

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09450

研究課題名(和文)新規培養法を用いたヒト歯髄・歯肉初代培養由来神経細胞による脳梗塞急性期治療の開発

研究課題名(英文) Development of treatment in acute stroke with neuronal cells derived from primary cell culture of human dental pulp and gingiva

研究代表者

松丸 祐司 (Matsumaru, Yuji)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：70323300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯髄から歯髄幹細胞を作製し、神経系細胞に分化誘導した。神経系細胞は、神経幹細胞、アストロサイト、未熟・成熟神経細胞、オリゴデンドロサイトの中枢神経系細胞のマーカー陽性であった。同細胞は電気的活動があり、VEGF発現が高く、低酸素耐性が強いことを明らかにした。免疫不全マウス脳梗塞モデルによる細胞の直接移植の実験系では、移植した神経系細胞は移植後28日目において脳梗塞病巣に生着しており、移植細胞のアストロサイト、未成熟・成熟神経細胞への分化を確認した。大脳皮質下に移植した神経細胞からホストの脳内への軸索伸長し、神経系ネットワークの構築を行っている可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

智歯等で抜歯を受けたヒト歯髄を用いることで、細胞源の倫理的問題を解決できる。ヒト歯髄から神経幹細胞、神経系細胞を分化誘導する新技術の特許出願(神経系細胞含有製剤の製造方法：特願2019-91625)、PCT出願(神経系細胞集団、神経系細胞含有製剤およびそれらの製造方法：PCT/JP2020/019290)を行い、指定国移行、権利化を行ったことで、今後、新たな歯髄由来の神経幹細胞や神経系細胞を用いた神経系の再生医療が可能になった。これらの研究成果は、学術論文として受理、掲載された。

研究成果の概要(英文)：Dental pulp stem cells were generated from human dental pulp and induced to differentiate into nervous system cells. The nervous system cells were positive for neural stem cells, astrocytes, immature and mature neuronal cells and oligodendrocytes markers of the central nervous system. The cells were electrically active, had high VEGF expression and were hypoxia tolerant. In an experimental system of direct transplantation of cells by an immunocompetent mouse model of cerebral infarction, transplanted nervous system cells were viable in the cerebral infarct lesion at 28 days after transplantation, confirming differentiation of the transplanted cells into astrocytes and immature and mature neuronal cells. We found the possibility of axonal elongation from transplanted neurons in the subcortex into the host brain and the establishment of a neuronal network.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳卒中 再生医療 歯髄 間葉系幹細胞 神経系細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

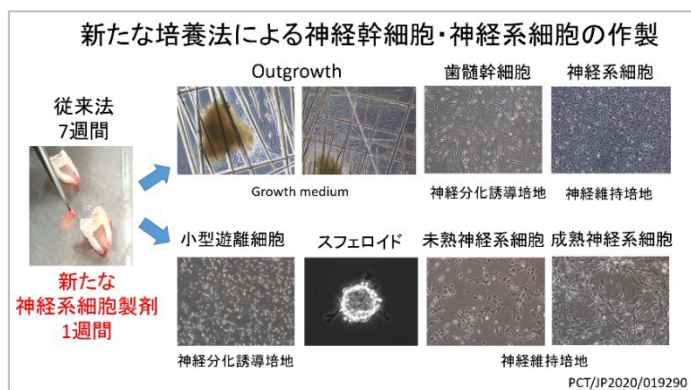
脳梗塞に対する細胞治療研究は、栄養因子などによる保護効果を狙った治療と神経再生や神経血管ユニットの再生を目指した治療がある。しかし、現在行われている細胞治療のほとんどは脳保護効果を期待したものであり、神経再生は困難である。神経再生には移植細胞の長期生存・生着が必要である。また、移植時期も先行する脊髄再生研究ではより急性期の移植効果が高いことが示唆されている。他家細胞移植は、保存細胞の使用により急性期移植は可能だが、免疫抑制薬使用、ウイルス感染、腫瘍化や倫理的問題がある。自家移植であればそれらの問題はないが、通常の培養方法では組織採取から移植までに約1.5~2か月かかるため、急性期での自家移植研究はすすんでいない。将来的な、脳梗塞に対する急性期自家移植を見据え、研究代表者らが新規に開発した約1週間で誘導可能なヒト歯髄・歯肉初代培養由来神経系細胞のマウス脳梗塞モデル移植実験を計画する。

### 2. 研究の目的

脳梗塞は急性期、亜急性期、慢性期でそれぞれ主な傷害メカニズムが異なるが、虚血およびその後の炎症や浮腫などによる損傷が未完成な時期、すなわち急性期に歯髄・歯肉初代培養由来神経系細胞で治療を行うことで、神経保護効果のみならず、神経細胞への分化、生着による神経血管ユニットの再生を得ることを目的とする。

使用する歯髄・歯肉初代培養由来神経系細胞は約1週間で組織採取から移植まで進められることが本研究の一番の特徴である。この新規法でえられた細胞はiPS細胞由来の神経系細胞とは異なり遺伝子操作の必要はない。またこの細胞は神経堤由来であり、神経系細胞に一度分化誘導した後に誘導物質を取り除いても、神経系細胞に分化した状態を維持し、前駆細胞や幹細胞へと戻らない。すなわち、分化誘導により獲得した神経のフェノタイプ(表現型)が安定していることも我々の誘導法の特徴である。その他、組織採取にあたって、歯髄・歯肉では侵襲が低く、仮に脳梗塞急性期で抗血栓薬を投与し

ていたとしても「抜歯に関するガイドライン 2015年版」で示されているように安全に採取可能である。ましてや歯肉採取はさらに容易である。以上のような臨床への応用可能性の高い細胞を用いた研究をすすめることで、現在欠落している脳梗塞急性期の自家移植という新たな治療ジャンルを開拓する。



### 3. 研究の方法

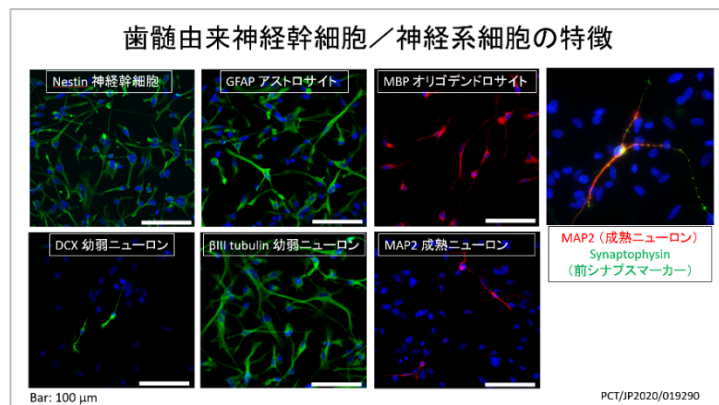
研究代表者らは、神経堤由来のヒト歯髄・歯肉・頬脂肪体の間葉幹細胞から神経系細胞を分化誘導する方法を確立した。さらに口腔内間葉組織から幹細胞の過程を経ないで直接神経系細胞に分化誘導する技術を独自に開発した。

本研究では、開発したヒト歯髄・歯肉初代培養由来神経系細胞を免疫不全マウスの脳梗塞モデルへ直接脳内移植し、治療効果、細胞の生着、細胞の分化を評価した。

1. 免疫不全マウス脳梗塞モデルおよび移植  
ローズベンガルの光応答性を利用した中大脳動脈永久閉塞モデルを作製し、7日後に定位脳内直接細胞移植を行った。緩衝液投与群、sham群をコントロールとした。
2. 至適移植量の決定  
細胞数としては  $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$  個/2 $\mu$ l とする。至適移植量は後述する神経所見や脳梗塞の大きさ、脳萎縮の程度を参考に決定した
3. 神経症状、脳梗塞範囲、脳萎縮の評価  
神経症状としては前肢の左右での使用頻度の差(シリンダーテスト)や前肢に付着した粘着テープを剥がすまでの時間(アドヒーズテスト)などで経時的評価を行った。移植後 4 週間で脳梗塞の大きさや対側脳と比べた罹患大脳半球の萎縮程度を評価した。
4. 生着率の評価  
ヒト由来の移植細胞の生着に関してはヒト HLA 抗体あるいはヒトミトコンドリア抗体で免疫染色して確認した。
5. 神経細胞への分化の評価  
ヒト HLA 抗体あるいはヒトミトコンドリア抗体と  $\beta$ 3tubulin(未成熟神経細胞マーカー)や NeuN(成熟神経)の二重染色で移植細胞の神経細胞への分化を確認した。
6. 神経血管ユニット構造の評価  
移植細胞と血管内皮(CD31)、アストロサイト(GFAP)、ミクログリア(Iba1)、神経細胞(NeuN)との解剖学的関係を免疫染色で評価した。

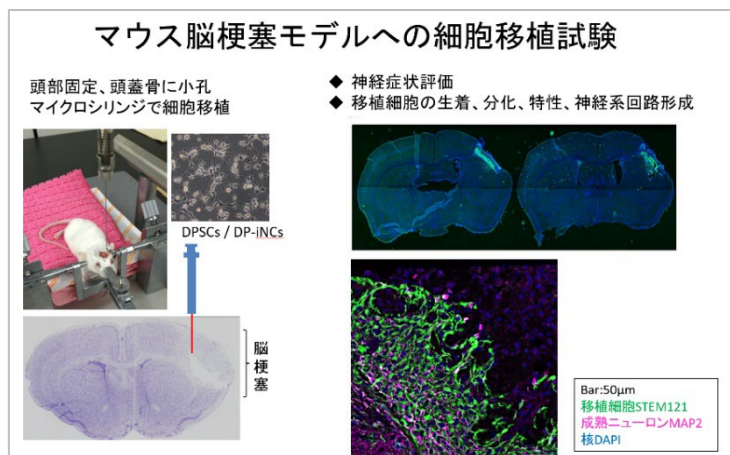
#### 4. 研究成果

智歯等で抜歯を受けたヒト歯髄から歯髄幹細胞を作製し、神経系細胞に分化誘導した。得られた歯髄幹細胞は、間葉系幹細胞のポジティブマーカーが陽性、ネガティブマーカーであるが陰性であった。また、免疫染色では幹細胞マーカーである Nanog, Oct4, Sox2 が陽性であり、間葉系幹細胞の特徴を有していることが示された。



歯髄幹細胞が骨、軟骨、脂肪に分化誘導可能であり、多能性を持つことが示された。歯髄幹細胞から分化誘導した神経系細胞は、Nestin、GFAP、MBP に加え、

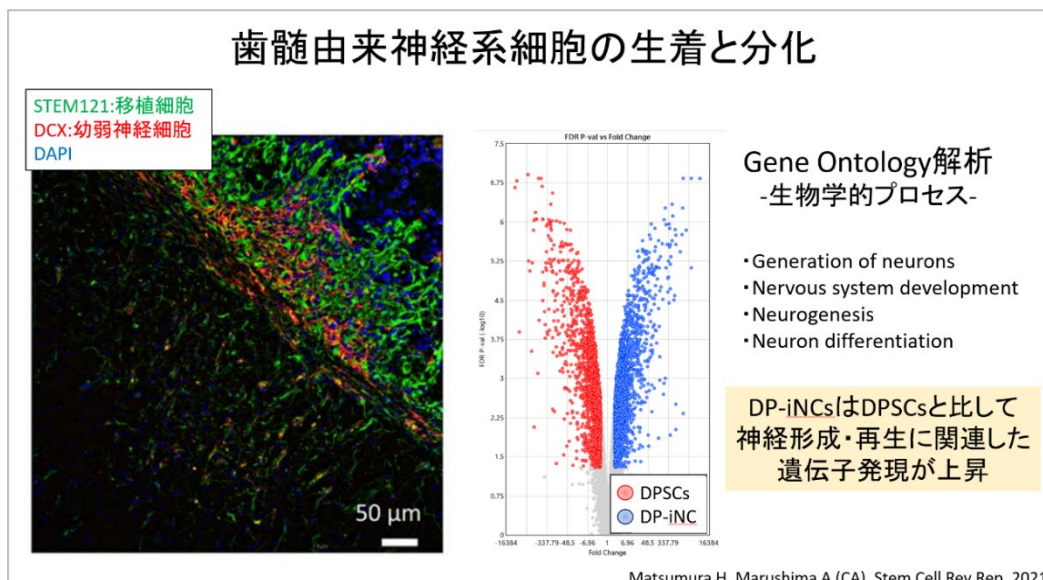
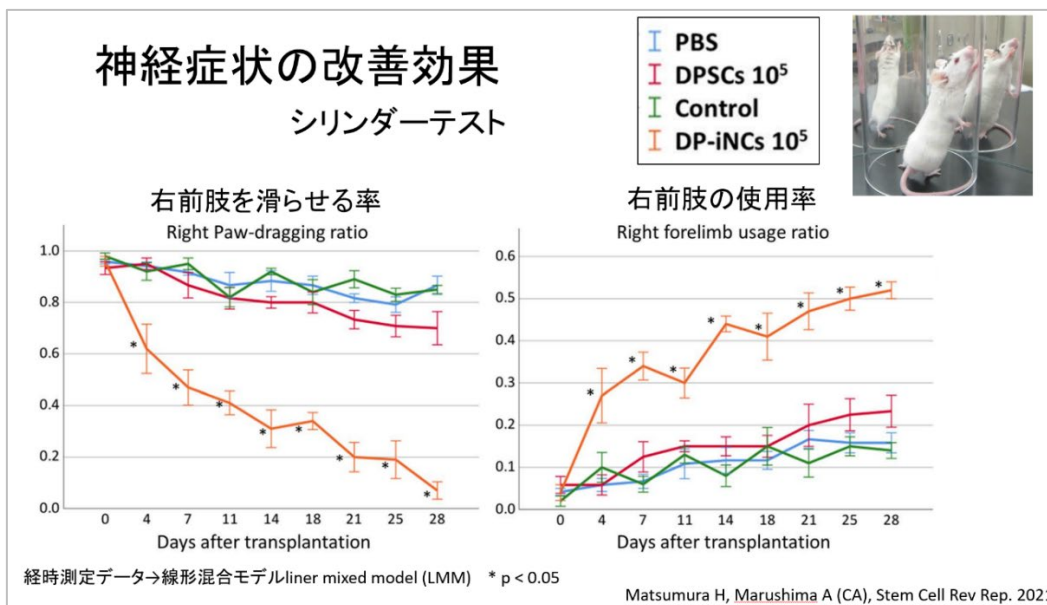
doublecortin、 $\beta$  III tubulin、MAP2 や Synaptophysin が陽性であり、神経幹細胞、アストロサイト、未熟・成熟神経細胞、オリゴデンドロサイトなど複数の中枢神経系細胞のマーカー陽性であった。同細胞は電気的活動があり、VEGF 発現が高く、低酸素耐性が強いことを明らかにした。また、免疫不全マウス脳梗塞モ



デルによる細胞の直接移植の実験系を確立し、至適移植細胞数を確定、脳梗塞病巣内の移植細胞生着、分化、神経症状の改善効果を明らかにした。移植した神経系細胞は移植後 28 日目において脳梗塞病巣に生着しており、移植細胞のアストロサイト、未成熟・成熟神経細胞への分化を確認し、また、大脳皮質下に移植した神経細胞からホストの脳内への軸索伸長、及び逆行性神経軸索トレーサーにより移植細胞から伸長した軸索がホストの脳内神経回路に組み込まれたことを明らかにした。

上述の研究で得られた歯髄から神経幹細胞、神経系細胞を分化誘導する新技術の特許出願し（神経系細胞含有製剤の製造方法：特願 2019-91625）、JST 支援による PCT 出願（神経系細胞集団、神経系細胞含有製剤およびそれらの製造方法:PCT/JP2020/019290）を行い、指定国移行を行った。これらの研究成果は、学術論文として受理、掲載された。

Matsumura H, Marushima A(CA), Ishikawa H, Toyomura J, Ohyama A, Watanabe M, Takaoka S, Bukawa H, Matsumura A, Matsumaru Y, Ishikawa E. Induced Neural Cells from Human Dental Pulp Ameliorate Functional Recovery in a Murine Model of Cerebral Infarction. Stem Cell Rev Rep. 2022 Feb;18(2):595-608. doi:10.1007/s12015-021-10223-w.



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsumura Hideaki, Marushima Aiki, Ishikawa Hiroshi, Toyomura Junko, Ohyama Akihiro, Watanabe Miho, Takaoka Shohei, Bukawa Hiroki, Matsumura Akira, Matsumaru Yuji, Ishikawa Eiichi	4. 巻 18
2. 論文標題 Induced Neural Cells from Human Dental Pulp Ameliorate Functional Recovery in a Murine Model of Cerebral Infarction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reviews and Reports	6. 最初と最後の頁 595 ~ 608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12015-021-10223-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Kentaro, Matsumaru Yuji, Kimura Kazumi, SKIP Study Investigators	4. 巻 325
2. 論文標題 Effect of Mechanical Thrombectomy Without vs With Intravenous Thrombolysis on Functional Outcome Among Patients With Acute Ischemic Stroke	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JAMA	6. 最初と最後の頁 244 ~ 244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1001/jama.2020.23522	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akimoto Taisuke, Ito Yoshiro, Akutagawa Kazuki, Sato Masayuki, Hayakawa Mikito, Marushima Aiki, Takigawa Tomoji, Tsuruta Wataro, Kato Noriyuki, Suzuki Kensuke, Uemura Kazuya, Yamamoto Tetsuya, Matsumaru Yuji	4. 巻 -
2. 論文標題 Perioperative and long-term complications following therapeutic internal carotid artery occlusion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Interventional Neuroradiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/15910199221095786	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Onuma Kuniyuki, Yanaka Kiyoyuki, Tsukada Atsushi, Nakamura Kazuhiro, Matsumaru Yuji, Ishikawa Eiichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Intracranial varix of the transverse-sigmoid dural arteriovenous fistula mimicking a ruptured middle cerebral artery aneurysm: A case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surgical Neurology International	6. 最初と最後の頁 103 ~ 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.25259/SNI_79_2022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 WATANABE Noriyuki, MARUSHIMA Aiki, HINO Tenyu, MINAMIMOTO Shinya, SATO Masayuki, ITO Yoshiro, HAYAKAWA Mikito, SAKAMOTO Noriaki, ISHIKAWA Eiichi, MATSUMURA Akira, MATSUMARU Yuji	4. 巻 9
2. 論文標題 A Ruptured Aneurysm in Aplanic or Twig-like Middle Cerebral Artery: A Case Report with Histological Investigation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NMC Case Report Journal	6. 最初と最後の頁 7~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/jns-nmc.2021-0276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 HAYAKAWA Mikito, MATSUMARU Yuji, YAMAGAMI Hiroshi, SATOW Tetsu, IIHARA Koji, SAKAI Nobuyuki, JR-NET investigators	4. 巻 60
2. 論文標題 Trends in Endovascular Reperfusion Therapy for Acute Stroke after Introduction of Mechanical Thrombectomy Devices: Japanese Registry of NeuroEndovascular Therapy (JR-NET)3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 191~201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.oa.2019-0267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abe Arata, Ota Takahiro, Ueda Masayuki, Amano Tatsuo, Shigeta Keigo, Matsumaru Yuji, Shiokawa Yoshiaki, Hirano Teruyuki	4. 巻 29
2. 論文標題 Tokyo Metropolitan Stroke Emergency Medical Services for Interventional Stroke Treatment: The Tama-REGistry of Acute Thrombectomy (TREAT) Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 104752~104752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104752	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hosoo Hisayuki, Tsuruta Wataro, Hamada Yusuke, Katsumata Masahiro, Ishigami Daiichiro, Ishikawa Eiichi, Matsumaru Yuji, Matsumura Akira	4. 巻 26
2. 論文標題 Retrograde three-dimensional rotational angiography: A novel method for the detection of plaque protrusion during carotid artery stenting under continuous distal balloon protection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Interventional Neuroradiology	6. 最初と最後の頁 316~320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1591019919900821	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imamura Hirotooshi, Sakai Nobuyuki, Matsumoto Yasushi, Yamagami Hiroshi, Terada Tomoaki, Fujinaka Toshiyuki, Yoshimura Shinichi, Sugiue Kenji, Ishii Akira, Matsumaru Yuji, Izumi Takashi, Oishi Hidenori, Higashi Toshio, Iihara Koji, Kuwayama Naoya, Ito Yasushi, Nakamura Masato, Hyodo Akio, Ogasawara Kuniaki	4. 巻 neurintsurg~2020
2. 論文標題 Clinical trial of carotid artery stenting using dual-layer CASPER stent for carotid endarterectomy in patients at high and normal risk in the Japanese population	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of NeuroInterventional Surgery	6. 最初と最後の頁 16250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/neurintsurg-2020-016250	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 SAKAI Nobuyuki, UCHIDA Kazutaka, IIHARA Koji, SATOW Tetsu, EZURA Masayuki, HYODO Akio, MIYACHI Shigeru, MIYAMOTO Susumu, NAGAI Yoji, NISHIMURA Kunihiro, TOYODA Kazunori, YOSHIMURA Shinichi, IMAMURA Hirotooshi, SAKAI Chiaki, MATSUMARU Yuji, Japanese Registry of Neuroendovascular Therapy (JR-NET) investigators	4. 巻 59
2. 論文標題 Japanese Surveillance of Neuroendovascular Therapy in JR-NET - Part II. Japanese Registry of NeuroEndovascular Treatment 3. Main Report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 106 ~ 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.oa.2018-0267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Pierot Laurent, Jarayaman Mahesh, Szikora Istvan, Rowley Howard A., Sanelli Pina C., Tampieri Donatella, Brouwer Patrick, Fiehler Jens, Kocer Naci, Vilela Pedro, Rovira Alex, Fischer Urs, Caso Valeria, van der Wort Bart, Sakai Nobuyuki, Matsumaru Yuji, et al.	4. 巻 46
2. 論文標題 Standards of Practice in Acute Ischemic Stroke Intervention International Recommendations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques	6. 最初と最後の頁 269 ~ 274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/cjn.2019.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松丸祐司、早川幹人、石川栄一
2. 発表標題 血行再建術で認知機能は改善するか？
3. 学会等名 第5回日本脳神経外科認知症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松丸祐司
2. 発表標題 血栓回収療法の現在、そして未来
3. 学会等名 第80回日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松丸祐司
2. 発表標題 血管撮影システム、治療環境等に関して
3. 学会等名 第37回日本脳神経血管内治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松丸祐司
2. 発表標題 MPCポリマーShieldテクノロジー
3. 学会等名 脳血管内治療ブラッシュアップセミナー2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松丸祐司、佐藤允之、早川幹人、細尾久幸、伊藤嘉朗、丸島愛樹
2. 発表標題 脊髄硬膜動静脈瘻とその類縁疾患
3. 学会等名 第50回日本脳卒中の外科学会学術集会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 松丸祐司
2. 発表標題 急性期脳梗塞治療 地域連携の取り組みと今後の展望
3. 学会等名 第25回日本脳神経外科救急学会 2020.2.7-8 (川越) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松丸祐司、佐藤允之
2. 発表標題 脳動脈瘤治療新規デバイスのこれから
3. 学会等名 第26回日本血管内治療学会総会 2020.7.10-11 (名古屋) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松村英明、丸島愛樹、石川 博、大山晃弘、豊村順子、渡邊美穂、高岡昇平、武川寛樹、石川栄一、松村 明、松丸祐司
2. 発表標題 ヒト歯髄から分化誘導した神経系細胞をマウス脳梗塞モデルに移植する再生医療の基礎実験
3. 学会等名 第63回日本脳循環代謝学会学術集会 2020.11.13-14 (横浜、口演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松村英明、丸島愛樹、石川 博、大山晃弘、豊村順子、渡邊美穂、高岡昇平、武川寛樹、石川栄一、松丸祐司
2. 発表標題 ヒト歯髄から分化誘導した神経系細胞をマウス脳虚血モデルに移植する再生医療の基礎実験
3. 学会等名 第79回日本脳神経外科学会総会 2020.10.15-17 (岡山、口演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸島愛樹, 石川栄一, 井上貴昭, 松丸祐司
2. 発表標題 脳梗塞に対する新規治療の開発 血栓回収療法時代のアンメットメディカルニーズと医薬品開発戦略
3. 学会等名 第63回脳循環代謝学会2020.11.13 (横浜、JSNETシンポジウム)(招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 神経系細胞含有製剤の製造方法	発明者 丸島愛樹, 石川博, 大山晃弘, 豊村順子, 松丸祐司, 松村英明, 他4	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-091625	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 神経系細胞集団、神経系細胞含有製剤およびそれらの製造方法	発明者 丸島愛樹、石川博、松村明、武川寛樹、松丸祐司、松村英	権利者 国立大学法人筑波大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/019290	取得年 2021年	国内・外国の別 外国

〔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	石川 博  (Ishikawa Hiroshi)  (30089784)	筑波大学・医学医療系・研究員   (12102)	
研究分担者	丸島 愛樹  (Marushima Aiki)  (40722525)	筑波大学・医学医療系・講師   (12102)	
研究分担者	武川 寛樹  (Bukawa Hiroki)  (80173558)	筑波大学・医学医療系・教授   (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	豊村 順子  (Toyomura Junko)  (80645630)	筑波大学・医学医療系・研究員    (12102)	
研究分担者	大山 晃弘  (Ohyama Akihiro)  (90538232)	筑波大学・医学医療系・研究員    (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関