

- ²⁰Shimer, A. L., F. C. Oner, and A. R. Vaccaro. Spinal reconstruction and bone morphogenetic proteins: open questions. *Injury* 40(Suppl 3):S32–S38, 2009.
- ²¹Sill, T. J., and H. A. von Recum. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 29:1989–2006, 2008.
- ²²Song, C., Z. Guo, Q. Ma, Z. Chen, Z. Liu, H. Jia, and G. Dang. Simvastatin induces osteoblastic differentiation and inhibits adipocytic differentiation in mouse bone marrow stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308:458–462, 2003.
- ²³Stein, D., Y. Lee, M. J. Schmid, B. Killpack, M. A. Genrich, N. Narayana, D. B. Marx, D. M. Cullen, and R. A. Reinhardt. Local simvastatin effects on mandibular bone growth and inflammation. *J. Periodontol.* 76:1861–1870, 2005.
- ²⁴Stevens, M. M. Biomaterials for bone tissue engineering. *Mater. Today* 11:18–25, 2008.
- ²⁵Takayanagi, H., S. Kim, T. Koga, H. Nishina, M. Isshiki, H. Yoshida, A. Saiura, M. Isobe, T. Yokochi, J. Inoue, E. F. Wagner, T. W. Mak, T. Kodama, and T. Taniguchi. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev. Cell* 3:889–901, 2002.
- ²⁶Tanigo, T., R. Takaoka, and Y. Tabata. Sustained release of water-insoluble simvastatin from biodegradable hydrogel augments bone regeneration. *J. Control Release* 143:201–206, 2010.
- ²⁷Venugopal, J., Y. Z. Zhang, and S. Ramakrishna. Fabrication of modified and functionalized polycaprolactone nanofibre scaffolds for vascular tissue engineering. *Nanotechnology* 16:2138–2142, 2005.
- ²⁸Wong, R. W., and A. B. Rabie. Histologic and ultrastructural study on statin graft in rabbit skulls. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 63:1515–1521, 2005.
- ²⁹Wu, Z., C. Liu, G. Zang, and H. Sun. The effect of simvastatin on remodelling of the alveolar bone following tooth extraction. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 37:170–176, 2008.
- ³⁰Xie, J., and C. H. Wang. Electrospun micro- and nanofibers for sustained delivery of paclitaxel to treat C6 glioma in vitro. *Pharm. Res.* 23:1817–1826, 2006.
- ³¹Yamawaki-Ogata, A., R. Hashizume, M. Satake, H. Kaneko, S. Mizutani, T. Moritan, Y. Ueda, and Y. Narita. A doxycycline loaded, controlled-release, biodegradable fiber for the treatment of aortic aneurysms. *Biomaterials* 31:9554–9564, 2010.
- ³²Zhang, Y., H. Ouyang, C. T. Lim, S. Ramakrishna, and Z. M. Huang. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 72:156–165, 2005.

幹細胞は必要か？

Do we need stem cell?



上田 実

Minoru UEDA

名古屋大学大学院医学系研究科頭頸部・感覚器外科学講座頭頸面外科

1993年 Vacantiらは、組織の再生には“幹細胞”“足場材料”“信号分子”が必要であると唱えた¹⁾。この三要素が協調的に働きながら組織を再生させるという考えである。だが、いまその基本ドグマが変わろうとしている。本特集ではその先駆けとなる研究成果を紹介する。

再生の三大要素(図1)

“足場材料”は文字どおり細胞活動の足場となる空間を提供する。適切な環境を提供すれば、生体組織は自然と再生に向かうとの考えに基づいている。そこでこれまで多くのバイオマテリアル(たとえばセラミックスやコラーゲンなど)が臨床現場に紹介された。しかし、足場材料だけでは組織再生はせず、事実、臨床の成績も芳しくない。そこでより効率的に再生させるために成長因子やサイトカインという“信号分子”を導入しようという考えが生まれた。信号分子は内在性の幹細胞に働きかけて組織再生を促進するといわれている(図2)。さらに成長因子やサイトカインは遺伝子組換え技術によって大量生産できる長所もある。最近、“足場材料”と“信号分子”の複合材料(骨形成蛋白, BMP-2とアテロコラーゲン)がアメリカで商品化された²⁾。しかし、臨床医の評判はいまひとつである。価格が高いわりに骨再生能が不安定で、術後に高度の浮腫が発生するからである³⁾。

最後に登場したのが“幹細胞”である。“幹細胞”はもともと生体のなかに存在し、組織や臓器に破壊が生じると局所に集積し、自ら組織を再構築する。いわゆる自然治癒の過程で主役をなす細胞である。

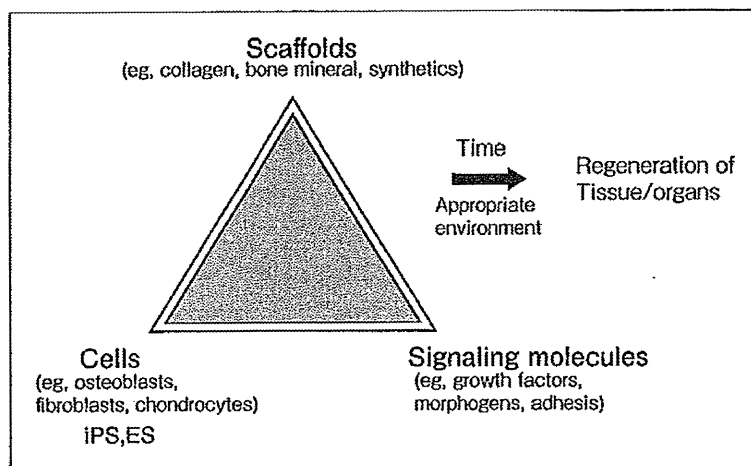


図1 再生の三大要素

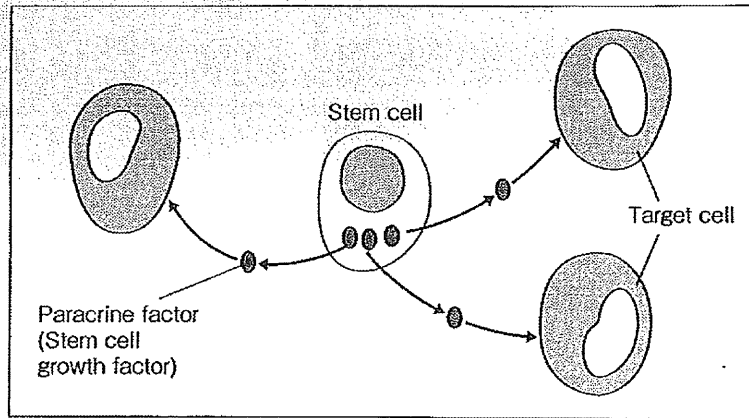


図 2 幹細胞のはたらき

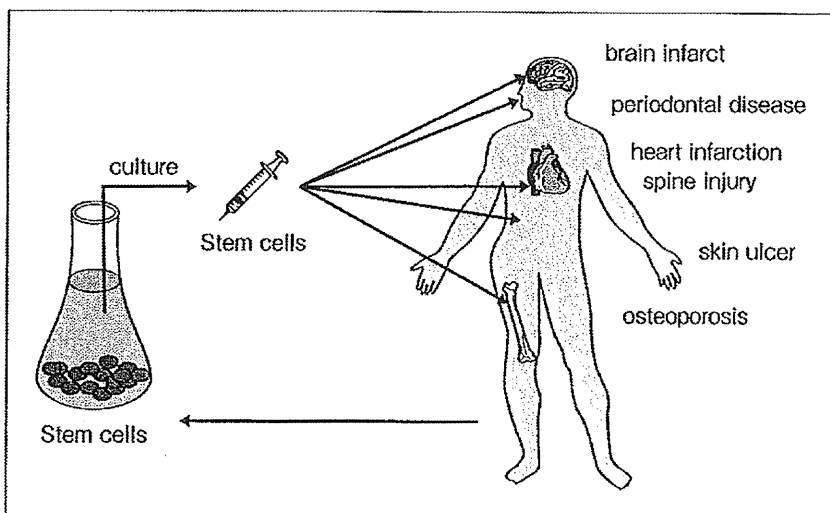


図 3 再生医療のこれまでの考え方

当然，多分化能と増殖能を備えている．この幹細胞をいったん体外に取り出して大量に増殖させふたたび組織欠損に移植すれば，より強力に自然治癒が起こるのではないか．これが再生医療の基本概念であり，理解しやすくきわめて魅力的な治療戦略である(図3)．そこでこの戦略に沿って，より分化能と増殖能が高い細胞が探索された．あらゆる幹細胞群の頂点にたつのが“胚性幹細胞(ES細胞)”と“人工多能性幹細胞(iPS細胞)”である．これらは万能細胞といわれるようにあらゆる細胞に分化でき，増殖能も著しく高い．しかしこうした優れた性能は“腫瘍化”と表裏の関係にあり，臨床で使用するのに慎重にならざるをえない．iPS細胞の登場によって，ここ数年の再生医療の世界では華々しい進展がみられたかのように映る．しかし，実用化(臨床応用)への道は，安全性への懸念からむしろ遠のいたように思えてならない．

再生医療のような先端医療が一般医療に進化するためには，現場をあずかる臨床医の信頼を得る必要がある．しかし臨床医の要求は過酷である．患者に対する全責任を負う以上，それは当然の姿勢といつてよい．“安全性”と“有効性”は当然のことである．さらに費用対効果も考慮しなくてはならない．これまでの方法では治療しえなかった病気が治せるなら，すこしぐらい費用が高くてよい．しかし従来法と大差がないなら新しい医療技術は受け入れられない．脳梗塞，脊髄損傷，心筋梗塞，劇症肝炎，腎不全など，現状では有効な治療法のない疾患を再生医療によって治すことが本来の再生医療のゴールであることを再認識するべきである．

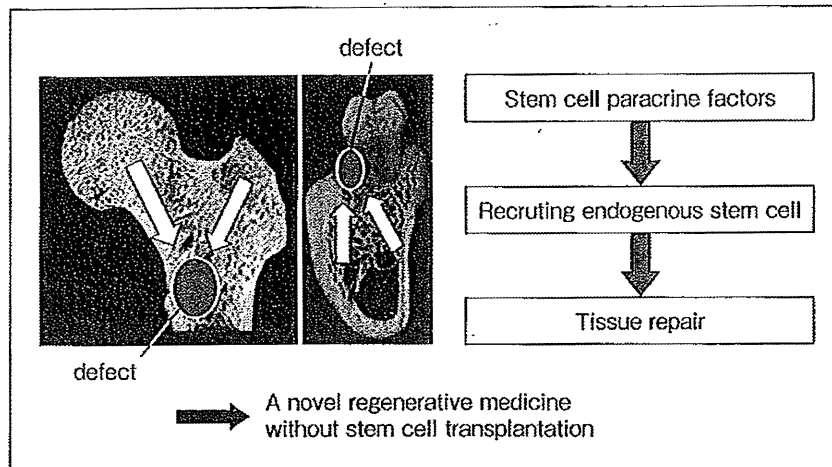


図 4 幹細胞を用いない再生医療の原理

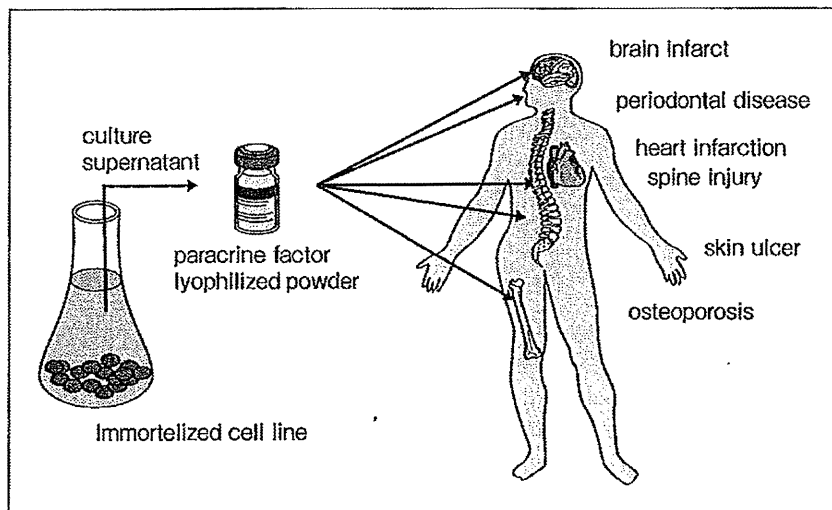


図 5 幹細胞を用いない再生医療

幹細胞はほんとうに必要なか

これまで幹細胞移植には共通する問題点が指摘されてきた。①突発性の疾患(たとえば脳梗塞や脊髄損傷)に大量の自家細胞を準備することができない、②生きている細胞の安全性(たとえば腫瘍化の完全排除)、規格化は難しい、③高額な細胞培養経費がかかるなどである。これらの問題が高いハードルとなり、再生医療の実用化を難しくしてきた³⁾。

著者らは、骨髄由来の間葉系幹細胞を用いて約 100 例の歯槽骨再生医療を行った⁴⁾。これらのデータの分析から、従来のセントラルドグマでは説明のつかない矛盾点が明らかになった。ひとつは、移植した細胞数と再生した骨量がかならずしも比例しないことである⁵⁾。もし幹細胞が骨再生の主役なら、細胞数と骨の再生量が正の相関関係でなければならない。さらに新生骨内には移植細胞がわずしかみられないこと、である。これらのことは移植した細胞が骨再生の主役ではなく、主役は別にいることを示唆している。

こうした現象は骨再生のみならず、血管や心筋、脳の再生でもみられる⁶⁾。ということは、幹細胞が臓器実質を再生させるのではなく、幹細胞の分泌するパラクラインファクターが内在性の幹細胞を欠損部に集積させ組織を再生するのではないか^{7,8)}(図 4)、幹細胞分泌蛋白こそが組織再生の主役ではないかという仮説が信憑性を帯びてくる。つまり、再生医療において幹細胞移植はかならずしも必要ではなく、

幹細胞の分泌する蛋白が重要ということになり、まったく新しい再生医療が誕生する可能性がある(図5)。生きている幹細胞移植を必要とせず、分泌蛋白の投与のみで再生が可能なら、幹細胞移植に伴うほとんどの問題が解消し、一気に実用化につながる。

おわりに

幹細胞由来成長因子は幹細胞移植と同等あるいはそれ以上の組織再生能をもつことを、本特集から理解していただけるだろう。それぞれの研究が示す結果は、幹細胞移植だけにとらわれていたわれわれにとって大きな驚きであった。

幹細胞由来の成長因子は幹細胞の培養上清から抽出され、製剤化することができる。この製剤は室温でも長期間活性を失うことはない。このことは幹細胞を利用したあらたな創薬産業の出現の可能性を意味している。培養上清に含まれる蛋白は、著者らが分析しただけでも100種類以上に及ぶ。このような複合蛋白製剤がどのようなメカニズムで組織再生を起こしているかは現在検索中である。しかし、単一ではなく複合蛋白で、しかも幹細胞由来であることが重要であると著者は考えている。現行の薬事法ではどのカテゴリーにも入らないが、あらたな組織再生用薬剤が実用化されることをわれわれは願っている。

文献

- 1) Langer, R. and Vacanti, J. P.: Tissue engineering. *Science*, **260** : 920-926, 1993.
- 2) Triplett, R. G. et al.: Pivotal, randomized, parallel evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge and autogenous bone graft for maxillary sinus floor augmentation. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **67** : 1947-1960, 2009.
- 3) Yaremchuk, K. et al.: Acute airway obstruction associated with the use of bone-morphogenetic protein in cervical spinal fusion. *Laryngoscope*, **120**(Suppl. 4) : S140, 2010.
- 4) Toma, C. et al.: Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature : *in vivo* observations of cell kinetics. *Circ. Res.*, **104** : 398-402, 2009.
- 5) Chen, L. et al.: Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*, **3** : e1886, 2008.
- 6) Miura, M. et al.: Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cell leads to malignant transformation. *Stem Cells*, **24** : 1095-1103, 2006.
- 7) Chen, L. et al.: Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*, **3** : e1886, 2008.
- 8) Yagi, H. et al.: Mesenchymal stem cells : Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant.*, **19** : 667-679, 2010.

* * *

幹細胞由来成長因子を用いた骨再生医療

——内在性幹細胞に働きかける新しいコンセプトの骨再生医療

Novel regenerative medicine of bone using stem cell driven growth factors



片桐 渉

Wataru KATAGIRI

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

◎近年、骨再生医療の分野においても幹細胞移植が行われるようになり、あらたな治療法として認識されるようになってきた。しかし、幹細胞移植には厳しい法規制や細胞培養にまつわる品質安全管理、設備投資などコスト面の足かせがあり、一般化した治療法となっていない。一方で、移植した幹細胞の生存率が低いという報告や、幹細胞の分泌する成長因子などが組織再生に重要であるという報告もみられる。著者らは幹細胞培養上清に含まれる幹細胞由来成長因子(MSC-CM)に着目し、細胞移植を行わないMSC-CMを利用した骨再生について検討した。その結果、MSC-CMは骨再生にかかわる成長因子を複数含有し、*in vitro*において幹細胞を遊走させ、血管新生を促し、骨芽細胞へ分化誘導する能力をもつことが明らかになった。*In vivo*においても、ラット頭蓋骨に作製した骨欠損モデルでは幹細胞を骨欠損部へ集積させ、細胞移植以上の骨再生能を有することが明らかになった。



骨再生, 幹細胞, 成長因子, 培養上清

骨腫瘍、骨髄炎などの骨疾患や外傷などにより失われた骨を再生するために、従来からさまざまな方法が用いられてきた。自家骨移植やハイドロキシアパタイトや β -TCP(β -三リン酸カルシウム)などに代表される人工骨移植は歴史も古い。また、BMP-2(bone morphogenic protein-2)、FGF-2(fibroblast growth factor-2)などの成長因子も用いられるようになり、一定の効果をあげている。しかし、tissue engineeringの概念によると組織再生には“細胞”“足場”“成長因子”の3要素が必要であり¹⁾、人工骨などの足場材のみや成長因子のみでは効果的な骨再生が得られにくい場合がある。

骨再生の現場で幹細胞移植が行われるようになったのは最近のことである。著者らは、骨髄由来間葉系幹細胞を患者より採取し培養、骨芽細胞様細胞に分化誘導し、成長因子を多数含みかつ足

場としてのフィブリンネットワークをもつゲル化多血小板血漿(platelet rich plasma: PRP)とを組み合わせて移植する“培養骨”を開発し、歯槽骨欠損や顎裂、骨延長などに臨床応用してきた(図1)²⁾。

この細胞移植治療である“培養骨”は良好な臨床成績を示す一方、幹細胞を用いるため厚生労働省の示す“ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針”を厳守し、品質安全管理を徹底する必要がある。さらに、細胞培養施設への設備投資、運用管理や細胞培養にかかるコストや人件費などが足かせとなり、現時点では施設限定的な治療法となっている。

一方、最近では移植した幹細胞の生存率が低いという報告が多数みられるようになっており³⁾、組織再生において移植した細胞の効果はもとより、その細胞が分泌する蛋白質が重要な役割を果

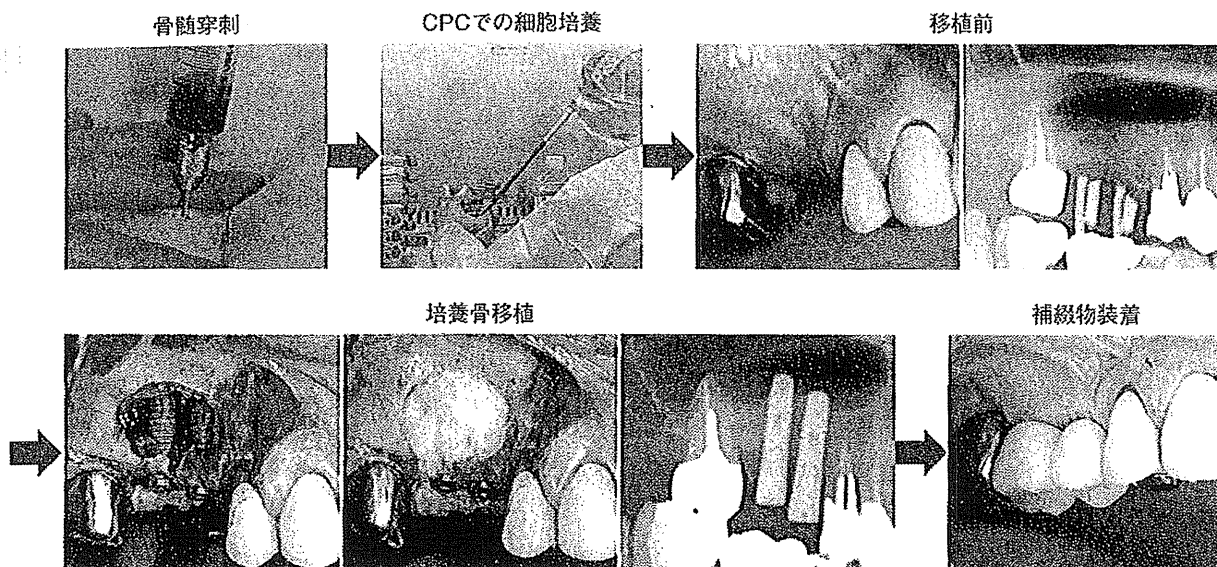


図 1 培養骨の臨床手順

患者腸骨より骨髓穿刺を行い、骨髓液約 20 mL 程度を採取する。骨髓液に含まれる未分化間葉系幹細胞(MSC)を分離、CPC(cell processing center)とよばれる細胞培養施設で約 1 カ月細胞培養を行い、骨芽細胞様細胞に分化誘導させたものを PRP(多血小板血漿)などと混和して移植する。右側上顎大臼歯部の骨吸収部に歯科インプラント埋入と同時に上顎洞底挙術を行い、歯科インプラントを支持する骨を再生させた症例。培養骨移植後約 6 カ月で骨化が得られたことを確認し、最終補綴物を装着する。

表 1 MSC-CMに含まれる成長因子

Factors	concentration (pg/mL)
IGF-1	1,386±465
VEGF	465.8±109
TGF-β1	339.8±14.4
HGF	20.3±7.8
FGF-2	ND
PDGF-BB	ND
BMP-2	ND
SDF-1	ND

ND: 検出されず。

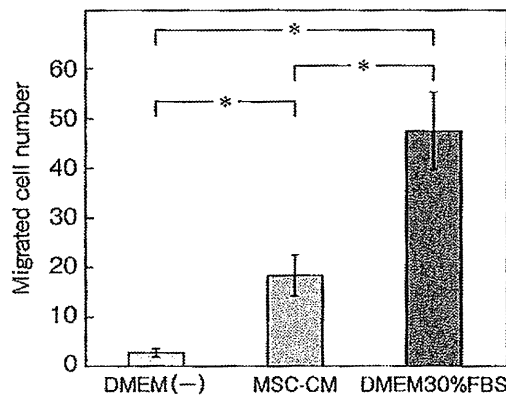


図 2 MSC-CMによるラットMSCの細胞遊走能の亢進

DMEM(-)でMSCを培養してできたMSC-CMは、ラットMSCsの遊走能を有意に上昇させた(*: $p < 0.01$)。すなわち、MSC由来のパラクライン因子がラットMSCの遊走能を亢進させたことになる。DMEM30%FBSはポジティブコントロールとして用いた。

たしているのではという認識がなされるようになってきた⁴⁾。つまり幹細胞移植はけっして効果的な治療法ではない場合が(適用分野によっては)ある可能性があるということである。

細胞は、自ら分泌する成長因子やサイトカインの自己分泌的(オートクライン)あるいは傍分泌的(パラクライン)刺激により、シグナル伝達経路や転写因子を活性化し、蛋白質を分泌する。このように細胞が機能することで組織再生が起こる。著者らはこの点に着目、幹細胞培養中はこれらの成長因子が培養上清中に分泌されることを利用し、幹細胞培養上清に含まれる成長因子がパラクライン効果により内在する幹細胞に作用し、骨再生が

なされるのではないかと考えた。

骨髄由来間葉系幹細胞培養上清由来成長因子(MSC-CM)とは?

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)を通常の培地にて 70%コンフル

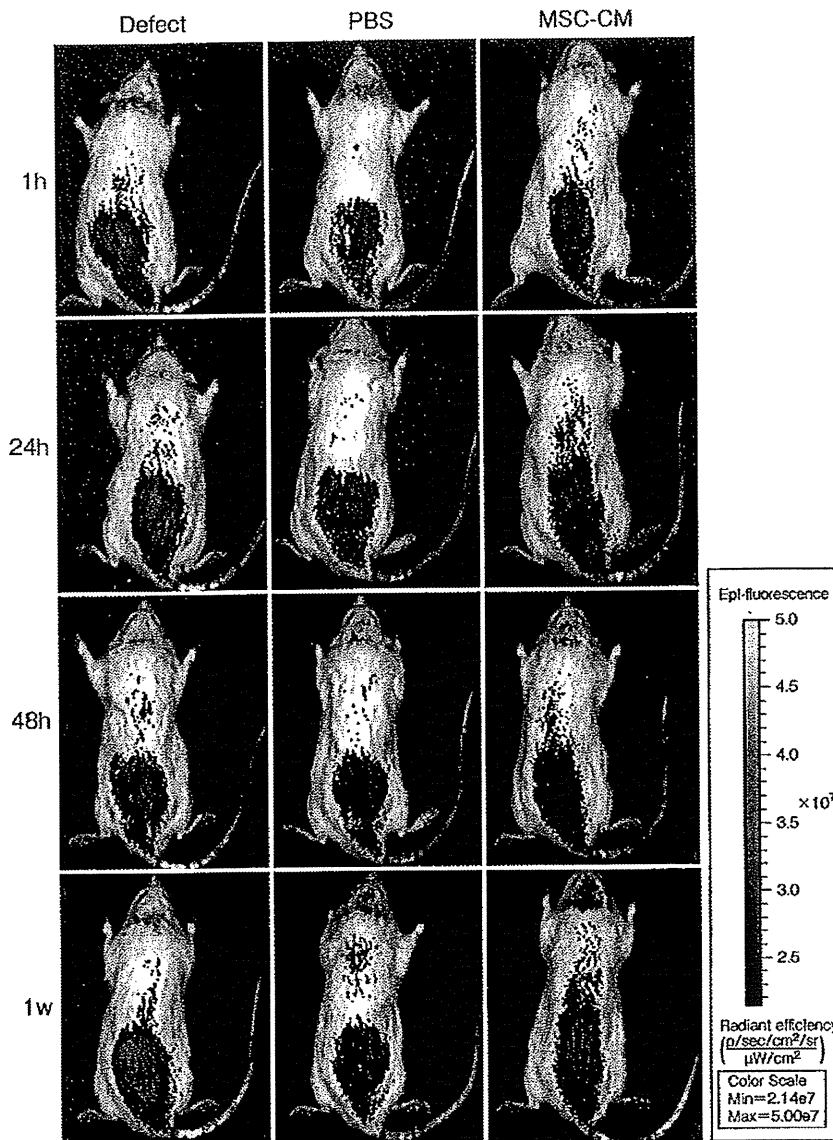


図3 蛍光*in vivo* imagingによるラットMSCの頭蓋骨骨欠損部への遊走および集積
 ラット頭蓋骨に直径5 mmの骨欠損を作成し、欠損のみの(Defect)群、
 PBS/アガロースゲル移植(PBS)群、MSC-CM/アガロースゲル移植(MSC-
 CM)群を作成、尾静脈より 3×10^6 個の蛍光標識したラットMSCを注入した。
 MSC-CM群では早期より頭蓋骨の移植部位への蛍光の集積を認め、移植後48
 時間、1週では他群に比べ顕著な差を認めた。

エントとなるまで培養し、血清を含まないDMEM(Dulbecco's modified eagle medium)(DMEM(-))に培地交換し48時間細胞培養をして得られた培養上清を凍結乾燥し粉末化したものを、骨髄由来間葉系幹細胞培養上清由来成長因子(MSC-CM)とした。

著者らはまず、MSC-CMに含有される成長因子のうち、骨再生に関連するとされるものについてその含有濃度をELISA法により測定した(表1)。その結果、IGF(insulin like growth factor)-1,

VEGF(vascular endothelial cell growth factor), TGF(transforming growth factor) $-\beta 1$, HGF(hepatocyte growth factor)が含有されていた。これらの成長因子群がどのようにMSC-CMによる骨再生に関与しているかはさらなる検討が必要であるが、いずれも骨再生には重要な因子であることには間違いない。IGF-1は骨芽細胞における骨形成促進やMSCsの遊走能を高める⁵⁶⁾。VEGFは血管新生をはじめ、造血系幹細胞の動員、血管内皮細胞の増殖・分化にかかわるほか、骨形成に

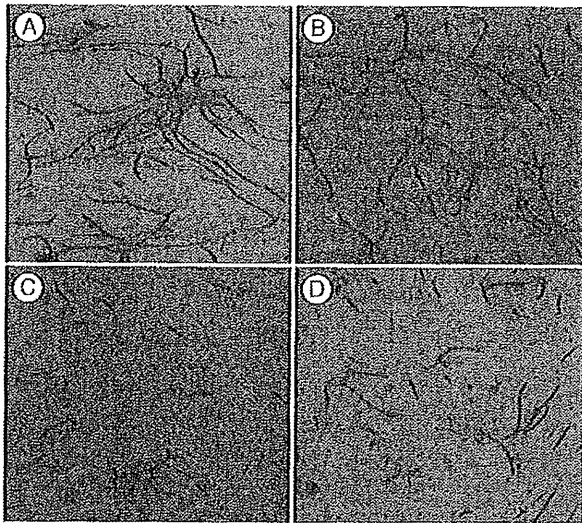


図4 MSC-CMによる血管新生効果

正常ヒト皮膚線維芽細胞をフィーダーとし、臍帯静脈血管内皮細胞を各培養条件下で培養した。培養開始11日に抗CD31抗体を用いて免疫染色を行い、管腔形成の状態を観察した。MSC-CM(A)はVEGF(B)とはほぼ同等の管腔形成能を示した。一方、ネガティブコントロールであるDMEM(-)群(C)、VEGF/Suramin群(D)においては染色性がわずかであった。

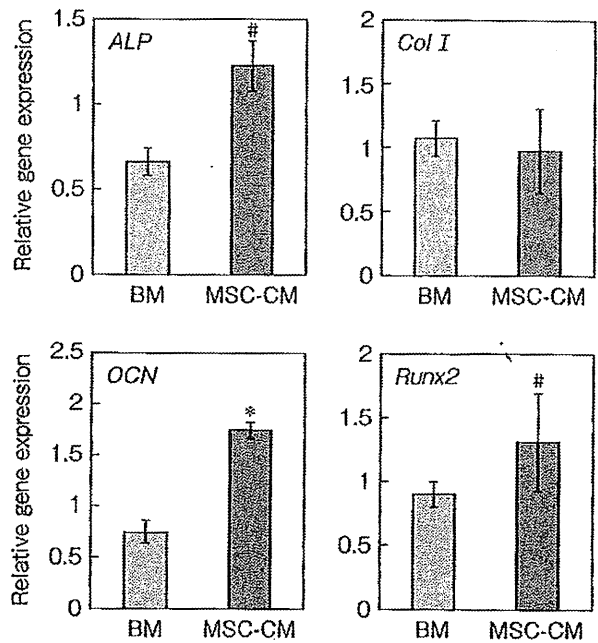


図5 MSC-CMによるラットMSCの骨形成関連遺伝子の発現亢進

MSC-CMは、ラットMSCsの骨形成関連遺伝子であるALP、OCN、Runx2の遺伝子発現を有意に亢進した。*: $p < 0.01$, #: $p < 0.05$ 。

も関与する⁷⁾。TGF- β 1は骨芽細胞前駆細胞の遊走を亢進し、細胞増殖および分化、細胞外基質の

生成を調節する⁸⁾。HGFは血管新生作用をもつ⁹⁾。つまりMSC-CMは、細胞遊走、血管新生、骨芽細胞への分化誘導という骨再生に必要なステップに関与するサイトカインを複数含有するという特徴を有する。

サイド
メモ

歯科における骨再生医療の歴史と組織工学の概念

組織再生は、“細胞”“足場”“成長因子”が3要素とされている。歯科における骨・歯周組織再生をこの観点から振り返る。まず自家骨移植には歴史があり、予知性もあり、いまなおゴールドスタンダードといわれているが、移植骨採取の手術のため患者負担は大きい。また、ハイドロキシアパタイトなど人工骨や牛骨を脱灰処理した骨補填材なども用いられているが、骨化に相応の時間を要することや感染の問題などがある。これらの方法はいずれも“足場”のみの提供であった。第2の方法として、BMP-2やFGF、血小板由来増殖因子(PDGF)など“成長因子”がある。これらは“足場”とともに用いられ一定の効果が報告されているが、第3の方法“細胞”が用いられるのは近年になってからである。骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)を用いた培養骨は、“成長因子”および“足場”の供給源としてゲル状の多血小板血漿(PRP)を用いており、組織再生の3要素を兼ね備えた治療法となった。

MSC-CMの基礎

—MSC-CMの細胞への作用は？

1. MSC-CMによる幹細胞遊走能亢進

MSC-CMによる幹細胞の遊走能亢進作用を確かめるためにラットMSCを用いて2層チャンバーによるマイグレーションアッセイを行った。その結果、MSC-CMがDMEM(-)に比べ有意にラットMSCの遊走能を上昇させた(図2)。さらに、著者らは*in vivo*における細胞遊走能を確認するためにラット頭蓋骨に直径5mmの骨欠損を作成し、同部にアガロースゲルに混和した原液相当濃度のMSC-CMを移植した。対照群にPBSをアガロースゲルに混和した群、あるいは移植を行わず欠損のみの群を設定した。尾静脈より蛍光色素標識を行ったラットMSCを注入し、経時的に注入したラットMSCの動態を追跡した。すると

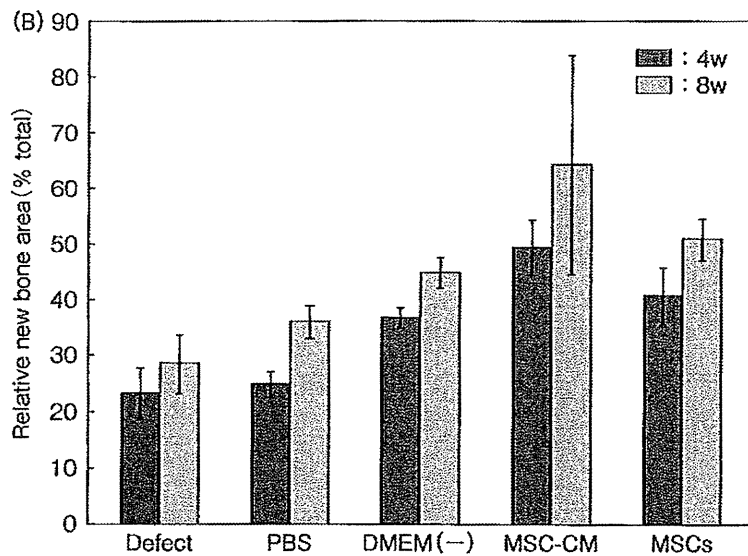
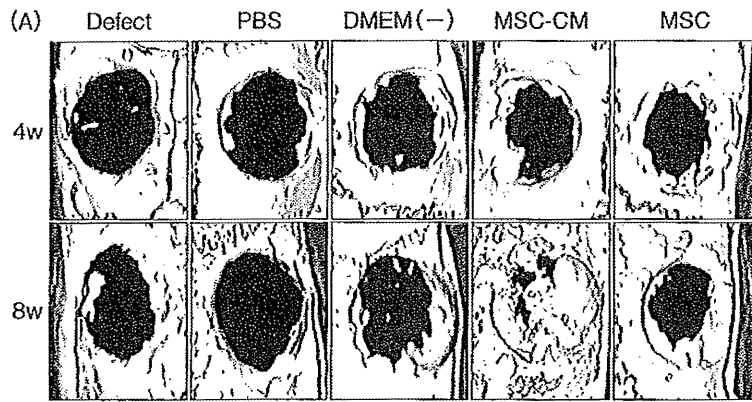


図6 ラット頭蓋骨骨欠損部への移植後4, 8週における骨再生実験群として5群を設定した。①欠損のみで移植を行わない Defect 群, ②アガロースゲルと PBS(リン酸緩衝生理食塩液)を移植した PBS 群, ③アガロースゲルと血清を含まない DMEM を移植した DMEM 群, ④アガロースゲルと MSC-CM を移植した MSC-CM 群, ⑤アガロースゲルとヒト MSC を移植した MSC 群, に分けて骨再生を評価した。

A: マイクロ CT 像。MSC-CM 群ではコントロールである Defect, PBS, DMEM 各群に比べ早期からの骨再生が認められた。さらに, 興味深いことに細胞移植を行った MSC 群に比べても良好な骨再生を得た。

B: 欠損に対する新生骨の占める割合をグラフに示した。MSC-CM 群は4週, 8週いずれにおいても, 他の群に比べ有意に新生骨の占める割合が多かった。 $p < 0.05$ 。

MSC-CM 移植群においては移植直後より頭蓋骨骨欠損部における蛍光の集積が認められ, 1 週後では他群との集積の差が顕著になった(図3)。すなわち, 頭蓋骨骨欠損部に移植した MSC-CM の効果により, 尾静脈より注入したラット MSC が欠損部に遊走したことを *in vivo* においても確認できた。

2. MSC-CMによる血管新生効果

MSC-CM による血管新生効果について, 正常ヒト皮膚線維芽細胞をフィーダーとし, 臍帯静脈血管内皮細胞を培養する血管新生アッセイにて検討した。実験群は, 血管新生専用培地に MSC-CM が原液相当濃度となるように溶解した MSC-CM 添加群, ポジティブコントロールとして VEGF 添加群, ネガティブコントロールとして DMEM

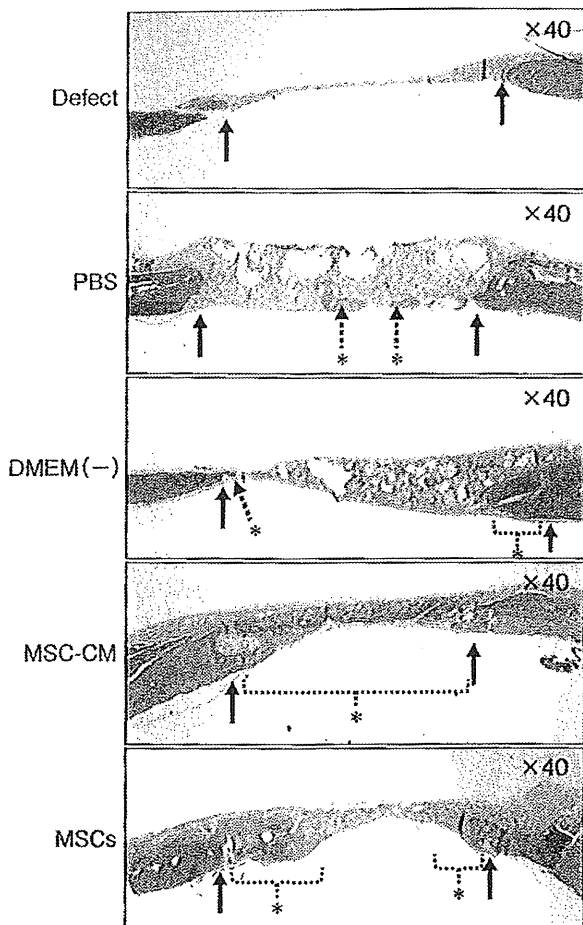


図7 移植後8週における移植部の組織学的評価
移植後8週での組織学的評価をヘマトキシリン・エオジン染色で行った。実線の矢印は母骨との境界を示す。点線および*印にて示した部分が新生骨である。MSC-CM群ではほぼ欠損部が新生骨で充満していた。

(-)添加群および VEGF と VEGF 拮抗薬である Suramin を加えた VEGF/Suramin 群を設定した。培養11日後、MSC-CM、VEGF 両群では分枝を含む管腔形成が数多く認められるのに対し、非添加群および VEGF/Suramin 群ではわずかに認めるのみであった(図4)。

3. MSC-CMによるラットMSCの骨形成関連遺伝子の発現亢進

ラット MSC 培養液(BM)に MSC-CM を原液相当濃度になるよう加え48時間培養後、ラット MSC より RNA を抽出し骨形成関連遺伝子であるアルカリホスファターゼ(ALP)、I型コラーゲン(Col I)、オステオカルシン(OC)、Runx2の各遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法により検討した。対照には MSC-CM を加えない BM 群を設

定した。その結果、グラフに示すように MSC-CM 群は、BM 群に比べラット MSC における ALP、OCN、Runx2 の発現を亢進させた(図5)。

MSC-CMの骨形成能

これまでの *in vitro* の実験において、MSC-CM が細胞遊走、血管新生、骨芽細胞への分化誘導という骨再生に必要なステップにかかわるサイトカインを含有し、それぞれのステップにおいて MSC-CM が有効に作用していることを示した。では実際、*in vivo* において MSC-CM は骨再生を促すのかどうかをさきほどと同じラット頭蓋骨骨欠損モデルを用いて検討した。移植後4週、8週にてマイクロCTによる評価および組織学的評価を行ったところ4週、8週ともに MSC-CM 群での良好な骨形成を認めた。CT 画像上での欠損全体に対する新生骨の占有面積を計測しても、他群に比べ MSC-CM 群では有意に新生骨の占める面積が増加した。さらに興味深いのは、MSC 自体をアガロースゲルに混和して移植したものより MSC-CM 群における新生骨量が有意に多く、注目すべき点である(図6)。さらに、組織学的にも MSC-CM による良好な骨再生が確認された(図7)。

幹細胞由来成長因子を用いた

新しいコンセプトの骨再生医療の可能性

これまでのことより、幹細胞が分泌する成長因子 MSC-CM を用いることで骨再生が可能であることが示された。幹細胞移植を行わないのでこれまで再生医療にとって大きなハードルであったさまざまな規制をクリアできる可能性がある。さらに、移植した細胞の癌化のリスクもない。しかも、MSC-CM は単一の成長因子ではなく、上述のように複数の成長因子を含むため、相乗の効果による組織再生が得られる可能性がある¹⁰⁾。単一の成長因子投与は効果発現のため非生理的に高濃度な量を必要とするため、術後の炎症反応の強いことが問題になっており¹¹⁾、複数の因子を含む MSC-CM はこういった面でも有効に作用するものと期待される(図8)。

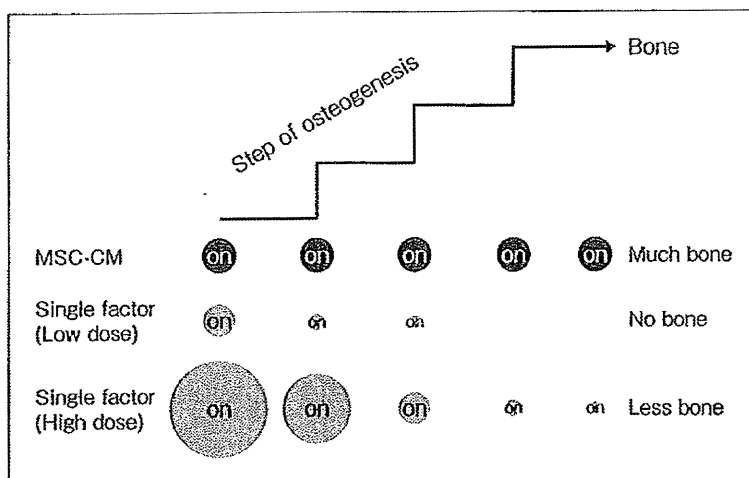


図 8 MSC-CMによる骨再生(仮説)

MSC-CM は骨再生のための成長因子を生理的濃度で複数含有し、各ステップにおいてスイッチを on にしている。一方、単一の成長因子は生理的な濃度では少数のステップにしか効果がなく、そのため骨再生における一連のスイッチを on にするためには高濃度にする必要があるのかもしれない。

おわりに

MSC-CM は細胞移植を必要としない、内在する幹細胞を利用するという新しいコンセプトの再生医療を実現する画期的なツールである。著者らの施設においてはこの号が発行されるころには臨床研究を開始する予定である。今後、細胞源の選択や適用法などバージョンアップを行っていく必要があるが、いずれは製剤化、大量生産という、これまで細胞を用いた再生医療ではなしえなかった、本当に患者にとって有益な新しい再生医療となることを願う。

文献

- 1) Langer, R. and Vacanti, J.P.: Tissue engineering. *Science*, **260** : 920-926, 1993.
- 2) Yamada, Y. et al.: Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells(MSCs) and platelet-rich plasma(PRP) —Tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng.*, **10** : 955-964, 2004.
- 3) Toma, C. et al.: Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature : *in vivo* observations of cell kinetics. *Circ. Res.*, **104** : 398-402, 2009.
- 4) Chen, L. et al.: Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS ONE*, **3** : e1886, 2008.
- 5) Spencer, E. M. et al.: *In vivo* actions of insulin-like growth factor- I (IGF- I) on bone formation and resorption in rats. *Bone*, **12** : 21-26, 1991.
- 6) Li, Y. et al.: Insulin-like growth factor 1 enhances the migratory capacity of mesenchyme stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **356** : 780-784, 2007.
- 7) Kaiglar, D. et al.: Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. *FASEB J.*, **19** : 665-667, 2005.
- 8) Bostrom, M. P. and Asnis, P.: Transforming growth factor beta in fracture repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **355** : S124-S131, 1998.
- 9) Morishita, R. et al.: Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension*, **33** : 1379-1384, 1996.
- 10) Ozaki, Y. et al.: Comprehensive analysis of chemotactic factors for bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.*, **16** : 119-129, 2007.
- 11) Perri, B. et al.: Adverse swelling associated with use of rh-BMP-2 in anterior cervical discectomy and fusion : a case study. *Spine J.*, **7** : 235-239, 2007.

* * *

歯髄幹細胞由来成長因子を用いた脳梗塞の再生医療

SHED-driven conditioned medium enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats



服部 宇

Hisashi HATTORI

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

◎脳梗塞による機能障害回復の新規医療のひとつに脳梗塞への細胞移植療法があり、骨髄幹細胞移植が臨床治験として実施され、一定の効果をあげている。しかし、脳梗塞の細胞移植医療においては、現段階で法規制の問題、設備投資、費用、長期間の培養時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。著者らは、骨髄幹細胞より増殖能・分化能が高く、免疫原性も低い乳歯歯髄幹細胞由来成長因子を鼻腔内投与することで、脳梗塞機能障害回復効果を認め、その可能性について検討した。

Key word : 脳梗塞, 歯髄幹細胞, 培養上清, 成長因子, 嗅球

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

現在注目されている新規医療のひとつに脳梗塞への細胞移植療法があり、ES細胞、iPS細胞など万能細胞が候補として考えられるが、現段階では倫理的問題や癌化の問題などがあり、現実的ではない。他の候補としては骨髄幹細胞があり、臨床治験として実施され一定の効果をあげているが¹⁾、骨髄幹細胞は採取の際に骨髄穿刺を要するため患者負担は大きく、また神経再生能も患者ごとのばらつきが大きいという問題点もある。Ioharaらは、歯髄幹細胞は骨髄幹細胞より高い多分化能をもち、*in vitro*にて血管誘導能および神経誘導能を示し、またブタ歯髄由来CD31⁻SP細胞を下肢虚血マウスに移植すると血管新生を促進することを示した²⁾。そして著者らは、脳梗塞モ

デルラットに同細胞を移植すると運動機能が改善し、梗塞体積が縮小することを示してきた³⁾。

脳梗塞の細胞移植医療において現段階で細胞培養に関しては、以下のさまざまな問題が障壁となっている。

- ① 法規制の問題：厚生労働省が定めた“ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針”を遵守する必要があり、医療機関にとって非常にハードルが高く、実施にあたっては困難を伴う。
- ② 設備の問題：細胞培養施設で、ヒト幹細胞を扱うため厳格な環境構築、人員の配置が必要である。
- ③ 費用・時間の問題：細胞培養施設の設備投資、維持管理、人材育成、人件費にかかる費用は莫大であり、細胞培養、精製には長い時間を要する。

上記問題に加え、脳梗塞で移植された細胞は生存率が低く、間葉系幹細胞は悪性形質を獲得する可能性があること⁴⁾、しかも機能障害の回復効果は移植細胞によって分泌された成長因子による

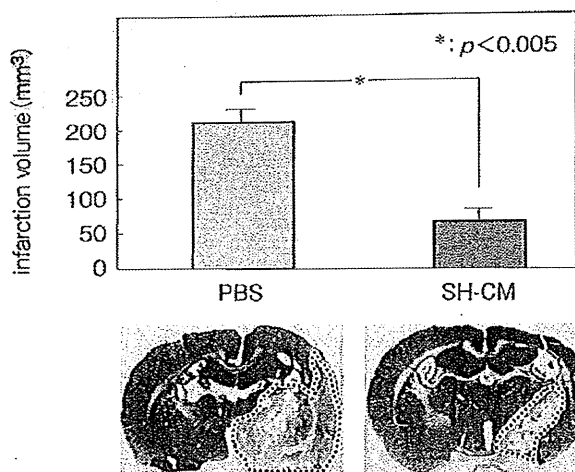


図1 脳梗塞領域の計測

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

paracrine効果が大きいことが示されつつある⁵⁾。そこで著者らは、幹細胞のなかでとくに増殖能が早く、免疫原性も低い乳歯歯髄幹細胞の分泌する成長因子に着目し、脳梗塞モデルを用いた治療研究について検討した。

脳梗塞モデルラットにおける 乳歯歯髄幹細胞由来成長因子投与

雄性SDラット(350~400g)を用いて中大脳動脈閉塞術を施行、永久閉塞モデル(pMCAo)を作製した。成長因子を分泌する細胞の候補として歯髄幹細胞のなかでも乳歯歯髄幹細胞は増殖能と分化能に優れ、免疫原性も低い乳歯歯髄幹細胞を採用した。乳歯は無菌的に歯髄を摘出、血清を含まないDMEM培地で72時間培養した細胞の培養上清を精製した。得られた上清は乳歯歯髄幹細胞由来成長因子成分(SHED-derived conditioned medium: SH-CM)として永久脳梗塞72時間後(3日後)にSH-CM 10 μ Lを2分ごとに10回、ハミルトンシリンジを用いて経鼻腔内投与した。コントロールとして生理食塩水(PBS)を同様に投与した。鼻腔内投与は梗塞3日後から15日後まで連日投与した。図1は脳梗塞領域の計測結果を示す。梗塞16日後に屠殺した試料において、左はコントロールのPBS、右はSH-CM投与で、有意に梗塞領域の縮小が認められる。

図2は運動麻痺スコアの変化を示し、Lekerら

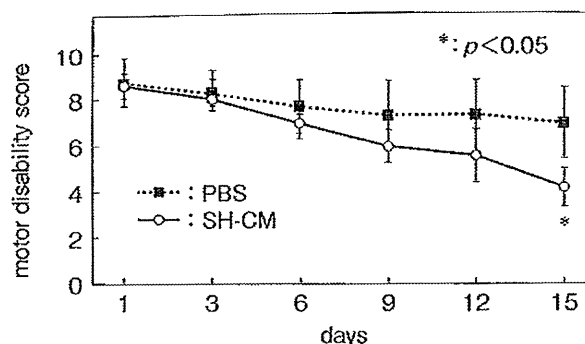


図2 運動麻痺スコアの比較
PBS投与群と比較してSH-CM投与群で、有意に運動麻痺の回復が認められた。スコアは表1参照。

表1 運動麻痺スコアの評価基準

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

の運動麻痺スコア⁶⁾を若干改変し、評価した(表1)。スコアは、最少を0点、最大を10点とした。計測時期は梗塞後1, 3, 6, 9, 12, 15日とし、PBS投与群と比較してSH-CM投与群で有意に運動麻痺の回復が認められた。

図3は神経幹細胞、神経前駆細胞マーカーである doublecortin(DCX)、神経細胞マーカーである neurofilament(NF)、NeuN、血管内皮細胞マーカーである RECA-1 の抗体を用いて脳梗塞部位における免疫組織化学染色結果を示す。PBS投与群と比較してSH-CM投与群で、陽性細胞の増加を認めた。

図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、1,2

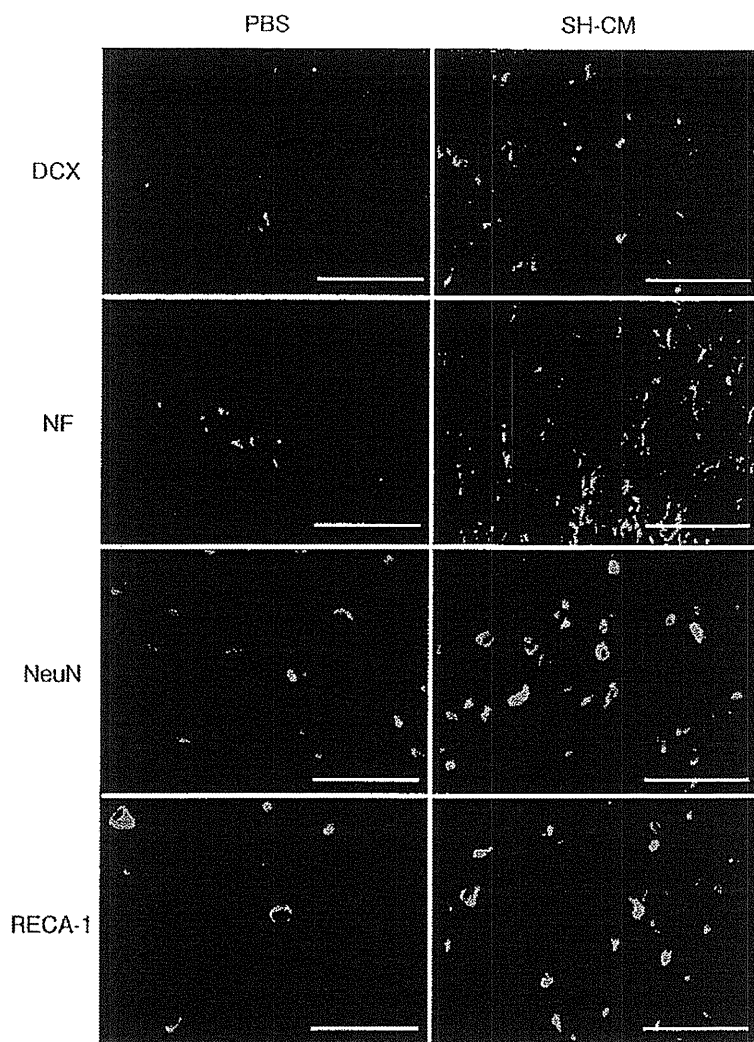


図3 免疫組織化学染色

神経幹細胞、神経前駆細胞マーカーである doublecortin(DCX)、神経細胞マーカーである neurofilament(NF)、NeuN、血管内皮細胞マーカーである RECA-1 の抗体を用いて、脳梗塞部位における免疫組織化学染色を行った。PBS 投与群と比較して SH-CM 投与群で陽性細胞の増加を認めた。スケールバー=100 μ m。

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

図5は神経幹細胞が存在する側脳室下帯周囲における梗塞後6日、16日のDCXによる免疫組織化学染色結果を示す。PBS 投与群と比較して SH-CM 投与群で、側脳室下帯から多くの神経前駆細胞の遊走が認められる。

しかも梗塞16日後よりも6日後のほうがより多くの神経前駆細胞の陽性細胞が認められ、早期の脳梗塞機能障害部位の修復への関与が示唆される。

梗塞領域の減少、運動麻痺の改善において、SH-CM 投与によって有意に改善が認められた。SH-CM 投与は梗塞領域における神経および血管の再生を促進することを示唆した。

歯髄幹細胞由来成長因子投与の脳内到達経路および作用機序

成体脳では長年静的なものと考えられてきた脳

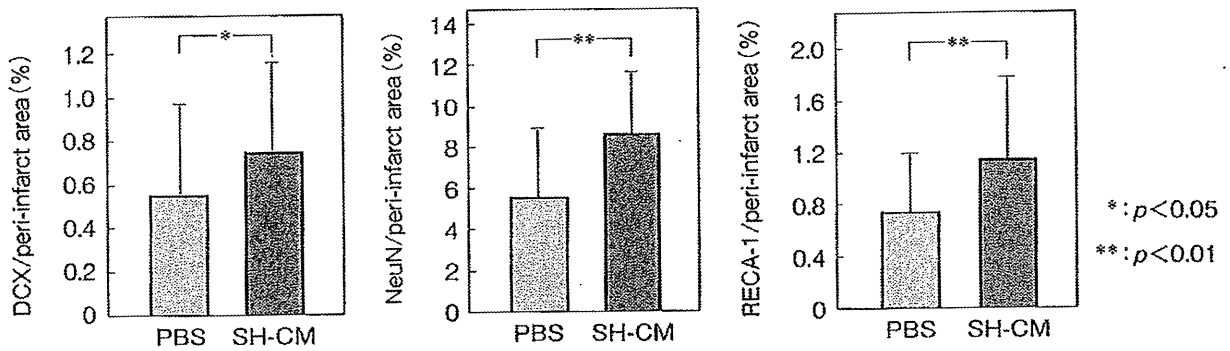


図4 陽性細胞数

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

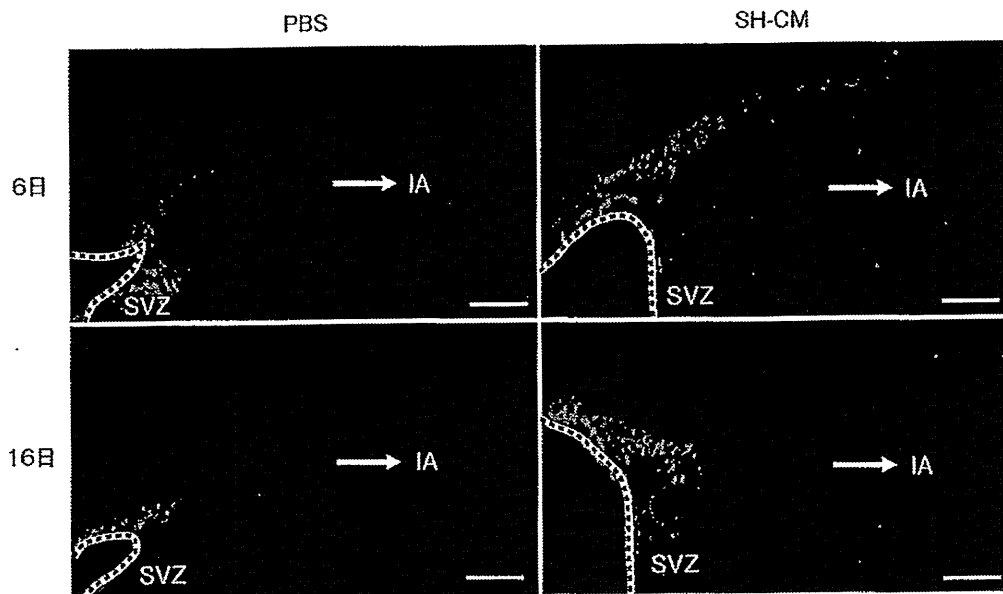


図5 側脳室下帯からの神経前駆細胞の遊走

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

IA: infarct area, SVZ: 側脳室下帯, スケールバー=100 μm.

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であることがわかってきた。海馬歯状回および側脳室下帯では内在性の神経前駆細胞が生じることがわかっており, 通常の場合, 海馬歯状回では顆粒細胞層に, 側脳室下帯では神経幹細胞から一過性増殖細胞に分化, 多数の幼若ニューロンを産生し, アストロサイトに囲まれた rostral migratory stream (RMS) とよばれる移動経路を通過して嗅球まで移動, 2 種類の介在性ニューロン (嗅脳顆粒細胞, 傍糸球体細胞) に分化し, 嗅球の神経回路に統合される。

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, 嗅球を介した脳内到達経路を明らかにした⁷⁾。ひとつは嗅球から細胞間質を経て脳介在部に至る経路, もうひとつは三叉神経から脳幹, 脊髄に至る経路である。著者らは, これらの方法に準じて鼻腔内から嗅球, 脳内に至る経路で, SH-CM 投与を行った。SH-CM 投与の脳梗塞機能障害の作用機序については基本的に細胞移植医療と同様の作用機序が考えられる。それは, ①成長因子(サイトカイン)による神経栄養・保護作用^{23,8)}, ②血管新生作用^{23,9)}, ③神

経再生^{2,3,10)}である。しかし、細胞移植医療と SH-CM 投与の違いは後者が内在するメカニズムを活用した神経回路の再生、つまり脳内に存在する幹細胞を成長因子投与によって活性化して自己修復を促す医療であるということである。したがって、SH-CM 投与の脳梗塞機能障害への臨床応用には、今後も新生ニューロンの産生、移動、生存、分化の過程を解明することが必要不可欠である。

おわりに

SH-CM 投与は細胞移植医療に代わり、「歯髄幹細胞由来の培養上清から精製した成長因子成分を脳梗塞治療に応用する」という新しい概念を提言する再生医療である。幹細胞由来の成長因子成分を用いることで、倫理面、臨床応用の利便性、急性期の対応、準備保存、細胞の癌化、免疫拒絶の問題はクリアーでき、非常に安全で、血栓溶解療法などの従来の治療法とも併用して行える可能性をもつ。また、投与方法も鼻腔内投与で、身体的侵襲も少なく、血液脳関門も通過し、虚血部位に直接効果を発揮する可能性もあげられる。乳歯歯髄幹細胞由来成長因子鼻腔内投与は有力な脳梗塞治療法となる可能性が存在している。

謝辞：本稿は日本学術振興会科学研究費補助金の援助を受け、井上崇徳大学院生、杉山昌彦博士の研究成

果をもとに作製した。

文献

- 1) Honmou, O. et al.: Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain*, **134** : 1790-1807, 2011.
- 2) Iohara, K. et al.: A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia : subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem Cells*, **26** : 2408-2418, 2008.
- 3) Sugiyama, M. et al.: Dental pulp-derived CD31-/CD146-side population stem/progenitor cells enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats. *Tissue Eng. Part A*, **17** : 1303-1310, 2011.
- 4) Miura, M. et al.: Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cell leads to malignant transformation. *Stem Cells*, **24** : 1095-1103, 2006.
- 5) Uccelli, A. et al.: Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.*, **24** : 59-64, 2011.
- 6) Gil Lavie, G. et al.: Long term cerebroprotective effects of dexanabinol in a model of focal cerebral ischemia. *Brain Res.*, **901** : 195-201, 2001.
- 7) Yang, J. P. et al.: Direct transport of VEGF from the nasal cavity to brain. *Neurosci. Lett.*, **449** : 108-111, 2009.
- 8) Liu, H. et al.: Neuroprotection by PIGF gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia. *Brain*, **129** : 2734-2745, 2006.
- 9) Toyama, K. et al.: Therapeutic benefits of angiogenic gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia. *Exp. Neurol.*, **216** : 47-55, 2009.
- 10) Kim, S. et al.: Neural differentiation potential of peripheral blood- and bone marrow-derived precursor cells. *Brain Res.*, **1123** : 27-33, 2006.

* * *

歯髄幹細胞を用いた脊髄損傷の再生医療

Regeneration of the completely transected spinal cord by human dental pulp stem cells



山本朗仁(写真) 酒井 陽

Akihito YAMAMOTO and Kiyoshi SAKAI

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

◎損傷した脊髄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。本稿では、歯髄幹細胞の多面的神経再生効果が脊髄損傷治療に有用であることを紹介する。完全切断したラット脊髄に歯髄幹細胞を移植すると、下肢運動機能が回復する。歯髄幹細胞は脊髄損傷環境下でオリゴデンドロサイトに特異的に分化し、失われた細胞を補給する。さらに、歯髄幹細胞由来のパラクライン因子は、①損傷による神経細胞やグリア細胞のアポトーシスを強力に抑制し、②損傷部周囲のグリア瘢痕に由来するさまざまな神経軸索伸長抑制因子を抑制し、切断された脊髄神経軸索を再生する。歯髄幹細胞の細胞自律的および非自律的神経再生効果が、完全に切断した脊髄の再生に与えるインパクトについて概説する。



Key
Word

脊髄損傷, 歯髄幹細胞, アポトーシス, 神経軸索伸長抑制因子, 神経再生

急性期の病態と多面的治療戦略の必要性

脊髄損傷では受傷後の時間経過とともに病態が複雑に変化する¹⁻³⁾。物理的ストレスによる脊髄の局所破壊(一次損傷)は生体の過剰な炎症反応や神経伝達物質の異常放出を促し、一次損傷領域を超える広範な細胞死を引き起こす(二次損傷)。一方、損傷部の周囲で活性化したアストロサイトに細胞外基質・プロテオグリカンを産生し、グリア瘢痕を形成する。このグリア瘢痕は炎症物質の拡散を抑制し、二次損傷の拡大を阻止する生体防御機構として機能する反面、損傷部位への再生神経軸索の侵入を阻害することで脊髄機能の回復を妨げる。損傷部周囲のオリゴデンドロサイトに由来するミエリン蛋白(MAG, Nogo, OMG, Nertin, Semaphorin, Ephrin)も同様な“神経軸索伸長抑制因子”として機能することが知られている。これらさまざまな軸索伸長抑制因子は、脊髄神経細胞の RhoGTPase シグナル経路を活性化すること

で軸索伸長を制御すると考えられている。このように脊髄損傷では多様な因子が複雑に絡み合い不可逆的な機能不全を引き起こす。

残念なことに、従来型の薬剤にはこの複雑な病態の改善に十分な有効性を示すものがなかった。近年、脊髄損傷の病態メカニズムの理解が深まるなか、Schwab ら²⁾は脊髄損傷の治療には5つの多面的な治療効果が必要であると提唱している(図1)。

幹細胞移植による脊髄損傷治療

幹細胞移植による脊髄損傷治療は、この多面的な治療効果を提供する新しい医療技術として注目されている。これまでヒト胎児由来神経幹細胞⁴⁾、胚性幹細胞由来のオリゴデンドロサイトや運動神経細胞⁵⁻⁷⁾、骨髄由来の間葉系幹細胞^{8,9)}などを齧歯類の脊髄損傷モデルに移植すると有意な機能改善が得られることが報告されている。これらの研究では、移植細胞が生着し、失われた細胞の機能

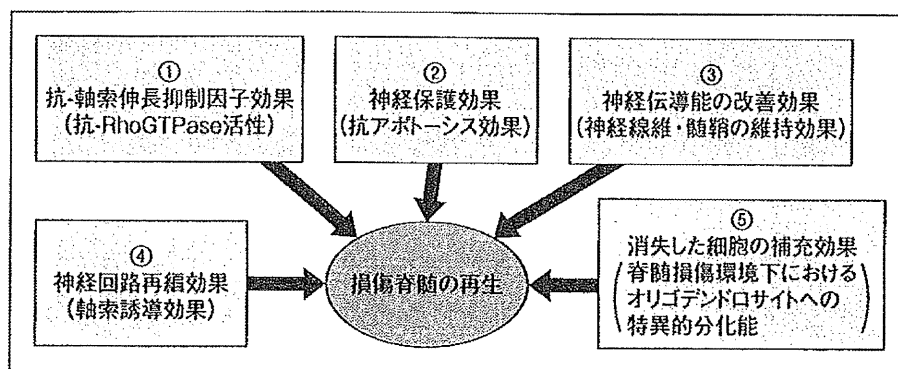


図1 脊髄損傷の治療に必要な5つの多面的な治療戦略
脊髄損傷治療に必要な5つの治療効果のなかで、歯髄幹細胞は4つの治療効果(①, ②, ③, ⑤)を提供することで、完全に切断した脊髄の機能回復を促す。

を代償することで機能改善が得られている可能性が示唆されてきた。しかし、激しい脊髄損傷の環境下で生着できる移植細胞の数がきわめて少ないことが明らかになるにつれて、移植細胞から分泌されるパラクライン因子群による非細胞自律的メカニズムによる脊髄再生効果が注目されるようになった¹⁰⁾。移植した幹細胞などのパラクライン効果を担う分子実態はいまだ不明のままであり、その同定が世界的な競争のなかにあることは疑いようもない。また、脊髄損傷に対する治療の有用性が明らかとなったさまざまな細胞が同じ治療有効因子群を分泌するのか、差異があるとすればそれが治療効果の違いを反映するのか、今後の研究によって明らかになるものと考えられる。

ヒト歯髄幹細胞

ヒトの歯髄組織は歯の内部空洞(歯髄腔)を満たす軟組織であり、神経・血管・結合組織、象牙質の栄養や修復を担う象牙芽細胞などで構成される¹¹⁾。歯髄組織の由来は胎生期の中脳や小脳から分化した神経堤細胞である。乳歯や永久歯の歯髄に含まれる歯髄幹細胞は驚くほど均一な性状を示す¹²⁻¹⁴⁾。90%以上の細胞は、①骨髄間葉系幹細胞に特有な細胞表面抗原マーカー(CD90, CD73, CD105)を共発現し、②骨、軟骨、脂肪細胞への多分化能を示す、③これらの細胞は同様に未分化神経系マーカー(Nestin, Doublecortin, β III-tubulin)も共発現し、④神経誘導にも高い反応性を示す、⑤骨髄由来の間葉系幹細胞に比べ3倍程度高い細胞増殖能を示すユニークな幹細胞集団であ

る。このように神経外胚葉と間葉系幹細胞的性質を兼ね備えた歯髄幹細胞は、脱落しかけた乳歯や永久歯智歯(親知らず)から採取できる。いわば生体にとって、不要な臓器から最小限度の生体侵襲で採取可能な多機能体性幹細胞である。

ヒト歯髄幹細胞のラット完全切断脊髄損傷モデルへの移植効果¹⁵⁾

成体ラット(生後9週)の胸部脊髄を完全切断・離断することで重度の脊髄損傷モデルを作成した。当然、ラットは下肢運動機能を完全に喪失する。切断部周囲と切断面に、ヒト脱落乳歯や永久歯智歯から採取したトータル 1×10^6 個の歯髄幹細胞を移植すると、移植後8週間で下肢3関節を回転させて歩行できるまでに回復する。骨髄由来の間葉系幹細胞を移植したラットは歩行できない。詳細な解析により、移植した歯髄幹細胞の30%以上が生着し、その90%程度がmyelin basic protein(MBP)とadenomatous polyposis coli(APC)を発現する成熟型オリゴデンドロサイトに分化することを見出した。コントロールの脊髄切断部位では髄鞘構造が完全に消失するが、歯髄幹細胞を移植するとこの切断部位にも髄鞘が確認できた。

歯髄幹細胞由来のパラクライン因子による神経再生

歯髄幹細胞は、この細胞補給効果に加え、以下の2つの特筆すべきパラクライン効果を発揮することが明らかになった。

① アポトーシス抑制効果：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おもな原因である。歯髄幹細胞はこれらすべてのアポトーシスを強力に抑制する。アポトーシス細胞の総数は歯髄幹細胞移植によって 1/10 程度に減る。歯髄幹細胞由来のパラクライン因子が直接的にアポトーシスを抑制している可能性が高い。

② 抗神経軸索伸長抑制因子効果：損傷 6 週後のラット大脳皮質運動野に順行性トレーサーを注入した後, 2 週間後に屠殺, トレーサーでラベルされた大脳皮質脊髄路の神経軸索を組織化学的に検出した。歯髄幹細胞を移植した脊髄では, 切断された軸索が切断面を越えて尾側脊髄に伸長していた。コントロールでは, 軸索伸長が損傷部周囲のグリア瘢痕によって抑制されていた。歯髄幹細胞を移植した脊髄では RhoGTPase の活性化が著しく抑制されていた。実際, 歯髄幹細胞が分泌する何らかのパラクライン因子が軸索伸長抑制因子に対して拮抗作用を示すか, *in vitro* 神経細胞培養系で検証した。新生ラット小脳顆粒細胞は Poly-L-Lysin コートの上で激しく突起を伸長する。これをプロテオグリカンや MAG 蛋白の上で培養すると突起伸長が抑制される。歯髄幹細胞の培養上清を加えると顆粒細胞の突起伸長が回復する。骨髄間葉系幹細胞や皮膚線維芽細胞の培養上清にはこの活性が検出できない。つまり歯髄幹細胞の培養上清のなかにはさまざま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。それゆえ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うるのである。

おわりに

脊髄損傷の病態改善に有効な 5 つの治療戦略が実現化すれば, 新しい神経損傷の治療が提供できる可能性が高い。歯髄幹細胞は 4 つの効果を同時に提供できる数少ない体性幹細胞である。さらに, 移植後 8 週の時点でも腫瘍形成は観察されない。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。今後, 歯髄幹細胞の

パラクライン効果のみで脊髄損傷治療が可能か検証する必要があると考える。

文献

- 1) Norenberg, M. D. et al.: The pathology of human spinal cord injury : defining the problems. *J. Neurotrauma*, 21 : 429-440, 2004.
- 2) Schwab, J. M. et al.: Experimental strategies to promote spinal cord regeneration—an integrative perspective. *Prog. Neurobiol.*, 78 : 91-116, 2006.
- 3) Rowland, J. W. et al.: Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies : promise on the horizon. *Neurosurg. Focus*, 25 : E2, 2008.
- 4) Cummings, B. J. et al.: Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102 : 14069-14074, 2005.
- 5) Keirstead, H. S. et al.: Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J. Neurosci.*, 25 : 4694-4705, 2005.
- 6) Kumagai, G. et al.: Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury. *PLoS ONE*, 4 : e7706, 2009.
- 7) Erceg, S. et al.: Transplanted oligodendrocytes and motoneuron progenitors generated from human embryonic stem cells promote locomotor recovery after spinal cord transection. *Stem Cells*, 28 : 1541-1549, 2010.
- 8) Hofstetter, C. P. et al.: Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 : 2199-2204, 2002.
- 9) Cizkova, D. et al.: Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 26 : 1167-1180, 2006.
- 10) Sharp, J. et al.: Therapeutic applications of oligodendrocyte precursors derived from human embryonic stem cells. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18 : 434-440, 2007.
- 11) Nanci, A. et al.: Ten Cate's oral histology : development, structure, and function. Mosby, St. Louis, 2008.
- 12) Miura, M. et al.: SHED : stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 : 5807-5812, 2003.
- 13) Arthur, A. et al.: Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells*, 26 : 1787-1795, 2008.
- 14) Gronthos, S. et al.: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 : 13625-13630, 2000.
- 15) Sakai, K. et al.: Multifaceted neuro-regenerative activities of human dental pulp stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord. *J. Clin. Invest.*, 122(1), 2011. (in press)