

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、本研究結果で得られた歯髄幹細胞培養上清の特異的効果である「活性化ミクログリア/マクロファージに対する炎症・免疫調節能」、「神経細胞アポトーシス死抑制能」、「神経軸索伸長促進能」を軸として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。

また、網羅的なサイトカインアレイ解析においても、歯髄幹細胞培養上清中には、骨髄間葉系幹細胞培養上清にはない抗炎症因子、ミクログリアの組織再生修復系タイプ誘導因子や、神経保護因子が同定されており、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、培養上清をフィルトレーションし、細分化後、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。

## G. 結論

本研究において、ヒト歯髄幹細胞培養上清のラット急性期脊髄損傷モデルへの投与において著明な下肢運動機能改善効果を認めた。それは、急性期炎症・免疫反応への培養上清中の因子の強い影響によるものであった。また、歯髄幹細胞無血

清培養上清中には抗炎症、ミクログリア誘導、神経保護関わる多数の因子群が含まれていることが判明した。このことから、歯髄幹細胞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。

## H. 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。

## I. 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

Matsubara, K, Yamamoto, A, Sakai, K, Matsushita, Y. & Ueda, M. (2011). The potential clinical benefits of the serum-free conditioned media derived from dental pulp stem cells in CNS regeneration therapy 第2回名古屋大学・生理学研究所合同シンポジウム 名古屋 2011.8.20

Matsubara, K, Yamamoto, A, Sakai, K, Matsushita, Y. & Ueda, M. (2011). The potential clinical benefits of the serum-free conditioned media derived from dental pulp stem cells in CNS regeneration therapy 第3回グローバル

COE 国際シンポジウム 名古屋 2011.12.8-9

Matsubara, K, Yamamoto, A, Sakai, K, Matsushita, Y. & Ueda, M. The potential clinical benefits of the serum-free conditioned media derived from dental pulp stem cells in CNS regeneration therapy 第4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】 PosterN1-5 名古屋 2012.2.24-25

Matsubara, K, Yamamoto, A, Sakai, K, Matsushita, Y. & Ueda, M. Effect of Growth Factors Derived from Dental Pulp Stem Cells for Spinal Cord Injury The Fourth Symposium of Young Researchers Micro-nano Systems for Biomedical Applications 名古屋 2012.03.01

論文発表

Sakai, K, Yamamoto, A, Matsubara, K, Nakamura, S, Naruse, M, Yamagata, M, Sakamoto, K, Tauchi, R, Wakao, N, Imagama, S, Hibi, H, Kadomatsu, K, Ishiguro, N. & Ueda, M. (2012) human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest* Jan 3, 2012

Matsubara, K, Yamamoto, A, Noda, M, Sakai, K, Matsushita, Y, Shohara, R, Naruse, M, Suzumura, A. & Ueda, M. (2012) Spinal cord injury recovery by human deciduous tooth stem cell secreted factors. 投稿中

J.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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

厚生労働科学研究費補助金（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脳室周囲白質軟化症治療法の開発

分担研究者 山本 朗仁

研究協力者 山形 まり

名古屋大学医学系研究科 頭頸部・感覚器外科学講座

研究要旨

難治性神経疾患の1つである脳質周囲白質軟化症（periventricular leukomalacia : PVL）の治療法の開発のため、細胞移植治療の細胞源として ES 細胞、iPS 細胞の研究が進められているが、倫理性や、癌化、免疫拒絶反応などによる安全性に問題があり、実用化にはほど遠いのが現状である。そこで我々は倫理面や安全性の問題を解決しうる移植細胞源として、医療廃棄物である乳歯から採取可能な乳歯歯髄幹細胞（SHED）に着目した。SHED は自己の乳歯由来の細胞であることから免疫拒絶反応の問題がなく、本来ならば医療廃棄物であることから倫理的な問題もほとんどない。体性幹細胞源としての骨髄や脂肪組織も注目されているが、これらに比べて SHED は採取方法も低侵襲であり、患者への負担も少ない。本研究では、SHED が実用可能な幹細胞源として有用であることを示し、脳質周囲白質軟化症の治療法の確立を目指す。PVL モデルマウスに未分化 SHED を移植し、移植細胞の生着率、機能回復などの移植治療効果の検討と腫瘍形成能などの安全性の検討を行った。SHED を移植した個体では、有意に神経細胞死が抑制されており、脳の委縮・変形も顕著に抑制されていた。細胞移植後 8 週間の段階でも腫瘍形成は見られず、移植細胞の生着が確認された。さらに PVL による運動障害が SHED 移植によって機能回復することも確認された。以上の結果から、PVL に対する移植細胞源として、安全性や倫理面の問題を克服した SHED が有用であることが示された。この結果は今後 PVL に対する細胞移植治療法を確立する上で重要な基礎データとなる。さらに我々は今回の結果を基に、移植した未分化 SHED がどのような機序で PVL の症状の改善に寄与するのか、より詳細なメカニズムの解明を目指している。

A. 研究目的

本研究の目的は、難治性神経疾患の1つである脳質周囲白質軟化症（periventricular leukomalacia : PVL）に対する細胞移植によ

る治療法を確立することである。

PVL は、在胎 32 週未満で出生した早産児に多くみられる疾患であり、側脳室周囲の深部白質の神経細胞に壊死を生じ、のちに脳性麻痺

や知的障害、てんかん、視空間認知障害、学習障害などの神経学的後障害を合併する。現在 PVL に対する治療法はなく、神経学的後障害に対する理学療法が行われるのみである。PVL の発生機序や修復過程に関する免疫組織化学的研究では、PVL 病巣周囲における、グリア細胞の免疫活性や、大脳白質における MyT1(myelin transcription factor 1) など特異的蛋白の発現が、損傷された組織の修復や神経系の可塑性・再生を示唆する報告があるが、失われた神経細胞を再生し症状を改善するまでには至っていない。PVL の治療法として ES 細胞や iPS 細胞を用いた移植治療の研究が進められているが、倫理性、安全性の問題から未だに確立されたものはない。われわれは、乳歯から採取、培養した乳歯歯髄幹細胞 (SHED) が神経系に特化した性質を有することを発見し、PVL で最も障害を受けやすいオリゴデンドロサイトへの分化が可能であることを確認した。そこで本研究では、PVL モデルマウスを作製後、SHED を脳虚血部位へ移植し、生着率、腫瘍形成能、組織学的所見での移植治療効果、行動解析からの機能の改善効果などについて検討し、PVL に対する細胞移植治療の確立を目指すものとする。

## 平成 22 年度研究報告

### B. 研究方法

#### 1) 脳質周囲白質軟化症 (PVL) モデルマウスへの乳歯歯髄幹細胞 (SHED) 移植

名古屋市立大学再生医学分野 澤本和延教授の指導のもと、臨床所見に基づいた PVL モデルマウスを作製した(図 1)。右総頸動脈焼灼

術を施し虚血障害を起こしてから 24 時間後に、SHED、hFb、PBS を Stereotaxic Injector (Muromachikikai Co.)にてガラスニードルを用いて虚血部位へ移植した。ヒト線維芽細胞 (hFb、セルライン)、溶媒 (PBS) の移植個体の作成も同様に行い、比較群とした。SHED、hFb は  $2 \times 10^5$  cells/2  $\mu$ l PBS に調整して、虚血部位へ移植を行った。異種移植であるため、移植細胞の宿主の免疫拒絶反応による影響を排除するため、移植時から屠殺時まで免疫抑制剤 (シクロスポリン) を 10  $\mu$ g/BWg/day 腹腔内投与を行った。移植に用いる SHED については、(財) 実験動物中央研究所 ICLAS モニタリングセンターへ微生物検査を依頼し、マイコプラズマなどの感染の危険がないことを確認済である。

#### 2) SHED 移植による PVL 治療効果の組織学的検討

PVL モデルマウスへの SHED/hFb/PBS 移植 48 時間後に脳を取り出し、4%パラホルムアルデヒド固定後、60  $\mu$ m に薄切した。その切片をヘマトキシリン・エオジン染色を行い形態変化による傷害の程度の比較を行った。また細胞死マーカーとして抗 Cleaved Caspase3 抗体を用いた免疫染色を行い、神経細胞死数の比較検討を行った。さらに、神経細胞マーカーとして抗 NeuN 抗体、オリゴデンドロサイトのマーカーとして抗 APC 抗体、アストロサイトのマーカーとして抗 GFAP 抗体を用い、どのような機序で PVL の傷害改善に介入したのか検討した。

#### 3) SHED 移植による安全性の検討

PVL モデルマウスへ SHED 移植後、48 時間

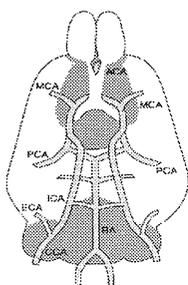
(短期)、4週間(中期)、8週間(長期)において、その脳を取り出し、同様に切片を作製した後、ヒト抗核抗体にて染色し、移植細胞の拡散の程度や腫瘍化について検討を行った。

#### 4) SHED 移植による PVL モデルマウスの機能障害改善の評価

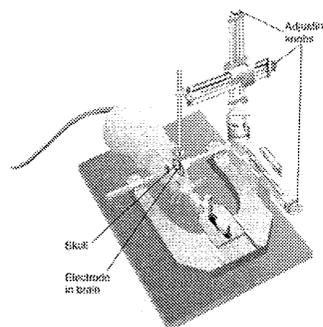
PVL モデルマウスでは、四肢の神経学的機能障害が生じることが知られている。SHED/hFb/PBS を移植した PVL モデルマウスに対し、移植 4 週間後、6 週間後、8 週間後に Foot Fault-Test を行い、神経学的機能障害に対する治療効果の検討を行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究で用いる乳歯歯髄幹細胞 (SHED) は、名古屋大学医学部附属病院歯科口腔外科において、該当患者に書面および口頭で十分に説明し、本研究への理解と同意のもと提供された乳歯を使用した。同意書については、名古屋大学倫理委員会にて承認を受けたものを用いた。また、SHED は完全に匿名化されており、プライバシー保護のためドナー情報が不明な状態で移植実験に用いた。



(図 1) 右総頸動脈永久焼灼術 麻酔下にて電気メスを用い、右総頸動脈(CCA)を永久焼灼する。

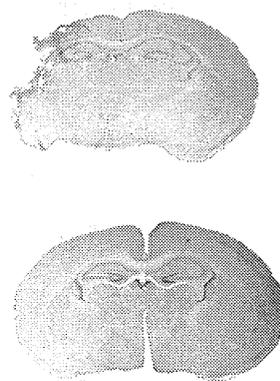


(図 2) Stereotaxic Injector PVL モデルマウスを固定し、脳虚血部へ細胞移植を行う。

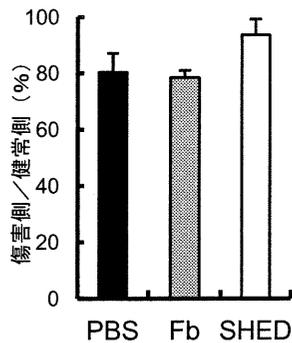
#### C. 研究結果

##### 1) SHED 移植による PVL 治療効果の組織学的検討

はじめに、移植細胞が虚血部位に生着していることを、ヒト抗核抗体を用いて免疫染色を行い確認した。移植後 48 時間後に脳を取り出しパラホルムアルデヒド固定後、60 μm 切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を用いて脳傷害の改善の程度を定量した(図 3)。その結果、hFb、PBS 移植群と比較して、SHED 移植群では有意に脳の萎縮、変形が少なかった(図 4)。

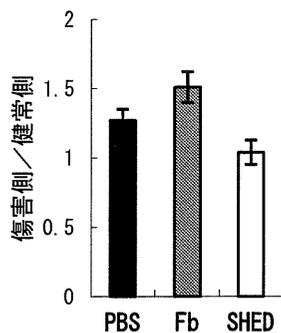


(図 3) ヘマトキシリン・エオジン染色 左：PBS 移植群/右：SHED 移植群



(図 4) 健常側に対する傷害側の脳の大きさの割合を定量  
SHED 移植群が有意に脳の萎縮や変形が少なかった

次に傷害脳における細胞死の割合を検討したところ、hFb、PBS 移植群と比較して、SHED 移植群では有意に細胞死が減少していることがわかった(図 5)。このことから、SHED は低酸素虚血傷害による細胞死に対し、神経保護的に作用することが示唆された。この細胞死が抑制された現象について詳細に解析するため、脳を皮質、脳梁、線条体、海馬の4つの部位に分け、さらにこの神経保護作用が脳内に存在する神経系細胞のうち、どのポピュレーションに対して効果があるのか、細胞死マーカーである抗 Cleaved Caspase3 抗体と、神経細胞マーカー NeuN、オリゴデンドロサイトマーカー APC、アストロサイトマーカー GFAP との二重染色を行い、解析を行った。その結果、SHED 移植群では皮質ではオリゴデンドロサイト、線条体と海馬では神経細胞の細胞死が特に減少していることがわかった。



(図 5) 健常側に対する傷害側の Caspase3 陽性細胞数の割合  
SHED 移植群

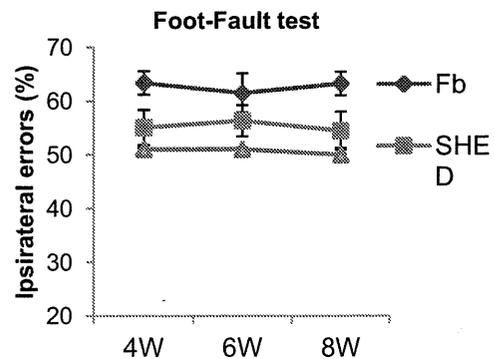
では有意に細胞死が減少していた

## 2) SHED 移植による安全性の検討

PVL モデルマウスへの SHED 移植 48 時間後、4 週間後、8 週間後に脳を取り出し、パラホルムアルデヒド固定後に 60 μm に薄切して切片を作製したのち、抗ヒト核抗体を用いて免疫染色を行い、移植細胞の局在を確認した。また、その周囲組織の腫瘍化、形態変化を検討した。その結果、移植細胞は移植部位に腫瘍化することなく生着しており、形態的にも著変は認めなかった。

## 3) SHED 移植による PVL モデルマウスの機能障害改善の評価

SHED、hFb を移植した PVL モデルマウスに対し、移植 4 週間後、6 週間後、8 週間後に Foot Fault-Test を行い、神経学的機能障害に対する治療効果の検討を行ったところ、SHED 移植群において有意に改善がみとめられた(図 6)。



(図 6) Foot Fault - Test SHED 移植群は Fb 移植群と比較して、有意に神経学的機能障害の回復が認められた

## 平成23年度研究報告

### B. 研究方法

1) SHED 移植による PVL モデルマウスの治療効果の病理学的検討

SHED の細胞死抑制効果について、病理学的解析を行った。移植脳を HE 染色にて、前方、中央、後方の皮質、線条体、海馬を CA1、CA2、CA3、DG の 8 カ所に分類し、神経病理学スコアを用いて評価を行った。

2) SHED を移植した脳の炎症性および抗炎症性サイトカインの発現の定量

神経細胞死の抑制、構造の維持などの効果が得られた機序を調べるため、我々は炎症症状に注目し、PVL モデルマウスへ細胞移植を行ってから 24 時間後の脳から mRNA を抽出し、炎症性および抗炎症性サイトカインの mRNA の発現を Real Time-PCR を用いて定量を行った。炎症性サイトカインとして、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  について、抗炎症性サイトカインとして、IL-4、IL-6、IL-10、IL-13 について、発現を解析した。

3) SHED のパラクライン効果の検討

細胞の培養上清 (SHED-CM) を用いた実験を行った。コントロールとしてヒト線維芽細胞の培養上清 (hFb-CM)、DMEM を用いた。細胞移植と同様の手法を用い、PVL モデルマウスを作製し、24 時間後に培養上清を脳内へ注入、その 48 時間後に評価を行った。48 時間後にマウスを屠殺、灌流固定後、4%パラホルムアルデヒドを用いて固定した。脳を 60  $\mu$ m に薄切後、免疫染色および HE 染色を

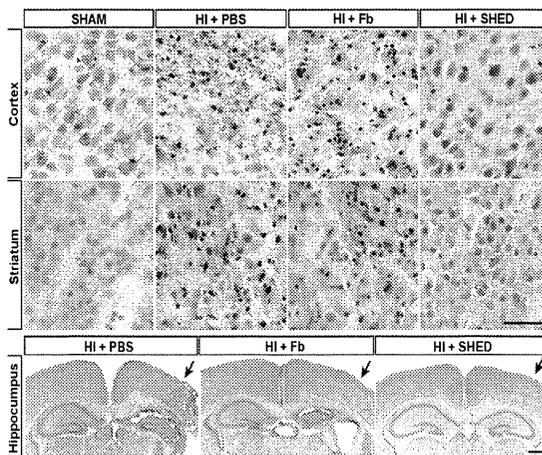
行った。HE 染色にて細胞の形態の評価を、神経細胞骨格を染色する MAP2 染色にて梗塞領域の評価を、Cleaved caspase-3 染色にてアポトーシスの評価を行った。

4) 生存率および神経学的機能回復の評価

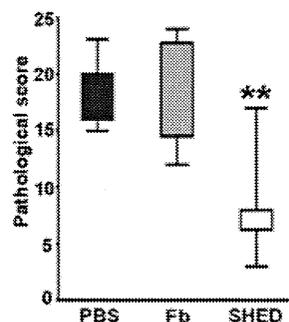
SHED-CM/hFb-CM/DMEM 投与後 4 週、6 週、8 週目に Foot Fault-Test を行い、神経学的機能の評価を行った。また、生存率についても Kaplan-Meier の生存曲線 (Log-rank test) を用いて評価を行った。

### C. 研究結果

1) SHED 移植による PVL モデルマウスの治療効果の病理学的検討



SHED 移植群においては、脳の組織構造が維持されており、病理学的にも PVL に対する治療効果を認めた。



(図 7) HE 染色像および神経病理学スコア

SHED 移植群では、PBS 群、hFb 移植群と比較し

て、有意に脳の神経細胞構造が保たれていた。

### 2) SHED を移植した脳の炎症性および抗炎症性サイトカインの発現の定量

SHED 移植群では、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  の発現が減少し、脳内では抗炎症性に作用するサイトカインの IL-4、IL-6、IL-10、IL-13 の発現が増加していた。SHED 移植群において、炎症性サイトカインの発現の抑制、抗炎症性サイトカインの発現の増加を認めた。

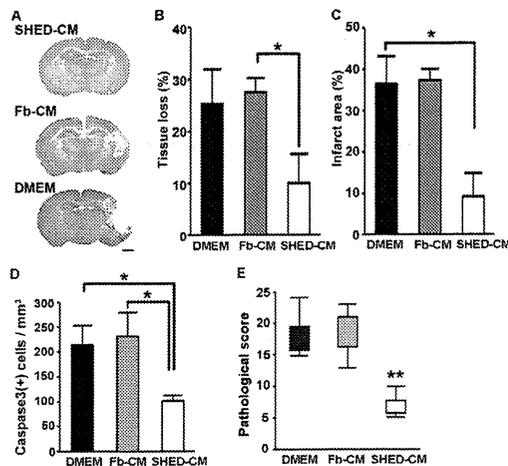
#### (図 8) Real Time-PCR 結果

A:TNF- $\alpha$ , B:IL-1 $\beta$ , C: IL-4, D:IL-6, E:IL-10, F:IL-13

### 3) SHED のパラクライン効果の検討

SHED の培養上清 (SHED-CM) を投与した群では、hFb-CM および、DMEM 群と比較して、細胞移植と同じ様に神経細胞死や脳の萎縮・変形の抑制、および梗塞領域の縮小を認めた。

また、病理学的評価においても、治療効果を認めた。



#### (図 9) 培養上清投与による PVL 治療効果

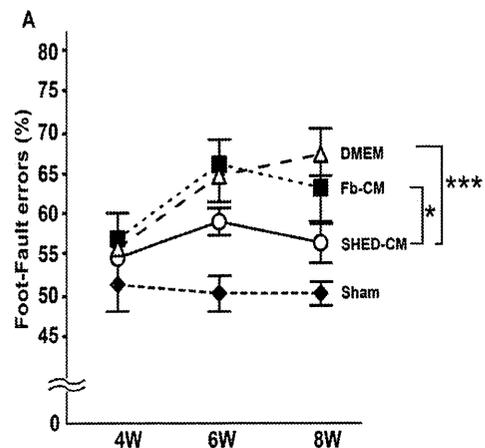
A: MAP2 染色像、B:組織損傷の定量、C:梗塞

領域の定量、D:アポトーシス細胞の定量、E: 神経病理学スコアによる病理学的評価

SHED-CM 投与群において、すべての項目で有意に治療効果を認めた。

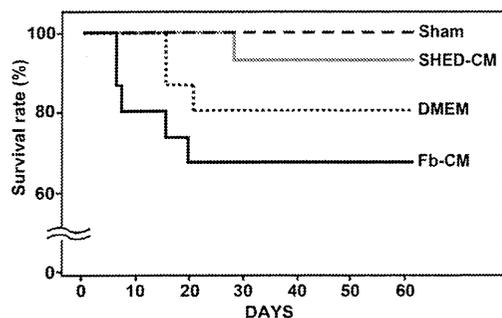
### 4) SHED-CM 投与による PVL モデルマウスの機能障害改善の評価

SHED-CM、hFb-CM を投与した PVL モデルマウスに対し、移植 4 週間後、6 週間後、8 週間後に Foot Fault-Test を行い、神経学的機能障害に対する治療効果の検討を行ったところ、SHED-CM 投与群において有意に改善がみとめられた(図 10)。



#### (図 10) Foot Fault-Test

また、生存率においても SHED-CM 投与群は、hFb-CM 投与群に比べて改善傾向を認めた。



(図 1 1) Kaplan-Meier Survival Curve

#### D. 考察

本研究において、PVL モデルにおける SHED 移植による治療効果を検討したところ、組織学的、機能的な解析において有益な結果を得ることができた。その機序について、炎症系について解析を行ったところ、SHED 移植群では炎症性のサイトカインの発現が抑制され、抗炎症性サイトカインの発現が上昇していたことから、傷害脳の微小環境が炎症性のものから神経保護的なものへとシフトしたことが示唆され、これも抗アポトーシス作用の一端を担っていると考えられる。細胞移植後 8 週間経過した脳を解析したところ、SHED および hFb のニューロン前駆細胞、オリゴデンドロサイト前駆細胞、ミクログリア、アストロサイトなどの神経系譜細胞への分化を確認することができなかった。このことから細胞移植による上記の効果は、移植した SHED が失われた神経系細胞へ分化し、補填したのではないことを示唆している。そこで、これらの作用は移植した細胞から分泌される何らかの栄養因子によるものではないかと考え、細胞の培養上清のみを用いた実験を行ったところ、細胞移植と同様の治療効果を認めた。

このことから、細胞から分泌される栄養因子に抗アポトーシス作用、抗炎症作用があることが示唆された。

#### E. 結論

本研究では、医療廃棄物である乳歯より採取した SHED は、PVL モデルに移植することによって脳内の微小環境を神経保護的なものへと変化させることで、炎症やアポトーシスを抑え、神経細胞の維持、保護に作用することがわかった。また、その作用は SHED が失われた神経細胞へ分化し補填したためではなく、SHED から分泌される栄養因子によるものであることがわかった。さらにこのパラクライン効果は、細胞移植と同様の効果を発揮することがわかった。

SHED の培養上清のみで神経保護や機能改善に寄与することができたことから、細胞不要の再生医療への道が拓かれたと考える。これは、移植細胞の免疫拒絶反応や腫瘍化の問題が解決されたことを意味する。その栄養因子の成分について詳細な解析が、今後の研究課題である。

#### 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

・第 3 回グローバル COE 国際シンポジウム  
名古屋 2011.12.8-9

□Mari Yamagata, Akihito Yamamoto, Eisuke Kako, Kiyoshi Sakai, Shoko Nakamura, Naoko Kaneko, Kazunobu

Sawamoto, Minoru Ueda

・第4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】 名古屋 2012.2.24-25

□Mari Yamagata, Akihito Yamamoto,  
Eisuke Kako, Kiyoshi Sakai, Shoko  
Nakamura, Naoko Kaneko, Kazunobu  
Sawamoto, Minoru Ueda

H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし

厚労省科学研究費補助金(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 藤井裕美

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、完治法がい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。平成 23 年度は歯髄幹細胞のドーパミン神経細胞への分化誘導を様々な方法で試み、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。また、ドーパミン神経細胞に分化誘導した歯髄幹細胞をパーキンソンモデルラットに移植し、行動の改善を認めた。

## 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である。そのような状況にあつて、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

### <平成22年度>

#### (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

髄幹細胞が高効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ト阻害物質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り細胞移植を行う。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。

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がもたらされること、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あ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、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医学部の動物実験ガイドラインに準拠して行った。

### <平成23年度>

#### (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  
平成22年度に行ったドーパミン神経細胞への分化誘導条件を参考に、12パターンの方法でSHEDの分化誘導を試みた。分化効率向上のためSHEDを1%低酸素下で培養し、誘導をstep1およびstep2の2段階で行った。step2の培養でShh,FGF8などの各種添加因子を様々な組み合わせで培養液に添加し、より効率的なドーパミン神経細胞への分化誘導法を模索した。

分化誘導の12パターンをTable1に示す。

分化誘導後の誘導効率は以下の項目で評価した。

①分化誘導をしたSHEDのTH陽性細胞の割合を免疫染色により評価し、ドーパミン神経細胞への分化誘導効率の検討を行った。

②分化誘導終了後のSHEDの細胞生存率を評価し、より効率的な分化誘導方法の検討を行った。

Step2medium添加因子	
1	Basic induction medium
2	+ Shh
3	+ Shh + FGF8
4	+ TGF $\beta$ 3
5	+ GDNF
6	+ GDNF + TGF $\beta$ 3
7	+ BDNF
8	+ Neurturin + NT3
9	+ Neurturin + NT3 + TGF $\beta$ 3 + GDNF + BDNF
10	+ Neurturin + NT3 + TGF $\beta$ 3 + GDNF + BDNF + Shh + FGF8
11	+ Estrogen
12	+ GDNF + TGF $\beta$ 3 + BDNF + Estrogen

Table1 step2の添加因子の組み合わせ12パターン

#### b) パーキンソン病モデルラットの作成

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した。6-OHDA注入より4週間以降にドーパミン受容体作用薬であるメタンフェタミンを投与し、30分以内の行動を観察した。メタンフェタミン投与によって手術と同方向への激しい(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した。

#### 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

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、メタンフェタミ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した。

## D. 研究結果

### <平成22年度>

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系譜細胞を图示している。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。

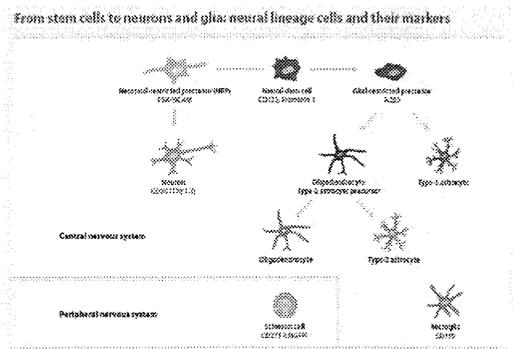


Fig.1 神経幹細胞から神経系譜細胞の分化

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)

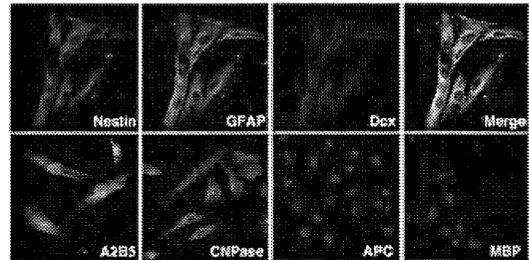


Fig.2-a SHEDにおけるマーカー遺伝子の発現 (細胞染色での定性解析)

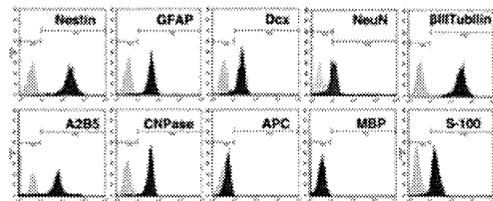


Fig.2-b SHEDにおけるマーカー遺伝子の発現 (フローサイトメトリーでの定量解析)

Nestin: 神経幹細胞マーカー, DCX・ $\beta$ -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

Neural marker	SHED n=3		DPSC n=3	
	average	S.D.	average	S.D.
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ともに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)。

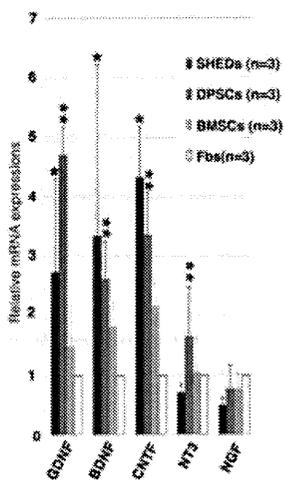


Fig.3 SHEDおよびDPSCにおける神経栄養因子の発現

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)。

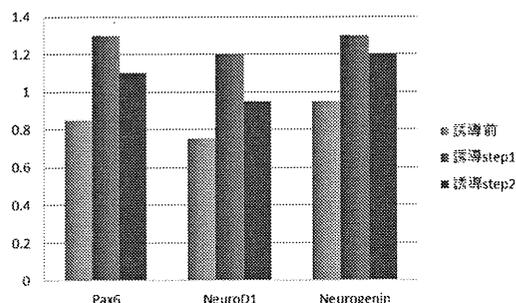


Fig.4 分化誘導DPSCにおける神経分化誘導下での神経マーカーの発現変化

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ではさらに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)。

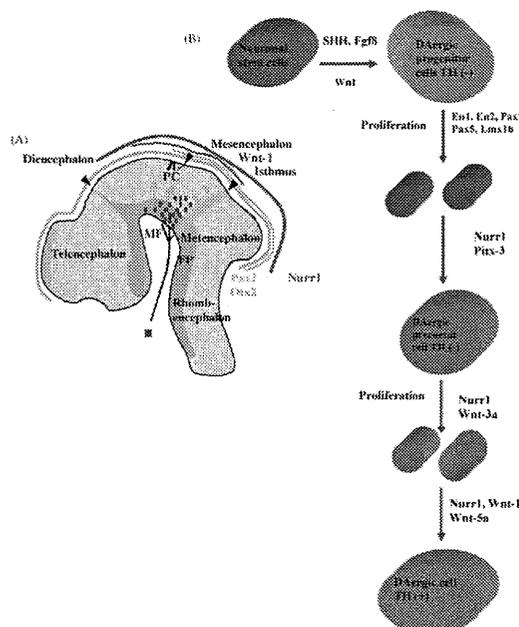


Fig.5 ドーパミン神経細胞の発生過程

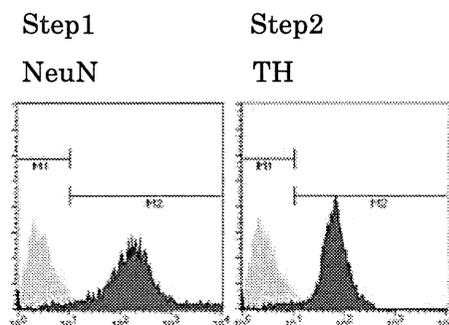
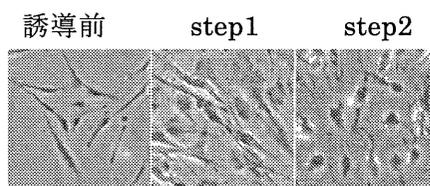


Fig.6 神経誘導 step1, step2 によるドーパミン神経細胞への分化

さらに効率よく分化したドーパミン神経細胞を得るために、培養条件の検討を行ったところ、分化効率は1% $O_2$ 低酸素培養で向上し安定した。誘導後に中脳やドーパミン細胞特異的な遺伝子マーカー:TH, En2, Ptx3, Wnt1, Wnt5a の発現を確認した (Fig.7)。

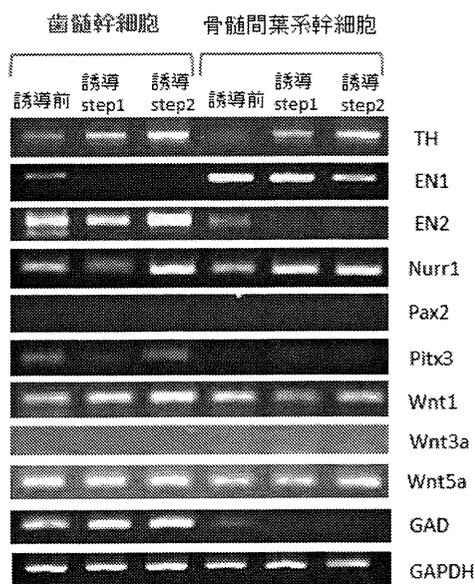


Fig.7 低酸素培養条件下でのドーパミン神経細胞マーカーの発現

今後、Real time PCRにて定量的解析を進める。また preliminary data であるが、ELAISA法でドーパミンの放出も確認している。

Fig.6、Fig.7の結果より、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と言える。ただし、マーカー遺伝子での評価が主なので、ドーパミンの放出など機能面での評価も早急に行い、移植実験に移る予定である。

(3)パーキンソン病モデル動物の作成、

(4)パーキンソン病モデルラットにおける歯髄幹細胞移植の有効性・安全性・機能回復効果の検討

当初からの計画通り、平成23年4月よりパーキンソンモデル動物作成の準備段階に入った。夏以降はパーキンソンモデル動物を用い

た研究がスタートできる予定である。歯髄幹細胞移植の有効性・安全性・機能回復効果の検討を行う予定である。

(2-2) 脊髄小脳変性症治療に向けて

計画では平成23年度よりスタートのテーマである。平成22年度の歯髄幹細胞の性状解析において、GABA作動性神経細胞の分化に必須である転写因子Ptf1aの発現も解析したところ、特に、乳歯由来歯髄幹細胞SHEDは骨髄間葉系幹細胞と比較して有意にPtf1aの発現が高いことを確認している。このことから、歯髄幹細胞はGABA作動性神経細胞であるプルキンエ細胞への分化誘導にも応答能を持つと考えられる。当初からの計画通り、平成23年4月よりプルキンエ細胞の分化誘導の技術確立のための実験をスタートしており、平成23年度中にプルキンエ細胞への高効率な分化誘導技術を確立し、平成24年度には移植治療効果の検討を行う予定である。

(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である。現在、パーキンソン病モデルラットまたはマウスおよび脊髄小脳変性症モデルマウスの準備中であるが、準備が整いしだい、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あわせでの再生治療効果の検討、を行う予定である。

<平成23年度>

平成23年度は(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、b)パーキンソン病モデル