

3. 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。

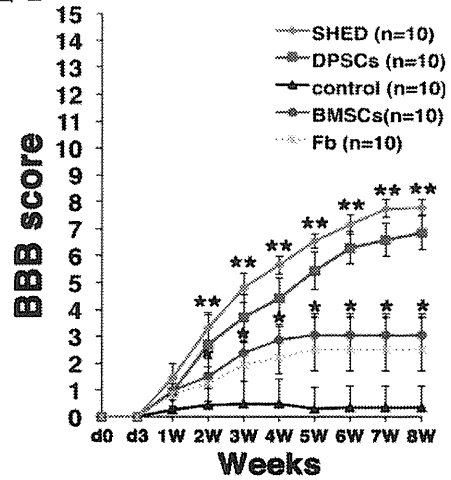
図 1

Functional gene classification in SHEDs versus BMSCs

Term	Changed gene up	Total gene	P
Extracellular region	343	2,865	2.52×10^{-14}
Skeletal system development	104	661	1.46×10^{-9}
Extracellular matrix	101	678	9.20×10^{-9}
Extracellular space	147	1,134	2.00×10^{-8}
Extracellular matrix organization	43	195	4.86×10^{-8}
Multicellular organismal development	643	6,683	9.36×10^{-8}
Collagen fibril organization	20	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	96	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	3.25×10^{-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	7.75×10^{-5}
Skeletal system morphogenesis	42	260	8.16×10^{-5}
Tissue development	185	1,720	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

4. 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

図 2



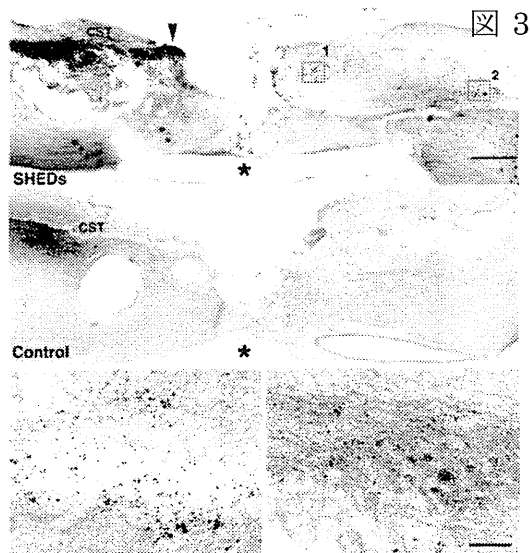
維芽細胞を移植したラット歯髄幹細胞を移植したラットは、体重をさせることはできないが、3関節を動かしながら、這って歩けるまでに回復した（図2）。

5. 驚異的な神経軸索伸長効果

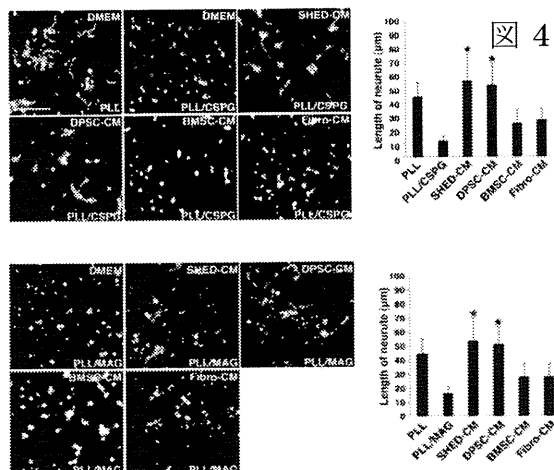
歯髄幹細胞を移植すると軸索が切断面を越えるか検証した。脊髄損傷ラットの脳に、脳から脊髄に向かう神経軸索の走行に沿って輸送される物質・BDAトレーサーを脳に注入し、トレーサーが切断面を越えれば、切断した軸索が再生したことがわかります。PBSを注入した脊髄損傷ラットではトレーサーが切断面を越えていることは観察できなかった。

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、尾側脊髄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3)。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ァ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4)。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。

6. 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5)。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。

図 5

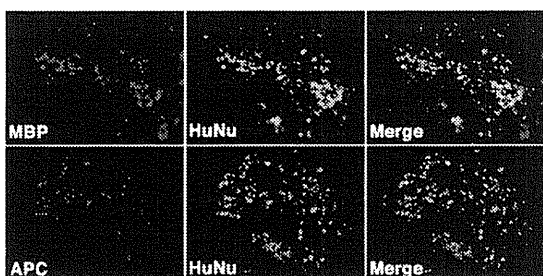
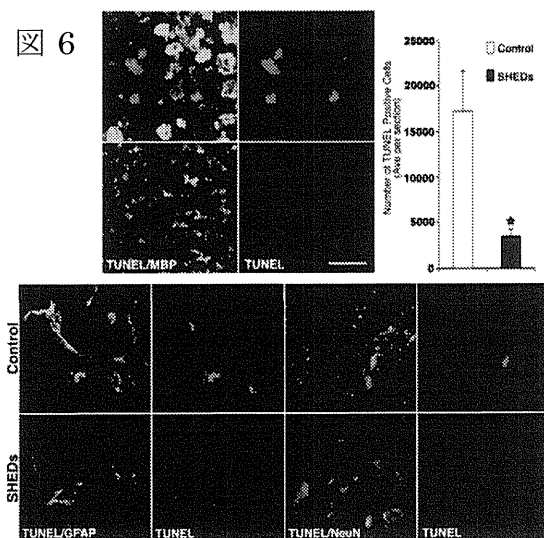


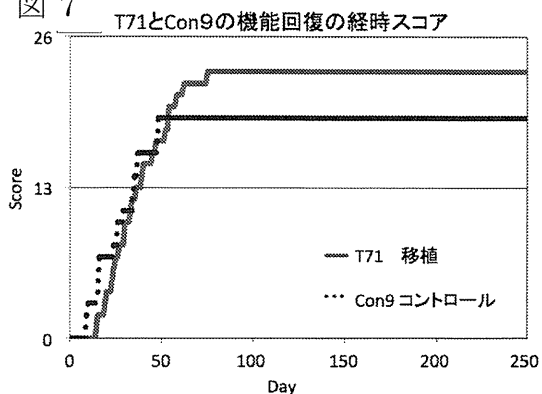
図 6



7. 神経損傷に伴うアポトーシス細胞死を抑制

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

図 7

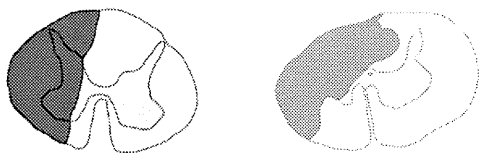


ス) を TUNEL 染色にて検出した。歯髄幹細胞移植群では TUNEL 陽性細胞は検出されなかった (図 6)。統計学的解析を行うと、歯髄幹細胞移植群の TUNEL 陽性細胞はコントロール群の 10 分の 1 程度であった。歯髄幹細胞はアポトーシスを強力に抑制することが観察された。

8. マカクザル脊髄半側切断モデルの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。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 7 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 8 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9、図10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9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10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 9 Con9のブリンクマンボード試験の結果

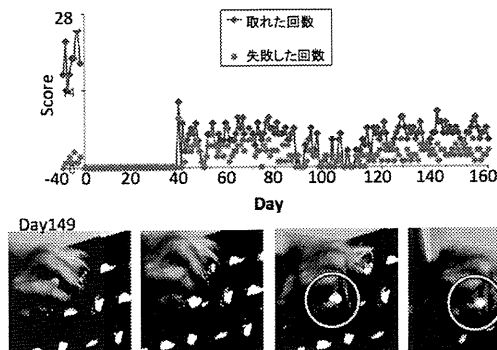
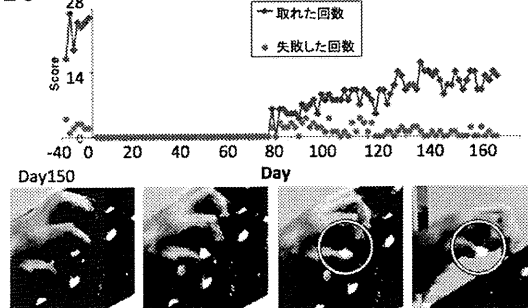


図 10 T71のブリンクマンボード試験の結果



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11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 よりもやや速く行っていた。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 12 の通り高い成功率で精密把持運動を行った。

図 11 Con9のスリットタスク試験の結果

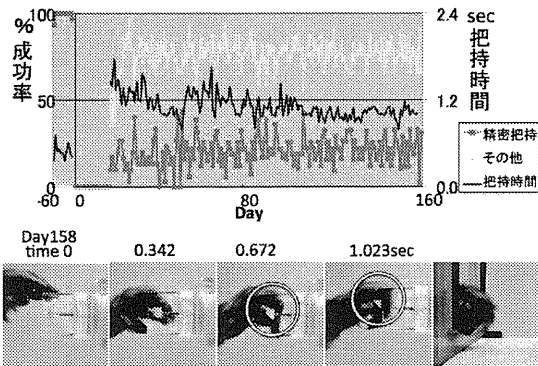


図 12 T71のスリットタスク試験の結果

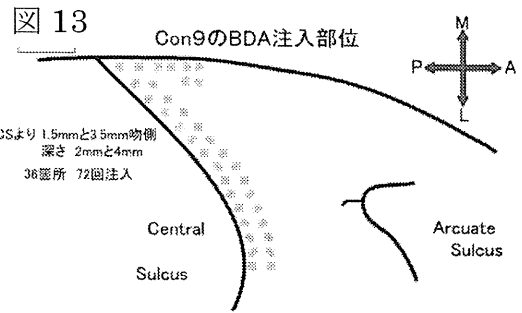
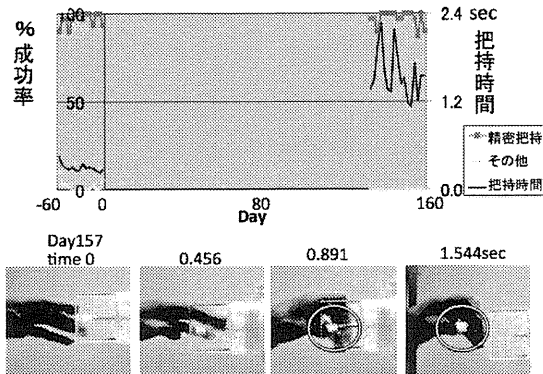
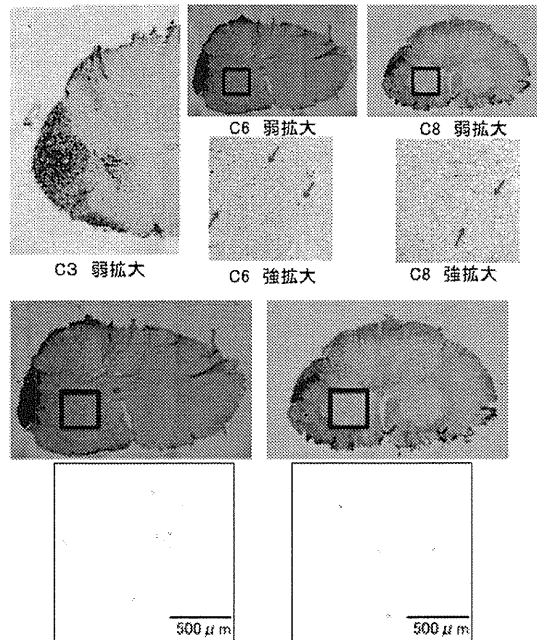


図 14 Con9の脊髄C3 C6 C8にて BDA標識された軸索線維



Con9 C6 強拡大模写 Con9 C6 強拡大模写

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 13、15 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。

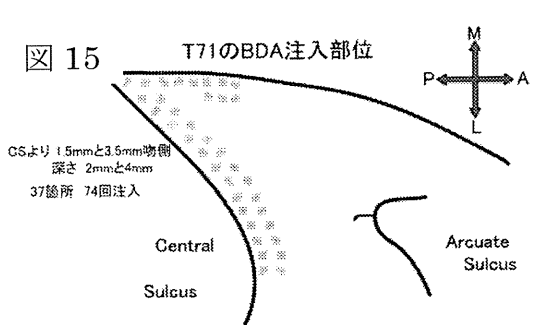
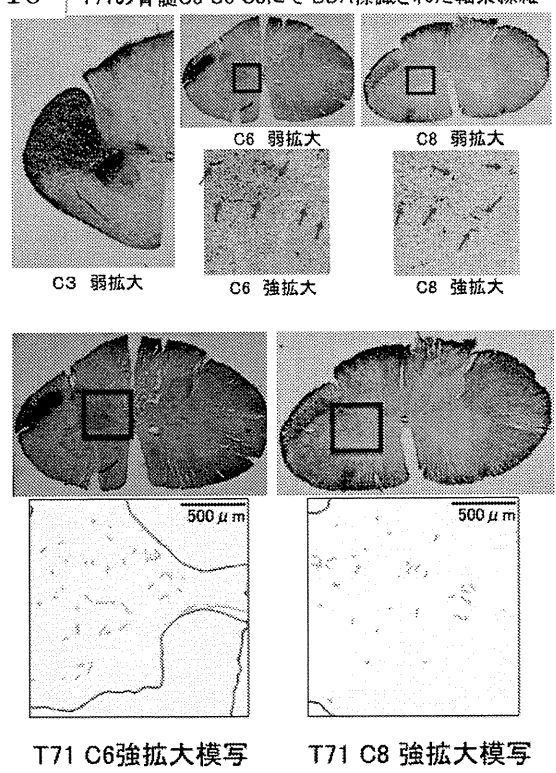


図 15 T71のBDA注入部位

図 16 T71の脊髓C3 C6 C8にて BDA標識された軸索線維



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 14 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

図 17 T71のC4-5損傷部位を貫通する BDA標識線維を認める

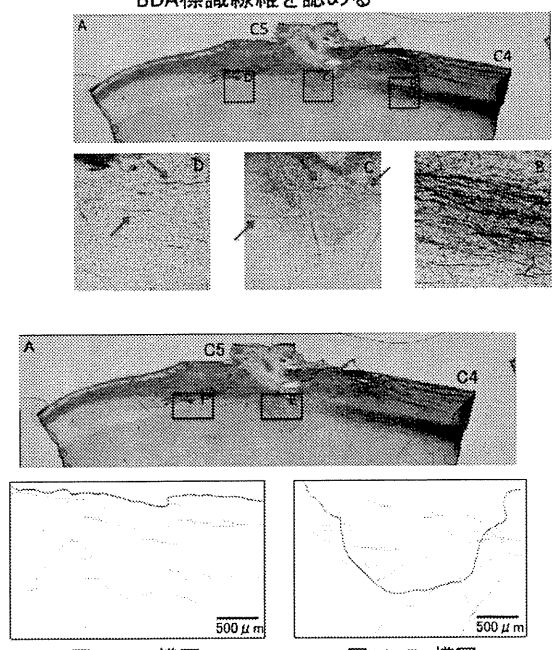


図14 F 模写 損傷部位の尾側を走行する軸索線維
図14 E 模写 損傷部位を越える軸索線維

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 17C 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 17D)。

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。

サルへの移植の結果では、まだ移植群、対照群1頭だけの結果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髄路線維が損傷部位を越えて再生し、損傷部より尾側の脊髄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

を要した。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、霊長類の脊髄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髄損傷の治療に有用であることを示唆している。

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四肢運動機能の回復を促した。霊長類の脊髄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髄損傷の治療に有用であることを示唆している。

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

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)

The Journal of Clinical Investigation
2012 Jan 3;122(1):80-90

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

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

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

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

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

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が、その実用化に向けては未だ様々な課題が山積している。近年、移植した幹細胞の重要な役割として、「細胞が分泌する液性因子によるパラクライン効果」による組織再生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た。歯髄幹細胞由来の液性因子群のみでの治療が可能であれば、細胞移植を伴わない新しい脊髄損傷治療法の開発が期待できるとし、平成22年度から平成24年度にかけて研究を遂行してきた。

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していた。

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。この活性転換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。本研究結果から、ヒト歯髄幹細胞由来の液性因子群は急性期脊髄損傷に治療有用性が高いことが示され、さらに培養上清中から製剤化への可能性が高い新規のミクログリア活性転換複合体が見出された。

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、その治癒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、その活性因子を同定することで、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。

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。

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、およびマイ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。

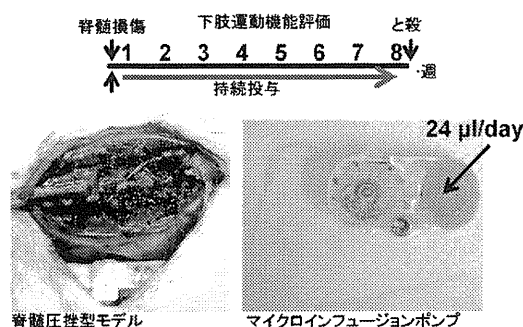
③脊髄損傷における炎症・免疫反応の主役となるマイクログリアを用い、その初代培養系を LPS で刺激、炎症/組織破壊系マイクログリアへ誘導し、その環境下で歯髄幹細胞培養上清を作用させ、炎症性サイトカインの遺伝子発現変動や、細胞障害性因子であるグルタメートや一酸化窒素産生の変動を解析した。

④近年、マイ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マイ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、マイ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 SHED-CM や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、神経軸索に対する組織学的評価を行った。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

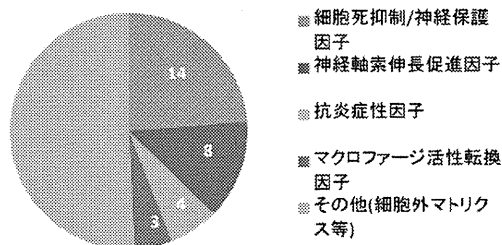
定等を行う場合は、匿名化・保管・廃棄方法、閲覧者の範囲等について規定する。あらかじめ被験者の同意を得ないで、同意説明文書で特定された利用目的の達成に必要な範囲を超えて、個人情報を取り扱わない。また、患者が本試験に参加しない場合、または途中で試験からの離脱を希望された場合にも不利益を受けることのないよう、通常通りの治療を行う。

C.研究結果

In vitro 実験系：

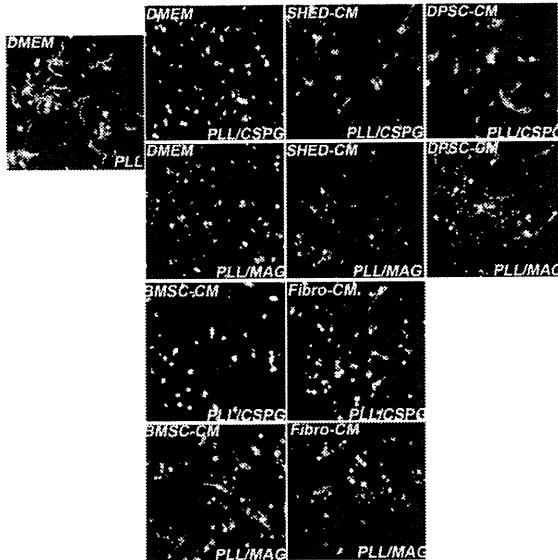
①SHED-CM 中に含まれる液性因子群をヒト274種類サイトカイン抗体アレイを用いて解析した。結果、SHED-CM 中には約80種類のタンパク質が含まれており、機能分類した結果14種類の細胞死抑制・神経保護因子、8種類の神経突起伸長促進因子、4種類の抗炎症促進因子、3種類のマクロファージ活性転換関連因子が含まれていた（下図参照。検出因子群の機能分類図）。

歯髄幹細胞-CM中の因子群分類

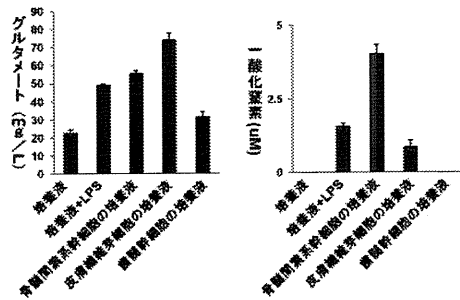
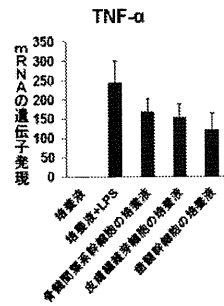
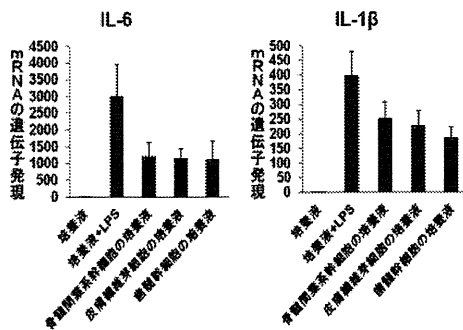


②神経再生阻害因子コーティング上で2種の細胞を培養し、そこへ歯髄幹細胞由来無血清培養上清を作用させると、神経突起の伸長が促進され、細胞死が抑制されるということが示された。これは、比較実験として行った他の無血清培養上清（ヒト骨髄間葉系幹細胞由来培養上清、ヒト繊維芽細胞由来培養上清）では認められない作用であった（下図参照。小脳顆粒細胞における神経突起伸長効果。SHED-CM：ヒト乳歯由来歯髄幹細胞培養上清。DPSC-CM：ヒト永

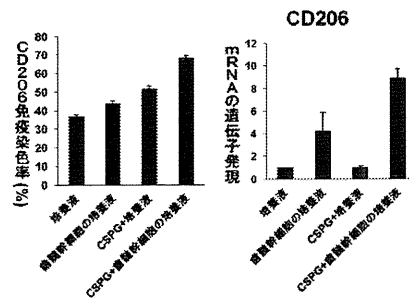
久歯由来歯髄幹細胞培養上清。BMSC-CM：ヒト骨髄由来幹細胞培養上清。Fibro-CM：ヒト線維芽細胞培養上清。)



③SHED-CMはLPSで活性化されたマイクログリアの炎症性サイトカインIL-6, IL-1 β , 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線維芽細胞培養上清でも同様の傾向を示した。また、マイ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)。

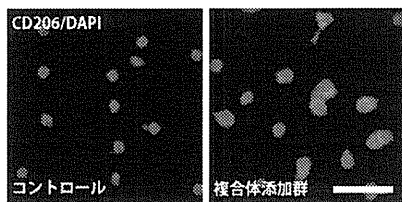


④非活性型マイクログリアへ歯髄幹細胞培養上清を作用させると、CSPGを介し、抗炎症/組織修復系マイクログリアマーカーであるCD206を発現し、かつ強力な抗炎症性サイトカインIL-10を産生するマイクログリアへと誘導された(下図参照)。



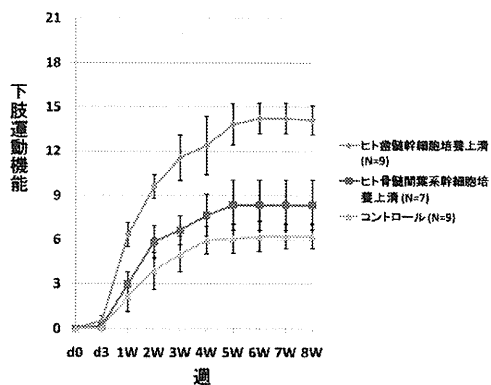
我々はSHED-CM中のマイクログリアを抗炎症型へ転換する活性因子を探索するために、アレイ解析で確認された3種類のマクロファージ活性転換関連因子(ケモカインA、分泌型Type IレクチンB、サイトカインC)に着目した。ELISA法による定量、ウェスタンブロット法によるタンパクの検出にてSHED-CM中に実際にこの3種類の因子が含有されている

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。

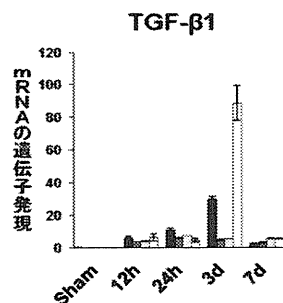
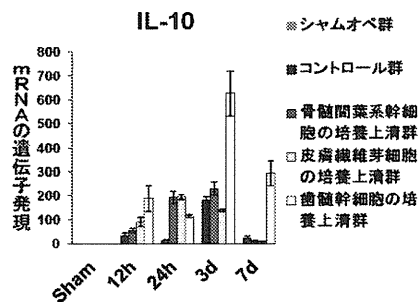


In vivo 実験系：

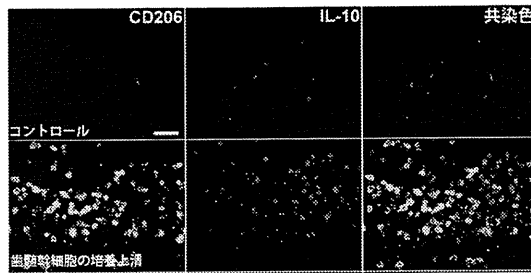
圧挫型脊髄損傷モデルラットにおいて、歯 SHED-CM 投与後に著明な下肢運動機能の回復が認められた（下図参照）。また、組織学的評価により、無血清培養上清投与群において、急性期における神経細胞死を最小限に抑え、神経再生阻害因子の作用を抑制し、神経回路の再編を促進するという結果が得られた。



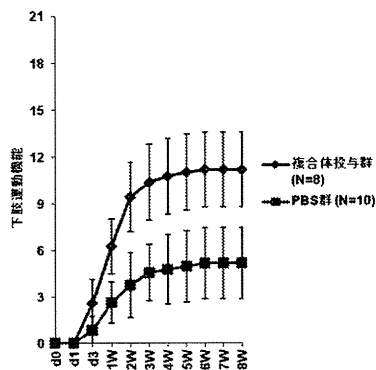
また、SHED-CM 投与後 12 時間、24 時間、3 日、7 日での脊髄での炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカインの遺伝子発現変動解析の結果、コントロール群と比較して、歯髄幹細胞培養上清投与群では各タイムポイントにおいて炎症性サイトカイン IL-6、IL-1 β 、TNF- α の有意な発現抑制がみられた。これは、骨髄間葉系幹細胞培養上清および皮膚繊維芽細胞培養上清投与群においても同様の傾向であった。一方、抗炎症性サイトカイン IL-10、TGF- β 1 は投与後 3 日目において歯髄幹細胞培養上清投与群においてのみ有意な発現上昇を認めた（下図参照）。



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マイクログリア/マクロファージの多くが抗炎症/組織修復系マイ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を発現するマイクログリア/マクロファージであった(下図参照)。

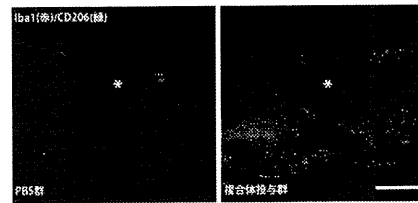


さらに、ラット圧挫型脊髄損傷モデルへマイクログリア活性転換複合体を投与したところ、コントロール群と比較し著明な下肢運動機能の回復が認められた(下図参照。下肢運動機能回復評価図)。



また、投与後3日目の遺伝子学的・組織学的解析により、マイ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マイクログリア/マクロファージの多くがCD206およびIL-10を発現するマイクログリア/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。マイクログリア/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

マイクログリア/マクロファージの存在を認めた。)



D. 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、今回、我々は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*実験系により世界で初めて実証した。これは幹細胞由来の液性因子群に治療有用性が高く、細胞移植を伴わない新しい治療法開発の可能性を示した点で非常に重要な意義を持つことが考えられる。

さらに、本研究の中で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マイクログリア活性転換複合体を同定した。この複合体は脊髄損傷のみならず、マイクログリアやマクロファージが主体となるような急性期損傷疾患・自己免疫疾患への応用が期待できる。今後はこの複合体の製剤化を目指し、その治癒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必要があることが考えられる。

E. 結論

本研究により、ヒト歯髄幹細胞由来の液性因子群の急性期脊髄損傷における治療有用性が実証され、さらに因子群の中から急性期脊髄損傷に治療効果のある新規のマイクログリア/マクローファージ活性転換因子が同定された。

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

学会発表

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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, 2012.6.12-14
8. 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, 2012.9.14-16
9. 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, 2012.10/19-21
10. 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, 2012.11.8

11. K. Matsubara, “Conditioned medium derived from stem cells from human deciduous teeth promote functional recovery after spinal cord injury”, Global COE program the 4th international symposium, P91, Nagoya, 2012.11.15-16

論文発表

1. 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*, Vol.122, No.1, (2012), pp.80-90.

2. 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.
3. 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)

総合研究報告書

分担研究

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 名古屋大学大学院医学系研究科顎顔面外科学講座 准教授

研究協力者 山形 まり

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髓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 で最も障害をう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 2×10^5 cells/2 μ 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 μ 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 μ 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)