

201206001B

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～24年度 総合研究報告書

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脳梗塞・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 服部 宇、杉山 昌彦、井上 崇徳、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	8
分担研究者 山本 朗仁／研究協力者 中村 祥子、藤井 裕美	
2. 歯髄幹細胞移植による脊髄損傷治療	16
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	
3. 歯髄幹細胞無血清培養上清を応用した細胞移植を伴わない脊髄損傷治療法の開発 と新規ミクログリア/マクロファージ活性転換複合体の同定	28
分担研究者 山本 朗仁／研究協力者 松原 弘記	
4. 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	37
分担研究者 山本 朗仁／研究協力者 山形 まり	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	45
IV. 研究成果の刊行物・別刷	49

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)

総合研究報告書

歯髄幹細胞を用いた脳梗塞・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 服部 宇、杉山 昌彦、井上 崇徳、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

研究要旨

近年、脳梗塞やアルツハイマー型認知症患者は年々増加傾向にあり、医学的・福祉的・医療経済的に重大な疾患で、画期的な治療法の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やアルツハイマー型認知症への幹細胞移植療法がある。移植した幹細胞は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）により治療効果を発揮するとされている。しかし、細胞移植医療においては、現段階で法規制の問題、癌化のリスク、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。

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いる。ラット脊髄損傷、ラット脳梗塞モデルやマウス低酸素脳虚血モデルに、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)を細胞移植するとそのパラクライン効果により驚異的な機能回復を示すことを見出した。さらに、損傷した脊髄のくも膜下腔にヒト乳歯由来歯髄幹細胞培養上清(SHED-CM)を投与すると、細胞移植と同等の機能回復が得られることを明らかにした。本研究では、SHED-CMを脳梗塞モデルラットや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脳梗塞や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。

研究目的

現在注目されている新規医療のひとつに脳梗塞やアルツハイマー型認知症への幹細胞移植療法がある。しかし、細胞移植医療においては、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、我々の見出し

たヒト歯髄幹細胞由来培養上清の脳梗塞・アルツハイマー型認知症モデルにおける治療有用性を検討し、細胞移植を伴わない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・23 年度研究成果

平成 22 年度から 23 年度にかけては、ヒト乳

歯由来歯髄幹細胞培養上清 (SHED-CM) を脳梗塞モデルラットへ投与しその治療効果を検討した。

平成 24 年度研究成果

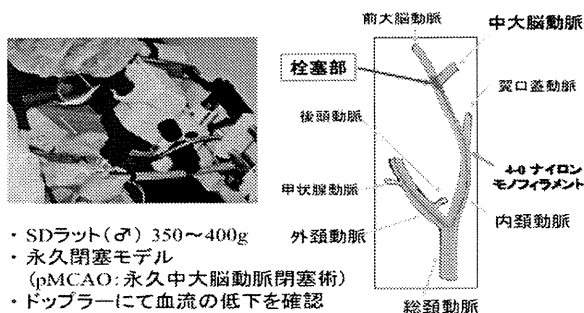
平成 24 年度においては、アルツハイマー型認知症モデルに対する SHED-CM の治療効果を検討した。

A. 研究方法

脳梗塞モデルラット作製

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。

脳梗塞モデルの作製



アルツハイマー型認知症モデルマウス作製

変異型 Aβ1-40 あるいは Aβ40-1 (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。

Aβ1-40 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
Aβ40-1 VVGGVMLGIAGKNSGVDEAFFVLKQHHVEYGS DHRFEAD

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。Aβ 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。

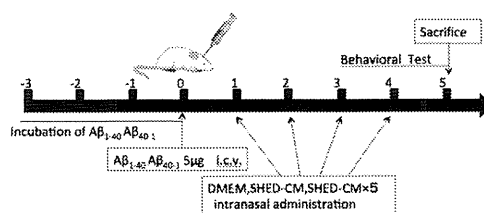
SHED-CM 作製

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 投与

脳梗塞モデルラット: 永久脳梗塞 3 日後から 15 日後までハミルトンシリンジを用いて SHED-CM 10μl を 2 分毎 10 回計 100μl / 日、経鼻投与した。コントロールとして生理食塩水(PBS)を同様に投与した。

アルツハイマー型認知症モデルマウス: SHED-CM を右側鼻腔内より、Aβ 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 100μl 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。



行動評価

脳梗塞モデルラット:

運動麻痺スコアの評価方法を以下の表に示す。

表 1 運動麻痺スコアの評価基準

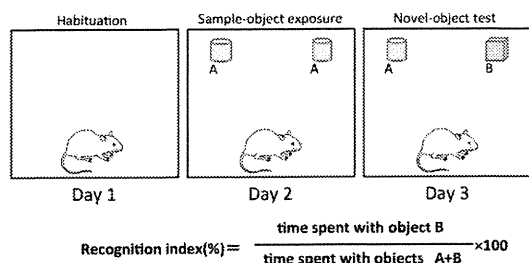
<p>評価基準：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 尻尾をもってもち上げたとき、麻痺側の四肢を突っ張らない(1点) 2. 麻痺側の下肢を引っ張ると下肢を引っ込めない(1点) 3. 体を麻痺側に倒すとそちらに傾く(1点) 4. 歩行させても歩けない(1点) 5. 50 cm の門のなかから <ol style="list-style-type: none"> 10 秒以内に歩いて抜け出せない(1点) 20 秒以内に歩いて抜け出せない(2点) 30 秒以内に歩いて抜け出せない(3点) 6-1. 麻痺側の四肢に上方向の抵抗を加えると突っ張らない(1点) 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。

アルツハイマー型認知症モデルマウス：

新規物体認識試験

- 実験 1 日目 (AB 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 (AB 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。

脳梗塞領域の測定

脳梗塞モデル作製後、16 日目のラットを灌流固定しラット脳を採取した。その後、画像解析ソフトを使用し、脳梗塞領域測定した。

免疫組織学染色

脳梗塞モデル作製後 16 日目のラット、アルツハイマー型認知症モデル作製後 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℃で凍結保存した。クライオスタッドにて厚さ 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、脳組織内での神経幹細胞、神経細胞や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

アルツハイマー型認知症モデル作製後、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。

B. 研究結果

脳梗塞モデルラット

脳梗塞領域の計測結果を図 1 に示す。梗塞 16 日後に屠殺した群において SHED-CM 投与群で有意に梗塞領域の縮小が認められた。

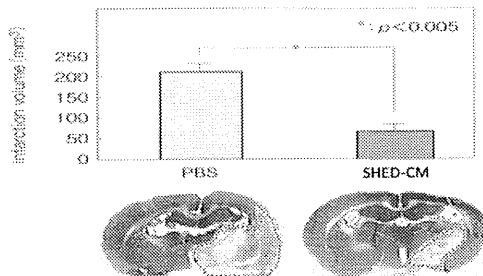


図1 脳梗塞領域の計測
脳梗塞16日後に解剖した試料においては左はコントロールのPBS投与群、右はSHED-CM投与群で、SHED-CM投与群では有意に梗塞領域の縮小が認められる。

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日とした。PBS投与群と比較してSHED-CM投与群で有意に運動麻痺の回復が認められた。

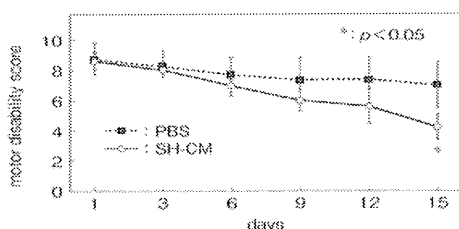


図2 運動麻痺スコアの比較
PBS投与群と比較してSH-CM投与群で、有意に運動麻痺の回復が認められた。スコアは表1参照。

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)、神経細胞マーカーである 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、SHED-CM投与群で、有意な陽性細胞の増加を認めた。

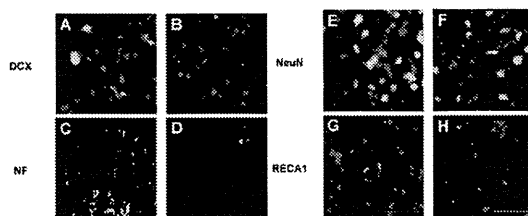


図3 免疫染色

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カ所を蛍光顕微鏡で撮影し、その密度を計測した。DCX、NeuN、RECA-1陽性細胞は、PBS投与群と比較してSHED-CM投与群で約1.5倍に増大していた。

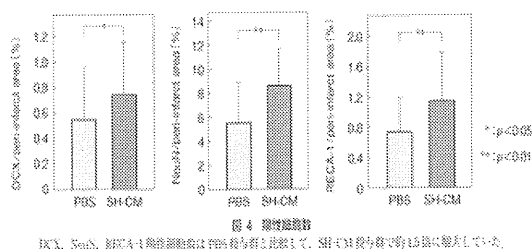


図4 免疫組織化学
DCX、NeuN、RECA-1陽性細胞数は梗塞後7日と比較して、SH-CM投与群で約1.5倍に増大していた。

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SHED-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た。さらに、梗塞16日後よりも6日後において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た。梗塞領域の減少、運動麻痺の改善において、SHED-CM投与によって有意に改善が認められた。SHED-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が示唆された。

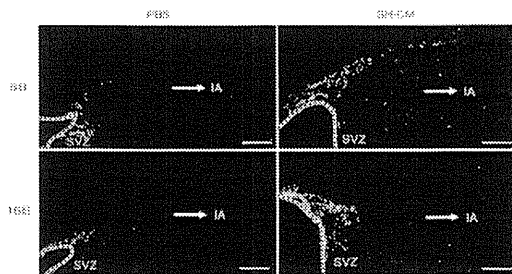
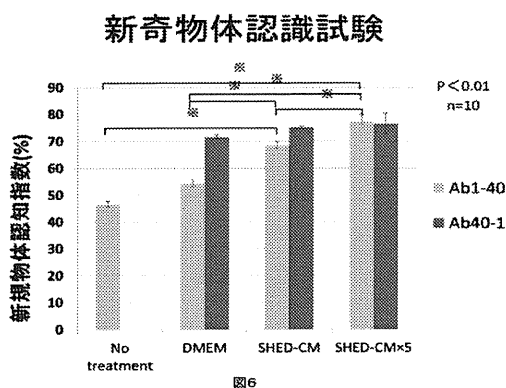


図6 脳内アミロイドβ蓄積による神経炎症の動態
 実験後3日、6日目の脳内アミロイドβ蓄積動態を調べるため、P18投与群とP35投与群の脳内アミロイドβ蓄積動態を蛍光免疫染色にて確認した。Iba1陽性細胞は、神経炎症の指標として知られる。Iba1陽性細胞は、脳内アミロイドβ蓄積後3日目と6日目の神経炎症の動態を反映している。
 Iba1: Iba1 immunoreactive, SVZ: Subventricular zone, Scale bar: 100 μm.

アルツハイマー型認知症モデルマウス

新奇物体認識試験の結果を図6に示す。



アルツハイマー病を誘発する AB1-40 注入群（青バー）は、ネガティブコントロール AB40-1 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。AB1-40 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7参照。Iba1:ミクログリア細胞系譜マーカー）。

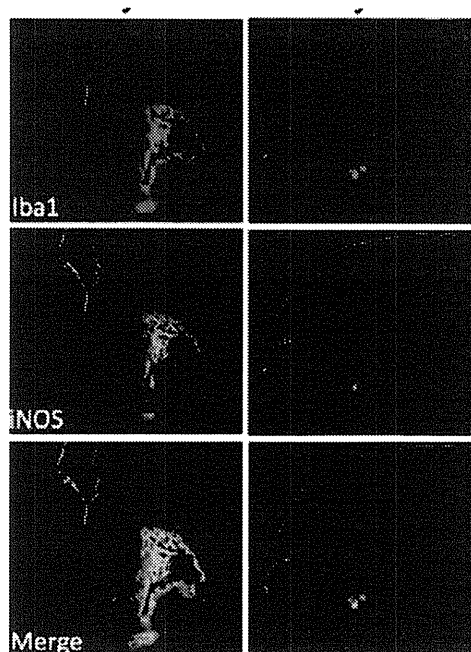
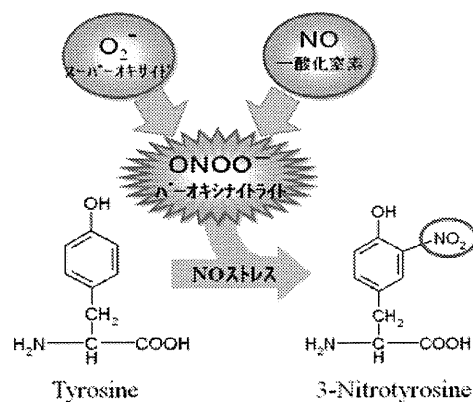


図7 アルツハイマー病では、異常蓄積した Aβ がミクログリアを活性化する。活性化ミクログリアは iNOS（一酸化窒素合成酵素）や NAPDH oxidase を発現し、一酸化窒素や活性酸素が大量に産生する。これらフリーラジカルが反応することで、パーオキシナイトライドが合成される。パーオキシナイトライドが神経伝達物質の原料となるチロシンをニトロ化する事により、神経伝達物質の産生を阻害し、認知機能の低下を引き起こすとされている。



さらに、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検証した結果、SHED-CM 群では他群と比較し iNOS、ニトロチロシン共に発現を抑制した。(図 8)

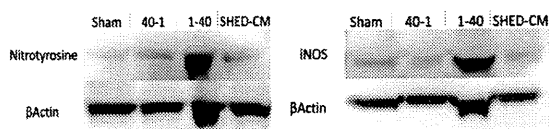


図8

C. 考察

脳梗塞モデルラット

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の

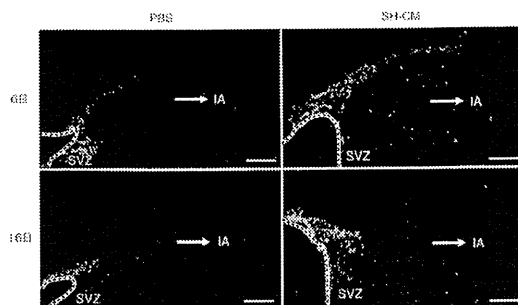


図 5 脳梗塞下部からの神経前駆細胞の発生
梗塞後6日目、16日のICNによる免疫組織化学染色装置で、PHS投与群と比較してSH-CM投与群で、嗅球下部から多くの神経前駆細胞の増殖が認められる。梗塞16日目よりも6日後のほうがより多くの神経前駆細胞の増殖が認められる。
IA: Intra-arterial, SVZ: 嗅球下部, Scale bar: 100 μm

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して嗅球まで移動、2種類の内在性ニューロン(嗅球顆粒細胞、傍糸球体細胞)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内存在部に至る経路、もうひとつは三叉神経から脳幹、脊髄に至る経路である。我々は、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、SHED-CM投与を行った。

SHED-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SHED-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、SHED-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。

アルツハイマー型認知症モデルマウス

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。

D. 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脳梗塞モデルラットやアルツハイマー型認知症モデルマウスにおける治療効果が見出された。

E. 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sugiyama,M,Iohara,K,Wakita,H,Hattori,H,Ueda,M,Matsushita,K,Nakashima,M

Dental pulp-derived CD31(-)/CD146(-) side population stem/progenitor cells enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats.

Tissue Eng Part A. 2011, 17(9-10)

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

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

第 32 日本炎症再生学会

京都 2011 年 6 月 3 日

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

第 56 回日本口腔外科学会総会

大阪 2011 年 10 月 22 日

井上崇徳, 杉山昌彦, 服部宇, 見田常幸, 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梗塞治療の可能性

第 11 回 日本再生医療学会総会

横浜 2012 年 6 月 13 日

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)

総合研究報告書

分担研究

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認し、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効率的にドーパミン神経細胞に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性を持つこと、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。平成24年度は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、行動の改善と移植細胞の生着を認めた。

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。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

<平成22年度>

(1)歯髄幹細胞の神経分化能の検討

未分化な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。

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。ドーパミン神経細胞に分化誘導したSHEDの発現する分子マーカー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った。

<平成23年度/平成24年度>

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で各種添加因子を様々に組み合わせ、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。

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モデルラット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22年度>

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を確立した。

(1)歯髄幹細胞の神経分化能の検討

Fig1 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。

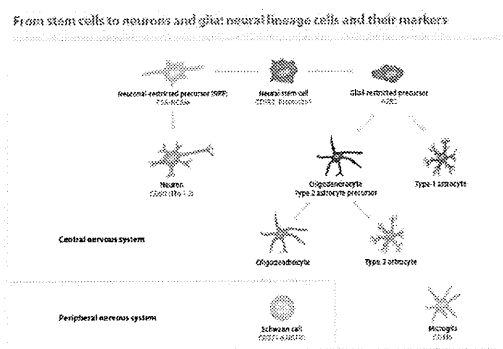


Fig1.神経幹細胞から神経系譜細胞の分化

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。(Fig2-a/b)

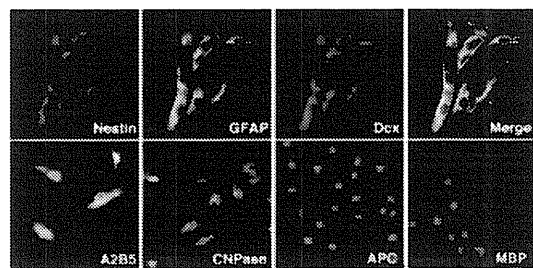


Fig2-a.SHEDにおけるマーカー遺伝子の発現 (細胞染色での定性解析)

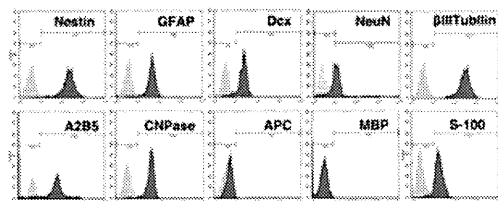


Fig2-b.SHEDのフローサイトメトリー解析

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(Fig3)。

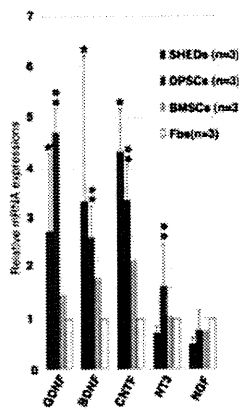


Fig3.SHEDおよびDPSCにおける神経栄養因子の発現

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。

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。

a)ドーパミン神経細胞への分化誘導法の確立

Fig4 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の分化誘導に成功した。(Fig5)

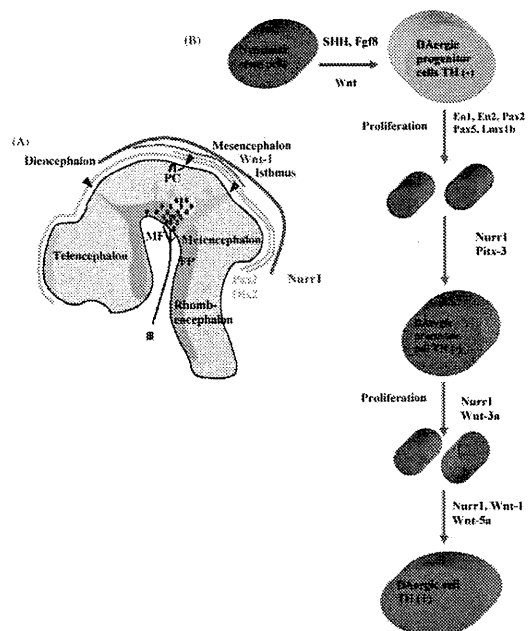


Fig4. ドーパミン神経細胞の発生過程

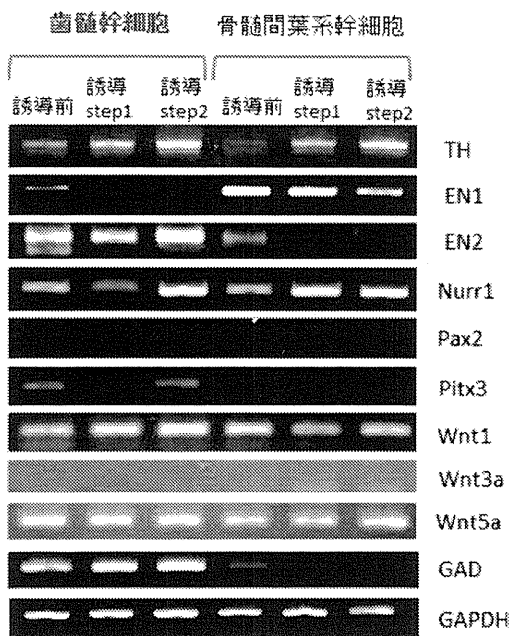


Fig5. ドーパミン神経分化誘導SHEDの遺伝子解析

以上から、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。

<平成23年度>

平成 23 年度はパーキンソン病治療へ向けて、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。

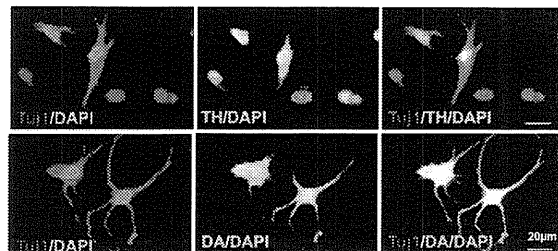
パーキンソン病治療に向けて

a) ドーパミン神経細胞への分化誘導法の確立

SHEDのドーパミン神経細胞への分化誘導はstep1およびstep2の2段階で行い、step2

の添加因子を12パターン試した。その結果、BDNFを添加する方法がTH陽性細胞率が最も高く、細胞生存率も優れていることが分かった。

ドーパミン神経分化誘導SHEDstep2



ドーパミンマーカー染色

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)をラットの片側脳内に注入しパーキンソンモデルの作製を試みたが、モデルの成功率は著しく低く、モデルの神経症状も安定しなかった。

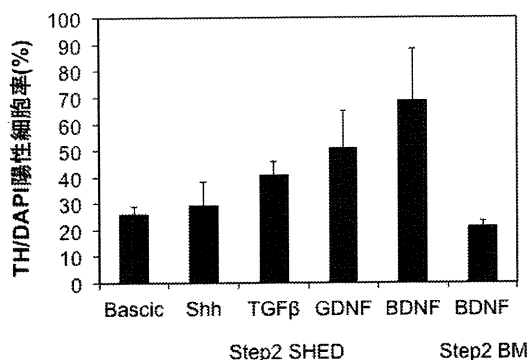
<平成24年度>

平成 24 年度は 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。

a) ドーパミン神経細胞への分化誘導法の確立

平成23年に試行した12パターンの添加因子のなかから有用と考えられる5パターンを選び、SHED及びBMで比較検討を行った。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、誘導効率は

BMと比べてSHEDが有意に優れていた。



(Fig1)

Fig1 分化誘導後のTH陽性細胞率(n=3)

また、ドーパミン神経分化SHEDのドーパミン分泌能をELISAで評価した。分化誘導終了後のSHEDは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。(Fig2)

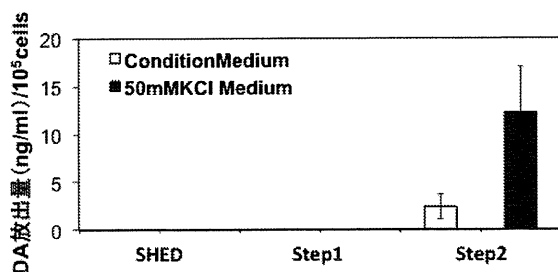


Fig2 ドーパミン分泌能の評価

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り、6-OHDA注入より1週間でパーキンソン病症状を発症させることが可能となった。

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。(Fig3)

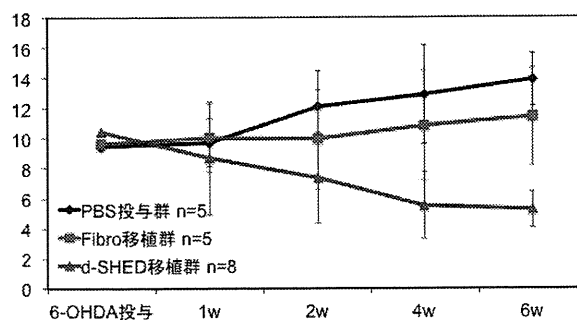


Fig3 パーキンソンモデルラットの神経症状評価

移植後6週間でい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

歯髄幹細胞の神経分化能を検討したところ、SHED、DPSCともに90%以上が神経幹細胞・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。また、歯髄幹細胞は神経分化誘導にも正常な応答能を示した。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。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いる。また、ドーパミン神経細胞への分化誘導効率は、骨髄間葉系幹細胞と比較して歯髄幹細胞は有意に優れていた。このことから、歯髄幹細胞は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な幹細胞であると推測される。ドーパミン神経細胞への分化誘導条件を各種検討した結果、step1およびstep2の2段階で培養し、step1ではbFGFとEGFを添加することで成熟型神経細胞に分化し、step2でさらにshhやBDNFなどの添加因子を加えることでTH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。なかでもstep2でBDNFを添加する方法が、最もTH陽性細胞への分化率および細胞生存率が高く、SHEDの最も効率の

良い分化誘導法であることがわかった。また、この方法で分化誘導した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。

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 なし

2.実用新案登録 なし

3.その他 なし

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)

総合研究報告書

分担研究

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⁽¹⁾

研究協力者 伊佐 正⁽²⁾

研究協力者 西村 幸男⁽²⁾

研究協力者 加納 史也⁽¹⁾

研究協力者 酒井 陽⁽¹⁾

(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

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、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、近年の幹細胞研究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。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、歯髄幹細胞は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。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。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ラット及びサル脊髄では、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。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。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。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。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。

平成 22 年度研究成果

歯髄幹細胞のラット急性期脊髄完全切断モデルへの移植による治療効果の検討を行った。

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。

平成 24 年度研究成果

歯髄幹細胞の霊長類脊髄損傷モデルへの移植による治療効果検討を行った。

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. ラットの脊髄を第9-10頸椎レベルで完全に切断したのち、切断部位に歯髄幹細胞を移植した。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。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。