

201106009A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 上田 実

平成24（2012）年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
歯髄幹細胞由来成長因子を用いた脳梗塞治療に関する研究-----	1
研究代表 上田 実／研究協力 服部 宇, 杉山 昌彦, 井上 崇徳	
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-----	5
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 急性期脊髄損傷治療に関する研究-----	14
研究分担 山本 朗仁／研究協力 松原 弘記	
3. 歯髄幹細胞移植による脳室周囲白質軟化症治療法の開発に関する研究-----	21
研究分担 山本 朗仁／研究協力 山形 まり	
4. 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-----	29
研究分担 山本 朗仁／研究協力 中村 祥子、藤井裕美	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 42
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 45

歯髄幹細胞を用いた脳梗塞治療に関する研究

研究代表者 上田 実

研究協力者 服部 宇, 杉山 昌彦, 井上 崇徳

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

脳梗塞は現在、世界の死因第2位である。脳梗塞に対する最近の治療によって急性期死亡率が低下し、機能障害の回復に一定の成果を上げているが、いまだわが国の寝たきり原因の40%と第1位を閉めている。また脳梗塞罹患患者は年々増加傾向にあり、後遺症を伴う画期的な治療法開発が急がれている。

現在注目されている新規医療のひとつに脳梗塞への細胞移植療法があり、ES細胞、iPS細胞など万能細胞が候補として考えられるが、現段階では倫理的問題や癌化の問題などがあり、現実的ではない。他の候補としては骨髄幹細胞があり、臨床治験として実地され一定の効果をあげているが、骨髄幹細胞は採取の際に骨髄穿刺を要するため患者負担は大きく、また神経再性能も患者ごとにばらつきが大きいという問題点もある。Ioharaらは、歯髄幹細胞は骨髄幹細胞より高い多分化能をもち、in vivoにて血管誘導能および神経誘導能を示し、またブタ歯髄由来のCD31-SP細胞を下肢虚血マウスに移植すると血管新生を促進することをしめした。そして著者らは、脳梗塞モデルラットに同細胞を移植すると運動機能が改善し、梗塞体積が縮小することを示してきた。しかし、脳梗塞の細胞移植医療においては、現段階で法規制の問題、設備投資、費用、長期間の培養基間など問題点が多く、幅広い医療機関への普及には困難を伴う。本研究では骨髄幹細胞より増殖、分化能が高く、免疫原性も低い乳歯歯髄幹細胞由来成長因子を鼻腔内投与することで、脳梗塞機能回復効果を認め、その可能性について検討した。

A. 研究目的

脳梗塞による機能障害回復の新規医療の一つに脳梗塞への細胞治療法があり、骨髄幹細胞移植が臨床治験として実施され、一定の効果を上げている。しかし、脳梗塞の細胞移植医療においては、現段階で法規制の問題、設備投資、費用、長期間の培養基間など問題点が多く、幅広い医療機関への普及には困難を伴う、本研究では骨髄幹細胞より増殖、分化能が高く、免疫原性も低い乳歯歯髄幹細胞由来成長因子を鼻腔内投与することで、脳梗

塞機能回復効果を認め、その可能性について

脳梗塞の現状

- ・世界における死因第3位
- ・運動麻痺・感覚障害・認知機能障害を伴う
- ・要介護の原因(寝たきりの原因の約40%…1位)



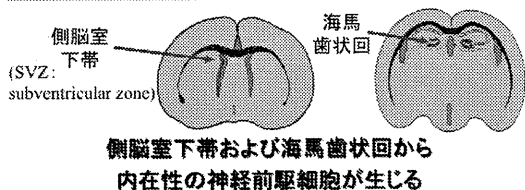
医学的・福祉的・医療経済的に重大な疾患

画期的な治療法の開発が急がれている

検討した。

成体脳の特徴

新生ニューロン発生場所



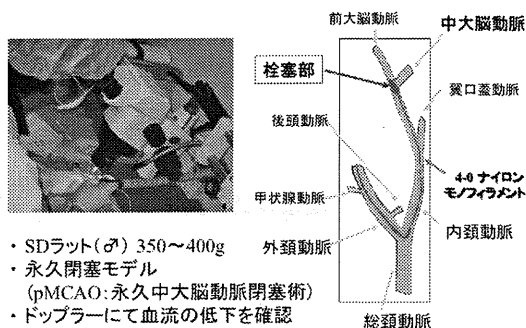
側脳室下帯および海馬齒状回から
内在性の神経前駆細胞が生じる

免疫租界 脳は免疫拒絶反応が起こりにくい組織
血液脳関門が関与

B. 研究方法

雄性 SD ラット(350~400g)を用いて中大脳動脈閉塞術を施行、永久閉塞モデル(pMCAo)を作製した。成長因子を分泌する細胞の候補として歯髄幹細胞の中で乳歯歯髄幹細胞は増殖能と分化能に優れ、免疫原性も低い乳歯歯髄幹細胞を採用した。乳歯は無菌的に歯髄を摘出、血清を含まない DMEM 培地で 72 時間培養した細胞の培養上清を精製した。得られた上清は乳歯歯髄幹細胞由来成長因子成分

脳梗塞モデルの作製



- SDラット(♂) 350~400g
- 永久閉塞モデル (pMCAO: 永久中大脳動脈閉塞術)
- ドップラーにて血流の低下を確認

(SHED-derived conditioned medium : SH-CM)として永久脳梗塞 72 時間後(3 日後)に SH-CM10 μ L を 2 分ごと 10 回、ハミルトンシリンジを用いて経鼻腔内投与した。コントロールとして生理食塩水(PBS)を同様に投

与した。鼻腔内投与は梗塞 3 日後から 15 日後まで連日投与した。

C. 脳梗塞モデルラットにおける乳歯歯髄幹細胞由来成長因子投与

脳梗塞領域の計測結果を示す。梗塞 16 日後に屠殺した試料において、左はコントロールの PBS、右は SH-CM 投与で有意に梗塞領域の

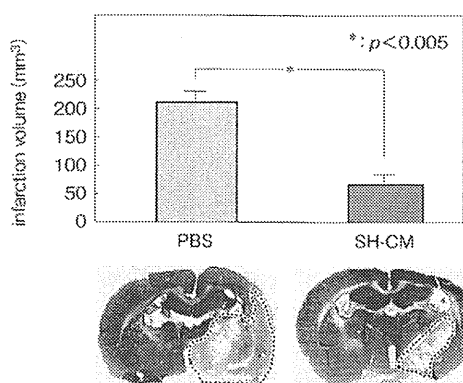


図 1 脳梗塞領域の計測

脳梗塞 16 日後に屠殺した試料において左はコントロールの PBS 投与群、右は SH-CM 投与群で、SH-CM 投与群では有意に梗塞領域の縮小が認められる。

縮小が認められる。図 2 は運動麻痺スコアの変化を示し、Leker らの運動麻痺スコアを若干改変し、評価した(表 1)。スコアは、最小を 0 点、最大を 10 点とした。計測時期は梗塞後 1,3,6,9,12,15 日とし、PBS 投与群と比較して SH-CM 投与群で有意に運動麻痺の回復が認められた。図 3 は神経幹細胞、神経前駆細胞マーカーである doublecortin(DCX)、神経細胞マーカーである neurofilament(NF)、NeuN、血管内皮細胞マーカーである RECA-1 の抗体を用いて脳梗塞部位における免疫組織化学染色結果を示す。PBS 投与群と比較して、SH-CM 投与群で、陽性細胞の増加を認めた。

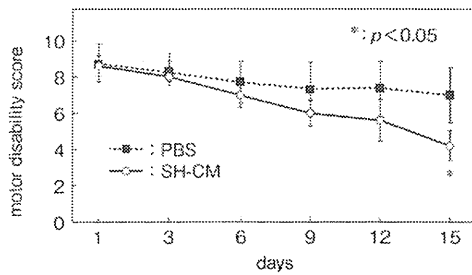


図2 運動麻痺スコアの比較
PBS 投与群と比較して SH-CM 投与群で、有意に運動麻痺の回復が認められた。スコアは表1参照。

表1 運動麻痺スコアの評価基準

評価基準：	
1.	尻尾をもってもち上げたとき、麻痺側の四肢を突っ張らない(1点)
2.	麻痺側の下肢を引っ張ると下肢を引っ込めない(1点)
3.	体を麻痺側に倒すとそちらに傾く(1点)
4.	歩行させても歩けない(1点)
5.	50 cm の円のなかから 10 秒以内に歩いて抜け出せない(1点) 20 秒以内に歩いて抜け出せない(2点) 30 秒以内に歩いて抜け出せない(3点)
6-1.	麻痺側の四肢に上方向の抵抗を加えると突っ張らない(1点)
6-2.	麻痺側の四肢に前方向の抵抗を加えると突っ張らない(1点)
6-3.	麻痺側の四肢に横方向の抵抗を加えると突っ張らない(1点)

スコアは、最少を0点、最大を10点とした。

図4は図3のDCX, NeuN, RECA-1について脳梗塞全体部を含む領域(幅6mm)において、1.2mmごとに5枚の連続切片を免疫染色し、脳梗塞部周囲の典型部を5カ所ずつ、1サンプルについて計25カ所を蛍光顕微鏡 BIOREVO、BZ-9000(KEYENCE)で撮影、Dynamic cell count、BZ-HIC(KEYENCE)にて密度の統計学的検討結果を示す。DCX、NeuN、RECA-1 陽性細胞は、PBS 投与群と比較して SH-CM 投与で約1.5倍に増大していた。

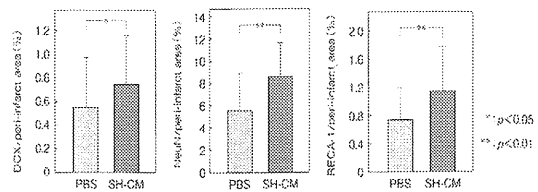


図4 陽性細胞数
DCX、NeuN、RECA-1 陽性細胞数は PBS 投与群と比較して、SH-CM 投与群で約1.5倍に増大していた。

図5は神経幹細胞が存在する側脳室下帯周囲における梗塞後6日、16日のDCXによる免疫組織化学染色結果を示す。PBS 投与群と比較して SH-CM 投与群で、側脳室下帯から多くの神経前駆細胞の遊走が認められる。しかも梗塞16日後よりも6日後のほうがより多くの神経前駆細胞の陽性細胞が認められ、早期の脳梗塞機能障害部位の修復への関与が示唆される。梗塞領域の減少、運動麻痺の改善において、SH-CM 投与によって有意に改善が認められた。SH-CM 投与は梗塞領域において神経および血管の再生を促進することを示唆した。

D. 歯髄幹細胞由来成長因子投与の脳内到達経路および作業機序

成体脳では長年静的なものと考えられてきた脳の神経回路が、実はダイナミックにニューロンを入れ替えて、たえず変化しているも

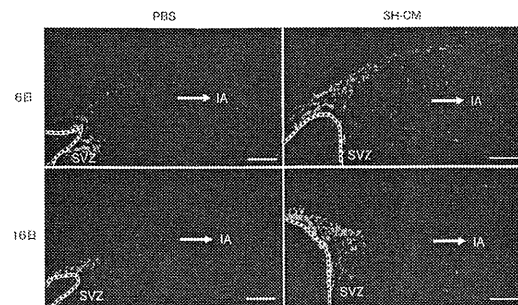


図5 側脳室下帯からの神経前駆細胞の遊走
梗塞後6日、16日のDCXによる免疫組織化学染色結果で、PBS 投与群と比較して SH-CM 投与群で、側脳室下帯から多くの神経前駆細胞の遊走が認められる。梗塞16日後よりも6日後のほうがより多くの神経前駆細胞の陽性細胞が認められる。
IA: infarct area, SVZ: 側脳室下帯、スケールバー=100μm。

のであることがわかってきた。海馬歯状回および側脳室下帯では内在性の神経前駆細胞が生じることがわかっており、通常の場合、海馬歯状回では顆粒細胞層に、側脳室下帯では神経幹細胞から一過性増殖細胞に分化、多数の幼若ニューロンを産生し、アストロサイトに囲まれた rostral migratory stream(RMS)とよばれる移動経路を通過して嗅球まで移動、2種類の介在性ニューロン(嗅脳顆粒細胞、傍系球体細胞)に分化し、嗅球の神経回路へ統合される。嗅球は以前より脳内への薬剤ターゲットとして、各種疾患にかかわる薬剤の脳内への入口として研究が盛んに行われており、Yangらは¹²⁵Iで標識したVEGFを鼻腔内投与し、嗅球を介して脳内到達経路を明らかにした。ひとつは嗅球から細胞間質を経て脳介在部に至る経路、もうひとつは三叉神経から脳幹、脊髄に至る経路である。著者らは、これらの方法に準じて鼻腔内から嗅球、脳内に至る経路で、SH-CM投与を行った。SH-CM投与の脳梗塞機能障害の作用機序については基本的に細胞移植医療と同様の作用機序が考えられる。それは、①成長因子(サイトカイン)による神経栄養・保護作用、②血管新生作用、③神経再生である。しかし、細胞移植医療とSH-CM投与の違いは後者が内在するメカニズムを活用した神経回路の再生、つまり脳内に存在する幹細胞を成長因子投与によって活性化して自己修復を促す医療であるということである。したがって、SH-CM投与の脳梗塞機能障害への臨床応用には、今後も新生ニューロンの産生、移動、生存、分化の過程を解明することが必

要不可欠である。

E. 研究発表

1. 論文発表

Sugiyama, M., Iohara, K., Wakita, H., Hattori, H., Ueda, M., Matsushita, K., & Nakashima, M. (2011). Dental Pulp-Derived CD31⁻/CD146⁻ Side Population Stem/Progenitor Cells Enhance Recovery of Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Tissue Eng Part A*, 17(9-10), 1303-1311.

2. 学会発表

・第56回日本口腔外科学会総会

井上崇徳・杉山昌彦・服部宇・日比英晴・上田実

乳歯歯髄幹細胞由来培養上清を用いた脳虚血疾患治療の可能性

2011年10月22日

大阪

・第32日本炎症再生学会

井上崇徳・杉山昌彦・服部宇・山本朗仁・日比英晴・上田実

乳歯歯髄幹細胞由来培養上清を用いた脳虚血疾患治療の可能性

2011年6月3日

京都

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

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10万人以上と言われている。損傷した中枢神経組織は自己再生能力に乏しく、永久的に重篤な機能不全が残るケースが多い。受傷後の時間経過とともに複雑に変化するその病態は、決定的な治療法の開発の大きな障壁となっている。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、歯髄幹細胞の多面的神経再生効果が脊髄損傷治療に有用であること示唆された。歯髄幹細胞は難治性神経疾患に優れた治療効果を発揮するための性質を兼ね備えていることが見いだした。損傷した神経組織の保護作用/抗アポトーシス効果：神経損傷では受傷後24時間で多くの神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトがアポトーシスで消失する。これが損傷後の神経線維や髄鞘の広範な破壊を引き起こす主たる原因である。歯髄幹細胞はこれら全てのアポトーシスを強力に抑制する。アポトーシス細胞の総数は歯髄幹細胞移植によって10分の1程度に減る。歯髄幹細胞由来のパラクライン因子が直接的にアポトーシスを抑制している可能性が高い。神経回路の再編を促す神経軸索伸長作用：トレーサーでラベルされた大脳皮質脊髄路の神経軸索を組織化学的に検出した。歯髄幹細胞を移植した脊髄では、切断された軸索が切断面を越えて尾側脊髄に伸長していた。コントロールでは、軸索伸長が損傷部周囲のグリア瘢痕によって抑制されていた。実際、歯髄幹細胞が分泌する何らか

のパラクライン因子が軸索伸長抑制因子に対して拮抗作用を示すかどうか、*in vitro*神経細胞培養系にて検証した。新生ラット小脳顆粒細胞はPoly-L-Lysineコートの上で激しく突起を伸長する。これをCSPGやMAG蛋白の上で培養すると突起伸長が抑制される。歯髄幹細胞の培養上清を加えると顆粒細胞の突起伸長が回復する。骨髄間葉系幹細胞や皮膚線維芽細胞の培養上清にはこの活性が検出できない。つまり、歯髄幹細胞の培養上清の中には様々な軸索伸長抑制因子の活性を制御する因子が含まれているのである。それ故に切断したラット脊髄神経の軸索を、切断面を越えるほど再生し得るのである。成熟型オリゴデンドロサイトへの特異的分化能：移植した細胞の30%以上が生着し、その90%程度がMyelin basic protein (MBP)とAdenomatous Polyposis Coli (APC)を発現する成熟型オリゴデンドロサイトに分化すること。さらに、自己由来の幹細胞であるため移植安全性が確保しやすく、倫理的問題もきわめて少ない。本研究において、不要な臓器から採取した体性幹細胞を用いて難治性神経疾患を治療するユニークな再生医療の実用化の可能性が示されたので報告する。

【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や神経へ移植後の分化様態が不明確であること、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. 歯髄幹細胞の性状解析: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。
2. S. Dラット(雌、9週齢)の脊髄を第9-10頸椎レベルで完全に切断したのち、切断部から頭側、尾側に各1mm、脊髄中心部から左右に1.5mm、深さ1.5mmの部位に直接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)をマイクロインジェクターにて移植した。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週後に皮質脊髄路にBDAを注入し、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。

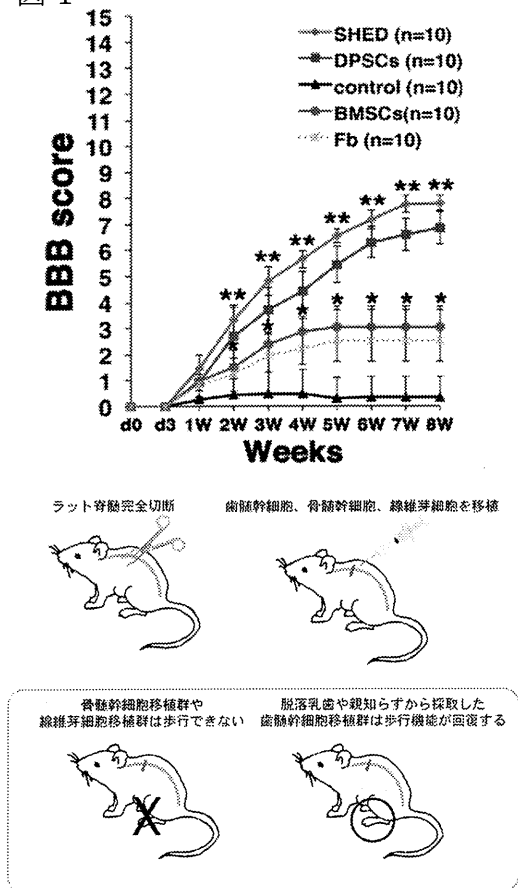
C. 研究結果

平成22年度研究成果

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った。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「ラット脊髄損傷モデル」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線維芽細胞を移植したラッ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（図1）。

図1



3. 歯髄幹細胞と骨髄間葉系幹細胞とのマイクロアレイ解析による比較

マイクロアレイ解析を行ったところ歯髄幹細胞は骨髄間葉系幹細胞に対し、2倍以

上発現の差を持つ遺伝子が3318種類、そのうち1718種類の遺伝子が非常に高度に発現していた。さらに上位30には、ontology categories: extracellular and cell surface region, cell proliferation, and tissue/embryonic developmentなどがより高度な遺伝子の発現が観察された (Table1)。

Table1

Functional gene classification in SHEDs versus BMSCs

Term	Changed gene up	Total gene	P
Extracellular region	343	2,865	2.52×10^{-16}
Skeletal system development	194	661	1.46×10^{-9}
Extracellular matrix	101	678	9.29×10^{-9}
Extracellular space	147	1,134	2.09×10^{-8}
Extracellular matrix organization	43	195	4.86×10^{-8}
Multicellular organismal development	643	6,683	9.36×10^{-8}
Collagen fibril organization	29	57	4.97×10^{-7}
Anatomical structure morphogenesis	346	3,339	9.52×10^{-7}
Mitotic cell cycle	146	1,184	1.11×10^{-6}
Proteinaceous extracellular matrix	82	578	1.36×10^{-6}
Organ morphogenesis	144	1,182	2.43×10^{-6}
Vasculature development	98	732	3.76×10^{-6}
Embryonic morphogenesis	95	728	7.04×10^{-6}
Cell proliferation	245	2,288	7.17×10^{-6}
Cell cycle	230	2,135	9.74×10^{-6}
Blood vessel development	93	707	1.31×10^{-5}
Response to wounding	191	1,738	2.02×10^{-5}
Receptor protein serine/threonine kinase signaling	56	369	2.12×10^{-5}
M phase of mitotic cell cycle	77	567	2.40×10^{-5}
Cell surface	86	671	3.26×10^{-5}
Organ development	362	3,675	3.68×10^{-5}
Collagen binding	21	90	3.90×10^{-5}
Glycosaminoglycan binding	42	262	4.65×10^{-5}
Mitotic spindle organization	12	33	7.15×10^{-5}
Cell adhesion	183	1,693	7.76×10^{-5}
Skeletal system morphogenesis	42	260	8.16×10^{-5}
Tissue development	185	1,729	8.76×10^{-5}
Cell surface receptor linked signaling pathway	368	3,785	8.98×10^{-5}
Mitosis	73	554	9.98×10^{-5}
Regulation of cell cycle	127	1,103	0.000109

平成23年度研究成果

詳細な組織学的解析と運動神経軸索のトレース実験を行った。

1. 驚異的な神経軸索伸長効果

歯髄幹細胞を移植すると軸索が切断面を越えるか検証した。脊髓損傷ラットの脳に、脳から脊髓に向かう神経軸索の走行に沿って輸送される物質・BDAトレーサーを脳に注入し、トレーサーが切断面を越えれば、

軸索に沿って輸送される
トレーサーを脳に注入



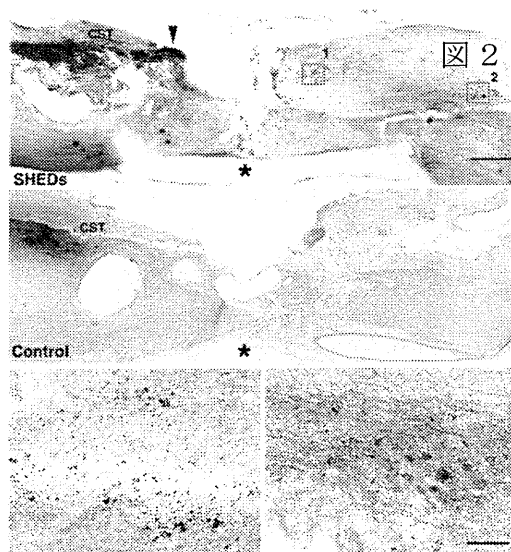
◆移植した歯髄幹細胞



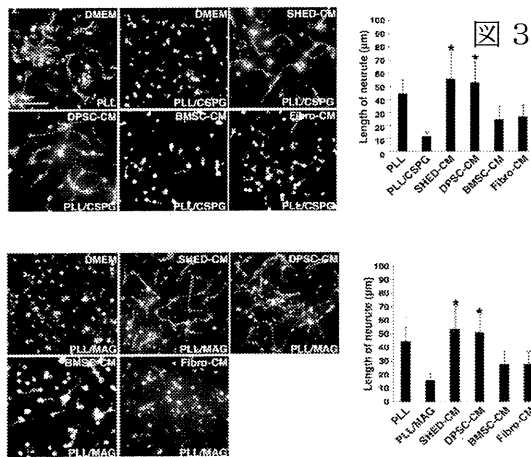
切断した軸索が再生したことがわかります。PBSを注入した脊髓損傷ラットではトレーサーが切断面を越えて

いることは観察できなかつた。一方、歯髄幹細胞を移植したラットではトレーサーが切断面を越えて、尾側脊髓に侵入していることが観察できた。切断面周囲は、癒痕組織で、コントロールでは癒痕内に侵入する軸索はない。歯髄幹細胞移植群では激しい軸索の侵入を観察された(図2)。これらの結果は、歯髄幹細胞を移植したラットでは癒痕組織があっても切断した神経軸索が癒痕や切断面を越えて再生することを示した。

癒痕の主要成分であるプロテオグリカンは、軸索の伸長を抑制する。*in vitro*にて歯髄幹細胞の分泌するパラクラインフ



クターがプロテオグリカンの機能を直接抑制する可能性を検証した。ラット脳から小脳顆粒細胞を採取し、培養すると軸索を伸ばす。プロテオグリカンの上で培養すると軸索は伸長しない(図3)。重要なことに、乳歯や永久歯の細胞培養上清を添加すると軸索の伸長が回復する。骨髄幹細胞や線維芽細胞の細胞培養液には、この活性が検出できなかった。歯髄幹細胞のパラクラインファクターは、癒痕による神経組織の再生抑制効果を取り除く効果があると示唆された。



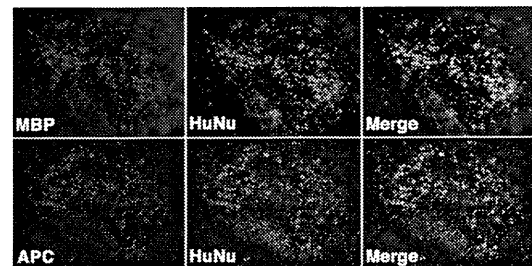
2. 成熟型オリゴデンドロサイトへの特異的分化能

脊髄は神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトで構成されている。オリゴデンドロサイトが作る髄鞘は、神経情報の伝達速度を速くする。髄鞘の再生・伝達速度の回復は、脊髄損傷による運動機能麻痺の改善に重要である。細胞移植した脊髄を、ヒト細胞核を認識する抗体 (HuNu) と細胞系譜マーカー (MBP, APC) で共染色した (図4)。両方の蛋白を発現している細胞は黄色で表示される。移植したヒト歯髄幹細胞が成熟型オリゴデンドロサイトに分化していることを見いだした。一方、神経やアストロサイトに分化した歯髄幹細胞は検出できなかった。これらの結果から脊髄損傷環境下に移植した歯髄幹細胞は髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトに分化し、損

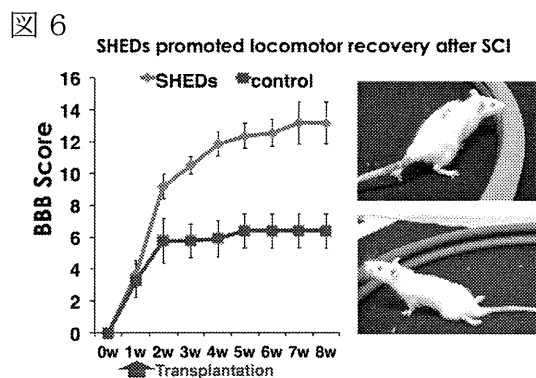
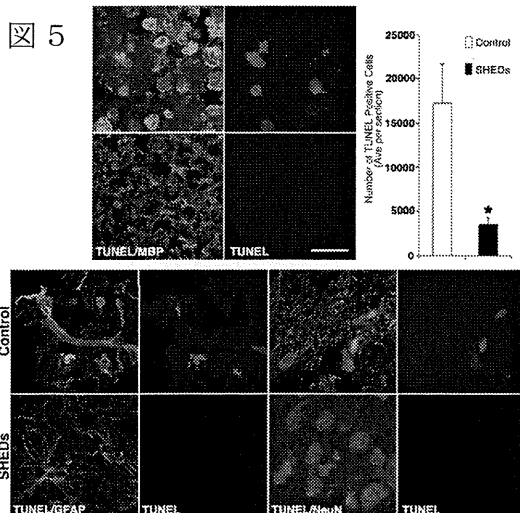
傷によって失われた細胞を補給することが明らかとなった。

3. 神経損傷に伴うアポトーシス細胞死を抑制

図4



損傷直後の神経細胞死は、脊髄を破壊する主たる要因である。歯髄幹細胞が損傷による細胞死を抑制する保護作用を発揮するか検証した。染色体の断片化 (アポトーシス) をTUNEL染色にて検出した。歯髄幹細胞移植群ではTUNEL陽性細胞は検出されなかった (図5)。統計学的解析を行うと、歯髄幹細胞移植群のTUNEL陽性細胞はコントロール群の10分の1程度であった。歯髄幹細胞はアポトーシスを強力に抑制することが観察された。



4. 脊髄損傷亜急性期での歯髄幹細胞の 下肢運動機能改善

ヒト脊髄損傷に近い圧挫型モデルラットを使った治療効果の検討を行った。脊髄切断の代わりに、200kdyneの加重をIH Impactor (Precision Systems and Instrumentation)にて加え、損傷から一週間後に歯髄幹細胞を移植した。歯髄幹細胞移植群が2週間から徐々に回復がみられ8週間には足底部で体重を支え、上下肢の協調性を認める劇的な機能改善を示すことを見いだした (図6)。

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, M. Naruse, M. Yamagata, K. Sakamoto, R. Tauchi, N. Wakao, S. Imagama, H. Hibi, K. Kadomatsu, N. Ishiguro, and M. Ueda Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms The Journal of Clinical Investigation 2012 Jan 3;122(1):80-90

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回日本再生医療学会総会 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, M. Yamagata, M. Fujio, M. Ueda Transplantation of human dental pulp stem cells in complete transaction 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)

K. Sakai Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms 第11回日本再生医療学会総会 4th Young Investigator Award 2012.06.12-14 横浜 (口演)

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

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急性期脊髄損傷治療

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

研究要旨

難治性疾患である脊髄損傷に対する新たな治療法として、様々な幹細胞（ES、iPS、体性組織幹細胞）の移植治療が検討されている。移植した幹細胞は「失われた細胞の補給効果」や「細胞が分泌する液性因子によるパラクライン効果」によって機能回復を促進すると考えられる。しかしながら、脊髄損傷後の激しい炎症環境下に生着できる細胞は限られているため治療効果は限定的である。また、細胞移植治療には、宿主による免疫拒絶、移植安全性や倫理的問題など臨床応用には様々な課題が山積している。これまで我々は「ヒト歯髄幹細胞をラット脊髄損傷モデルに移植すると下肢運動機能が劇的に回復する」ことを報告してきた。

本研究では、「歯髄幹細胞由来のパラクライン神経再生効果」のみで脊髄損傷モデルの治療が可能か検討した。歯髄幹細胞の無血清培養した培養上清を急性期圧挫型ラット脊髄損傷モデルへ持続投与すると「ミエリンの脱髄」「神経軸索伸長阻害」や「神経系細胞のアポトーシス死」を抑制し、下肢運動機能が改善した。骨髄間葉系幹細胞や皮膚線維芽細胞の培養上清では十分な回復は得られなかった。これらの結果には歯髄幹細胞培養上清中のパラクライン因子の損傷急性期における「強い炎症・免疫調節能」が起因していることが明らかとなった。歯髄幹細胞培養上清は損傷部位へ集積した活性化ミクログリア/マクロファージを抗炎症・組織修復系タイプへと強く転化させることを見いだした。また、ミクログリア初代培養系においても、歯髄幹細胞培養上清の同様な効果を確認した。本研究結果によって、ヒト歯髄幹細胞由来パラクライン因子は脊髄損傷直後の組織破壊的な炎症環境を神経再生・修復環境へと導くことで治癒促進に寄与しているということが示された。

【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。現在、国内製薬企業と連携し、培養上清中の神経再生活性因子の探索を遂行している。今後、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く、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。中枢神経再生効果を有する因子群が同定されれば、細胞移植を伴わない安全で臨床応用しうる理想的な治療法を確立できることが期待される。

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急性期脊髄損傷モデルへ投与し、その治療効果を確認した。さらに、その治療メカニズムを急性期投与による培養上清の炎症・免疫調節能への影響に着目し、*in vivo* および *in vitro* で詳細に解析することで、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。

平成 22 年度研究成果

平成 22 年度では、歯髄幹細胞培養上清の急性期脊髄圧挫損傷モデルへの持続投与による治療効果の検討を行った。

B. 研究方法

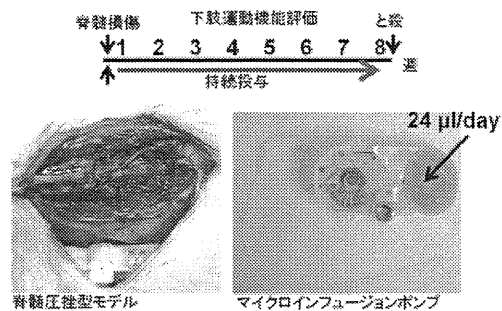
1) *In vitro* 細胞培養系

- 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、名古屋大学医学部付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まないようにする。試験の目的以外に、

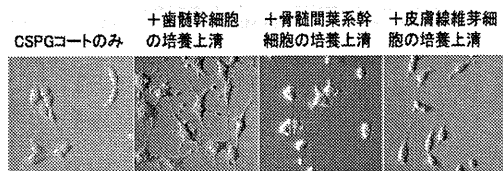
試験で得られた被験者のデータを使用しない。

- 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。

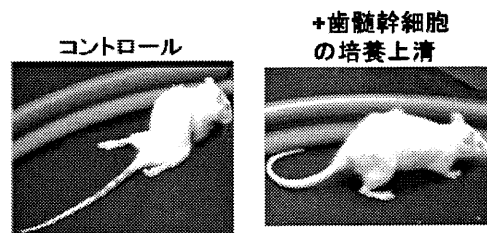
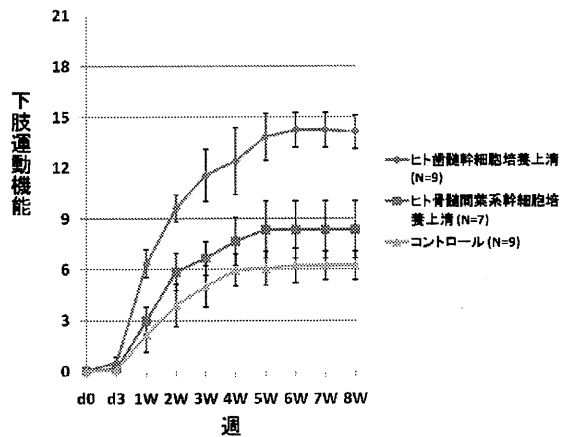
C. 研究結果

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)。



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。



平成 23 年度研究成果

平成 23 年度では、歯髄幹細胞培養上清の急性期脊髄圧挫損傷モデルへの投与での治癒メカニズムをその炎症・免疫調節能について解析した。

D. 研究方法

1) In vitro 細胞培養系

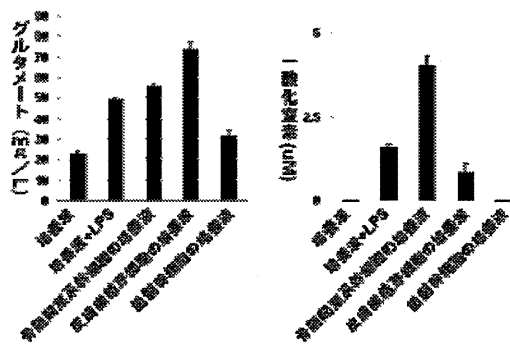
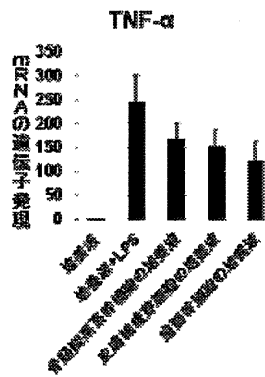
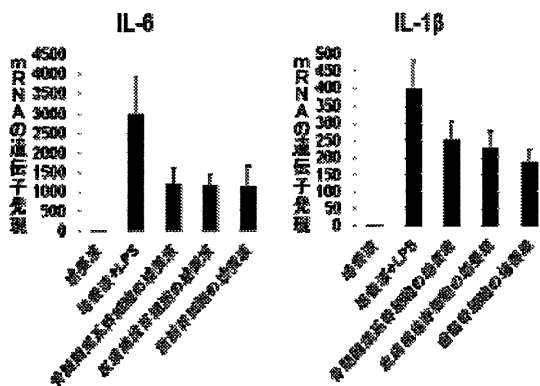
脊髄損傷における炎症・免疫反応の主役となるミクログリアを用い、その初代培養系を LPS で刺激、炎症/組織破壊系ミクログリアへ誘導し、その環境下で歯髄幹細胞培養上清を作用させ、炎症性サイトカインの遺伝子発現変動や、細胞障害性因子であるグルタミン酸や一酸化窒素産生の変動を解析した。また、非活性型ミクログリアへ歯髄幹細胞培養上清を作用させた時に抗炎症/組織修復系ミクログリアへ誘導できるかどうか検討した。

2) *In vivo* 脊髄損傷モデル

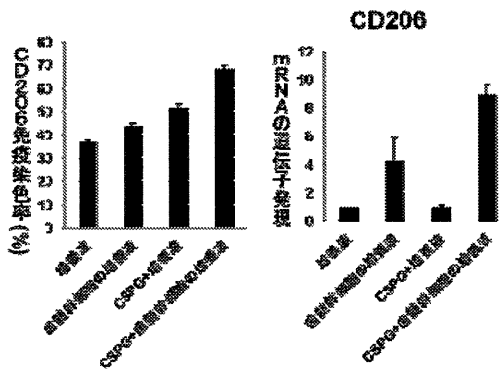
8 週齢雌 SD ラットを用いて、圧挫型脊髄損傷のラットモデルを制作した。損傷直後より完全埋め込み型マイクロインフュージョンポンプにて脊髄くも膜下腔にヒト歯髄幹細胞無血清培養上清を持続的に投与した。投与後 12 時間、24 時間、3 日、7 日で脊髄より RNA を抽出し、遺伝子発現解析を行った。さらに、投与後 3 日目で組織学的解析を行い、急性期に損傷部へ集積したミクログリア/マクロファージの動態を観察した。

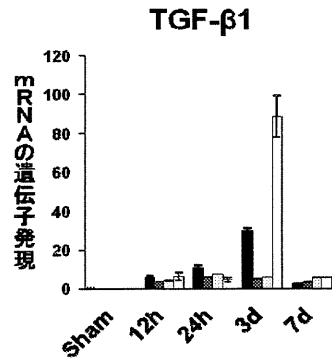
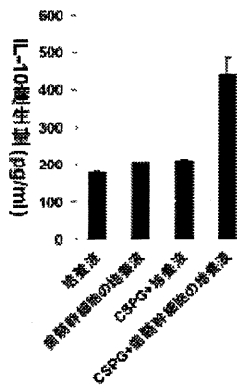
E. 研究結果

***In vitro* 実験系**：歯髄幹細胞培養上清は LPS で活性化されたミクログリアの炎症性サイトカイン IL-6、IL-18、TNF- α の発現を抑制した。これは骨髄間葉系幹細胞培養上清および繊維芽細胞培養上清でも同様の傾向を示した。また、ミクログリアからの細胞障害性因子グルタメートや一酸化窒素の産生は歯髄幹細胞培養上清が特異的に阻害した（下図参照）。



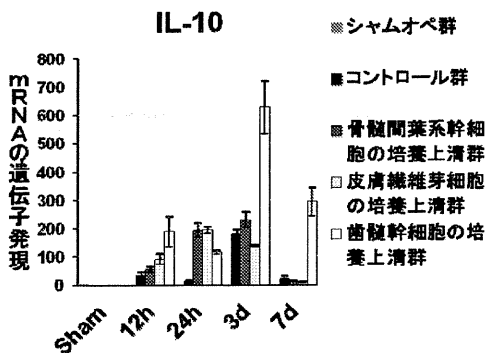
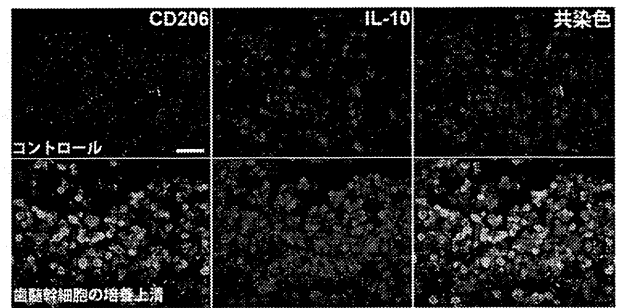
さらに、非活性型ミクログリアへ歯髄幹細胞培養上清を作用させると、CSPG（神経軸索伸長阻害因子であるが、近年脊髄損傷急性期におけるミクログリア刺激因子の一つとして報告されている）を介し、抗炎症/組織修復系ミクログリアマーカーである CD206 を発現し、かつ強力な抗炎症性サイトカイン IL-10 を産生するミクログリアへと誘導された（下図参照）。





In vivo 実験系：歯髄幹細胞培養上清投与後 12 時間、24 時間、3 日、7 日での脊髄での炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカインの遺伝子発現変動解析の結果、コントロール群と比較して、歯髄幹細胞培養上清投与群では各タイムポイントにおいて炎症性サイトカイン IL-6、IL-18、TNF- α の有意な発現抑制がみられた。これは、骨髄間葉系幹細胞培養上清および皮膚繊維芽細胞培養上清投与群においても同様の傾向であった。一方、抗炎症性サイトカイン IL-10、TGF- β 1 は投与後 3 日目において歯髄幹細胞培養上清投与群においてのみ有意な発現上昇を認めた（下図参照）。

また、投与後 3 日目の組織学的解析により、歯髄幹細胞培養上清群では、急性期に損傷部へ集積したミクログリア/マクロファージの多くが抗炎症/組織修復系ミクログリアマーカーである CD206 および抗炎症性サイトカイン IL-10 を発現するミクログリア/マクロファージであった（下図参照）。



F. 考察

現在、脊髄損傷に対する新たな治療法として、様々な幹細胞（ES、iPS、体性組織幹細胞）の移植治療が検討されているが、様々な課題が残されており、臨床応用は現実的に難しい。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、ヒト歯髄幹細胞由来の無血清培養上清を用いてその中枢神経再生効果・治癒メカニズムを *In vitro* および *In vivo* 実験系で実証した。このことから歯髄幹細胞培養上清中のタンパク質が新規中枢神経再生治療薬