

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11662

研究課題名(和文) ヒト頬脂肪体由来幹細胞を細胞源とする分化誘導神経細胞による下歯槽神経の再生

研究課題名(英文) Regeneration medicine of inferior alveolar nerve using differentiated neural cells derived from buccal fat pad stem cells

研究代表者

田中 彰 (TANAKA, AKIRA)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授

研究者番号：60267268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト頬脂肪体由来幹細胞を細胞源として分化誘導した神経系細胞を用いて、下歯槽神経損傷、麻痺の改善を目的とした神経再生を行った。

ヒト頬脂肪体由来幹細胞から神経分化誘導した細胞の性質評価を行い、神経系細胞へと分化誘導されることを確認した。コラーゲンビーズに分化誘導した神経系細胞を付着させて細胞ビーズを作製した。ラット下顎骨内の下歯槽神経を切断し、神経切断部に細胞ビーズを移植したところ、ガングリオン様の神経節細胞として生着した。また、神経分化誘導時の培養上清を採取し、下歯槽神経結紮ラットの腹腔内投与を行ったが、非投与群と有意な差は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下顎骨を対象とする各種手術において、術後合併症として高頻度に発症する下歯槽神経麻痺・知覚鈍麻は、患者に摂食・構音時の障害や心理的負担を強いることになり、早期の対応が求められる。神経再生の研究としては、iPS細胞を細胞源とした検討や移植細胞の血液神経関門、移植部への神経細胞の定着などの問題から臨床応用は困難とされる。本研究では、感染、免疫、倫理的に問題のない自己細胞を用いて安心して行える治療を検討するため、ヒト頬脂肪体由来幹細胞より分化誘導した神経系細胞を細胞源とした下歯槽神経損傷、麻痺の改善を目的とする神経再生賦活を試みた。臨床応用が可能になれば、根本的治療として大きな意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：This study was to develop nerve regeneration therapy for inferior alveolar nerve disorder using the neural cells differentiated from human buccal fat pad stem cells.

We demonstrated that human buccal fat pad stem cells differentiated into neurons. Cell beads were prepared using neural cells induced from human buccal fat pad stem cells. We cut the inferior alveolar nerve in the mandibular canal, transplanted cell beads into the cut-off portion. After transplantation of cell beads, ganglion-like cells were observed in the transplanted area. In addition, the conditioned medium at the time of inducing nerve differentiation was collected and intraperitoneally administered to rats with ligation of the inferior alveolar nerve, but no significant difference was observed from the non-administered group.

研究分野：口腔外科

キーワード：ヒト頬脂肪体組織由来幹細胞 神経分化誘導細胞 神経分化誘導培養上清 下歯槽神経再生 アテロコラーゲンビーズ

1. 研究開始当初の背景

顎顔面口腔領域において下歯槽神経麻痺・知覚鈍麻は、治療（インプラント埋入手術、智歯抜歯、顎変形症に対する顎骨骨切り手術、腫瘍切除術等）の術後合併症として頻度が高く、手術によっては回避不可能な症候である。そして、神経症状が出現した場合には、患者の摂食・構音時の障害や心理的負担は避けられず、薬剤を用いた神経賦活療法・神経節ブロック・理学療法などを長期的に行われるが、完治をみないこともある。一方で、近年、iPS細胞の研究成果および普及により、中枢神経系の神経再生分野は飛躍的に進展しているものの、顎顔面口腔領域での神経傷害の多い末梢神経系での神経再生研究は少ないのが現状である。末梢神経系の神経再生では、細胞移植法として全身的に応用するものが多く、末梢神経系のバリアーシステムである血液神経関門が突破できない問題があり、課題が多いのが現状であった。また、末梢神経の再生では、移植細胞の保持に、神経再生を誘導するコラーゲン製のチューブが臨床応用されているが、下歯槽神経は骨内の下顎管内を走行しており、神経損傷部に、同チューブを適用することは極めて困難であるため、細胞移植時の足場になる材料の検討が必要と考えられていた。

そこで申請者は、血液神経関門を通過させず、末梢神経の損傷部に限局した神経再生法として、局所的な細胞移植法を考案した。研究分担者である石川らは、アテロコラーゲンビーズを用いた三次元的組織培養を行っており、アテロコラーゲンビーズに神経細胞を付着させることで、移植細胞を神経損傷部に自在に適用し、停留させることができると考え、本研究の立案に至った。また申請者は、歯科領域で採取可能な頬脂肪体より分離できる組織幹細胞を用いた神経細胞誘導法の応用と確立をすでに進めている。頬脂肪体組織は他脂肪組織に比較して、口腔内から容易に豊富な量を採取可能で収集率が高く、培養により得られる幹細胞は、細胞源として有用である。とくに発生学的に顎顔面領域の間葉系幹細胞は、神経堤由来細胞を多く含むことから神経系細胞を分化誘導させやすいと考えられ、頬脂肪体由来幹細胞は神経細胞へ分化誘導することを確認している。さらに、分化誘導時の培養上清を用いることができれば、感染や免疫、倫理的にも問題はなく、腫瘍形成のリスクもない再生医療の検討が可能と考えた。

また、下歯槽神経損傷ラットに対して分化誘導した神経系細胞を用いた細胞ビーズの移植および分化誘導中の培養上清の投与を行い、その機能的評価を、研究分担者である佐藤が担当した。

2. 研究の目的

下顎骨を対象とする各種手術において、術後合併症として高頻度に発症する下歯槽神経麻痺・知覚鈍麻は、患者に摂食・構音時の障害や心理的負担を強いることになり、早期の対応が求められる。中枢神経系の神経再生では、iPS細胞を細胞源とした神経細胞の研究が行われているが安全性、効率性の面で課題が残されている。また末梢神経系では、血液神経関門や、移植部への神経細胞の定着などの問題から臨床応用に課題が多いのが現状である。そこで、手術時に、低侵襲かつ同時に容易に採取可能な頬脂肪体組織から分離した体性幹細胞を細胞源として分化誘導した神経系細胞や分化誘導時の培養上清を用いて、下歯槽神経損傷、麻痺の改善を目的とした神経再生を行った。また、新規神経再生治療法の開発を最終目的として本研究を施行した。

3. 研究の方法

(1) ヒト頬脂肪体由来幹細胞より分化誘導した神経系細胞の性質評価

口腔内より採取した頬脂肪体組織よりヒト頬脂肪体由来幹細胞を培養し、幹細胞性や多分化能を有しているか確認後、神経分化誘導を行って得た神経系細胞を、組織形態学的・遺伝子学的に解析した。

(2) 移植実験による評価

ヒト頬脂肪体由来幹細胞より分化誘導した神経系細胞が、下歯槽神経損傷ラットに対して、生着もしくは神経としての機能の有無を検討した。また、細胞移植とは異なるアプローチ法および低侵襲の方法として、培養上清を用いた全身的投与を介した神経賦活の可能性も検討した。

① 細胞ビーズの移植

ヒト頬脂肪体組織由来幹細胞から分化誘導した神経系細胞をアテロコラーゲンビーズに付着させて細胞ビーズを作製し（図 1）、オトガイ孔部で切断した下歯槽神経部から連続する中枢側に形成された骨溝にビーズを移植した。感覚神経回復の差異について、電気的なオトガイ神経刺激による開口反射の有無ならびに顎二腹筋の筋電図を測定して生理学的解析することで機能的評価を予定していたが、困難となったため、Von Frey 式感覚測定キットを用いて評価した。また、移植前後の組織学的解析も行った。

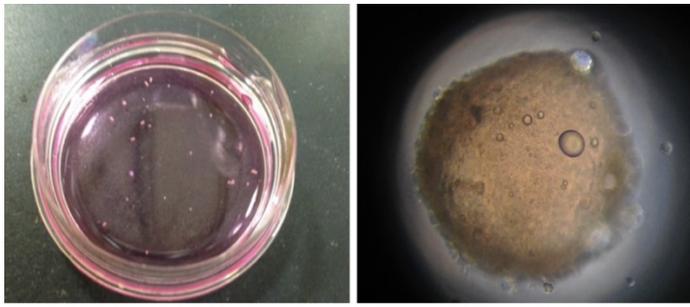


図1 アテロコラーゲンビーズ

② 培養上清の全身投与

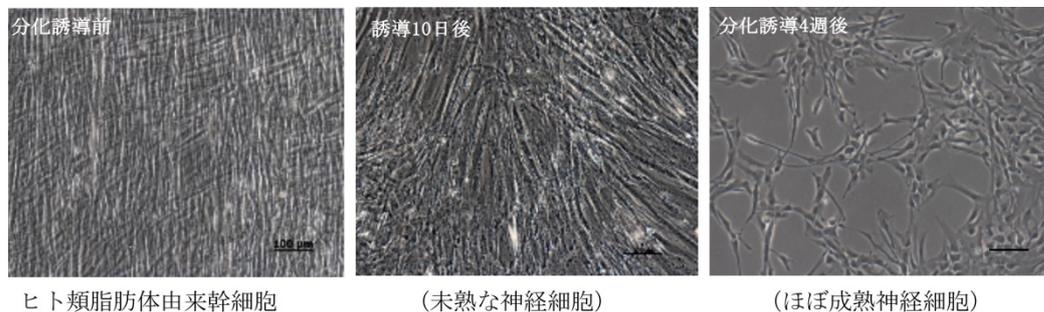
ヒト頬脂肪体組織由来幹細胞から神経分化誘導する過程で生じた培養上清を採取し、下歯槽神経をオトガイ孔部で結紮したラットに腹腔内投与して、組織学的に解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト頬脂肪体由来幹細胞より分化誘導した神経系細胞の性質評価

ヒト頬脂肪体由来幹細胞は多分化能を有し、間葉系幹細胞マーカーの発現を認めることから、幹細胞様の性質を含む細胞であることを確認後に使用した。ヒト頬脂肪体由来幹細胞から分化誘導された細胞は神経細胞様の形態を維持し(図2)、免疫染色およびRT-PCRにおいては神経細胞マーカーである β III tubulinおよびNeurofilament200や、アストロサイトマーカーであるGFAPの発現を認めた。電子顕微鏡像では、軸索様の所見を認め、一方向性に微小管や微小線維が豊富にみられる軸索様の所見やシナプス様構造を認め、神経細胞特有の所見を有していることを確認した。

これらの結果からヒト頬脂肪体由来幹細胞から神経分化誘導した細胞は、神経系細胞であることが同定された。



ヒト頬脂肪体由来幹細胞

(未熟な神経細胞)

(ほぼ成熟神経細胞)

図2 神経分化細胞の位相差顕微鏡像

(2) 移植実験による評価

① 細胞ビーズの移植

アテロコラーゲンビーズに分化誘導した神経系細胞を付着させて細胞ビーズを作製した。ラット下顎骨内の下歯槽神経を切断し、神経切断部に細胞ビーズを移植したところ(図3)、生着を認めた。免疫染色にて生着した移植細胞は、神経細胞マーカーである β III tubulin および Neurofilament200 の陽性反応を認め、ヒト細胞であることも確認したことから、ganglion様の神経細胞として生着したと考えた(図4)。

生理学的評価は、筋電図を応用した評価は困難であり、von Frey 式感覚測定キットを用いて測定した。免疫染色にて神経細胞として生着していると考えられたが、ラットの下顎部(口唇)への von Frey 式フィラメントによる刺激では有効な逃避反応が確認されず、コントロール群との間に有意な差は認められなかった。

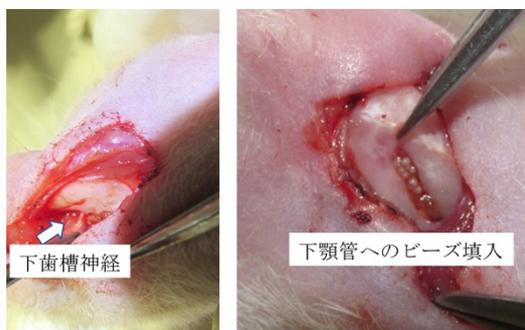
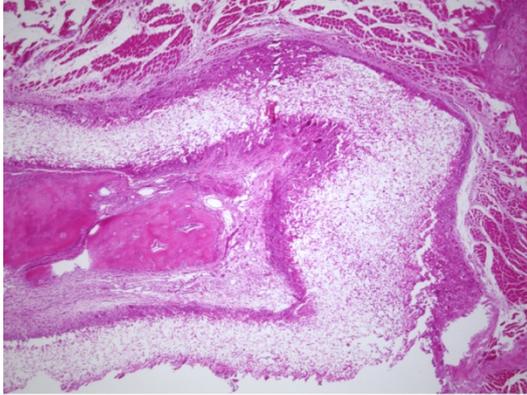


図3 ラット下顎管へのアテロコラーゲンビーズ填入

HE 染色



NF200 染色

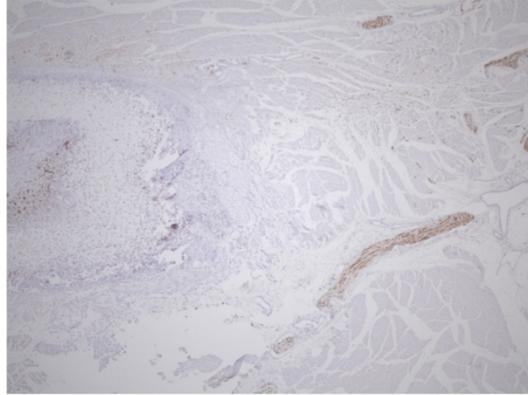


図4 細胞ビーズ移植部位の組織像

② 培養上清の全身投与

神経分化誘導時の培養上清を採取し、下歯槽神経結紮ラットの腹腔内投与を行ったが、2週後に非投与群と組織学的評価にて有意な差は認められなかった。

ヒト類脂肪体組織由来幹細胞から神経分化誘導する過程で生じた培養上清は、神経断裂に至らないシュワン管断裂までの症候には、有効な治療手段として検討に値すると考えているため、今後は、軸索断裂を想定した実験計画を、他期間の効果判定を踏まえて立案し、機能的評価も含めて確認する必要があると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Haruka TAKAHASHI, Miho WATANABE, Junko TOYOMURA, Akihiro OHYAMA, Miyuki HATA-KAWAKAMI, Hiroshi ISHIKAWA, Akira TANAKA
2. 発表標題 Neural spheroid bio-string method using induced differentiated neural cells derived from dental pulp stem cells for neural transplantation to the cutoff portion of inferior alveolar nerve
3. 学会等名 第62回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 義英 (SATO YOSHIHIDE) (20287775)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授 (32667)	
研究分担者	石川 博 (ISHIKAWA HIROSHI) (30089784)	日本歯科大学・生命歯学部・客員教授 (32667)	