

201206001A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 上田 実

平成25年(2013) 5月

## 目 次

I. 総括研究報告	
歯髄幹細胞を用いたアルツハイマー型認知症治療に関する研究	1
研究代表者 上田 実／研究協力者 見田 常幸	
II. 分担研究報告	
1. 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	4
分担研究者 山本 朗仁／研究協力者 中村 祥子, 藤井 裕美	
2. 歯髄幹細胞無血清培養上清より同定した新規ミクログリア/ マクロファージ活性転換複合体を応用した急性期脊髄損傷治療	8
分担研究者 山本 朗仁／研究協力者 松原 弘記	
3. 霊長類の脊髄損傷モデルにおける歯髄幹細胞の治療有用性の解析	12
分担研究者 山本 朗仁／研究協力者 伊佐 正, 西村 幸男, 加納 史也, 酒井 陽	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	18
IV. 研究成果の刊行物・別刷	20

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)  
総括研究報告書

歯髄幹細胞を用いたアルツハイマー型認知症治療に関する研究

研究代表者 上田 実

研究協力者 見田 常幸

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

アルツハイマー型認知症患者は年々増加傾向にある。医学的・福祉的・医療経済的に重大な疾患であり、画期的な治療法の開発が急がれている。アルツハイマー病では、アミロイド-B (A $\beta$ ) や神経原線維濃縮体 (NFTs) などの変性蛋白が、神経組織に沈着し変性脱落 (神経細胞死) を引き起こす (図参照)。

これまでに、我々はヒト歯髄幹細胞の強力な中枢神経再生能力を世界に先駆けて報告してきた。ヒト乳歯由来歯髄幹細胞 (SHED) やヒト永久歯由来歯髄幹細胞 (DPSC) をラット脊髄損傷や脳梗塞モデル、およびマウス低酸素脳虚血モデルに細胞移植すると、神経機能が著しく改善することを見出した。さらに、歯髄幹細胞の無血清培養上清 (CM) を損傷した脊髄のくも膜下腔、脳虚血の脳室腔内や鼻腔内に投与すると細胞移植と同等の機能回復が得られることから、歯髄幹細胞の神経再生効果の多くがパラクラインメカニズムによる物であることを明らかにした。

本研究では、SHED-CM をアルツハイマー型認知症モデルマウスへ投与し治療効果を検討することで、ヒト歯髄幹細胞由来分泌因子のアルツハイマー型認知症への治療応用の可能性を検証した。

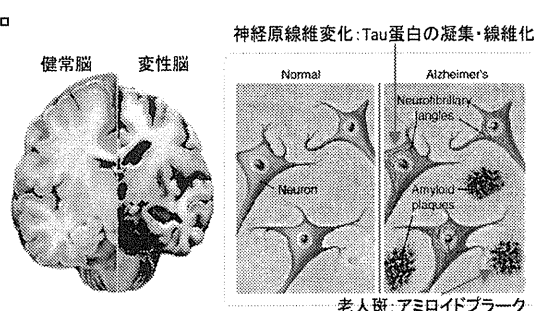
A. 研究目的

我々はこれまでの研究で、SHED-CM が炎症性ミクログリアを抗炎症性に変換することを見出している。アルツハイマー病では、ミクログリアの活性化が病態の増悪に強く関与することが知られており、SHED-CM 投与によってアルツハイマー病の神経症状が改善する可能性が高いと考えた。本研究では、変異型 A $\beta$  を脳内に投与して制作したマウスアルツハイマー病モデルに SHED-CM を投与し治療効果および治癒メカニズムを検討した。

B. 研究方法

アルツハイマー型認知症モデル作製

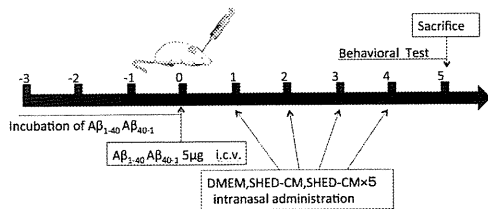
変異型 A $\beta$ 1-40 あるいは A $\beta$ 40-1 (逆位蛋白:ネガティブコントロール) を 3 日間 37°C でインキュベートしオリゴマーを形成させ



る。ICR マウス (雄 9 週齢) の脳室内に注入し、アルツハイマー型認知症モデルマウスを作製した。A $\beta$  注入から 5 日後に新奇物体認識試験 (下記参照) により認知機能異常を評価した。

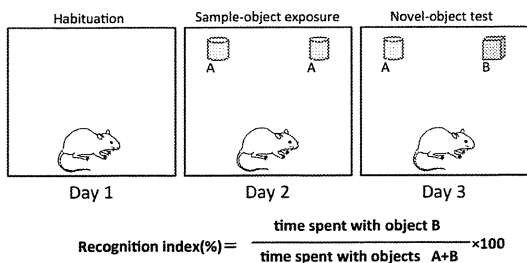
SHED-CM 作製と径鼻投与

乳歯歯髄幹細胞を無血清培地にて 48 時間培養したのち、細胞培養上清を精製し SHED-CM とした。SHED-CM を右側鼻腔内より、A $\beta$  投与翌日より 4 日間連続で、SHED-CM 原液あるいは SHED-CM 5 倍濃縮液を、ハミルトンシリンジを用いて 1 日 100 $\mu$ l を経鼻投与した。また、コントロールとして、DMEM を同様に投与した。



**新奇物体認識試験**

- 実験 1 日目 (Aβ 投与後 3 日目) に物体を設置しない実験装置で 10 分間マウスを慣らす。
- 実験 2 日目に 2 つの同一物体 A を置いた装置内で 10 分間自由探索させ、2 つの物体に対する探索時間を測定する。
- 実験 3 日目 (Aβ 投与後 5 日目) に片方を新奇物体 B に置換した装置内で 10 分間自由探索させ、新しい物体への探索時間・探索指向性を測定し、記憶学習試験、視的認知記憶の指標とした。



認知機能に障害があれば、新奇物体 B に対する探索時間 (time spent with object B) が低下する。結果、新奇物体認知指数 (Recognition index) が低下する。

**免疫組織化学的染色**

モデル作製後、1・3・5 日後のマウスを灌流固定し脳組織を採取し OCT コンパウンドにて包埋し -80°C で凍結保存した。厚さ 20μm の凍結切片を作製し、通法に従い蛍光免疫染色を施行し、脳組織内でのミクログリアの動態を検証した。

**ウェスタンブロッティング法**

モデル作製後、5 日後のマウスより脳を採取し、脳組織よりタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質を通法に従いウェスタンブロッティング法を施行し、脳組織内で

の iNOS およびニトロチロシンの発現を生化学的に検証した。

**C. 研究結果**

新奇物体認識試験の結果を図 1 に示す。アルツハイマー病を誘発する Aβ1-40 注入群 (青バー) は、ネガティブコントロール Aβ40-1 逆位蛋白注入群 (赤バー) に比べ、有意な認知機能障害を認めた。SHED-CM 投与群および 5 倍濃縮 SHED-CM 群において、有意に認知機能障害の改善が認められた。機能改善は 5 倍濃縮液群の方が優れていた。

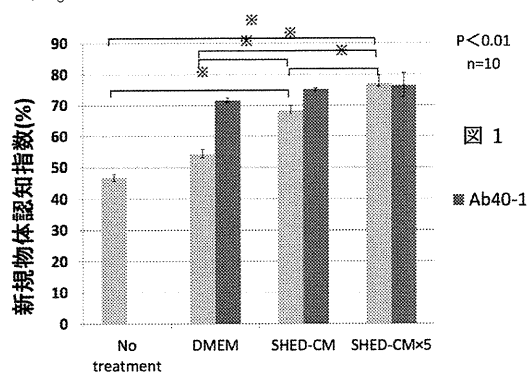


図 1

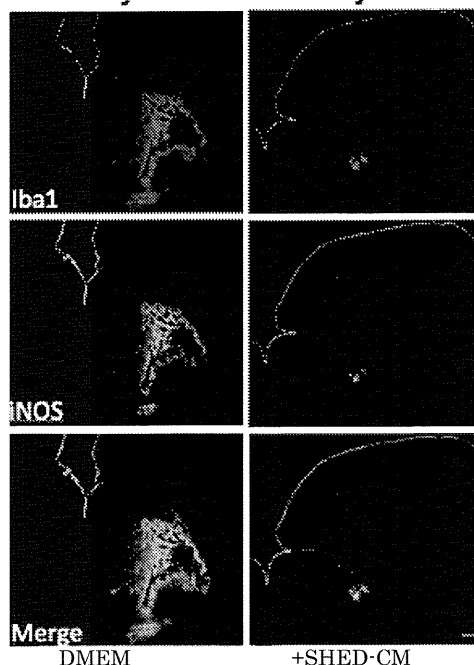
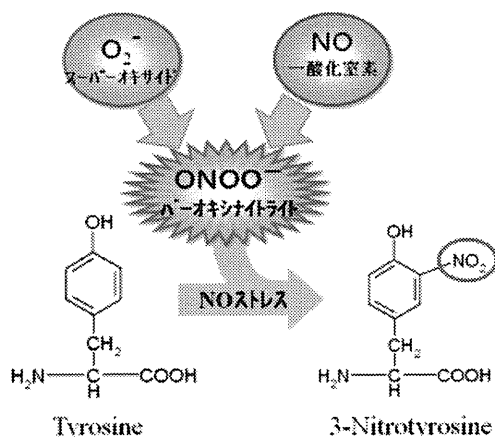


図 2

Aβ1-40 注入後 3 日目のマウス脳内のミクログリアの動態を蛍光免疫染色にて確認した。DMEM 投与群に比べ、SHED-CM 群では Iba1・iNOS 陽性範囲が著しく減少した (図 2 参照。Iba1:ミクログリア細胞系譜マーカー)。

アルツハイマー病では、異常蓄積した Aβ がミクログリアを活性化する。活性化ミクログリアは iNOS（一酸化窒素合成酵素）や NAPDH oxidase を発現し、一酸化窒素や活性酸素が大量に産生する。これらフリーラジカルが反応することで、パーオキシナイトライトが合成される。パーオキシナイトライトが神経伝達物質の原料となるチロシンをニトロ化する事により、神経伝達物質の産生を阻害し、認知機能の低下を引き起こすとされている。



マウスより取り出した脳組織をウェスタンブロッティング法にて iNOS、ニトロチロシンの発現変化を検証した。Aβ1-40 注入による iNOS やニトロチロシンの大量産生が、SHED-CM 投与にて著しく低下した (図 3)。

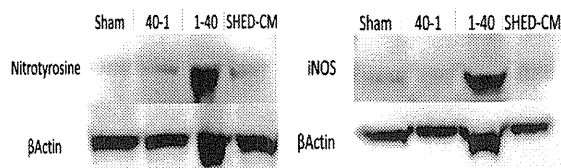


図 3

#### D. 考察

現在、ミクログリアの性情を直接的に制御するアルツハイマー病治療薬は無い。SHED-CM は Aβ により活性化したミクログリアの iNOS やニトロチロシンの産生を抑制する。これが認知機能の改善に重要な役割を果たしているものと考えられる。SHED-CM には、アルツハイマー病の神経機能改善に有用な因子が含まれることが示唆された。

#### E. 結論

本研究において、ヒト乳歯歯髄幹細胞由来培養上清のアルツハイマー型認知症モデルマウスにおける認知機能障害改善効果が見出された。

#### 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

##### 1. 論文発表

Inoue, T, Sugiyama, M, Hattori, H, Wakita, H, Wakabayashi, T, Ueda, M  
Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Tooth-Derived Conditioned Medium Enhance Recovery of Focal Cerebral Ischemia in Rats.  
Tissue Engineering Part A. 2013, 19(1-2)

##### 2. 学会発表

見田常幸, 山本朗仁, 日比陽子, 松原弘記, 井上崇徳, 服部宇, 山田清文, 上田実  
乳歯歯髄幹細胞由来培養上清を用いたアルツハイマー型認知症治療の可能性  
第 12 回 日本再生医療学会総会  
横浜 2013 年 3 月 21 日

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24年度は歯髄幹細胞の効率的なドーパミン神経細胞への分化誘導方法を確立すると共に、パーキンソンモデルラットに移植し治療効果を認めた。

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、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。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、高齢者に発病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。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に効率的に分化誘導し、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。本研究ではパーキンソン病をターゲットとし、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

### 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

SHEDを1%の低酸素下で培養し、step1及びstep2の2段階でドーパミン神経細胞に分化誘導した。添加因子は有用と思われる5種類を選び、SHED及びBMで分化誘導効率を比較した。また、ドーパミン分泌能をELISAで評価した。さらに、電気生理的評価をパッチクランプで行った。

#### 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。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。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った。

#### (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。

## C. 研究結果

### <平成24年度>

平成24年度はパーキンソン病治療に向けて、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ラットの作成c)パーキンソン病モデル動物に細胞移植を行い、神経症状及び組織学的評価と安全性の検証を行った。

### 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

step2の添加因子で有用と考えられる5種類を選び、SHED及びBMで比較検討を行った。(Fig1)また、ドーパミン神経分化誘導SHEDのドーパミン分泌能を検証した。(Fig2)

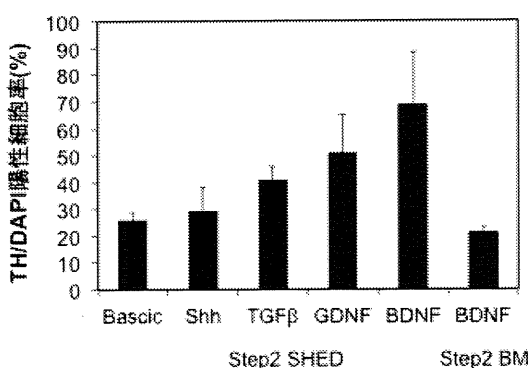


Fig1 分化誘導後のTH陽性細胞率(n=3)

TH陽性細胞の割合は、SHEDはstep2培養でBDNFを添加したものが最も高く、BMも同様であった。しかし、誘導高率はBMと比べてSHEDが有意に優れていた。

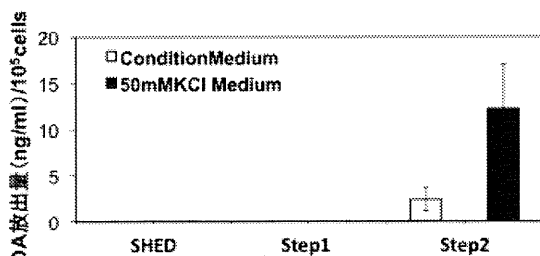


Fig2 ドーパミン分泌能の評価

ドーパミン神経分化SHEDのドーパミン分泌能をELISAで評価し、培養上清中にドーパミンの分泌を認め、KClの刺激により多量の分泌を認めた。

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

平成23年に作製したパーキンソンモデルラットはモデルの成功率が著しく低く安定しなかったため、6-OHDA注入手技を改善し、平成24年は安定したモデル作製が可能となった。

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SHED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。コントロールの線維芽細胞(Fibroblast)移植群及びPBS注入群では回転運動回数の減少は認められなかったが、ドーパミン神経分化SHED移植群は移植後4週間で回転運動回数が有意に減少し、パーキンソン症状の改善を認めた。(Fig4)

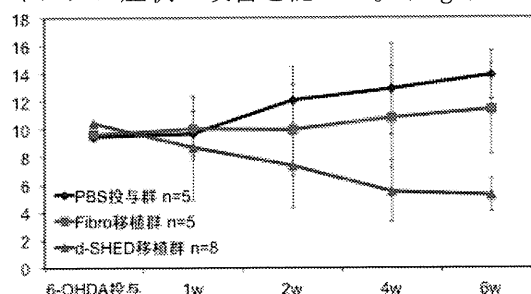


Fig4 パーキンソンモデルラットの神経症状評価

移植後6週間で行った組織学的評価では、移植細胞の生着を認めた。また、コントロール群と比べてドーパミン神経分化SHED移植群の線条体のTH陽性細胞の占める面積が増加し、ドーパミン産生の回復が認められた。

尚、ドーパミン神経細胞に分化誘導した歯髄幹細胞が電気生理的に神経細胞として機能するかを評価するためパッチクランプを施行したが、活動電位の発生に必須な電位依存性Naチャンネルは認められず、電位依存性Kチャンネルも極少数しか認められなかった。今後は分化誘導方法を再検討し、電気生理学的にも神経細胞として機能する細胞の分化誘導方法の確立を目指す。

D. 考察

SHEDのドーパミン神経細胞への分化誘導は、低酸素下でBDNFを添加する方法が最も効率的であることがわかった。また、分化誘導したSHEDをパーキンソンモデルラットに移植し、行動改善とドーパミン産生の回復及び移植細胞の生着が認められた。しかし、この方法で分化誘導した細胞はドーパミンを分泌するものの、電気生理的な神経細胞の特徴を認めなかった。今後は分化誘導方法を再検討し、電気生理的にも神



経細胞として機能する細胞の分化誘導方法を模索する予定である。

#### **E. 結論**

我々はSHEDを効率的に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、動物実験によりSHEDは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。今後さらに解析を進め、SHEDを用いた神経再生治療の実用化を目指す。

#### **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 なし

2.学会発表

藤井裕美 山本朗仁 伊藤美佳子 大野欽司 上田実 “ドーパミン作動生ニューロンへ分化させたヒト歯髄幹細胞のパーキンソンモデルへの移植治療効果の検討”，第12回日本再生医療学会総会，2013年3月21日 横浜

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)**

1.特許出願

2.実用新案登録 なし

3.その他

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

歯髄幹細胞無血清培養上清より同定した新規ミクログリア/マクロファージ活性転換複合体  
を応用し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 顎顔面外科学

研究要旨

近年、幹細胞由来分泌因子による細胞非自律的効果（パラクライン効果）が注目されている。我々はこれまでヒト歯髄幹細胞をラット脊髄損傷モデルへ移植することで著しい下肢運動機能の改善が得られることを報告しており、この移植効果も歯髄幹細胞が産生する分泌因子群によるところが大きいと考え解析に着手してきた。

我々はヒト歯髄幹細胞を無血清培養した際に得られる培養上清（以下、SHED-CM）をラット急性期脊髄損傷モデルへ持続投与すると急性期炎症性反応を強力に抑制し、抗炎症因子発現を増大することで損傷後の機能回復を促進することを見出した。驚くべきことに、SHED-CMは損傷後集積してきた炎症性ミクログリア/マクロファージを抗炎症型へと転換し、脊髄組織内の抗炎症性因子の発現を増大することで治療効果を発揮する。さらに我々は、SHED-CM中の液性因子群のプロテオーム解析、およびミクログリア初代培養系を用いたスクリーニング解析により、SHED-CM中の液性因子群の中からミクログリアを特異的に抗炎症型へと転換する新規の活性転換複合体を同定した。この複合体はケモカインAおよび分泌型Type I レクチンBで構成される。複合体をラット脊髄損傷モデルへ投与した結果、SHED-CMを投与した時と同様に、損傷急性期に集積してきた炎症性ミクログリア/マクロファージを抗炎症型へと転換し、脊髄組織内の抗炎症性因子の発現を増大、著明な下肢運動機能回復が得られた（未発表、論文投稿中。特許取得済）。本研究結果から、ヒト歯髄幹細胞由来培養上清より見出されたミクログリア活性転換複合体はこれまでにない新しい抗炎症・免疫制御製剤となりうることが示唆された。

【再生医療実用化に向けた意味合い】ミクログリアやマクロファージはあらゆる中枢神経系損傷疾患・組織損傷疾患の病態機序に関わる炎症・免疫制御のメインプレイヤーである。今回我々が明らかにした新たなミクログリア活性転換複合体による免疫制御機構は、人間の本来持つ自然治癒力を高め、組織破壊的環境から組織再生的環境へと促進するといった新しい治療概念を創出した。今後、この活性転換複合体の製剤化を進め、広く国民に還元できるよう鋭意努力する。

A.研究目的

我々のこれまでの研究で、SHED-CMをラット急性期脊髄損傷モデルへ持続投与すると急性期炎症反応を著しく抑制し、抗炎症因子発現を増大することで損傷後の機能回復を促進することを見出している。SHED-CMは特に損傷後集積してきた炎症性ミクログリア/マクロファージを抗炎症性へと転換し、脊髄組織内の抗炎症性因子の発現を増大することで治療効果を発揮す

る。SHED-CM中の液性因子群を詳細に解析し、ミクログリアやマクロファージを抗炎症性へと転換する活性因子を見出せば、これまでにない新しい抗炎症・免疫制御製剤の開発につながる事が考えられる。

平成 24 年度研究成果

平成 24 年度では、歯髄幹細胞培養上清の液性因子群の解析、およびミクログリア初代培養系を用いた活性因子解析および、活性

転換複合体のラット脊髄損傷モデルへの投与による治療効果の検証実験を行った。

## B.研究方法

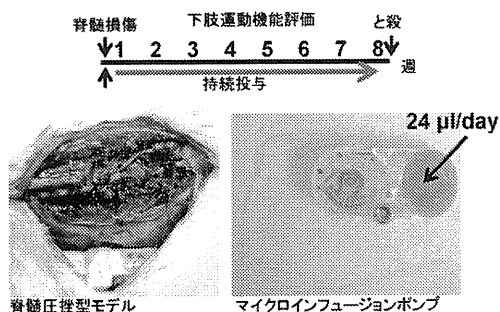
### 1) *In vitro* 細胞培養系

①SHED-CM 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・機能分類を行った。

②近年、ミクログリア活性化因子の一つとされている CSPG (コンドロイチン硫酸プロテオグリカン) をコーティングした培養皿上で初代培養マウスミクログリアを播種し活性化させ、そこへ SHED-CM や同定した活性転換因子を作用させ、ミクログリアが抗炎症型へと誘導されるかどうかを検証した。

### 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活性転換複合体を持続的に投与した (下図参照)。8週間経過観察し、下肢運動機能回復評価を行った。また、急性炎症期 (投与後 3 日目) での遺伝子学的および組織学的解析を行い、活性化ミクログリア/マクロファージの性状を解析した。



(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。

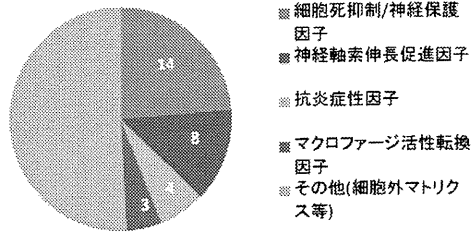
2) 本研究はすべてヘルシンキ宣言、厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する倫理指針」にのっとり、研究対象者に対する安全保護・人権擁護に、下記の通り十分注意して行う。

- 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。

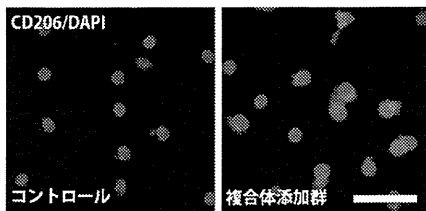
## C.研究結果

*In vitro* 実験系: SHED-CM 中に含まれる液性因子群をヒト 274 種類サイトカイン抗体アレイを用いて解析した。結果、SHED-CM 中には約 80 種類のタンパク質が含まれており、機能分類した結果 14 種類の細胞死抑制・神経保護因子、8 種類の神経突起伸長促進因子、4 種類の抗炎症促進因子、3 種類のマクロファージ活性転換関連因子が含まれていた (下図参照。検出因子群の機能分類図。)

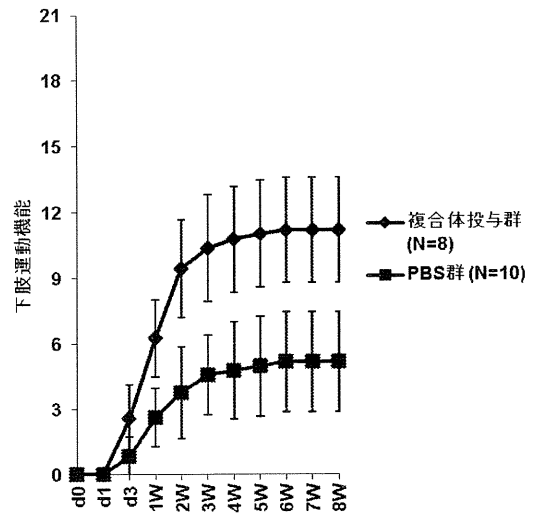
### 歯髄幹細胞-CM中の因子群分類



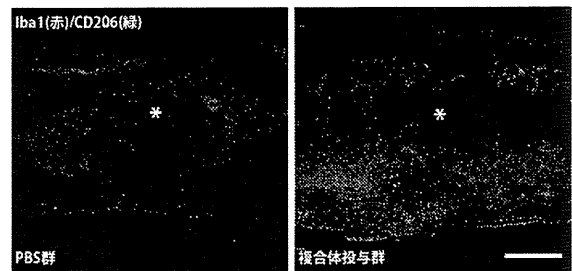
我々はこの中で 3 種類のマクロファージ活性転換関連因子（ケモカイン A、分泌型 Type I レクチン B、サイトカイン C）に着目した。ELISA 法による定量、ウェスタンブロット法によるタンパクの検出にて SHED-CM 中に実際にこの 3 種類の因子が含有されていることを確認した。また、SHED-CM 中にこれら 3 因子の中和抗体を添加し不活化し、CSPG で活性化させたミクログリアへ作用させると、3 因子のうち 2 因子（ケモカイン A、分泌型 Type I レクチン B）を不活化させた場合のみ、SHED-CM をミクログリアへ作用させた際にみられる抗炎症型への転換効果が打ち消された。さらに、このケモカイン A、分泌型 Type I レクチン B のリコンビナント体を CSPG で活性化させたミクログリアへ作用させると、効率的にミクログリアが CD206 陽性の抗炎症型ミクログリアへと誘導された（下図参照。抗炎症型ミクログリアマーカーである CD206：赤によるミクログリア蛍光免疫染色図。）。以上の結果より、我々は SHED-CM 中に含まれるケモカイン A および分泌型 Type I レクチン B をミクログリア活性転換複合体とした。



**In vivo 実験系：**ラット圧挫型脊髄損傷モデルへミクログリア活性転換複合体を投与したところ、コントロール群と比較し著明な下肢運動機能の回復が認められた（下図参照。下肢運動機能回復評価図。）。



また、投与後 3 日目の遺伝子学的・組織学的解析により、ミクログリア活性転換複合体投与群では、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。損傷後 3 日目の脊髄組織矢状断。ミクログリア/マクロファージ細胞系譜マーカー Iba1：赤と CD206：緑の共染色像。\*は損傷中心部を示す。複合体投与群において Iba1 と共染色される多くの CD206 陽性ミクログリア/マクロファージの存在を認めた。）。



### D. 考察

ヒト歯髄幹細胞培養上清中の液性因子群解析およびミクログリア初代培養系を用いたスクリーニング解析によりケモカイン A と分泌型 Type I レクチン B の二つの因子から構成されるミクログリア活性転換複合体が同定された。さらに、ラット脊髄損傷モデルへの投与により急性期炎症抑制・抗炎症促進効果および著明な下肢運動機能回復効果が認められた。今回我々が見出した

この複合体は脊髄損傷疾患のみならず、ミクログリアやマクロファージが炎症制御の主体となるようなあらゆる急性炎症性組織損傷疾患・自己免疫疾患などへの応用が期待できることが示唆される。今後様々な実験モデルへこの複合体投与による治療効果を検討していく必要があると考えられる。

#### E. 結論

本研究において、ヒト歯髄幹細胞無血清培養上清から急性期脊髄損傷モデルへ治療効果のある新規のミクログリア活性転換複合体が同定された。今後はこの複合体の製剤化を目指し、その治療メカニズムのさらなる詳細な解析と共に、様々な炎症性損傷疾患モデル・自己免疫疾患モデルでの治療効果を検証していく予定である。

#### 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

##### 学会発表

1. K. Matsubara, “Conditioned medium derived from stem cells from human deciduous teeth promote functional recovery after spinal cord injury”, International symposium on Micro-Nano systems for the interaction of young researchers, P6, Nagoya, 11/8, 2012
2. K. Matsubara, “Conditioned medium derived from stem cells from human deciduous teeth promote functional recovery after spinal cord injury”, Global COE program the 4<sup>th</sup> international symposium, P91, Nagoya, 11/15-16 2012
3. 松原弘記, 山本朗仁, 酒井陽, 野田万里子, 松下嘉泰, 錫村明生, 上田実, “ヒト歯髄幹細胞由来無血清培養上清を応用した急性期脊髄損傷治療と治癒メカニズムの解析”, 第11回日本再生医療学会総会・学術大会, C-4-23, 横浜, 6/12-14, 2012

4. 松原弘記, 山本朗仁, 酒井陽, 上田実, “ヒト歯髄幹細胞由来無血清培養上清を応用した急性期脊髄損傷治療と治癒メカニズムの解析”, 第54回歯科基礎医学会学術大会・総会, 郡山, 9/14-16, 2012
5. 松原弘記, 山本朗仁, 酒井陽, 松下嘉泰, 上田実, “ヒト歯髄幹細胞由来液性因子を応用した急性期脊髄損傷治療”, 第57回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2-C2-2, 横浜, 10/19-21, 2012

#### 論文発表

1. M. Yamagata, A. Yamamoto, E. Kako, N. Kaneko, K. Matsubara, K. Sakai, K. Sawamoto and M. Ueda, “Human dental pulp-derived stem cells protect against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice”, *Stroke*, Vol.44, No.2, (2013), pp.551-554.
2. K. Matsubara, A. Yamamoto, M. Noda, N. Hashimoto, K. Sakai, M. Kondo, Y. Matsushita, K. Furukawa, A. Suzumura, and M. Ueda, “Factors inducing M2 microglia/macrophages promote recovery after spinal cord injury”, 投稿中

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

出願番号 特願 2011-037028

出願日 2011/2/23

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

出願番号 特願 2013-25119

出願日 2013/2/13

発明の名称：組織再生ミクログリア・マクロファージ誘導型抗炎症製剤

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

霊長類の脊髄損傷モデルにおける歯髄幹細胞の治療有用性の解析

分担研究者 山本 朗仁<sup>(1)</sup>  
研究協力者 伊佐 正<sup>(2)</sup>  
研究協力者 西村 幸男<sup>(2)</sup>  
研究協力者 加納 史也<sup>(1)</sup>  
研究協力者 酒井 陽<sup>(1)</sup>

(1) 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

(2) 大学共同利用機関法人自然科学研究機構生理学研究所  
発達生理学研究系認知行動発達機構研究部門

研究要旨

脊髄損傷に有効な治療法は未だ開発されていない。これまで、様々な幹細胞の移植応用が神経損傷に対して、検討されてきたが、十分な治療効果が得られず既に縮小あるいは中止されている。今、脊髄損傷には革新的な新しい治療戦略の開発が求められている。我々は胎生期の神経堤細胞に由来する「ヒト歯髄幹細胞」の強力な神経再生効果を報告してきた。乳歯や永久歯の歯髄から採取した歯髄幹細胞は、未分化神経幹細胞マーカーを発現し、成熟した神経細胞やオロゴデンドロサイトに分化する神経幹細胞様の性格を示す多能性幹細胞である。これまでに我々日本、ブラジル、イスラエルの3つの研究グループによって、「急性および慢性ラット脊髄損傷モデルに歯髄幹細胞を移植すると、下肢運動機能が著しく回復する」ことが示されている。しかしながら、体重250g程度のげっ歯類における治療効果が、ヒトの脊髄損傷治療に応用できるのかは不透明である。

本研究はヒトと近縁な解剖・生理・行動学的特徴を有するマカクサルを用いて、頸髄C5での脊髄半切モデルにヒト歯髄幹細胞移植を行い、移植群と非移植群で、行動および解剖学的、組織学的評価、生理学的評価の比較検討を行い、移植が回復過程に与える影響を検討した。

【霊長類を用いる必要性】脊髄損傷からの機能回復機構を調べることは、多くの中枢神経の傷害に対する治療理論を構築する上で重要な課題である。しかし、傷害後の可塑性にかかわる脳内機構の観察はヒトでは不可能であり、解明することができない。しかし、モデル動物を用いることで経時的に形態及び生理機能の評価が可能でありその脳内機構を特定することができる。このような研究には、培養細胞ではなく哺乳類の動物個体を用いることが必要である。そして巧緻な運動制御に重要な皮質脊髄路(CST)にはげっ歯類と霊長類では明確な差があり、本研究はヒトと同じ霊長類であるサル類を用いる必要があった。

## A. 研究目的

ヒトと近縁な解剖・生理・行動学的特徴を有するマカサル脊髄損傷モデルに、ヒト乳歯、永久歯抜去歯より分離培養した歯髄幹細胞を移植し、行動および解剖学的、組織学的評価、生理学的評価の比較検討を行った。さらにその精密運動の回復経路について検証することを目的とした。

## 平成 24 年度研究成果

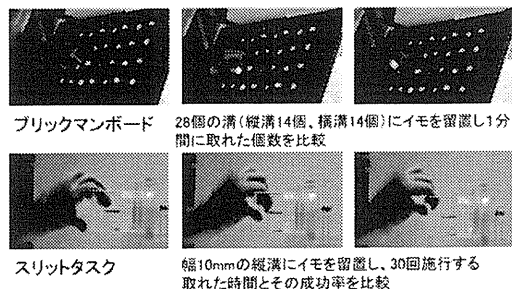
平成 24 年度は、脊髄の半側切断を行ったマカザルへ歯髄幹細胞を移植しその行動学的治療効果および、組織学的変化の評価を行った。

## B. 研究方法

### 1) モデル動物作製と治療介入

2 頭のアカゲザル (Con9, M71) は予めゲージ内から手を伸ばして、ブリンクマンボードと呼ばれる板に作った小さい穴からイモの小片を指先で摘む動作 (図 1 上) と幅 1 センチメートルのスリットの中に第 2 指と拇指を入れてイモ片を精密把持で摘み取る事 (スリットタスク 図 1 下) も訓練した。

図 1 損傷前の機能評価訓練



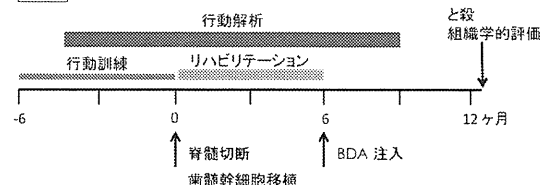
そして、鎮静・導入麻酔後、ペントバルビタール或いは、イソフルレン 1-5% 吸入麻酔による深麻酔下にて頸髄 C5 レベルで脊髄左側半分をピンセットで切断した。1 頭については損傷後直ちに損傷部位、損傷部位より頭側・尾側にそれぞれ歯髄幹細胞  $1 \times 10^6$  個をマイクロシリンジにてリン酸緩衝液 (PBS) とともに移植 (T71)、一方対照群 (Con9) には同量のリン酸緩衝液 (PBS) のみを注入した。

### 2) 行動解析実験

手術の翌日から損傷側の四肢のリハビリテーションを 6 か月間行い、その回復過程

をビデオ撮影した (図 2)。精密把持運動の回復を観察するため、複数のタスクを使用して観察を行った。

図 2 実験のスケジュール



### 3) 神経トレーサー注入

6 ヶ月後の行動観察終了後、深酔下で、大脳皮質運動野に順行性神経トレーサーである Biotin Dextran Amin (10%) をオートインジェクターを用いて微量注入 (一箇所あたり 2 $\mu$ l、C9 は 36 箇所、T71 には 37 箇所) した。術後の動物は、神経トレーサーが脊髄へ運ばれるための日数である約 3 ヶ月以上ケージ内で飼育した。

図 3 機能回復スコア

指	腕
0 指が一切動かせない	0 腕が一切上がらない
+1 指が少しかげ持ち上がる	+1 腕が少しかげ持ち上がる
+1 腕を肩から動かせ、前腕を肘の高さまで挙げられる	+1 腕を肩から動かせ、前腕を肩の高さまで挙げられる
+1 親指と他の指がピクッと動く	
+1 親指と他の指がピクッと動く	
+1 指の関節が曲がる	5 肩関節の可動域
0 肩を持つ素振りが出るが、把持出来ない	0 全く動かせない
+1 把持出来る	+1 肘可動する
	+1 ~90° (肘を肩の高さまで挙げられる)
	+1 90° ~ (肘を肩以上の高さまで挙げられる)
2 把持方法	
+1 指の上に物を乗せる事	6 Leg
+1 傘を握る様に物を握む	0 足が一切動かない
+1 3本から5本の指を使い握む	+1 2関節 (膝、足首) が少し動く
+1 2本の指で挟む	+1 立てないが足が独立して動く
+1 親指と人差し指で物を挟む	+1 膝に体を沿わせて立ち続けられる
+2 親指と人差し指の先端を使用	+1 腕の支えがあり持続的な起立出来るが、腕に体重がかかっていない
	腕の支えがあり、両足に体重をかけるられる
3 肘関節の可動域	+1 腕の支えが無く両足で立てる
0 90° ~ 不可動	
+1 90° ~ 160° (軽度肘の伸展が可能)	
+1 90°	
+1 ~90° (肘の伸展が可能)	

## C. 研究結果

### 1) 損傷範囲と回復傾向の比較

脊髄損傷からの全身の回復傾向を定量化するために、指、腕、足の動き、関節の可動域にそれぞれ点数をつけ、最大点数 26 点として損傷後毎日点数化していった (図 3)。そして損傷範囲と回復指数について比較検討を行った。すると、広範囲な後索と灰白質の一部を損傷した対照群 Con9 (損傷範囲 44.6%) では、損傷直後はほぼ半身付随であったが、その後次第に回復を見せたが、図 4 青破線のように肘関節の可動域、肩関節の可動域で回復レベルが低かった。

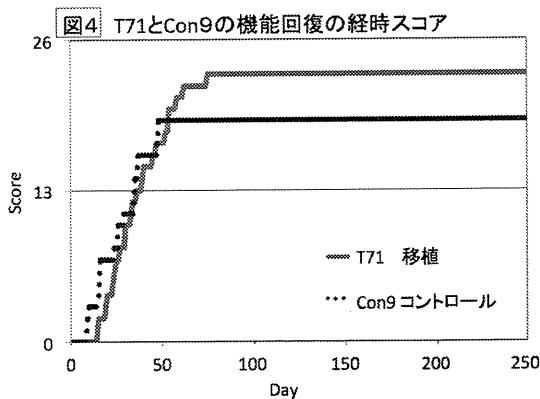
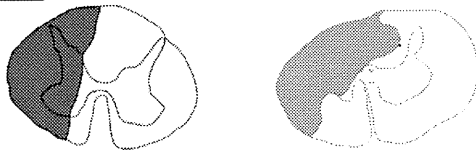


図5 T71とCon9の損傷範囲を比較



T71 脊髄C5損傷範囲47.7% Con9 脊髄C5損傷範囲44.6%

それに対して、赤線の移植群 T71 ではより損傷が大きい（損傷範囲 47.7%）にも関わらず、起立運動、肘関節、肩関節、指先の精密運動などで回復を認めた。

さらに手指の巧緻運動機能に注目して回復を評価するため、ブリンクマンボード試験とスリットタスク試験にて評価を行った。

#### ブリンクマンボード試験

1枚のボードに縦横 14 個ずつ、計 28 個の溝からイモ片を指先で把持出来た個数をカウントするブリンクマンボード試験では、図 6、図 7 の様に指先で取得できたイモ個数を青線で、失敗した個数を赤線で記録した。Con9 は平均 8.7 個、細胞移植群の T71 は平均 13.3 個であった。実際に手の運動をビデオで観察すると、図 6 のように、Con9 では巧緻な手指の運動の回復が不完全であるのに対し、図 7 のように T71 では第二指と拇指の間で正確につまむ精密把持が回復していた。

図6 Con9のブリンクマンボード試験の結果

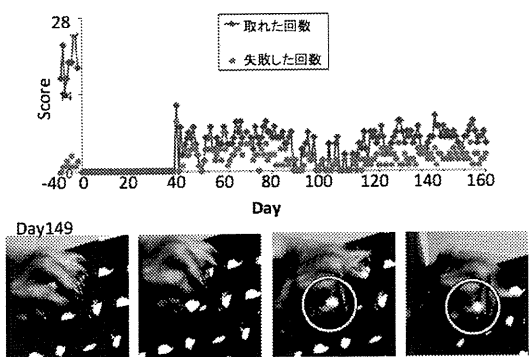
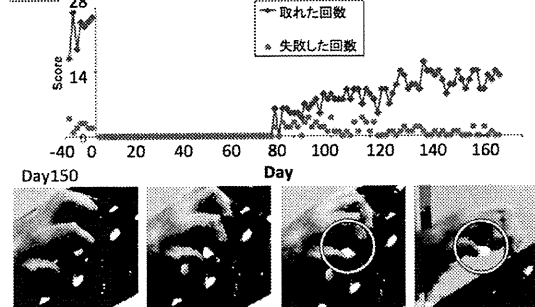


図7 T71のブリンクマンボード試験の結果



#### スリットタスク

幅 1 センチメートルのスリットから芋の小片を把持した方法とその成功率、時間を計測したスリットタスク試験では、精密把持を行えた割合を桃色で、その他の把持方法を使用した場合は黄色で記録し、タスクを行えた平均時間を青線で記録した。

Con9 では精密把持運動の頻度は低く、図 8 の様に指で巻き込むような形で把持する事が多い。対して T71 では精密把持運動の評価を行える様になるまで時間がかかったが、その成功率はほぼ 100%となった。把持スリットに指を入れてから、把持しスリットから指を出すまでを記録した時間の比較では非精密把持の C9 の方が精密把持を行っていた T71 よりもやや速く行えていた。T71 はブリンクマンボード試験と同様に術後 80 日目頃より精密把持運動が可能となったが、スリットタスク試験での手指運動は精密把持運動を示さず、第二指のみでイモ片を落下させ、拾う動作を行っていた。約 1 ヶ月訓練を行ったところ、術後 140 日目頃よりスリットタスク試験でも精密把持運動を行う様になり、それ以降は図 9 の通り高い成功率で精密把持運動を行った。



図8 Con9のスリットタスク試験の結果

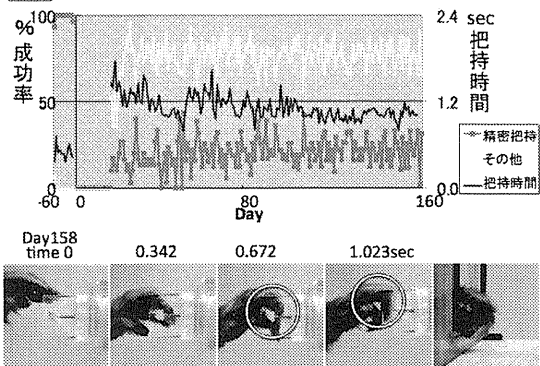


図9 T71のスリットタスク試験の結果

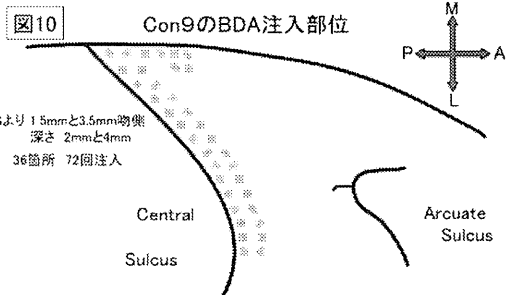
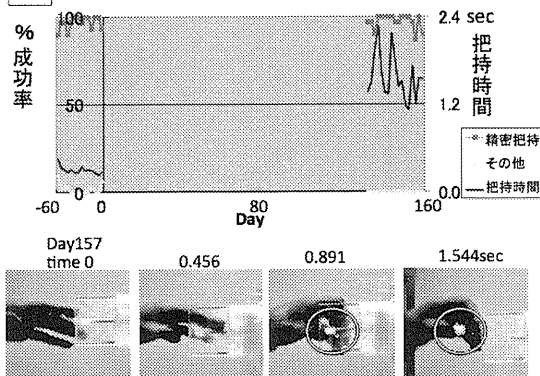


図11 Con9の脊髄C3 C6 C8にて BDA標識された軸索線維

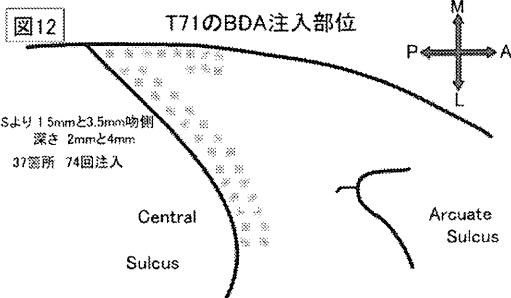
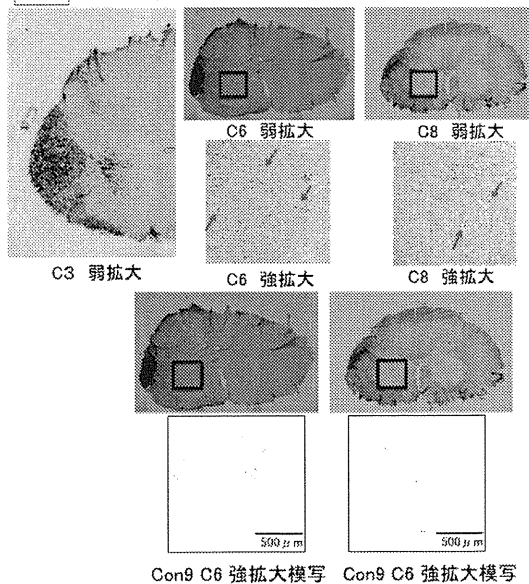
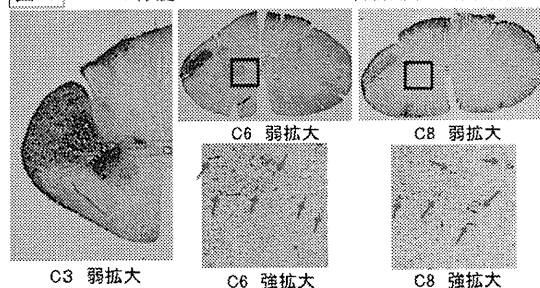


図13 T71の脊髄C3 C6 C8にて BDA標識された軸索線維

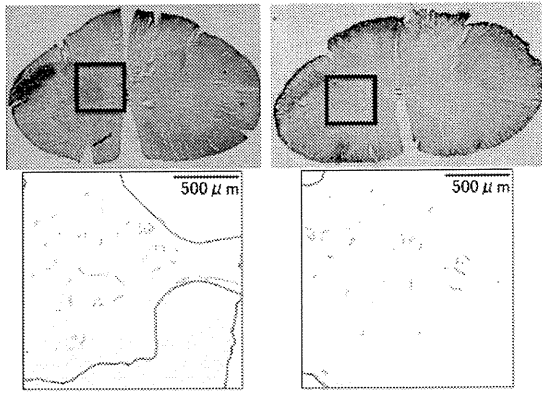


## 2) 皮質脊髄路の可塑的变化

損傷から6ヶ月以上の機能評価を終えて、その回復に関与していると思われる皮質脊髄路を可視化するために、図10、12のように一次運動野の広汎な領域に順行性トレーサーBDAを注入した。

Con9の損傷部位(C5)より吻側のC3において白質、灰白質にBDAによって標識された皮質脊髄路が数多く観察された。それに対して損傷部位より尾側のC6では白質にBDA標識された軸索線維はなく、灰白質に若干数の標識軸索が認められた(図11矢印)が、C8では殆ど認められなかった。

T71でも損傷部位C5より吻側のC3においてCon9と同様に白質、灰白質にBDA標識された皮質脊髄路線維が多数標識された。一方、驚くべきことに損傷部位より尾側C6の白質には標識線維は認められなかったが、灰白質においてはBDA標識軸索が多数認められ、さらにC8の灰白質でもその数は逆に若干増加しているくらいであった。



T71 C6強拡大模写      T71 C8 強拡大模写  
 T71 において損傷尾側の灰白質で多数の線維が認められたことが何に由来するかを明確にするため、脊髓 C4-5 では前頭断で組織切片を作成し観察を行った。

吻側 C4 より標識された軸索線維が損傷部位で大幅にその数を減らしている事がわかった。しかしながら、その線維の一部は図 14C のように損傷部位の中を走行し、C5 の尾側へ伸長している事が観察された。さらにその離れた尾側まで軸索神経が走行している事も観察された (図 14D)。

図14 T71のC4-5損傷部位を貫通するBDA標識線維を認める

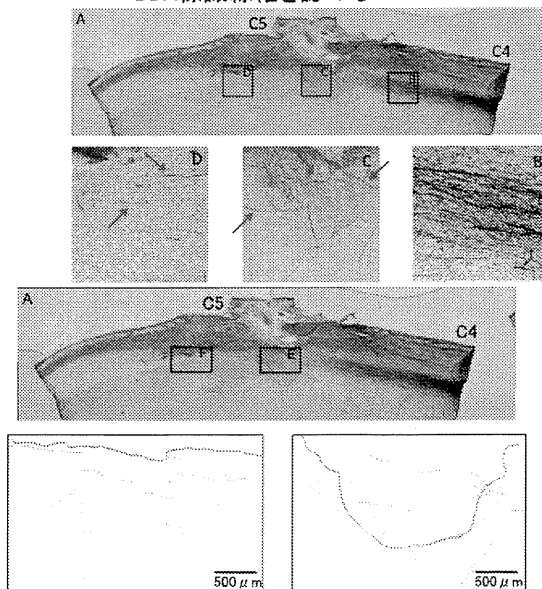


図14 F 模写 損傷部位の尾側を走行する軸索線維  
 図14 E 模写 損傷部位を越える軸索線維

### 3) 有害事象

本研究の実施期間において歯髄幹細胞を移植した T71 は行動異常を示さなかった。また、組織学的解析において腫瘍等の形成は

観察できなかった。

### D. 考察

今回の結果では、まだ移植群、対照群 1 頭のみでの比較でしかないが、移植群の損傷範囲が大きかったにも関わらず回復が良好であった。

理由として、一旦切断された皮質脊髓路線維が損傷部位を越えて再生し、損傷部より尾側の脊髓神経回路に影響を与えるようになった可能性が考えられる。損傷後、機能回復に差が出るのに 2 カ月程度の時間を要した (図 4) 理由のひとつとして、このように損傷部位を越えて再生した軸索が下部頸髄まで達して回路を再編するのに時間がかかった可能性が考えられる。

今回の研究で、霊長類の脊髓損傷に対する歯髄幹細胞の再生効果を及ぼす可能性が示唆された。この解析結果は、歯髄幹細胞がヒト脊髓損傷の治療に有用であることを示唆している。今後、サル頭数を増やしてこの結果の再現性を確認する必要がある。大型霊長類の脊髓半切断モデルに対する細胞移植効果についての検討は世界的に見ても稀な研究であり、精密運動の回復は驚くべき事だ。先の研究で歯髄幹細胞が成熟型オリゴデンドロサイトへ分化していることから、歯髄幹細胞はミエリンを産生し、皮質脊髓路の再生に寄与した可能性が考えられる。

### E. まとめ

歯髄幹細胞を切断した霊長類の脊髓に移植すると、一旦切断された皮質脊髓路が損傷部位を越えて再生していることが確認された。これによりマカクザル特有の巧緻性運動機能の回復に寄与した可能性が考えられる。歯髄幹細胞を移植したマカクザルにおいて行動異常や腫瘍形成は観察されなかった。歯髄幹細胞は移植安全性と治療有用性が高い希有な生体幹細胞であることが明らかとなった。今後、歯髄幹細胞移植による霊長類脊髓損傷治療の有効性を確認するための再現性実験を追加する必要がある。

### 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。

学会発表予定

F. Kano, A. Yamamoto, K. Sakai,  
Y. Nishimura, T. Isa, M. Ueda,  
Mechanisms of functional recovery of  
spinal cord injury in primates using  
dental pulp stem cells 第 36 回日本神経科  
学大会 2013.6.20-23

研究成果の刊行に関する一覧表  
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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, 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	Vol.122 No.1	80-90	2012
M. Osugi, W. Katagiri, R. Yoshimi, T. Inukai, H. Hibi, M. Ueda.	Conditioned Media from Mesenchymal Stem Cells Enhanced Bone Regeneration in Rat Calvarial Bone Defects	Tissue Engineering Part A	Vol.18, No.13-1 4	1479-14 89	2012
R. Shohara, A. Yamamoto, S. Takikawa, A. Iwase, H. Hibi, F. Kikkawa, M. Ueda.	Mesenchymal Stem Cells of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Accelerate Wound Healing by Paracrine Mechanism	Cytherapy	Vol.14, No.10	1171-11 81	2012
M. Ueda, W. Katagiri.	Paradigmshift in Tissue Engineered Bone	Regenerative Research	Vol.1, No.2	39-48	2012
山本 朗仁, 酒 井 陽, 松原 弘記	歯髄幹細胞を用いた脊 髄損傷の再生医療	Clinical Neuroscience	Vol.30,N o.10	1102-11 04	2012
上田 実, 山本 朗仁, 酒井 陽, 松原 弘記	歯髄幹細胞を用いた中 枢神経損傷治療	再生医療叢書 ～歯学系～	朝倉書店	15-25	2012
T. Inoue, M. Sugiyama, H. Hattori, H. Wakita, T. Wakabayashi, M. Ueda.	Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Tooth-Derived Conditioned Medium Enhance Recovery of Focal Cerebral Ischemia in Rats	Tissue Engineering Part A	Vol.19, No.1-2	24-29	2013
T. Inukai, W. Katagiri, R. Yoshimi, M. Osugi, T,	Novel Application of StemCell-Derived Factors for Periodontal	Biochemical and Biophysical Research Communication	Vol.430 No.2	763-768	2013