されている。近年、モデル動物を用いた研究結果からヒト胎児の神経幹細胞やヒト ES・iPS 細胞由来の神経幹細胞、オリゴデンドロサイトの移植治療が神経疾患治療に有用であることが報告されているが、倫理性・安全性に大きな問題を抱えており、実用化への道筋は未だ不透明である。骨髄間葉系幹細胞は、移植安全性が確保し易い自己由来の幹細胞であるが、幹細胞採取における生体侵襲不明確な移植後の分化様態加齢に伴う幹細胞数の減少などの問題を抱えている（図 1 参照）。我々は、こ



これらの問題点を解決しうる幹細胞源として、ヒト乳歯および智歯に含まれる歯髄幹細胞に着目した。歯髄幹細胞は脱落または抜歯した乳歯や智歯から採取するため、採取にあたっての倫理面での問題はなく、低侵襲的に採取できるため安全性も高い。また神経堤由来であるため神経へ分化しやすいと予想された。さらに自己由来の歯髄幹細胞を用いることも可能であるため、移植安全性を高めることができる。以上のような理由から我々は歯髄幹細胞を用いて、実用化可能な難治性神経疾患治療の開発を目指している。

B. 研究方法

①各種神経系マーカーの発現をフローサイトメトリーと免疫組織化学的にておこなった。神経栄養因子の遺伝子発現を定量的PCRにて検討した。

②S.Dラット(雌、9週齢)の脊髄を第10頸椎レベルで完全に切断したのち、直接脊髄中にガラスニードルを装着したハミルトンシリンジにて4継代目の歯髄幹細胞(1×10^6 個)を移植した。移植後は、1週間ごとにBBBスコアにて下肢の運動機能を評価し、8週間後に屠殺した。移植実験を行う2日前から屠殺を行うまで1日1回免疫抑制剤を投与した。免疫組織学的検討、統計学的検討を行い、6週後にBDAにて順行性トレーサー試験を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト歯髄採取を行う場合、該当患者に書面および口頭にて十分に説明同意を得た。さらにこれらの説明・同意文書については名古屋大学倫理委員会にて承認されたものを用いた。また、採取した全ての組織については、プライバシーの保護のためドナー情報は秘密にて行うことにした。

C. 研究結果

①歯髄幹細胞は、神経幹細胞、神経前駆細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞マーカーなどを共発現していたが、成熟した神経細胞やオリゴデンドロサイトマーカーは発現していなかつた。

複数の神経栄養因子: GDNF, BDNF, CNTF を多く発現していた。

②脊髄を完全に切断した「ラット髄損傷モデル」を用いて歯髄幹細胞の神経再生治療における効果を検討した。その結果、急性期に歯髄幹細胞を移植することによって下肢の運動機能が回復するという、驚くべき治療効果を見いだした。

- 処置後8週後、PBS投与群は、下肢運動機能が麻痺したままであった。
- 骨髄間葉系幹細胞や皮膚繊維芽細胞を移植したラットはわずかに1~2関節を動かせる程度。
- 歯髄幹細胞を移植したラットは、体重をさせることはできないが、3関節を動かしながら、這って歩けるまでに回復した。

詳細な組織学的解析と運動神経軸索のトレース実験から、歯髄幹細胞は1)神経損傷に伴うアポトーシス細胞死を抑制する、2)切断した神経軸索を、切断面を越えて伸長する、3)損傷による髄鞘破壊を抑制する、4)生着した歯髄幹細胞は成熟型オリゴデンドロサイトへの特異的分化能を示す、などの現象が観察された。移植した歯髄幹細胞の腫瘍化は観察できなかった。歯髄幹細胞は移植安全性、倫理的問題をクリアした細胞ソースであり、極めて強力な神経再生能力を発揮することが明らかとなった。

D. 考察

今回の研究で、歯髄幹細胞の強力な中枢神経に対する多面的な再生効果を確認した。その再生能力は、現在までに行われてきた脊髄損傷に対する細胞治療研究の中でも群を抜いている。特に重要なことは、完全切断した脊髄に移植した歯髄幹細胞の30%以上の細胞が生着し(ES関連細胞の生着率は数%程度)、そのほとんどが成熟型オリゴデンドロサイトへ特異的に分化したことである。これらの細胞はミエリンを産生しており、再生した脊髄の神経伝導能を高めているものと考えられる。

E. 結論

歯髄幹細胞は、切断した神経軸索の伸長効果、髄鞘保護効果、抗アポトーシス効果、オリゴデンドロサイトへの特異的分化による Cell replacement、これら多面的な神経再生効果によって下肢運動機能の回復を促した。歯髄幹細胞を用いた脊髄損傷治療の有効性が明らかになった。

F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

K. Sakai, A. Yamamoto, K. Matsubara, S. Nakamura, R. Tauchi, N. Wakao, S. Imagama, H. Hibi, M. Ueda Multifaceted neuro-regenerative activities of tooth-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the spinal cord Nature Medicine 2011.05.17 投稿中

2. 学会発表

K. Sakai, A. Yamamoto, H. Hibi, Y. Yamada, M. Fujio, M. Yamagata, and M. Ueda. Transplantation of dental pulp stem cells in spinal cord injury 88th IADR July 4-17, 2010 Barcelona Spain (ポスター)

K. Sakai, A. Yamamoto, H. Hibi, Y. Yamada, M. Yamagata, M. Fujio, R. Tauchi, N. Wakao, S. Imagama, M. Ueda

Transplantation of human dental pulp stem cells after complete transection of the rat spinal cord 第9回再生医療学会総会 2010.03.18-19 広島 (ポスター)

酒井 陽、松原 弘記、山本 朗仁、日比 英晴、山田 陽一、今釜 史郎、若尾 典充、田内 亮、上田 実 脱落乳歯および智歯(親知らず)由来の歯髄幹細胞による神経再生治療 第31回日本炎症・再生医学会 2010.08.5-6 東京(ワークショップ口演)

酒井 陽、松原 弘記、山本 朗仁、日比 英晴、山形 まり、上田 実 ラット

脊髄完全切断モデルにおけるヒト歯髄細胞移植効果の検討 第52回歯科基礎医学会学術大会・総会 2010.09.20-22 東京 (口演)

K. Sakai, A. Yamamoto, K. Matsubara, M. Yamagata, U. Minoru Transplantation of dental pulp stem cells in spinal cord injury Development of bone tissue engineering using human umbilical cord derived tissue regenerative cells MHS 2010& Micro-Nano Global COE Nov.7-10, 2010 Nagoya, Japan (ポスター)

K. Sakai, K. Matsubara, A. Yamamoto, M. Ueda Transplantation of dental pulp stem cells in spinal cord injury The Third Symposium of Young Researchers-Innovative MEMS design and the biomedical application- Micro/Nano Global COE December 6, 2010 Nagoya Japan (口演)

K. Sakai, A. Yamamoto, H. Hibi, Mari Y., M. Fujio, M. Ueda Transplantation of human dental pulp stem cells in complete transection of the rat spinal cord 第2回NAGOYAグローバルリトリート名古屋大学医学部グローバルCOEプログラム【機能分子医学への神経疾患・腫瘍の融合拠点】 2010.02.26-27 名古屋 (ポスター)

K. Sakai, A. Yamamoto, K. Matsubara, H. Hibi, M. Ueda Engrafted dental pulp stem cells promoted functional recovery of completely transected rat spinal cord ISSCR 9th 2011.6.15-18 Toronto Canada (ポスター予定)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

出願番号 特願2010-092585

発明の名称：歯髄幹細胞を用いた神経疾患治療用組成物

厚生科学研究費補助金（再生医療実用化 研究事業）
分担研究報告書

細胞移植を伴わない、歯髄幹細胞の無血清培養上清を用いた脊髄損傷治療

分担研究者 山本 朗仁
研究協力者 松原 弘記

名古屋大学大学院医学系研究科 頭頸部感覚器外科学講座 顎顔面外科学

研究要旨

中枢神経損傷では、受傷直後 24 時間以内に急性期炎症性反応により多くの神経系細胞が失われる。さらに一週間後（亜急性期）、損傷部位に形成される「グリア瘢痕」に由来するコンドロイチン硫酸や、「挫滅した髄鞘」由来のミエリンタンパクなど様々な神経再生阻害因子群が神経軸索再生を阻害する。我々はヒト歯髄幹細胞をラット完全脊髄切断モデルに移植すると下肢運動機能が回復することを見いだした。

歯髄幹細胞は、①急性期炎症性反応による神経系細胞のアポトーシス死を強力に抑制、②切断した神経軸索を効率的に再生、③切断した脊髄の中でオリゴデンドロサイトに特異的に分化し神経伝導能を再生する。これらの3つの神経再生効果は、移植細胞から分泌される神経再生因子群によるパラクライン効果（①と②）、損傷で失った細胞を補給する Cell-replacement 効果（③）に分けることができる。

本研究では、「歯髄幹細胞のパラクライン効果のみによる脊髄損傷治療の可能性」を検討した。歯髄幹細胞の無血清培養上性をラット圧挫型脊髄損傷モデルに持続投与すると、「グリア瘢痕などに由来する神経再生抑制効果」や「神経系細胞のアポトーシス死」をシャットダウンし、下肢運動機能が改善した。処置後8週で、歯髄幹細胞の培養上清を投与したラットは踵を上げて歩けるまでに回復した。歯髄幹細胞の培養上性に含まれる神経再生因子の同定は、新しい神経再生治療を可能にするかもしれない。

【再生医療実用化に向けた意味合い】本研究は細胞移植を伴わない脊髄損傷治療に道を開くものである。細胞を使用することによる様々な制約を取り払える可能性を秘めている。詳細な培養上清の成分解析は、新しい中枢神経再生製剤の開発につながる可能性が高い。今後、国内製薬企業との連携を模索し、研究成果を広く国民に還元できるよう鋭意努力する。

A. 研究目的

ヒト歯髄幹細胞の神経再生能力は極めて高い。ラット完全脊髄切断モデルに移植すれば下肢運動機能が回復する。この再生効果は、移植した幹細胞から分泌される神経再生因子群によるところが大きいと考えた。歯髄幹細胞由来の強力な中枢神経再生因子が同定されれば、細胞移植を伴わない脊髄再生治療法が確立でき

る可能性が高い。

本研究はヒト歯髄幹細胞由来の分泌因子群に着目し、ヒト歯髄幹細胞由来の無血清培養上清を用いてその中枢神経再生効果を解析し、新規中枢神経再生治療薬開発の可能性を検証することを目的とした。

B. 研究方法

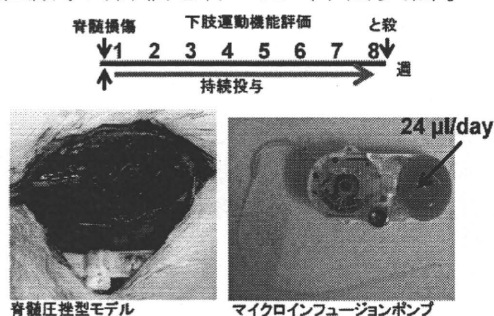
1) *In vitro* 細胞培養系

①ヒト歯髄幹細胞無血清培養上清に含まれる成長因子群の網羅的蛋白発現解析 (RayBio 社 Human Cytokine Antibody Array G Series 4000) を行い、培養上清中に含まれる成長因子群を解析した。

②神経再生阻害因子である MAG(ミエリンタンパク)や CSPG(コンドロイチン硫酸)をコーティングした培養皿上でPC12 細胞(神経細胞のモデル細胞株)や初代培養のラット小脳顆粒細胞を培養し、中枢神経損傷部位における環境を *in vitro* で再現する。そこへ無血清培養上清を作用させ、細胞死の抑制や軸索伸長などの神経再生効果を検証した。

2) *In vivo* 脊髄損傷モデル

8 週齢雌 SD ラットを用いて、圧挫型脊髄損傷のラットモデルを制作した。損傷直後より完全埋め込み型マイクロインフュージョンポンプにて脊髄くも膜下腔にヒト歯髄幹細胞無血清培養上清を持続的に投与、8 週間経過観察し、下肢運動機能、組織学的評価を行った(下図参照)。



(倫理面への配慮)

1) 本研究では動物実験を行うので、名古屋大学医学部附属動物実験施設に動物実験の申請を行う。動物実験の施行に際しては、名古屋大学医学部の動物実験ガイドラインに準拠して行う。すなわち、実験に使用する動物数の可能な限りの削減・実験動物の苦痛を可能な限り軽減するなどである。

2) 本研究はすべてヘルシンキ宣言、厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する倫理指針」にのっとり、研究対象者に対する安全保護・人権擁護に、下記の通り十分注意して行う。

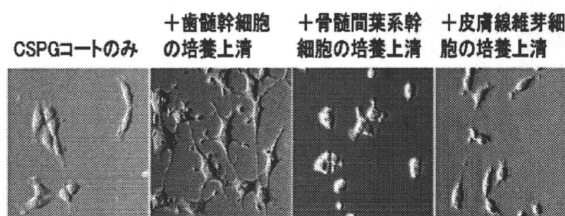
- 研究を実施する前に、治験等審査委員会会で承認の得られた同意説明文書

を用いて患者に研究の内容および患者の権利等を文書および口頭により十分な説明を行い、患者本人の自由意志による同意を文書(記名・捺印または署名、同意年月日の記入)にて得る。

- 試験実施に係る生データ類および同意書等を取り扱う際に、被験者の秘密保護に十分配慮する。病院外に提出する症例報告書等では、被験者識別コード等を用いて行う。試験の結果を公表する際は、被験者を特定できる情報を含めないようにする。試験の目的以外に、試験で得られた被験者のデータを使用しない。
- 被験者の検体等を病院外に持ち出して測定等を行う場合は、匿名化・保管・廃棄方法、閲覧者の範囲等について規定する。あらかじめ被験者の同意を得ないで、同意説明文書で特定された利用目的の達成に必要な範囲を超えて、個人情報を取り扱わない。また、患者が本試験に参加しない場合、または途中で試験からの離脱を希望された場合にも不利益を受けることのないよう、通常通りの治療を行う。

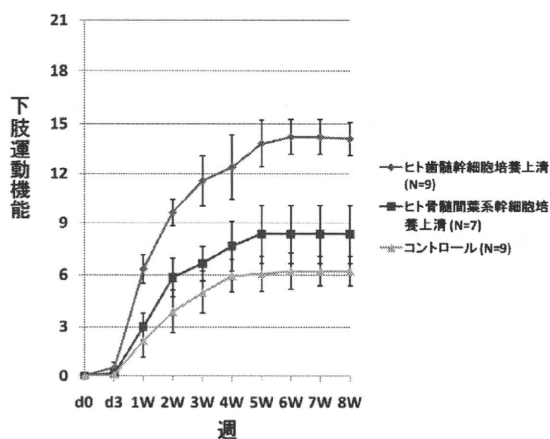
C. 研究結果

In vitro 実験系: 網羅的蛋白発現解析により、ヒト歯髄幹細胞培養上清中には約 80 種類のタンパク質が含まれていることが分かった。また、神経再生阻害因子コーティング上で 2 種の細胞を培養し、そこへ歯髄幹細胞由来無血清培養上清を作用させると、神経突起の伸長が促進され、細胞死が抑制されるということが示された。これは、比較実験として行った他の無血清培養上清(ヒト骨髄間葉系幹細胞由来培養上清、ヒト繊維芽細胞由来培養上清)では認められない作用であった(下図参照)。



In vivo 実験系: 圧挫型脊髄損傷モデルラットにおいて、歯髄幹細胞由来無血清

培養上清投与後に著明な下肢運動機能の回復が認められた（下図参照）。また、組織学的評価により、無血清培養上清投与群において、急性期における神経細胞死を最小限に抑え、神経再生阻害因子の作用を抑制し、神経回路の再編を促進するという結果が得られた。



D. 考察

より安全で低侵襲、低コストである中枢神経治療法が世界中で模索されている中、われわれはこれまでラット脊髄損傷モデルにおいてヒト歯髄幹細胞が示す治療効果の分子実体を同定することを目的とし、ヒト歯髄幹細胞由来の無血清培養上清を用いてその中枢神経再生効果を *In vitro* および *In vivo* 実験系で実証した。このことから培養上清中のタンパク質が新規中枢神経再生治療薬となりうるということが示された。このような知見はこれまでに例がなく、本研究で網羅的に神経再生効果を担う分泌性分子群を同定することで、製薬化を目指す上で世界的にも初めての重要な結果を提示するものになると思われた。

これまでの結果から、ヒト歯髄幹細胞無血清培養上清中には多種多様なタンパク質が含まれていることが判明した。しかし、新規中枢神経再生治療薬の開発を目指すには、上清中のタンパク質の何種類かのどのようなタンパク質が効果を有しているか検証し、タンパクカクテルとして精製する必要があると思われる。われわれの最近の研究で、ヒト歯髄幹細胞無

血清培養上清は a) プロテインキナーゼ処理によりその生物活性が完全に失われること、b) 限外濾過膜によるフィルトレーション処理により低分子分画群（10kDa程度）で強い生物活性が認められること、c) 培養上清を作用させると細胞内 Rho/RhoA シグナル活性（神経再生阻害因子の作用により神経系細胞内で活性化され、軸索伸展阻害、アポトーシスを誘導することが報告されている）を効果的に抑制することを *In vitro* 実験系で実証している。以上のことから、培養上清中の低分子タンパク群が細胞内 Rho/RhoA シグナル活性を抑制することで神経再生効果を生み出しているということが示唆された。よって、今後はさらなる本格的なプロテオーム解析が必要となってくると思われる。具体的には、フィルトレーションを細分化し、得られた分画の各タンパク質の質量分析を行い、これまでわれわれが確立してきた *In vitro* 実験系および *In vivo* 実験系を用いて、神経再生効果を持つタンパク質を同定していく。効果の認められたタンパク質が複数に渡る可能性も高く、最終的には、それらのリコンビナントタンパクによるカクテルを作製し、同等の神経再生効果が認められることが確認できれば新規中枢神経再生治療薬として開発が大いに期待できると考えている。

E. 結論

本研究において、ヒト歯髄幹細胞無血清培養上清中には中枢神経損傷後の治療・再生に関わる多数の因子群が含まれていることが判明し、特にラット急性期脊髄損傷モデルにおいて著明な下肢運動機能改善効果を認めた。このことから、培養上清中に含まれる因子群は新規中枢神経再生治療薬となりうるということが示唆された。今後製剤化を目指すうえで、培養上清中の成長因子群のさらなる詳細な解析が必要となってくると思われた。

F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重

大な影響を及ぼす事項は発生していない。

G. 研究発表

学会発表

K. Matsubara, K. Sakai, A. Yamamoto,
M. Ueda The potential clinical benefits
of the serum-free conditioned media
derived from dental pulp stem cells in
CNS regeneration therapy 第 3 回
NAGOYA グローバルリトリート名古屋
大学医学部グローバル COE プログラム
【機能分子医学への神経疾患・腫瘍の融
合拠点】 Poster26 名古屋 2011.02.25-26

K. Matsubara, K. Sakai, A. Yamamoto,
M. Ueda The potential clinical benefits
of the serum-free conditioned media
derived from dental pulp stem cells in
CNS regeneration therapy 第 10 回日本
再生医療学会総会 IP-083 東京
2011.3.1-2

H. 知的財産権の出願・登録状況

出願番号 特願 2010-267962

出願日 2010/12/1

発明の名称：歯髄幹細胞の培養上清を用
いた中枢神経疾患治療用組成物 申請中

歯髄幹細胞の分化誘導と神経疾患モデルへの移植に関する研究

分担研究者 山本 朗仁

研究協力者 中村 祥子

名古屋大学大学院医学系研究科 頭頸部・感覚器外科学講座

研究要旨

高齢化に伴い、進行性に神経細胞が脱落していく難治性神経疾患に苦しむ患者数は増加傾向にある。細胞移植治療は、完治法がまだ見出せない進行性神経疾患において新しい治療法として注目されているが、倫理面や安全性などの問題から実用化に至っていない。もっとも大きな問題は実用化可能な移植細胞源が見出せなかったことにあると考えられる。本研究の目的は、低侵襲で採取可能かつ移植安全性の高い自己幹細胞である歯髄幹細胞を用いた再生医療の実現を目指すことであり、特に難治性神経疾患治療への歯髄幹細胞応用の可能性を検討し、臨床実用化への道を開拓することである。本研究ではとくに、パーキンソン病と脊髄小脳変性疾患をターゲットとし、移植に必要な神経細胞の分化誘導方法を確立し、疾患モデル動物を用いた移植治療効果の検討を行う。最終的にはヒトにおける歯髄幹細胞を用いた難治性神経疾患の治療法の確立に貢献することを目的としている。平成 22 年度は歯髄幹細胞の性状解析と高効率でドーパミン神経細胞を分化誘導する方法の確立を行った。歯髄幹細胞は神経系譜に近い性状を示す細胞集団であり、神経分化誘導に応答能を持つこと、骨髄間葉系幹細胞よりもドーパミン神経細胞や小脳プルキンエ細胞への分化誘導に応答性が高い可能性があり、より効率的な神経分化誘導システムが構築できれば神経疾患治療に有用な細胞源であることが強く示唆された。さらに我々は歯髄幹細胞から高効率でドーパミン神経細胞を分化誘導する方法を見出した。

A. 研究目的

本研究の目的は、低侵襲で採取可能かつ移植安全性の高い自己幹細胞である歯髄幹細胞を用いた再生医療の実現を目指すことであり、特に難治性神経疾患治療への歯髄幹細胞応用の可能性を検討し、臨床実用化への道を開拓することである。

昨今、ヒト胎児や ES 細胞、iPS 細胞由来の神経幹細胞を用いた難治性神経疾患の細胞移植治療が、現実性のある治療法として認識されているが、倫理性や安全性に大きな問題を抱えており、実用的な“幹細胞源”については今も模索状態

ある。

そのような状況にあって、医療廃棄物であるヒト乳歯歯髄幹細胞 (SHED) や智歯由来の永久歯歯髄幹細胞 (DPSC) は、1) 低侵襲で採取可能な体性幹細胞集団であること、2) 神経堤由来の細胞集団、すなわち神経系譜に近い性状を持つ幹細胞集団であるため神経細胞への分化誘導に高い反応性を示すこと、3) 自己由来の成体幹細胞を採取可能であること、4) 幹細胞の性状維持に外部からの遺伝子導入は不要であること、などの特性から、移植における安全性が高く、倫理的問題も極めて少ない、実用的な“幹細胞

源”であるといえる。歯髄幹細胞の移植が難治性神経疾患治療に有用であることが明らかとなれば、極めてユニークかつ重要な「医療廃棄物の有効利用のモデルケース」を提示するとともに、低侵襲・安全性の高い自己幹細胞を用いた再生医療の実現を可能にし、多数の苦しむ人々を助けることができると考えている。

近年の高齢化に伴い、難治性神経疾患に苦しむ患者数は年々増加傾向にあり、倫理性や安全性の問題をクリアした上での細胞移植治療確立の重要性は高まる一方である。たとえば特定疾患であるパーキンソン病は、10万人当たり100-150人が発症し、高齢者に発症頻度の高い神経疾患である。ほとんどが孤発性であり、振戦・無動・固縮など特徴的な症状がみられる。原因としては中脳黒質のドーパミン神経細胞が選択的に脱落することによって投射先の線条体で神経伝達物質のアンバランスが生じるためにこれらの症状が起こると考えられている。神経脱落の原因はよくわかっておらず、現在の主たる治療法であるドーパミンの補充による対処療法では完治が望めないが現状である。

一方、脊髄小脳変性疾患のように遺伝性での発症率の高い神経変性疾患も存在する。この疾患は10万人あたり5-10人の割合で発症すると推定されており、現在日本での患者数は2万人と言われている。小脳、脳幹、脊髄の神経細胞が破壊され、運動機能が徐々に衰退していく。孤発性と遺伝性の発症比率は6:4だが、遺伝性の場合の大多数は常染色体優性遺伝である。中年以降で発症することが多いが、若年期での発症もみられる。脊髄小脳変性症には多数の型があるが、日本国内や世界的にも最も患者数が多いのは3型(SCA3)、通称マシヤド・ジョセフ病と呼ばれる型で、この型ではポリグルタミン鎖をもつ遺伝子産物の過剰蓄積で小脳プルキンエ細胞が脱落することが原因である。現在までのところ、症状緩和の薬物治療がとられるが、

完治する方法は見つかっていない。

このような神経疾患の完治を目指すには、脳内にて脱落した神経細胞の機能を代償することが重要だと考えられており、安全で倫理的問題が少ない移植細胞材料の開発が望まれている。歯髄幹細胞を中脳黒質ドーパミン神経細胞や小脳プルキンエ細胞へ効率よく分化誘導し、安全に移植する方法が確立できれば、これまで完治不可能だった進行性の神経疾患を克服でき、困窮している多数の患者を救うことが可能になる。

そこで本研究では、(I) いまだ未知の部分が多い歯髄幹細胞の神経系譜への分化能を詳細に解析し、難治性神経疾患への応用の基盤データを得る、(II) 移植治療に必要な神経細胞などを、高効率で再現性良く、高品質を保ちながら簡便に用意できる方法を確立する、(III) 難治性神経疾患モデル動物を作成し、歯髄幹細胞から誘導した神経細胞の移植治療の有効性・機能回復効果および安全性の検討を行う、という3点を当面の目的とし、実用化可能な治療法確立のための基盤データを得る。本研究ではとくに、パーキンソン病と脊髄小脳変性疾患をターゲットとし、移植に必要な神経細胞の分化誘導方法を確立し、疾患モデル動物を用いた移植治療効果の検討を行う。最終的にはヒトにおける歯髄幹細胞を用いた難治性神経疾患の治療法の確立に貢献することを目的としている。

B. 研究方法

(1) 歯髄幹細胞の神経細胞系譜へ分化能の検討

未分化状態の歯髄幹細胞と分化誘導した歯髄幹細胞とで、神経分化を評価し得る分子の発現を特異的抗体で検出した。細胞染色やフローサイトメトリー解析でどのような分子をどれくらいの割合で発現しているのかを解析し、歯髄幹細胞

胞の持つ神経分化能を検証した。

(2-1) パーキンソン病治療に向けて

a) ドーパミン神経細胞への分化誘導法の確立

我々はすでに ES 細胞などを用いたドーパミン神経細胞への分化誘導条件を参考に、Shh,FGF8, などの添加培地で培養を行い、歯髄幹細胞が高效率でドーパミン神経細胞へ分化能する条件を見出していた。そこでさらなる分化誘導の効率化と簡素化を目指し、分化誘導法の改良を行った。誘導法は以下の項目で評価する。①ドーパミン神経細胞に発現する分子マーカー解析：中脳領域化因子、ドーパミン神経細胞特異化転写因子について、発現変化を免疫染色にて定性的に、Real time-PCR にて定量的に分化誘導効率の検討を行う。②ドーパミン分泌確認：ELISA 法でドーパミンの放出を検出する。ドーパミントランスポータ阻害物質 GBR12909 によって、培養液中のドーパミン量の変化を測定し、ドーパミン再取り込みによる細胞外ドーパミン量の制御能を検証する。

b) パーキンソン病モデル動物（ラットまたはマウス）の作成

6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA) をラットまたはマウスの片側脳内に注入し、ドーパミン神経細胞を特異的に破壊してパーキンソン様症状を誘発する。モデル作出の評価は行動学的変化と組織学的変化について行う。6-OHDA 注入後 2~3 週間以降にドーパミン受容体作用薬であるアポモルフィンを投与し、30分以内の行動を観察する。アポモルフィン投与によって手術と反対方向への激しい(1分間に7回以上)回転を示せばパーキンソン症状とみなす。脳の組織学的解析では抗体染色によってドーパミン神経細胞の有無を健常側と比較して評価する。

c) パーキンソン病モデル動物における細胞移植の有効性・機能回復効果・安全性の検証

①有効性・機能回復効果の検討：ドーパミン神

経細胞に分化した歯髄幹細胞をパーキンソン病モデル動物の障害側脳内の線条体に移植し、アポモルフィン投与によって誘発される回転運動が改善するかを確認する。組織切片を作成して、歯髄幹細胞由来のドーパミン神経細胞が生着しているのか確認し、移植細胞数に対する生着率も検出する。②安全性の検討：ドーパミン神経細胞は本来は中脳黒質緻密部に存在しているのだが、この領域は脳の深部であり技術的に移植が難しいため、ほとんどのパーキンソンモデル動物ではドーパミン神経細胞が投射する線条体に細胞移植を行う。本研究でのモデル作出も従来の方法にのっとなって細胞移植を行う。このため異所的に移植した歯髄幹細胞が生体内でどのようにふるまうのか詳細に検討する必要がある。移植されたドーパミン神経細胞の異所的環境下での挙動を追跡するため、ルシフェラーゼ遺伝子などラベルを導入した歯髄幹細胞由来ドーパミン神経細胞の動態を、*in vivo imaging* や組織学的に解析する。腫瘍形成能も検証する。③長期間における細胞移植効果の検討：有効性・機能回復効果・安全性は継時変化についても詳細に検討し、長期間(マウス・ラットの通常寿命などを考慮して1年ほど)に渡る有効性・安全性が担保されるものか確認する。

(2-2) 脊髄小脳変性症治療に向けて

a) プルキンエ細胞への分化誘導法の確立

すでに報告のある ES 細胞を用いたプルキンエ神経細胞への分化誘導条件を参考に、Shh,FGF8, などの添加培地で培養を行い、歯髄幹細胞がプルキンエ神経細胞へ分化する条件を検討する。さらに分化誘導の効率化と簡素化を目指し、分化誘導法の改良を行う。誘導法は以下の項目で評価する。①プルキンエ神経細胞に発現する分子マーカー解析：小脳領域化因子、プルキンエ細胞特異化転写因子について、発現変化を免疫染色にて定性的に、Real time-PCR にて定量的

に分化誘導効率の検討を行う。②GABA 分泌確認:ELISA 法で GABA の放出を確認する GABA トランスポータ阻害物質によって、培養液中の GABA 量の変化を測定し、GABA 再取り込みによる細胞外 GABA 量の制御能を検証する。

b)脊髄小脳変性症モデル動物における細胞移植の有効性・機能回復効果・安全性の検証

SCA3 型の脊髄小脳変性疾患モデルマウスはすでに確立されており Jackson laboratory より購入可能なので、それを用いて細胞移植の有効性・機能回復効果・安全性を検証する。

①有効性・機能回復効果の検討：プルキンエ細胞に分化した歯髄幹細胞を脊髄小脳変性疾患モデルマウスの小脳に移植し、運動障害が改善するかを確認する。組織切片を作成して、歯髄幹細胞由来のプルキンエ細胞が生着しているのかを確認し、移植細胞数に対する生着率も検出する。

②安全性の検討：移植したプルキンエ細胞の体内での挙動を検討するため、ルシフェラーゼ遺伝子などラベルを導入した歯髄幹細胞由来プルキンエ細胞の動態を、*in vivo imaging* や組織学的に解析する。腫瘍形成能も検証する。③長期間における細胞移植効果の検討：有効性・機能回復効果・安全性は継時変化についても詳細に検討し、長期間（マウス・ラットの通常寿命などを考慮して 1 年ほど）に渡る有効性・安全性が担保されるものか確認する。

(3) より治療効果の高い細胞移植方法の検討

この項は今年度の研究成果によって新たに着想を得て追加した研究計画である。神経再生治療では、移植する幹細胞による非細胞自律型と細胞自律型の組織再建システムが想定される。近年、脳虚血や脊髄損傷に「分化誘導していない骨髄間葉系幹細胞」を移植することで、神経機能の改善をはかる成体幹細胞治療が注目されている。移植された「分化誘導していない幹細胞」は、損傷部位で必要とされる細胞に分化して生

着し細胞自律的に機能回復をもたらす場合と、神経栄養因子などを分泌して非細胞自律的に損傷部位の神経細胞死を抑制し、軸索伸張を促進して機能回復をもたらす場合の 2 つが考えられている。実際、我々は分化誘導していない SHED や DPSC を脊髄損傷モデルに移植したところ、損傷部位にて必要とされる細胞に分化し生着して機能回復をもたらされること、さらに損傷と同時に細胞移植なしで SHED や DPSC の培養上清を投与することでも脊髄損傷モデルラットの機能回復効果があることを見出した。つまり、歯髄幹細胞の神経再生効果には顕著に細胞自律的および非自律的効果の 2 つがあることになる。面白いことに、未分化歯髄幹細胞の生着率は ES 細胞や骨髄間葉系細胞の移植と比較するとはるかに高効率であった（論文投稿中）。これは、細胞非自律的要素が損傷部位の細胞毒性を遮断して細胞死を抑制することや神経栄養因子の産生促進、酸化ストレス改善などの機能を担い、移植部位の細胞環境を改善したため移植細胞の生着率が向上しているのではないかと考えられる。このことから、本研究においても、細胞移植治療における生着率向上のために培養上清を同時投与するという方法が考えられる。また、未分化歯髄幹細胞を移植する方法や細胞移植なしで培養上清のみで治療効果が得られる可能性も示唆されたことになる。したがって、これらの可能性についても検討することを実験計画に新たに加えることとする。

具体的には a) 未分化歯髄幹細胞を用いた移植効果の検討、b) 培養上清のみでの再生治療効果の検討、c) 培養上清と分化誘導した細胞の組み合わせでの再生治療効果の検討、を行う。前述の方法で治療の有効性・機能回復効果・安全性の検討などを行う。未分化歯髄幹細胞を用いる場合は治療に必要な細胞に生体内で分化するのかが、腫瘍形成能など安全性の検討が特に重要になってくる。もしも未分化歯髄幹細胞や培養上

清のみでパーキンソン病や脊髄小脳変性症が治療できるとなれば、その他の神経疾患への適用の可能性も広がる。また、歯髄幹細胞は神経細胞のみならず、グリア細胞のマーカーも発現していることから、脱髄疾患などへも応用できるようになるのではないかと期待される。

(倫理面への配慮) ヒト幹細胞の採取および管理については、ヘルシンキ宣言、厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する倫理指針」に従って行った。ヒトの組織採取を行う場合は治療時に余剰となったものを利用することを原則に、該当患者に書面および口頭で十分に説明し、同意を得た。さらにこれらの説明文、同意書については名古屋大学倫理委員会にて承認されたものを用いた。また、採取したすべての組織については、プライバシー保護のため、研究に必要なドナー情報(性別・年齢)以外は秘密にて行うこととした。

歯髄幹細胞の性状解析における遺伝子発現解析などは、文部科学省・厚生労働省の定める「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従って行った。

動物実験は、日本国内の動物実験に関する法律・指針などに基づいて規定された名古屋大学医学部の動物実験ガイドラインに準拠して行った。

C. 研究結果

研究計画では平成22年度は(1)歯髄幹細胞の神経系譜への分化能の検討、および、(2-1)パーキンソン病治療へ向けて、の項目 a) ドーパミン神経細胞への分化誘導法の確立、を行うことになっている。ほぼ計画通り遂行できたので、今回はこの2項目の結果とその他の項目については現在の進捗状況を報告する。

(1) 歯髄幹細胞の神経細胞系譜への分化能の検討

Fig.1 は神経幹細胞から分化する神経細胞系譜を図示している。図のように神経幹細胞は神経細胞のみならず、アストロサイトやオリゴデンドロサイトといったグリア細胞へも分化可能である。

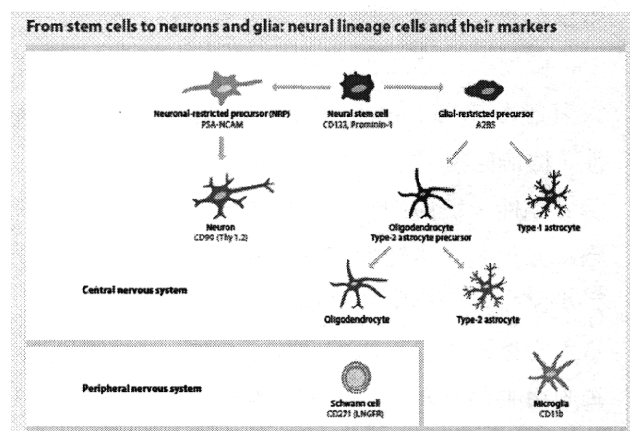


Fig.1 神経幹細胞から神経系譜細胞の分化

我々は歯髄幹細胞の神経系譜への分化能を確認するため、名古屋大学倫理委員会の承認を得て、口腔外科外来患者から得たヒト乳歯歯髄幹細胞(SHED)や智歯由来の永久歯歯髄幹細胞(DPSC)の性状解析を細胞染色やフローサイトメトリー解析を用いて行った。SHED、DPSCとも、90%以上の歯髄幹細胞が神経幹細胞・幼弱神経細胞・アストロサイト・未成熟オリゴデンドロサイトのマーカーを共発現していた。その一方で、成熟型神経細胞や成熟オリゴデンドロサイトのマーカーは発現していなかった。このことから、歯髄幹細胞は神経細胞のみならず、アストロサイトやオリゴデンドロサイトへの分化能も持ち合わせた、未成熟状態にある、ユニークな細胞集団であることが見出された(Fig.2,Table.1)

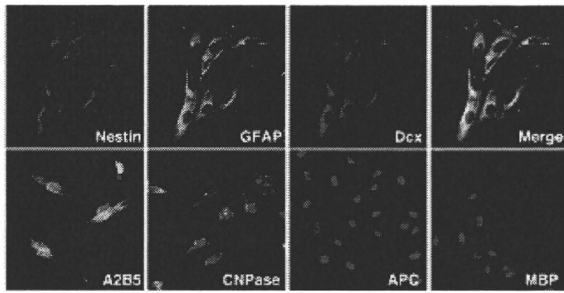


Fig.2-a SHED におけるマーカー遺伝子の発現
(細胞染色での定性解析)

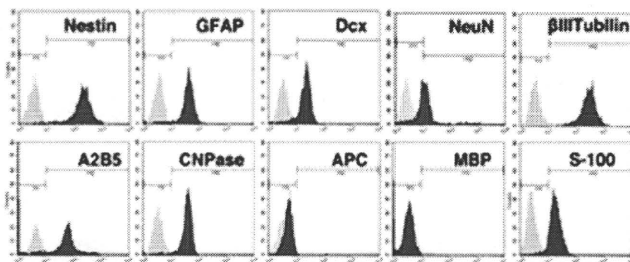


Fig.2-b SHED におけるマーカー遺伝子の発現
(フローサイトメトリーでの定量解析)

Nestin : 神経幹細胞マーカー, DCX・β-tubulin : 幼若神経細胞マーカー, GFAP・S100 : アストロサイトマーカー, A2B5・CNPase : 未成熟オリゴデンドロサイトマーカー, NeuN : 成熟型神経細胞マーカー, APC・MBP : 成熟オリゴデンドロサイトマーカー

	SHED n=3		DPSC n=3	
	average	S.D.	average	S.D.
Neural marker				
Nestin	92.71	10.46	95.40	1.52
Dcx	95.42	0.66	94.66	0.45
b-tubulin	99.69	0.21	98.10	0.77
GFAP	92.93	8.30	97.50	3.54
A2B5	94.84	3.72	96.56	0.33
CNPase	99.21	0.11	97.83	0.46
NeuN	3.73	5.45	7.00	0.51
APC	0.20	0.01	0.36	0.02
MBP	0.68	0.04	0.32	0.02

Table1 SHED および DPSC におけるマーカー遺伝子の発現

また、他の体性幹細胞である骨髄間葉系幹細胞 (BMSCs) や線維芽細胞 (FBs) と比較すると、歯髄幹細胞は SHED、DPSC とも GDNF、BDNF、CNTF といった神経栄養因子群を高率に発現していた (Fig.3)。

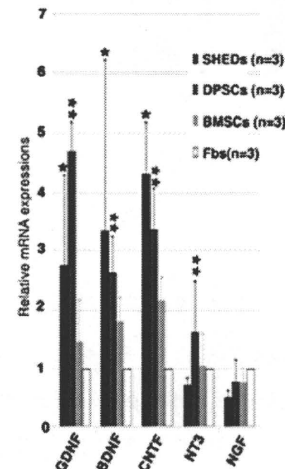


Fig.3 SHED および DPSC における神経栄養因子の発現

特に GDNF はドーパミンの取り込みと中脳神経細胞の生存および形態学的分化を特異的に促進することが知られており、このことは歯髄幹細胞のほうが骨髄間葉系幹細胞と比較して、パーキンソン病治療応用に有用であることが推測される。

歯髄幹細胞のもつ神経分化誘導への応答性を確認するため、神経細胞マーカー遺伝子の発現変化を定量 PCR で調べた。誘導は 2 段階で行い、神経細胞への分化 (step1) の後、さらにドーパミン神経細胞への分化 (step2) を行った。発現解析を行ったのは神経幹細胞・神経前駆細胞のマーカーである Pax6、神経幹細胞から神経細胞への分化を誘導する NeuroD1、NeuroD1 の発現を正に制御する Neurogenin、の 3 つの転写因子である。これらの発現は、step1 の段階で誘導前より増加し、step2 ではやや減少していた

(Fig.4)。

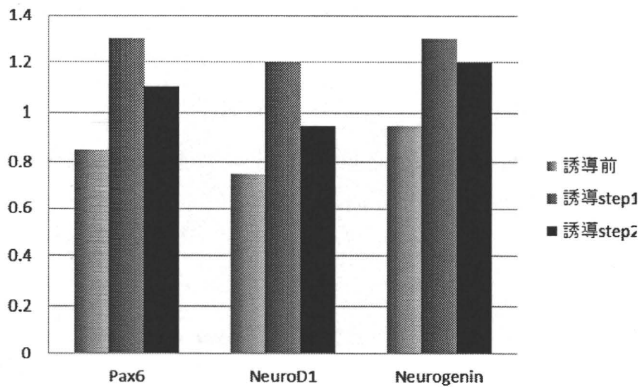


Fig.4 分化誘導 DPSC における神経分化誘導下での神経マーカーの発現変化

この結果は step1 では神経前駆細胞が誘導され、同時に神経前駆細胞から神経細胞への分化過程にあると考えられる。step2 のドーパミン神経細胞誘導によって成熟神経細胞に分化し、これら 3 つの遺伝子の発現量が減少していると考えられる。このことから、歯髄幹細胞は神経分化誘導に対して、正常な応答性を持つことが示唆された。

以上、Fig.2 から Fig.4 までの解析結果から、歯髄幹細胞は神経系譜に近い性状を示す細胞集団であり、より効率的な神経分化誘導システムが構築できれば神経疾患治療に有用な細胞源であることが強く示唆された。

(2-1) パーキンソン病治療に向けて

a) ドーパミン神経細胞への分化誘導法の確立

Fig.5はドーパミン神経細胞の発生過程と関与する遺伝子を図示している。複雑な転写因子発現のカスケードが正しく作動することでドーパミン神経細胞が産生されることがわかる。歯髄幹細胞を用いて、これらのカスケードが再現できるか検討した。誘導は 2 段階で行い、各種条件検討の結果、塊浮遊培養からスタートし、誘導

step1 では bFGF と EGF を添加することで 97%が NeuN 陽性成熟型神経細胞に分化し、step2 でさらに shh や BDNF 添加することで TH (チロシン水酸化酵素、ドーパミンの産生に関与する) 陽性のドーパミン神経細胞に分化誘導できることがわかった (Fig6)。

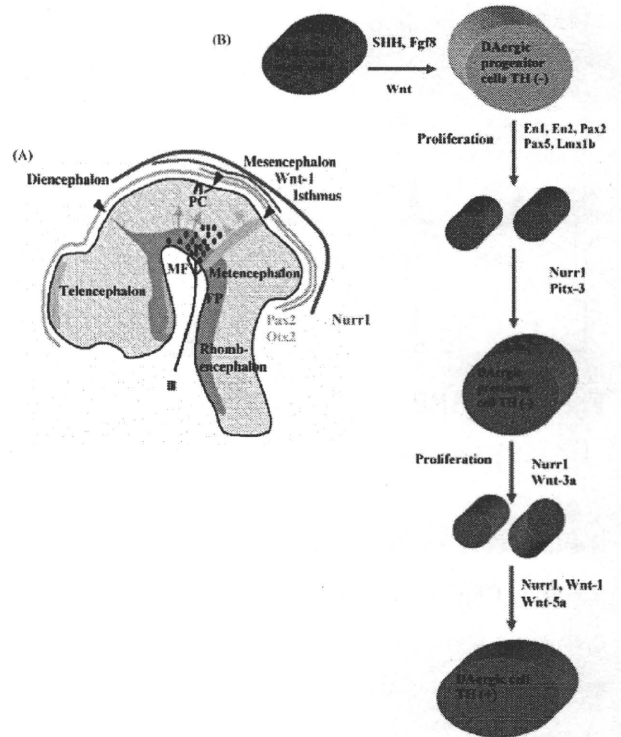


Fig.5 ドーパミン神経細胞の発生過程

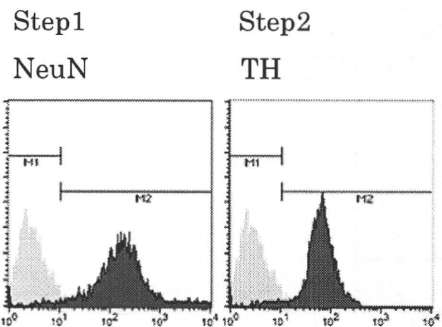
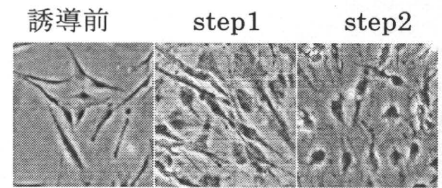


Fig.6 神経誘導 step1, step2 によるドーパミン神経細胞への分化