

potential (Shimazu *et al.*, 2006; Herford *et al.*, 2008) and are already on the market. However, unfortunately, these applications require supraphysiological doses (Kawasaki *et al.*, 1998) and may induce a severe inflammatory response (Perri *et al.*, 2007; Shields *et al.*, 2006). A serious adverse reaction with soft tissue swelling was reported when using rh-BMP-2 in anterior cervical spine surgery (Perri *et al.*, 2007; Vaidya *et al.*, 2007; Shields *et al.*, 2006). Eighty-five percent of the patients who received rh-BMP-2 therapy for anterior cervical discectomy and fusion showed dysphagia (Vaidya *et al.*, 2007).

Here, we present that stem cell based cytokines such as paracrine factors might enhance bone regeneration through migration and osteogenesis of endogenous cells. If it is possible to enhance new bone regeneration by implantation of stem cell derived cytokines rather than of living stem cells, this will be a paradigm shift in tissue engineering and regenerative medicine.

References

1. Akeno N, Robins J, Zhang M, Czyzyk-Krzeska MF, Clemenc TL. Induction of vascular endothelial growth factor by IGF-1 in osteoblast-like cell is mediated by the PI3K signaling pathway through the hypoxia-inducible factor-2 α . *Endocrinology*. 2002;143: 420-425.
2. Alman BA, De Bari A, Krajchich JJ. Massive allografts in the treatment of osteosarcoma and Ewing sarcoma in children and adolescents. *J Bone Joint Surg Am*. 1995;77:54-64.
3. Ammann P, Rizzoli R, Muller K, Sloman D, Bonjour P. IGF-1 and pamidronate increase mineral density in ovariectomized rat. *Am J Physiol*. 1993; 265: E770.
4. Boyne PJ, Marx RE, Nevins M, Triplett G, Lizaro E, Lilly LC, Alder M, Nummikoski P. A feasibility study evaluation rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1997; 17:11-25.
5. Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS ONE*. 2008;3: e1886.
6. Fang B, Song Y, Lin Q, Zhang Y, Cao Y, Zao RC, Ma Y. Human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells as salvage therapy for treatment of severe refractory acute graft-vs.-host disease in two children. *Pediatr Transplant*. 2007;11: 814-817.
7. Gerhart TN, Kirker-Head CA, Kriz MJ, Holtrop ME, Hennig GE, Hipp J, Schelling SH, Wang E. Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res*. 1993; 293:317-326.
8. Hattori H, Sato M, Masuoka K, Ishihara M, Kikuchi T, Matsui T, Takase B, Ishizuka T, Kikuchi M, Fujikawa M, Ishihara M. Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs*. 2004;178: 2-12.
9. Herford AS, Boyne PJ. Reconstruction of mandibular continuity defects with bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Oral Maxillofac Surg*. 2008; 66: 616-624.
10. Ide C, Nakai Y, Nakano N, Seo T, Yamada Y, Endo K, Noda T, Saito F, Suzuki Y, Fukushima M, Nakatani T. Bone marrow stromal cell transplantation for treatment of sub-acute spinal cord injury in rat. *Brain Res*. 2010; 1332: 32-47.
11. Jensen J, Simonsen EK, Sindetpedersen S. Reconstruction of the severely resorbed maxilla with bone grafting and osseointegrated implants: A preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg*. 1990; 48:27-32.
12. Kaigler D, Krebsbach PH, Polverini PJ, Mooney DJ. Role of vascular endothelial growth factor in bone marrow stromal cell modulation of endothelial cells. *Tissue Eng*. 2003; 9: 95-103.
13. Kawasaki K, Aihara M, Honmo J, Sakurai S, Fujimaki Y, Sakamoto K, Fujimaki E, Wozney JM, Yamaguchi A. Effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on differentiation of cells isolated from human bone, muscle, and skin. *Bone*. 1998; 23: 223-231.
14. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 2004; 109: 1543-1549.
15. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993; 260:920-926.
16. Laurie SW, Kaban LB, Mulliken JB, Murray JE. Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plast Reconstr Surg*. 1984; 73:933-938.
17. Lendeckel S, Jodicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, Hedrick MH, Berthold L, Howaldt HP. Autogenous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg*. 2004; 6: 370-373.

18. Li Y, Yu X, Lin S, Li X, Zhang S, Song YH. Insulin-like growth factor 1 enhances the migratory capacity of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 356: 780-784.
19. Lord CF, Gebhardt MC, Tomford WW, Mankin HJ. Infection in bone allografts. Incidence, nature and treatment. *J Bone Joint Surg Am.* 1988; 70:369-376.
20. Mankin HJ, Gebhardt MC, Tomford WW. The use of frozen cadaveric allografts in the management of patients with bone tumors of the extremities. *Orthop Clin North Am.* 1987; 18:275-289.
21. Marx RE. Clinical application of bone biology to mandibular and maxillary reconstruction. *Clin Plast Surg.* 1994; 21: 377-392.
22. Marx RE, Morales MJ. Morbidity from bone harvested in major jaw reconstruction. *J Oral Maxillofac Surg.* 1988; 48: 196-203.
23. Nakano N, Nakai Y, Seo TB, Yamada Y, Ohno T, Yamanaka A, Nagai Y, Fukushima M, Suzuki Y, Nakatani T, Ide C. Characterization of conditioned medium of cultured bone marrow stromal cells. *Neurosci Lett.* 2010; 483: 57-61.
24. Osugi M, Katagiri W, Yoshimi R, Inukai T, Hibi H, Ueda M. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Eng Part A.* 2012; 18: in press.
25. Perri B, Cooper M, Laurysen C, Anand N. Adverse swelling associated with use of rh-BMP-2 in anterior cervical discectomy and fusion: a case study. *Spine J.* 2007; 7: 235-239.
26. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multi lineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284:143-147.
27. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med.* 2001; 344:385-386.
28. Raghoobar GM, Brouwer TJ, Reintsema H, Van Oort RP. Augmentation of the maxillary sinus floor with autogenous bone for placement of endosseous implants: A preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg.* 1993;51:1198-1203.
29. Riddle RC, Khatri R, Schipani E, Clemens TL. Role of hypoxia-inducible factor-1 α in angiogenic-osteogenic coupling. *J Mol Med.* 2009; 87: 583-590.
30. Shields LB, Raque GH, Glassman SD, Campbell M, Vitaz T, Harpring J, Shields CB. Adverse effects associated with high-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in anterior cervical spine fusion. *Spine.* 2006; 31: 542-547.
31. Shimazu S, Hara T, Kinuta Y, Moriya K, Maruo Y, Hanada S, Minagi S. Enhanced vertical alveolar bone augmentation by recombinant human bone morphogenetic protein-2 with carrier in rats. *J Oral Rehabil.* 2006; 33: 609-618.
32. Sigurdsson TJ, Lee MB, Kubota K, Turek TJ, Wozney JM, Wikesjo UM. Periodontal repair in dogs: recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. *J Periodontol.* 1995;66:131-138.
33. Smith JL. Osseous regeneration in preclinical models using bioabsorbable delivery technology for recombinant human bone morphogenetic protein2 (rhBMP-2). *J Control Release.* 1995; 36: 183-195.
34. Spencer EM, Liu CC, Si ECC, Howard GA. In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on bone formation and resorption in rats. *Bone.* 1991; 12: 21-26.
35. Mueller K, Cortesi R, Modrowski D, Marie PJ. Stimulation of trabecular bone formation by insulin-like growth factor I in adult ovariectomized rats. *Am J Physiol.* 1994; 267: E1-6.
36. Stevenson S. The immune response to osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg Am.* 1987; 69:573- 582.
37. Tatum H. Maxillary and sinus implant reconstructions. *Dent Clin North Am.* 1986; 30:207-230.
38. Toriumi DM, Kotler HS, Luxenberg DP, Holtrop ME, Wang EA. Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor: Functional, histologic, and biomechanical evaluation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1991;117:1101-1112.
39. Ueda M, Yamada Y, Ozawa R, Okazaki Y. Clinical case reports of injectable tissue-engineered bone for alveolar augmentation with simultaneous implant placement. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2005; 25: 129-37.
40. Vaidya R, Carp J, Sethi A, Bartol S, Craig J, Les CM. Complications of anterior cervical discectomy and fusion

using recombinant human bone morphogenetic protein-2. Eur Spine J. 2007; 16: 1257-1265.

41. Weinzierl K, Hemprich A, Frerich B. Bone engineering with adipose tissue derived stromal cells. J Craniomaxillofac Surg. 2006;34: 466-471.

42. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi M, Hata K, Nagasaka T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: Tissue-engineered bone regeneration. Tissue Eng. 2004;10: 955-964.



歯髄幹細胞を用いた脊髄損傷の再生医療

—細胞移植を伴わない脊髄損傷治療の可能性

山本 朗仁 酒井 陽 松原 弘記

はじめに

損傷した脊髄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。われわれは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ことを見出した。歯髄幹細胞は3つの神経再生効果によって切断した脊髄を再生する。① 損傷による神経細胞やグリア細胞のアポトーシスを抑制し神経線維や髄鞘構造を維持する神経保護効果、② 損傷部周囲のグリア瘢痕に由来する「様々な神経軸索伸長抑制因子」に拮抗する神経軸索再生効果、③ 脊髄損傷環境下でオリゴデンドロサイトへ特異的に分化することによる細胞補給効果。さらに、上記治療効果(①と②)を担うパラクライン因子を歯髄幹細胞の無血清培養上清として回収し、重度圧座型ラット脊髄損傷モデルにくも膜下投与すると「細胞移植なしで下肢運動機能が劇的に改善する」ことを見出した。本稿では歯髄幹細胞とその強力な神経再生能力に関して概説する。

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

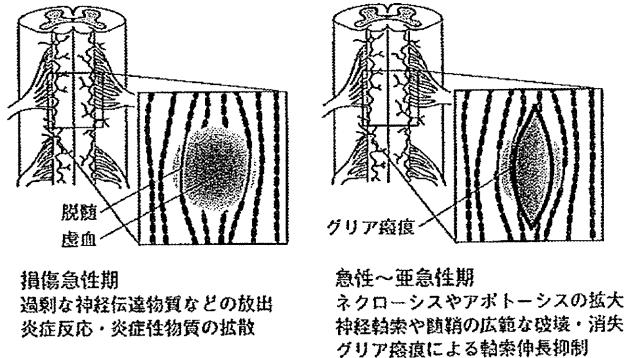


図1 複雑に変化する脊髄損傷の病態 (Bambakidis ら³⁾より改変)

化する(図1)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は細胞外基質・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タンパク(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中、Schwab ら²⁾は脊髄損傷の治療には多面的な治療戦略が必要であると提唱している。

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、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、骨髄由来の間葉系幹細胞(BMSC)などをげっ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

やまもと あきひと 名古屋大学大学院准教授/医学研究科頭頸部感覚器外科学
 さかい きよし 名古屋大学大学院/医学研究科頭頸部感覚器外科学
 まつばら こうき 同

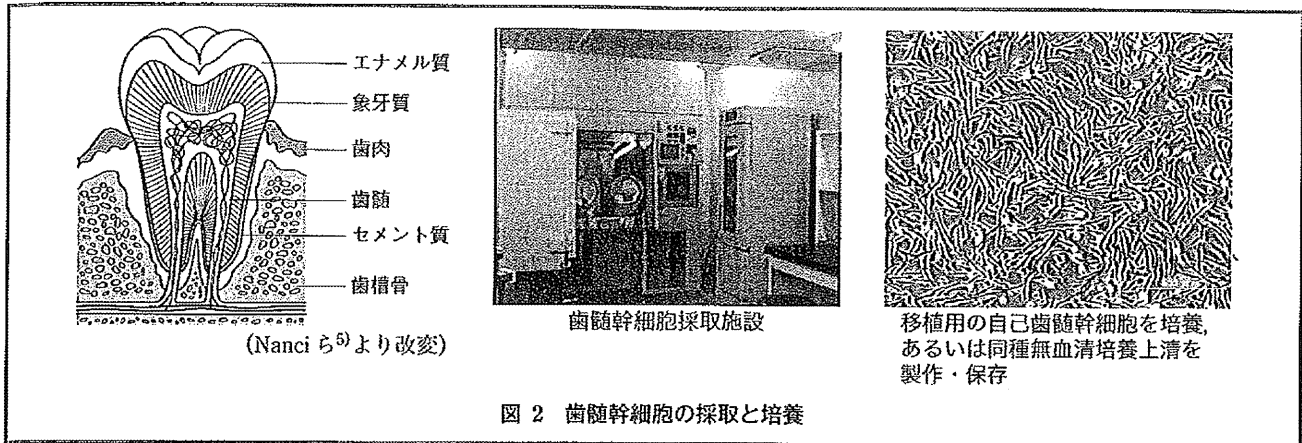


図 2 歯髄幹細胞の採取と培養

た、しかしながら、激しい脊髄損傷の環境下で生着できる移植細胞の数が極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脊髄再生効果が注目されるようになった⁴⁾。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未だ不明のままであり、その同定が世界的な競争の中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有用性が明らかとなった様々な細胞が、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

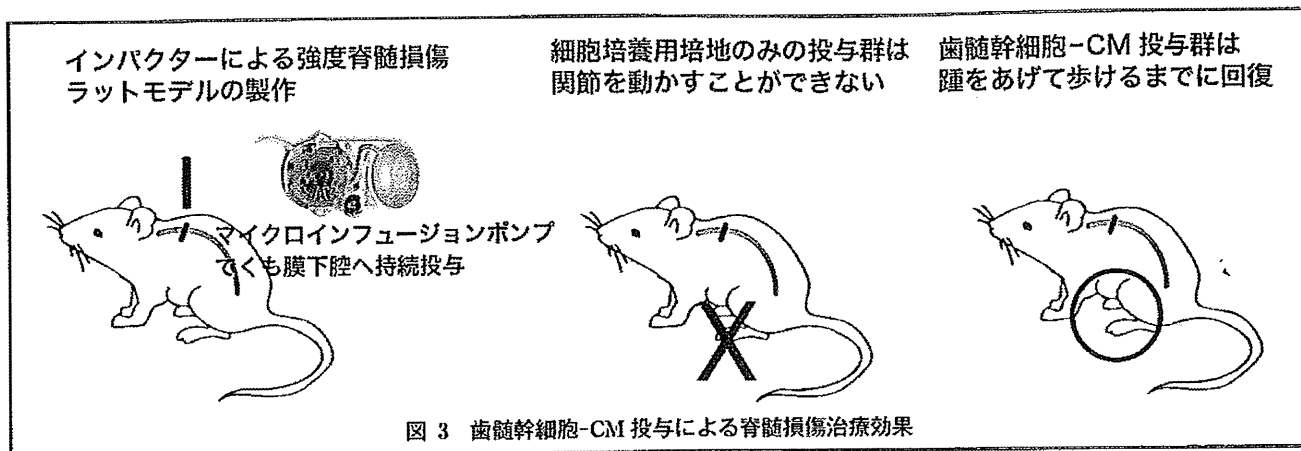
ヒトの歯髄組織は歯の内部空洞(歯髄腔)を満たす軟組織であり、神経・血管・結合組織、象牙質の栄養や修復を担う象牙芽細胞などで構成される⁵⁾。歯髄組織の由来は、胎生期の中脳や小脳の外側背側神経細胞から分化した神経堤細胞である。乳歯や永久歯の歯髄に含まれる歯髄幹細胞は驚くほど均一な性状を示す。90%以上の細胞は、① 骨髄間葉系幹細胞に特有な細胞表面抗原マーカー(CD90, CD73, CD105)を共発現し、② 骨、軟骨、脂肪細胞への多分化能を示す、③ これらの細胞は同様に未分化神経系マーカー(Nestin, Doublecortin, β III-tubulin, NeuN, GFAP, S-100, A2B5, CNPase)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(図2)⁶⁻⁸⁾。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

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製作した。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⁹⁾。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。さらに、脊髄損傷治療に有効である歯髄幹細胞の2つの強力なパラクライン効果を見出した。

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主たる原因である。歯髄幹細胞はこれら全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程度に減少する。

② 抗神経軸索伸長抑制因子効果：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。さらに、in vitroで小脳顆粒細胞培養系において、歯髄幹細胞の無血清培養上清(CM: conditioned medium)がプロテオグリカンやMAGによる軸索伸長抑制効果を抑制



し、神経突起の伸張を促すことを見出した。

歯髄幹細胞-CM による脊髄損傷治療効果

歯髄幹細胞-CM の治療効果を、ラット圧座型脊損モデルを用いて検証した(図3)。インパクトで重度の脊損ラットを製作した後、くも膜下腔にカテーテルを留置した。マイクロインフュージョンポンプにて毎時3 μ Lの流速で歯髄幹細胞-CMを8週間持続投与した。術後8週で細胞培養液 DMEM 投与群は激しい下肢運動機能麻痺で関節を動かすことができなかったが、歯髄幹細胞投与群は踵をあげて歩けるまでに回復した。骨髄間葉系幹細胞や皮膚線維芽細胞のCM投与群は体重を支えて歩くことが困難であった。これらの結果は、歯髄幹細胞由来パラクライン因子が脊髄損傷の治療に有効であることを強く示唆している。

むすび

脊髄損傷の治療には、安全性の高い多面的治療戦略がタイムリーに提供される必要がある。歯髄幹細胞の神経保護効果や抗神経軸索伸長抑制因子効果のコンビネーションは、重度の脊髄損傷の治療に有効である可能性が高い。さらに、術後8週で歯髄幹細胞移植群およびCM投与群は体調良好で、腫瘍形成は観察されなかった。細胞は移植前準備に一定期間を必要とし機動性に欠けるが、CMは保存可能な状態で維持管理できる可能性が高く、救急対応部署などに配備すれば救急患者に迅速に提供できるかもしれない。

い、これまでの細胞治療をベースにした再生医療は、移植安全性、倫理問題、高額医療費など多くの課題を抱えているが、CMのみでの脊損治療が可能になれば多くの課題を解消できる。本研究で、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、ヒトへの臨床研究を加速させるために、歯髄幹細胞-CMに含まれる神経再生因子群の同定、多施設で独立的な歯髄幹細胞-CMの治療効果の検証、霊長類モデルを用いた治療有効性・安全性の検証が急務である。

文 献

- 1) Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5: 146-56.
- 2) Schwab JM, Breghtel K, Mueller CA, et al. Experimental strategies to promote spinal cord regeneration—an integrative perspective. *Prog Neurobiol.* 2006; 78: 91-116.
- 3) Bambakidis NC, Butler J, Horn EM, et al. Stem cell biology and its therapeutic applications in the setting of spinal cord injury. *Neurosurg Focus.* 2008; 24: E20.
- 4) Rossi SL, Keirstead HS. Stem cells and spinal cord regeneration. *Curr Opin Biotechnol.* 2009; 20: 552-62.
- 5) Nanci A, Ten Cate AR. Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 6th ed. St Louis, London: Mosby; 2003. p. xi, 445.
- 6) Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 5807-12.
- 7) Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 13625-30.
- 8) Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, et al. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest.* 2012; 122: 80-90.

- 8) Oda Y, et al: Induction of pluripotent stem cells from human third molar mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem* 285: 29270-29278, 2010
- 9) Hanna J, et al: Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* 462: 595-601, 2009
- 10) Nakajima F, et al: Human leukocyte antigen matching estimations in a hypothetical bank of human embryonic stem cell lines in the Japanese population for use in cell transplantation therapy. *Stem Cells* 25: 983-985, 2007
- 11) Nakatsuji N, et al: HLA-haplotype banking and iPS cells. *Nat Biotechnol* 26: 739-740, 2008
- 12) Okita K, et al: A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 8: 409-412, 2011

1.2

歯髄幹細胞を用いた中枢神経損傷治療

歯髄は胎生期に頭部神経管の背側から分化・遊走した神経堤細胞に由来する。神経外胚葉と間葉系細胞の性格をあわせもつ歯髄幹細胞は口腔内の疾患だけでなく、さまざまな難治性全身疾患の治療に有用であると考えられる。ここではいまだ有効な治療法が開発されていない脊髄損傷における歯髄幹細胞の治療有用性に関して概説する。完全切断したラット脊髄損傷モデルに歯髄幹細胞を移植すると、4つの治療効果によって下肢運動機能を改善する。①神経損傷によって誘導される神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトのアポトーシスを強力に抑制（神経保護効果）、②プロテオグリカンやミエリンタンパクによる神経軸索伸長抑制効果に対して、直接的な拮抗作用を発揮することで切断した神経軸索を再生（抗-軸索伸長抑制因子効果）、③移植した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することで、損傷によって失われた細胞の補給（細胞補給効果）、④上記神経保護作用と細胞補給効果による、髄鞘構造の維持・再生（神経伝導能回復効果）。これらの多面的な歯髄幹細胞の神経再生効果は、新しい効率的な神経再生治療の開発にきわめて有用であると考えられる¹⁾。

1.2.1 脊髄損傷の急性期病態と多面的治療戦略の必要性

脊髄損傷急性期では受傷後の時間経過とともに病態が複雑に変化する（図1.11）²⁻⁵⁾。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

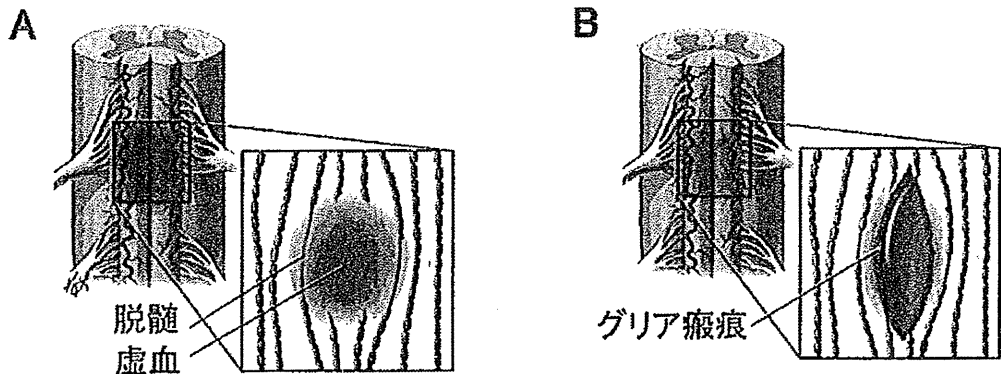


図 1.11 損傷急性期(A), 損傷亜急性期(B)における脊髄損傷の病態組織(文献5から改変)
 A: 急性期の生体反応 (炎症反応, 細胞障害性浮腫, 虚血, イオンバランス不良, 神経伝達物質のリーク, フリーラジカルによる細胞障害), B: 急性～亜急性期の生体反応 (ネクローシスやアポトーシスの拡大, 軸索や髄鞘の広範な破壊, グリア瘢痕による炎症性物質の拡散抑制 (神経保護) と軸索伸長抑制 (再生阻害効果)).

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領域でアポトーシスやネクローシスを引き起こす (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は細胞外基質・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タンパク (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, Schwab³⁾ らは, 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 1.12). ①神経保護効果 (抗-アポトーシス効果: 二次損傷の軽減), ②神経伝導能の改善効果 (髄鞘や軸索の維持および再髄鞘化), ③抗-軸索伸長抑制因子効果; ④神経回路再編効果 (上位軸索末端を標的神経細胞体へ誘導), ⑤神経損傷で失った細胞の補充効果. これらの多面的治療効果を包括的に発揮する新しい治療法が確立されれば中枢神経損傷治療に革新をもたらす可能性が高い.

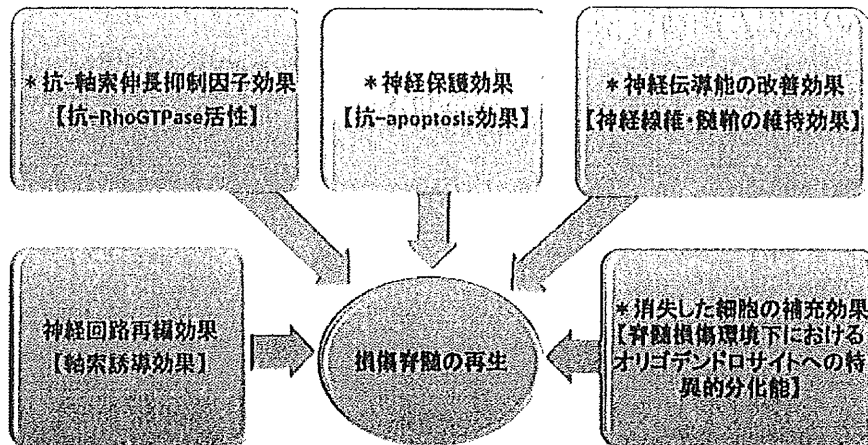


図 1.12 脊髄損傷の治療に必要な多面的神経再生効果 (文献 3 から改変)
* : 歯髄幹細胞の神経再生効果.

1.2.2 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⁶⁾。これまでヒト胎児由来神経幹細胞⁷⁾、ヒト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⁸⁻¹⁰⁾、ヒト骨髓由来の間葉系幹細胞 (BMSC)^{11,12)}などをげっ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。しかしながら、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⁶⁾。実際、Schwab らが提唱する5つの治療効果のうち、細胞移植を必要とするのは項目⑤ (失った細胞の補充効果)のみであり、他の4つの治療効果はパラクライン効果で対応しうるものである。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。

1.2.3 歯の発生と歯髄幹細胞

ヒトの歯は胎生中期に歯胚と呼ばれる器官原基から発生する¹³⁾。歯胚は予定歯胚形成領域の口腔粘膜上皮と、頭部神経管から遊走した神経堤細胞に由来する外胚葉性間葉組織で構成される (図 1.13)。この上皮と間葉組織が相互に作用しあうことで歯胚形成が進む。上皮組織はエナメル器へと分化し、間葉系組織を包み込む。一方、間葉系組織は歯の内部空洞 (歯髄腔) を満たす歯髄組織へ分化する。完成した乳歯や永久歯の歯髄組織は、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。永久歯由来の歯髄幹細胞 (dental pulp stem cell: DPSC) や乳歯由来の歯髄幹細胞 (stem cell from human exfoliated deciduous teeth: SHED) は、このような歯髄組織の血管網周囲に常在すると考えられている (以下、記載なき場合はすべてヒト細胞)^{14,15)}。採取した歯髄をコラゲナーゼやディスパーゼで酵素処理し、細胞培養皿への細胞接着性を指標にして容易に分離培養できる。特定抗原の発現を指標としない選別法にもかかわらず、3~5 継代後の歯髄幹細胞はきわめて均一で特徴的な幹細胞性状を示す (図 1.14)。①線維芽細胞様の紡錘形態である歯髄幹細胞は高い細胞増殖能を示す。歯髄幹細胞と骨髄間葉系幹細胞の増殖能をコロニー形成能で比較すると、歯髄幹細胞のコロニー形成能は骨髄間葉系幹細胞の 20 倍以上である¹⁴⁾。② 90% 以上の

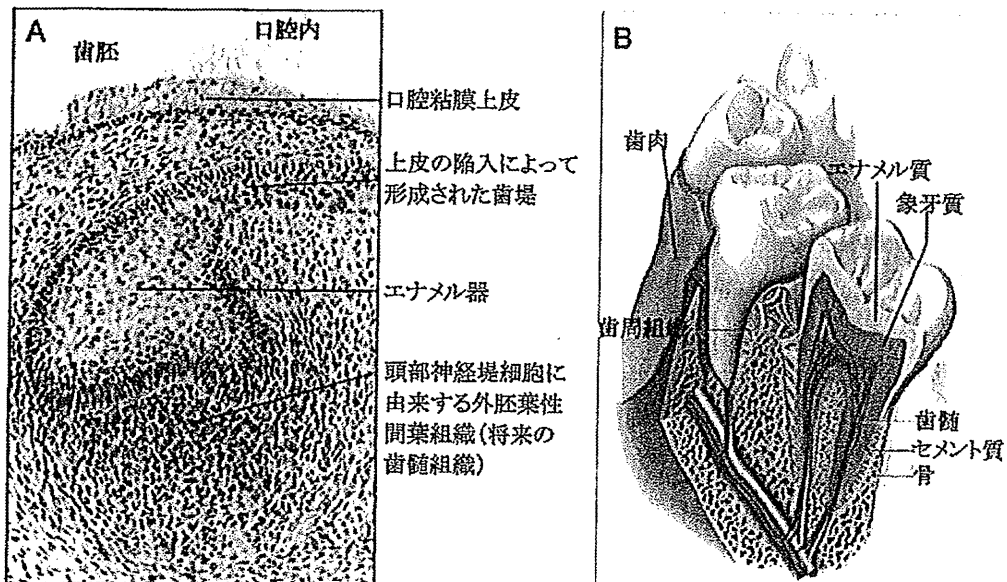


図 1.13 発生期における歯胚原基 (A) と萌出後の歯の構造 (B) (文献 13 から改変)
胎生期に口腔粘膜上皮が陥入し歯堤を形成する。この上皮との相互作用によって外胚葉性間葉系組織が歯髄に分化する。

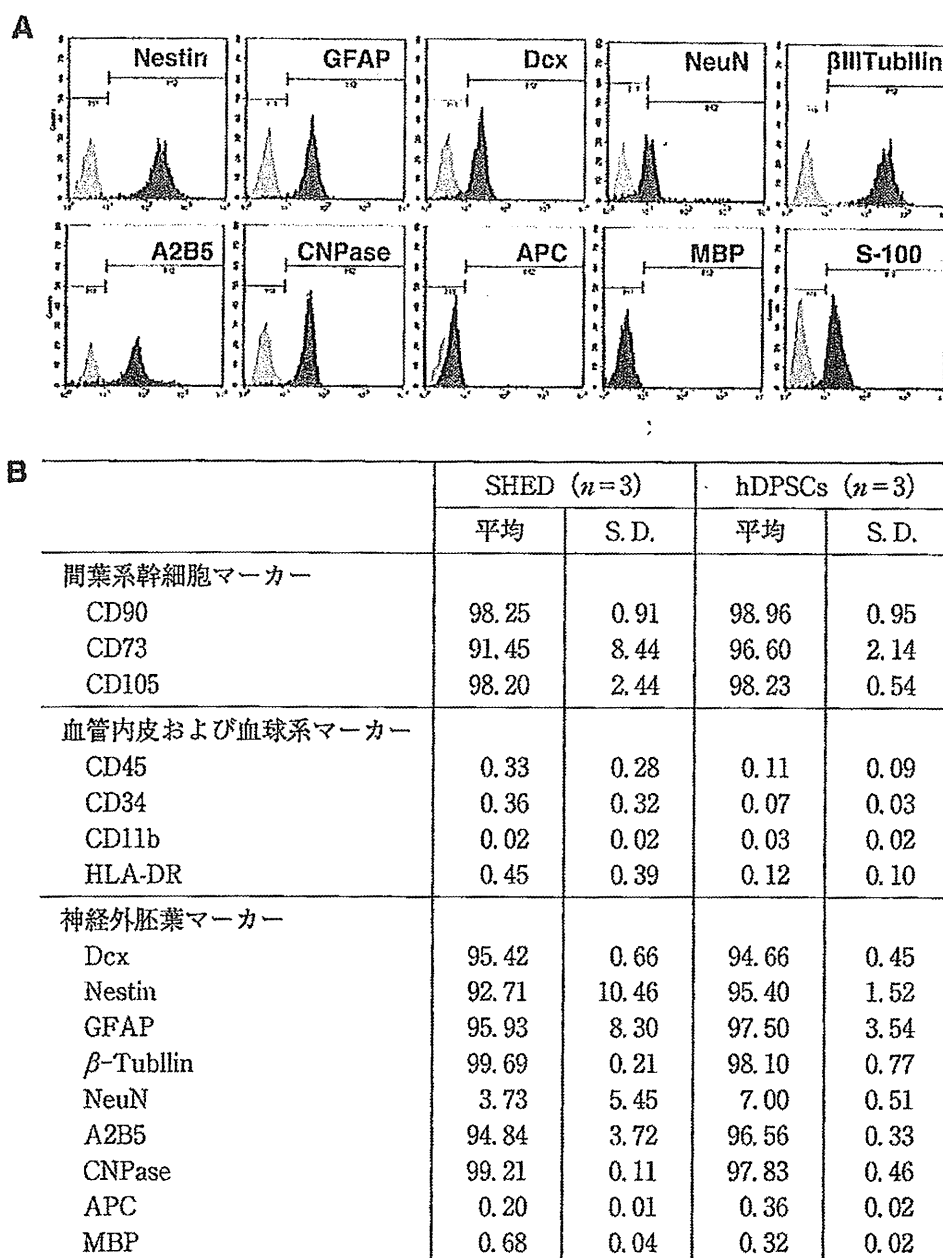


図 1.14 さまざまな神経外胚葉 (neural) と間葉系 (MSC) マーカーを共発現する歯髄幹細胞 (文献 1 から改変)

A: ヒト歯髄幹細胞を採取し, 5 継代後にフローサイトメトリーで神経系および間葉系幹細胞マーカーの発現を解析した. 細胞内タンパク質の検出には膜透過処理を行った. 歯髄幹細胞は未分化な神経系細胞に特有なマーカー分子を多数共発現するユニークな細胞集団である. 一方, 成熟型神経細胞 (NeuN) や成熟型オリゴデンドロサイトマーカー (APC や MBP) は発現していない.

B: それぞれ 3 人の患者に提供を受けた SHED や DPSC のマーカー発現を解析し評価した. 培養皿への接着性で選別したこれらの幹細胞は, きわめて均質な細胞集団であることがわかる.

細胞は、BMSCの細胞表面抗原マーカー（CD90, CD73, CD105）陽性で、血管内皮や血球系マーカー（CD54, CD34, CD45, CD11b/c, HLA-DR）陰性である。③ BMSCと同様に骨、軟骨、脂肪細胞への多分化能を示す。④さらに採取した歯髄幹細胞の90%以上の細胞が未分化神経外胚葉マーカー：Nestin（神経幹細胞）、Doublecortin（神経前駆細胞）、 β III-チューブリン（未分化神経細胞）、GFAP（神経幹細胞およびアストロサイト）、A2B5やCNPase（オリゴデンドロサイト前駆細胞）共陽性である。他方、NeuN（成熟型神経細胞）、MBP（myelin basic protein）やAPC（adenomatous polyposis coli）などの成熟型オリゴデンドロサイトマーカー陰性である。⑤ *in vitro* 神経誘導にも高い反応性を示し、ニワトリなどの胎児脳に移植すると神経細胞へと分化する¹⁶⁾。このように間葉系幹細胞と未分化神経外胚葉の性質をあわせもつ歯髄幹細胞は、脱落しかけた乳歯や永久歯親知らず（智歯）の歯髄から比較的容易に採取できる。

1.2.4 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による下肢運動機能回復

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製作した。当然、ラットは下肢運動機能を完全に喪失する。驚くべきことに切断部周囲と切断面に、 1×10^6 個のDPSCやSHED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（図1.15）。BMSCやヒト皮膚線維芽細胞（fibroblast）を移植したラットは歩行できない。詳細な解析によって歯髄幹細胞は4つの神経再生効果を発揮することで完全に切断した脊髄の機能回復を促進することが明らかとなった。

a. 神経保護効果

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。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以下に減少する。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。

b. 抗-神経軸索伸長抑制因子効果

損傷6週間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

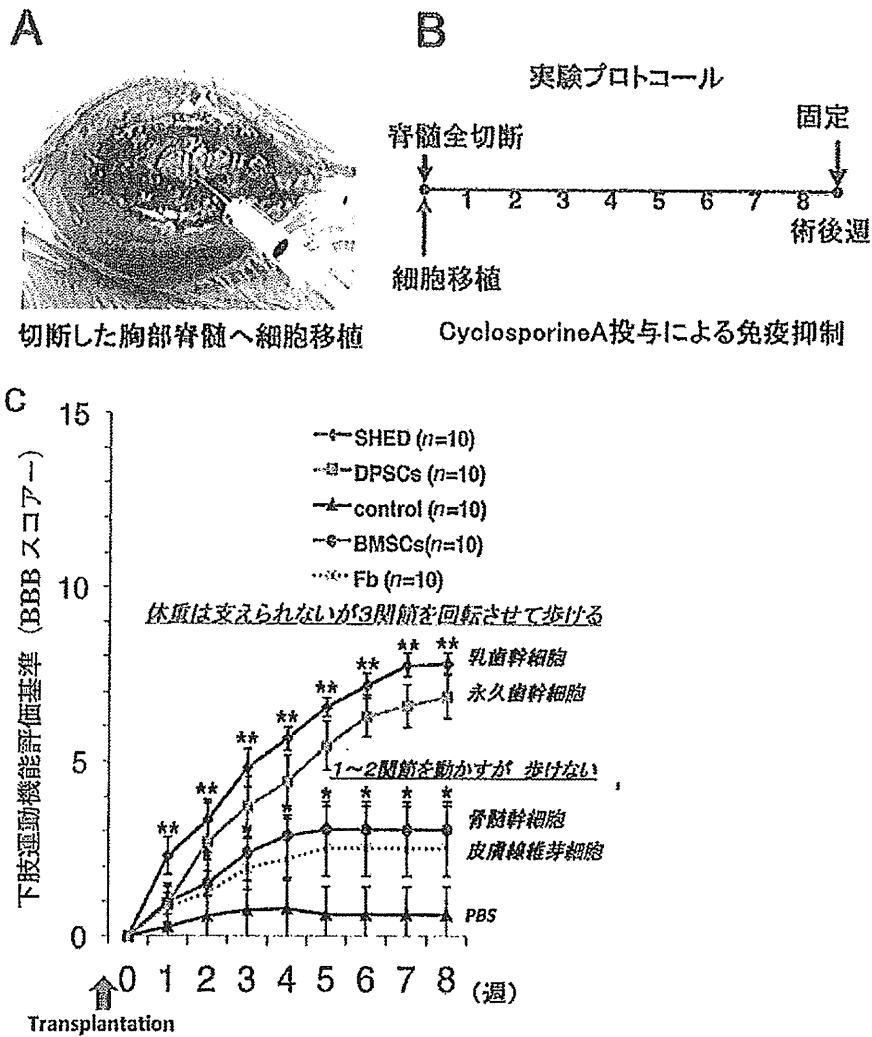


図 1.15 歯髄幹細胞移植による、ラット完全脊髄損傷モデルの下肢運動機能回復 (文献1から改変)

A, B: 実験プロトコール. C: 10万個の歯髄幹細胞を移植したラットは、術後8週で歩けるまでに回復した. 骨髄間葉系幹細胞や皮膚線維芽細胞を移植したラットは歩くことができなかった. BBB スコア: ラット下肢運動機能評価基準.

間後に屠殺, トレーサーでラベルされた大脳皮質脊髄路 (corticospinal tract: CST) の神経軸索を組織化学的に検出した (図 1.16). 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. 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* 神経細胞培養系にて検証した (図 1.17). 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. これをプロテ

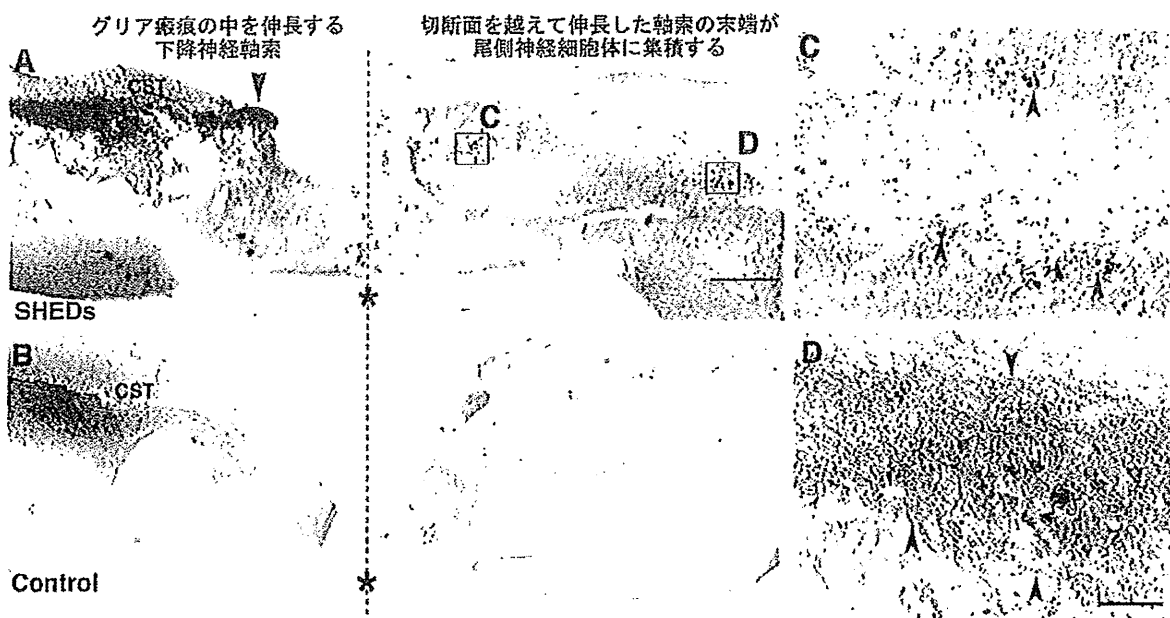


図 1.16 大脳皮質脊髄路 (corticospinal tract: CST) のトレーサー解析 (文献 1 から改変)
 A, B: 大脳運動野に順行性トレーサーであるピオチン標識デキストランを注入し, 2 週間後に解剖した. 矢状面で組織切片を製作し, 酵素処理によってトレーサーを検出した. 歯髄幹細胞移植群では, 切断した脊髄 (点線と*) 周囲のグリア瘢痕のなかをトレーサーでラベルした CST 軸索が勢いよく伸長している (矢頭). さらに切断面を越えた尾側脊髄にトレーサーを検出した. 切断した CST 軸索が再生していることがわかる. C, D: 歯髄幹細胞移植群の尾側脊髄にみられるトレーサー集積部位 (□) の拡大図. トレーサーでラベルした軸索末端が, 尾側神経細胞に集積していることがわかる.

オグリカンや MAG タンパク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. 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.

c. 細胞補給効果

図 1.18 が示すように, 移植したヒト細胞は抗-ヒト核特異的モノクローナル抗体で検出できる. 一般的に, ラット脊髄損傷の急性期へ細胞移植しても細胞生着は得にくいとされている. オリゴデンドロサイトや運動神経細胞に分化したヒト ES 細胞の生着率は 1% を下回る. これに対し, 歯髄幹細胞の生着率は 30~45% である. 移植した歯髄幹細胞は細胞塊として検出されることが多く, 何らかの細胞接着メカニズムが高い生着率の要因であるかもしれない. 移植前の歯髄幹細胞

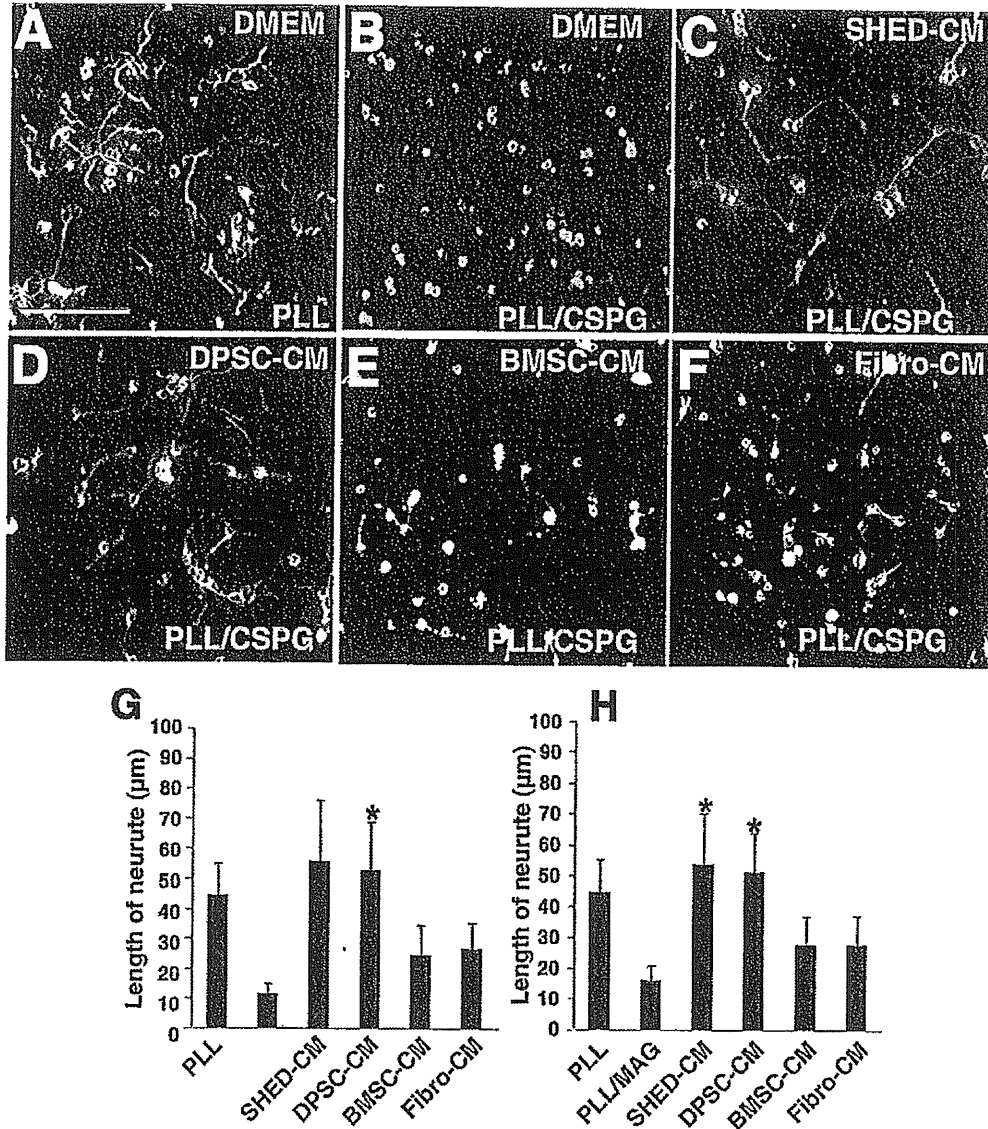


図 1.17 歯髄幹細胞の抗-神経軸索伸長抑制因子効果 (文献 1 から改変)

A: 新生ラット小脳顆粒細胞は PLL コート上で突起伸長する。B: グリア瘢痕の主要成分であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG: 神経軸索伸長抑制因子) のコート上では突起伸長しない。一方、乳歯 (C: SHED) や永久歯 (D: DPSC) の無血清培養上清 (CM) を添加すると突起伸長能力が回復する。骨髄間葉系幹細胞 (E) や皮膚線維芽細胞 (F) の CM にはこの効果がほとんどない。歯髄幹細胞 CM 処理は、CSPG (G) だけでなく MAG (H) の上でも顆粒細胞の突起伸長が回復する。歯髄幹細胞はさまざまな神経軸索伸長抑制因子に対して拮抗作用を示す。

はさまざまな初期神経系細胞マーカーを共発現するユニークな細胞であった。完全切断した脊髄に移植後 8 週, 90% 以上の移植細胞は成熟型オリゴデンドロサイトマーカー MBP や APC 陽性で, 成熟神経細胞マーカー NeuN やアストロサイトマーカー GFAP 陰性であった。このことから, 移植後の歯髄幹細胞はオリ

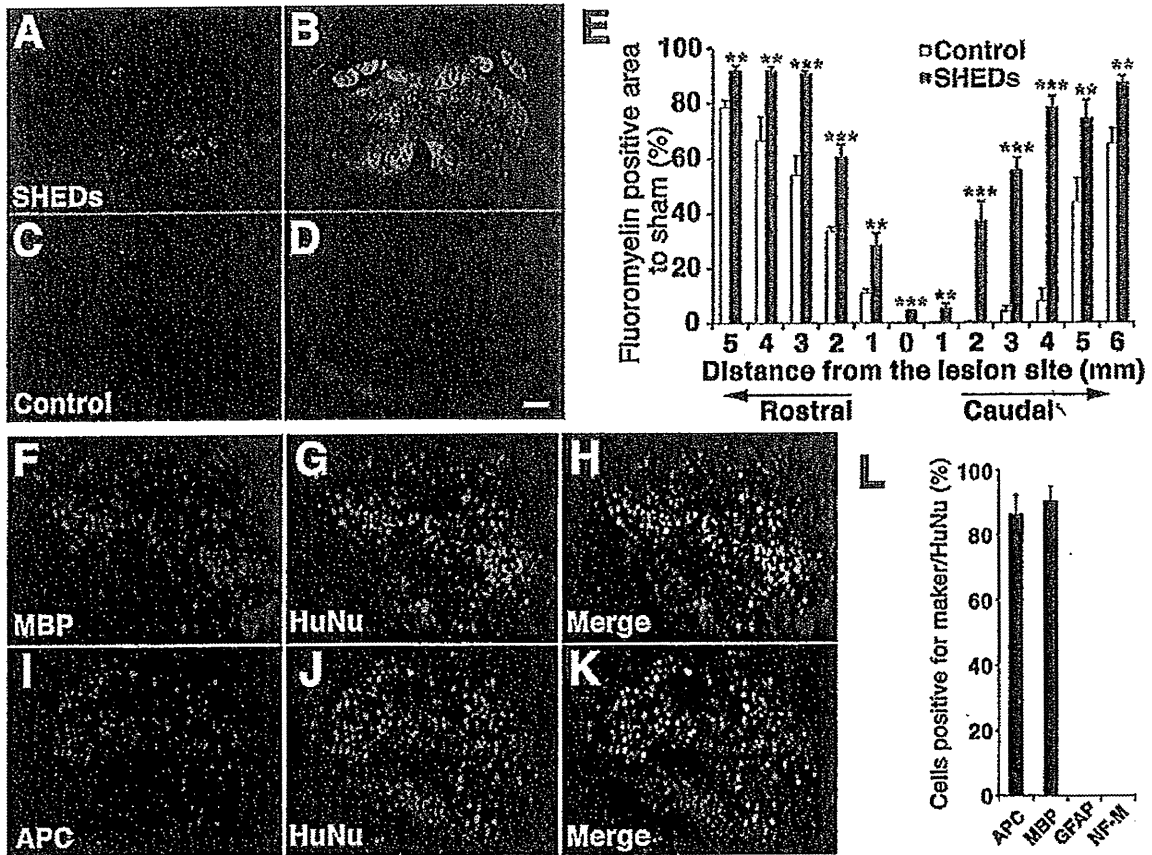


図 1.18 移植した歯髄幹細胞の髄鞘維持効果とオリゴデンドロサイト特異的な分化能 (文献1から改変, 口絵1参照)

A~D: 術後8週の脊髓横断面の髄鞘染色像. 歯髄幹細胞移植群では切断面 (A) や3mm尾側脊髓 (B) でも髄鞘が維持されていた. コントロールでは髄鞘構造がほとんど検出できない (C, D). E: 非処理群 Sham の髄鞘面積に対する歯髄幹細胞移植群とコントロール群の髄鞘面積. F~K: 完全切断した脊髓に移植したヒト歯髄幹細胞の細胞分化. 移植細胞はヒト核特異的抗体 (HuNu) と成熟型オリゴデンドロサイトマーカー (MBP と APC: H と K) で共染色された. アストロサイト (GFAP) や成熟神経細胞マーカー (NF-M) では染色されなかったことから, 脊髓損傷環境下に移植した歯髄幹細胞が成熟型オリゴデンドロサイトに特異的に分化したことがわかる (L).

ゴデンドロサイトに特異的に分化したことがわかる.

d. 神経伝導能回復効果

脊髓切断部位やその周辺では髄鞘構造が消失する. 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る (図 1.18). 損傷周囲でも, 歯髄幹細胞移植群は40~60%の髄鞘が維持されている. 一方, コントロール群の尾側脊髓における髄鞘維持率は10%を下回っており, この差が下肢運動機能の回復に大きく影響しているものと考えられる.

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希少な体性幹細胞である。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。〔山本朗仁・酒井 陽・松原弘記〕

文 献

- 1) Sakai K, et al: Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. Clin Invest 122: 80-90, 2012
- 2) Norenberg MD, et al: The pathology of human spinal cord injury: Defining the problems. J Neurotrauma 21: 429-440, 2004
- 3) Schwab JM, et al: Experimental strategies to promote spinal cord regeneration—an integrative perspective. Progr Neurobiol 78: 91-116, 2006
- 4) Rowland JW, et al: Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: Promise on the horizon. Neurosurg Focus 25: E2, 2008
- 5) Bambakidis NC, et al: Stem cell biology and its therapeutic applications in the setting of spinal cord injury. Neurosurg Focus 24: E20, 2008
- 6) Sharp J, et al: Therapeutic applications of oligodendrocyte precursors derived from human embryonic stem cells. Curr Opin Biotechnol 18: 434-440, 2007
- 7) Cummings BJ, 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
- 8) Keirstead HS, 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) Hofstetter CP, et al: Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. Proc Nat Acad Sci USA 99: 2199-2204, 2002
- 12) 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
- 13) Nanci A, et al: Ten Cate's oral histology: Development, structure, and function. St. Louis: Mosby, 2008
- 14) Gronthos S, et al: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 97: 13625-1363, 2000
- 15) Miura M, et al: SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci USA 100: 5807-5812, 2003

- 16) 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

1.3 歯髄・象牙質再生

超高齢社会に向かい、医療・福祉経済の破綻の可能性が示唆され、健康長寿者を増加させる政策は急務と考えられる。愛知県歯科医師会の2008（平成20）年度の8020表彰者追跡調査によると、8020達成者は未達成者よりも明らかに自立・健康者が多いと報告されている。すなわち、歯の健康維持・延命化は全身の健康維持に重要であり¹⁾、認知症とくにアルツハイマー病との関係など学術的にも明らかにされつつある²⁾。現在、歯を失う原因の半分は歯根破折を含めたう蝕によるもので、無髄歯の抜歯は全体の約60%を占め、歯髄を抜くと歯を失う可能性が増加することが知られている（8020推進財団 抜歯原因調査報告書2005年）。8020運動により、80歳の残存歯数は現在10本、8020達成者は24%と改善されつつあるが、日本歯科医師会目標の50%を達成させるにはう蝕・根管治療を見直す必要がある。根管治療の予後は、抜髄根管で86%、未処置の感染根管で80%、再治療の感染根管では56%といわれている³⁾。平成21年社会医療診療行為別調査（e-stat, <http://www.e-stat.go.jp/>）によれば、感染根管治療数は抜髄症例数より多く、歯内治療は再治療される確率が高く、再治療を重ねるにつれ予後は悪化することが明らかである。とくに根管治療の失敗の原因の多くは歯根破折といわれている。破折の原因は、歯髄の力学的緩和作用の喪失、水分供給の断絶による乾燥・亀裂、ポスト形成のための過剰な歯質削除、根管内二次う蝕によりポストと歯質の隙間が生じ楔状の力あるいは剪断応力が集中することなどが考えられている⁴⁾。また、再治療となるとさらに根管内を25%以上追加切削することになる⁵⁾。したがって、根管治療・充填法は、最小限の切削で残存歯質の量を高め、歯冠側からの細菌漏洩を完全に防止し、残存歯質の性状・機械的強度を変化させないことが理想的と考えられる。従来から、天然の歯髄・象牙質に勝る充填材はないといわれているが、ここでは、最も理想的な治療法として、歯髄幹細胞を用いた歯髄・象牙質再生法について紹介する。

Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Tooth-Derived Conditioned Medium Enhance Recovery of Focal Cerebral Ischemia in Rats

Takanori Inoue, D.D.S.,¹ Masahiko Sugiyama, Ph.D.,¹ Hisashi Hattori, Ph.D.,¹ Hideaki Wakita, M.D.,² Toshihiko Wakabayashi, Ph.D.,³ and Minoru Ueda, Ph.D.¹

Regenerative therapy using stem cells is a promising approach for the treatment of stroke. Recently, we reported that dental pulp stem cells (DPSC) ameliorated ischemic tissue injury in the rat brain and accelerated functional recovery after middle cerebral artery occlusion (MCAO). In this study, we investigated the effects of stem cells from human exfoliated deciduous tooth (SHED)-derived conditioned medium (SHED-CM) on permanent MCAO (pMCAO). Adult male Sprague-Dawley rats were subjected to pMCAO. SHED-CM were then administered intranasally, and the motor function and infarct volume were evaluated. Neurogenesis and vasculogenesis were determined using immunochemical markers. The SHED-CM group had more positive signals than the Dulbecco's modified Eagle's medium group, with doublecortin (DCX), neurofilament H, neuronal nuclei, and rat endothelial cell antigen observed in the peri-infarct area. Migration of neuronal progenitor cells (NPC) with DCX from the subventricular zone to the peri-infarct area was observed on days 6 and 16, with migration on day 6 being the most prominent. In conclusion, SHED-CM promoted the migration and differentiation of endogenous NPC, induced vasculogenesis, and ameliorated ischemic brain injury after pMCAO as well as transplantation of DPSC.

Introduction

STROKE IS THE THIRD leading cause of death worldwide and the most frequent cause of long-term disability in humans.¹ Recently, transplantation of bone marrow mononuclear cells was shown to achieve clinical efficacy by inducing angiogenesis in patients with cerebral ischemia.^{2,3} However, bone marrow aspiration to acquire bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) is an invasive and painful procedure for the donor. In addition, the number, proliferation, and differentiation potential of BMMSCs decline with increasing age.⁴ There are two potential sources of human dental pulp stem cells (DPSC), the last molar teeth and deciduous teeth. Above all, deciduous teeth can be obtained noninvasively from extracted teeth discarded as medical waste without raising any ethics issues. The proliferation rate of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) is significantly higher than that of BMMSCs. SHED have the added advantages of being simple to harvest and their expression of several growth factors.⁵ Furthermore, if stem cells are banked from deciduous teeth, they may be used as the donor in future. Banking stem cells from deciduous teeth is a reasonable and simple alternative to harvesting

stem cells from BMMSCs.⁶ Recently, we reported that transplantation of DPSC in rats promoted neurogenesis and vasculogenesis in an induced peri-infarct area and enhanced recovery after middle cerebral artery occlusion (MCAO). These cells also released vascular endothelial growth factor (VEGF) and promoted the migration and differentiation of endogenous neuronal progenitor cells (NPC) in the subventricular zone (SVZ).⁷ Recently, we reported that SHED possessed high proliferation ability and were enriched with the extracellular matrix, suggesting that they may be a useful source for stem cell-based therapy compared with DPSC and BMMSCs.⁵ SHED are therefore considered a potential source for cell therapy in stroke patients.

Recent studies have reported that growth factors derived from transplanted stem cells accelerate the recovery of several diseases.^{7,8} However, the methods used to administer stem cells or growth factors in clinical applications require revision. Intranasal administration provides a method of bypassing the blood-brain barrier (BBB) and delivering therapeutic agents directly to the central nervous system (CNS).^{9,10} There are some reports that intranasal administration of VEGF provides an effective way of treating CNS diseases.¹¹ In the present study, we investigated the effects of

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Laboratory Medicine, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.

²Department of Internal Medicine, Fujita Health University Nanakuri Sanatorium, Tsu, Japan.

³Department of Neurosurgery, Laboratory Medicine, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.

a SHED-derived condition medium (SHED-CM) in a rat model of cerebral ischemia.

Materials and Methods

SHED harvest from deciduous teeth

Human dental pulp tissues were obtained from clinically healthy, extracted deciduous teeth from eight patients. The ethics committee of the Nagoya University approved the experimental protocols. SHED were isolated and cultured as previously described.^{12,13} Briefly, the pulp was removed gently and digested for 1 h at 37°C in a solution containing 3 mg/mL collagenase type I and 4 mg/mL dispase. After filtration through 70- μ m cell strainers (Falcon; BD Labware), the cells were cultured at 37°C under 5% CO₂ in the Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) containing 20% mesenchymal cell growth supplement (Lonza, Inc.) and antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 0.25 mg/mL amphotericin B; Gibco). After primary culture, the cells were subcultured at $\sim 1 \times 10^4$ cells/cm² and used in the experiments after three to five passages.

Preparation of SHED-CM and BMMSC-CM

SHED and BMMSCs (Lonza, Inc.) (4×10^5 cells) were cultured in a serum-free DMEM. Conditioned media of SHED and BMMSCs were collected after 48 h of culture and centrifuged at 1500 rpm for 5 min. The supernatants were recentrifuged at 3000 rpm for 3 min followed by collection of the second supernatants, named SHED-CM and BMMSC-CM, respectively.

Cerebral ischemia model

All the animal experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (Nagoya University). Adult male Sprague-Dawley rats (Japan SLC, Inc.) weighing 350–400 g were used in the experiments. Animals were anesthetized initially with 5% isoflurane (Abbott Laboratories) and were maintained under anesthesia with 1.5% isoflurane in a mixture of 70% N₂O and 30% O₂. The rectal temperature was maintained at 37°C \pm 0.5°C on a heating pad. Focal cerebral ischemia was induced by permanent MCAO (pMCAO) (Fig. 1A).¹⁴ A 4-0 monofilament nylon

suture (Shirakawa) with the tip rounded by flame heating and coated with silicone (KE-200; Shin-Etsu Chemical) was advanced from the external carotid artery into the internal carotid artery until it blocked the origin of the MCA. Regional cerebral blood flow in the MCA territory was measured after occlusion using a laser Doppler flowmeter (Omega FLO-N1; Omega Wave, Inc.). The response was considered positive and included only if the reduction in the regional cerebral blood flow was >70%.

Intranasal administration of the conditioned media and DMEM

Seventy-two hours after pMCAO (day 3), the rats were anesthetized again with 1.5% isoflurane in a mixture of 70% N₂O and 30% O₂. The animals were divided randomly into three groups: the SHED-CM group ($n=7$, three sacrificed on day 6 and four on day 16), the BMMSC-CM group ($n=3$, three sacrificed on day 16), and the DMEM group ($n=7$, three sacrificed on day 6 and four on day 16). The rats were placed on their backs with their necks elevated by a 4 \times 4-cm roll of gauze. A total of 100 μ L of SHED-CM, BMMSC-CM, and DMEM was administered to each rat via the olfactory pathway using a Hamilton microsyringe (Fig. 1B). The preparations were administered in aliquots of 10 μ L at a time and alternated nostril, with an interval of 2 min between each administration. During these procedures, the mouth and opposite nostril were closed. Intranasal administration was performed everyday from days 3 to 15.

Evaluation of motor disability

The rats were blindly examined on days 1, 3, 6, 9, 12, and 15 using a standardized motor disability scale with slight modifications.¹⁵ They scored 1 point for each of the following parameters: flexion of the forelimb contralateral to the stroke side when hung instantly by the tail, extension of the hind limb contralateral to the stroke side when pulled from a table, and rotation to the paretic side against resistance. In addition, 1 point was scored for circling motions to the paretic side when trying to walk, 1 point for failure to walk out of a 50-cm-diameter circle within 10 s, 2 points for failure to leave the circle within 20 s, and 3 points for inability to exit the circle within 60 s. In addition, 1 point each was scored for inability of the rat to extend the paretic forepaw when pushed against the table from above, laterally, and sideways. The motor disability scale was performed 3 times in each animal at each time point.

Assessment of infarct volume

The cryosections obtained from samples on day 16 were stained with hematoxylin and eosin.¹⁶ ImageJ (National Institutes of Health) was used to determine each infarct area in 12 coronal sections (20- μ m thick) at 1.00-mm intervals. The entire infarction area was covered by these 12 coronal sections. Regional infarct volumes were calculated by summing the infarct areas and multiplying them by the distance between sections (1.00 mm), followed by remediation for brain edema.¹⁷

Immunohistochemistry

On day 16 after the injection, the rats were perfused transcardially with a 4% paraformaldehyde solution (Nakarai

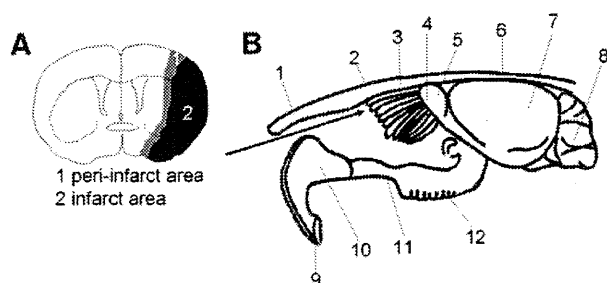


FIG. 1. (A) The peri-infarct area. Peri-infarct area (gray) and infarct core (black). (B) Anatomy around the olfactory bulb. 1: nasal bone. 2: forehead bone. 3: ethmoid bone. 4: olfactory nerve area. 5: olfactory bulb. 6: forehead bone. 7: cerebrum. 8: cerebellum. 9: incisor teeth. 10: incisive bone. 11: maxilla bone. 12: molar teeth. The arrow displays the passage of nasal administration.