

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17222

研究課題名(和文) ヒト組織幹細胞の分化誘導神経細胞を用いたパーキンソン病細胞移植療法の新たな展開

研究課題名(英文) Development of cell replacement therapy for parkinson's disease using differentiated nerve cells derived from human tissue stem cells

研究代表者

高橋 悠 (Takahashi, Haruka)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・助教

研究者番号：90779802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病を対象として、歯科領域で採取可能なヒト組織幹細胞(頬脂肪体由来幹細胞および歯髄幹細胞)を細胞源とした新規の神経再生療法開発を行った。  
ヒト頬脂肪体由来幹細胞および歯髄幹細胞から分化誘導した神経系細胞の性質評価を行い、ドパミン性神経細胞を含んだ神経系細胞へ分化誘導されることが明らかとなった。また、頬脂肪体由来幹細胞より分化誘導した神経系細胞は、電子顕微鏡像にて神経細胞に特有の所見を示した。この神経系細胞を用いて、パーキンソンモデルラットの神経変性部に細胞移植実験を行ったところ、運動症状の改善を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科領域で採取可能な頬脂肪体や歯髄細胞から獲得した幹細胞を使用して、パーキンソン病の新規再生医療の開発を行った。現在、パーキンソン病の細胞移植療法はES細胞や胎生期脳細胞も検討されているが、倫理的な問題が大きく、日本では臨床応用が困難である。またiPS細胞を用いた検討も行われ、ヒトへの応用も進められているが、腫瘍形成リスクはゼロではなく、移植後は定期的な検査が必要とされている。成人組織の幹細胞を使用した再生医療開発を行うことは、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根本治療が可能となり、今後臨床応用が可能になれば、パーキンソン病の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 a new nerve regeneration therapy for Parkinson's disease using human tissue stem cells (buccal fat pad stem cells and dental pulp stem cells) that can be collected in the dental field.

We demonstrated that human buccal fat pad and dental pulp stem cells differentiated into neurons included dopaminergic neurons. In addition, the neural cells differentiated from the buccal fat pad stem cells showed the findings similar to the morphological characteristics of neurons in the electron micrographs. Cell transplantation experiment using the differentiated nerve cells was performed on the neurodegenerative region of the rat model of parkinson's disease, the motor symptoms had improved.

研究分野：口腔外科

キーワード：tissue stem cell parkinson's disease buccal fat pad dental pulp

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、パーキンソン病の細胞移植療法においては、ES細胞や胎生期脳細胞も検討されているが、倫理的問題が大きく、日本では臨床応用が困難である。iPS細胞を細胞源に用いた検討も行われ、ヒトへの応用も進められている。しかし、iPS細胞移植による腫瘍形成リスクはゼロではなく、移植後は定期的な検査が必要とされている。組織幹細胞を細胞源にした細胞移植療法は、臨床的に腫瘍形成リスクが低く、iPS細胞、ES細胞および胎生期脳細胞よりも倫理的・免疫的問題や安全性においても安心である。そこで、申請者は細胞源として成人から採取可能な組織幹細胞に着目した。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、神経疾患に対する細胞移植療法には有用であると考えられる。そのため、口腔内から採取できる組織幹細胞である頬脂肪体由来幹細胞と歯髄幹細胞を細胞源として検討する。

ヒト頬脂肪体由来幹細胞については、既に多くの報告によって、骨、軟骨および脂肪等へ分化する多分化能を有する細胞であることが確認されている。ヒト歯髄幹細胞についても同様に、多分化能を有しており、再生医療に有用であることは既に研究されている。申請者はこれまでの研究成果から、ヒト頬脂肪体由来幹細胞およびヒト歯髄幹細胞のいずれもドパミン性神経細胞を含む神経系細胞への分化誘導が可能であり、移植により動物脳内に生着することを確認した。これらの結果より、分化誘導した神経系細胞を用いて移植実験にて機能的評価を行うことが必要となる。また、各幹細胞からの神経分化誘導結果には個体差があるため、分化誘導した神経系細胞のさらなる解析や、その細胞からパーキンソン病の細胞移植療法にとってより有用となるようドパミン性神経細胞を分離することが必要と考える。

### 2. 研究の目的

歯科領域で採取可能なヒト組織幹細胞(頬脂肪体由来幹細胞および歯髄幹細胞)を細胞源とした新規の神経再生療法開発を目的とする。対象として、パーキンソン病への検討を考えている。パーキンソン病は、中脳にある黒質のドパミン性神経が変性脱落するために線条体でドパミン不足をきたし、錐体外路性運動障害が出現する神経変性疾患であり、現在は薬物による対症療法が主な治療法である。そのため、根本的な治療法として細胞移植療法の検討が進められている。この細胞移植療法の細胞源として、さまざまな細胞が検討されているが、申請者は発生学的に神経堤由来の細胞が多いヒト頬脂肪体幹細胞およびヒト歯髄幹細胞を考えた。ヒト頬脂肪体由来幹細胞および歯髄幹細胞から分化誘導した神経系細胞をパーキンソンモデル動物の脳内神経変性部に移植し、機能的・組織形態学的に評価する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 幹細胞から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およびヒト歯髄幹細胞を培養し、神経分化誘導を行って得た神経系細胞を組織形態学的・遺伝子学的に解析する。とくにパーキンソン病の治療で必要とされるドパミン神経細胞を有しているか確認する。

#### (2) 細胞移植実験による評価

片側パーキンソンモデルラットは、黒質から線条体への神経束を有する内側前脳束(MFB)への神経毒である6-hydroxydopamine(6-OHDA)投与により作製する。マイクロインジェクションカニューレを用いて、固定していた位置で、脳内神経変性部(MFB)にヒト頬脂肪体由来幹細胞およびヒト歯髄幹細胞から分化誘導した神経系細胞を移植し、4週後に機能的評価と組織学的評価を行う。機能的評価としては、移植前後にドパミン受容体作用薬であるアポモルフィンを腹腔内投与し、モデルラットの回転数を計測し、運動症状の有無を確認する行動評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 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とヒト歯髄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とヒト歯髄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、免疫染色においては神経細胞マーカーである 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。また、ドパミン神経細胞マーカーである TH を発現する細胞も認められた。RT-PCR においては、分化された細胞に成熟神経細胞マーカーである NeuN の発現も認められた。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とヒト歯髄幹細胞から神経分化誘導した細胞は、ドパミン神経細胞も含んだ神経系細胞であることが同定された。

tubulin (red) - GFAP (green)

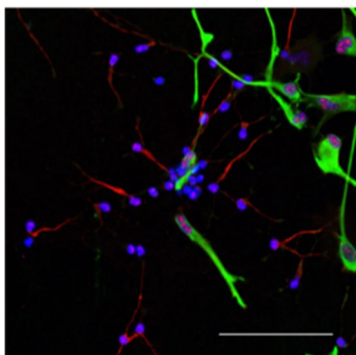


図1 ヒト頬脂肪体由来幹細胞から分化誘導した神経系細胞の免疫染色像

(2) 細胞移植実験による評価

パーキンソンモデルラットへの神経系細胞移植では、移植4週後において、コントロール群ならびに移植前より、アポモルフィン投与による異常回転数は減少し、有意に運動症状が改善した。移植後に運動症状が消失したラットの脳組織像においては、移植した細胞は生着し、免疫染色によりヒト細胞由来であり、さらに同部位の細胞はドパミン神経細胞を含む神経系細胞であることが示された。また、本研究で移植細胞の腫瘍化は全く認められなかった。

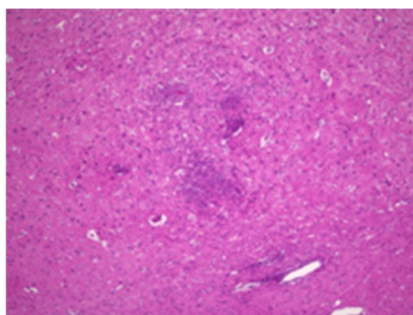


図2 パーキンソンモデルラット脳組織の細胞ビーズ移植部位のHE染色像

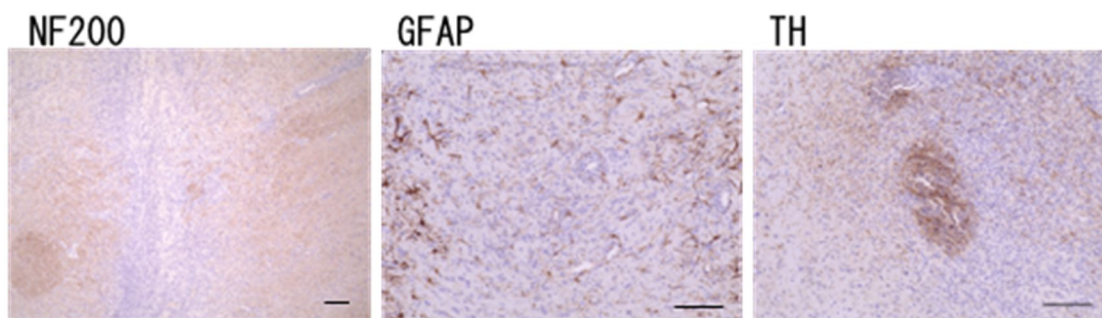


図3 パーキンソンモデルラット脳組織の細胞ビーズ移植部位の免疫染色像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----