

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009 ～ 2012

課題番号：21390524

研究課題名（和文）

乳歯・永久歯由来幹細胞バンクの有用性の検討と難治性疾患に対する再生治療研究

研究課題名（英文）Analysis of benefits of dental pulp stem cells from permanent and milk teeth for the treatment of the intractable diseases and of their banking system.

研究代表者

上田 実（UEDA MINORU）

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00151803

研究成果の概要（和文）：

細胞バンク技術の開発により、骨再生はもとより、これまで治療が困難と考えられていた脳梗塞、脊髄損傷、劇症肝炎などの難治性疾患の急性期に、凍結保存した歯髄幹細胞を必要に応じて解凍し、迅速に患部へ移植する、または、その無血清培養上清を投与することが可能となった。また、それらの難治性疾患に対し、乳歯・永久歯由来幹細胞移植、または、歯髄幹細胞由来の無血清培養上清を投与すると劇的に病態が改善する事も見いだした。本研究結果より、細胞バンクの有用性とそれを活用した難治性疾患急性期における乳歯・永久歯由来幹細胞移植、及び歯髄幹細胞無血清培養上清投与の有効性が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

According to the development of the cell banking technology, we established a system that allows to quickly prepare dental pulp stem cell for transplantation into the diseased area. Furthermore, we found remarkable therapeutic benefits of serum free conditioned media (CM) of the dental pulp stem cells for treatment of the various intractable diseases, including cerebral infraction, severe bone defects, spinal cord injury and fulminant hepatic failure. Our study demonstrate a marked advantage of newly developed cell banking system and therapeutic benefits of the dental pulp stem cells and their CMs for treatment of the multiple refractory diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2012年度	1,900,000	570,000	2,470,000
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：再生医学

科研費の分科・細目：歯科再生

キーワード：歯髄幹細胞、セルバンク、再生医療、難治性疾患治療

1, 研究開始当初の背景
近年、再生医療は失われた組織、臓器に対す

る治療法として注目を集め、臓器ドナー不足等の問題を抱えている移植治療に代替する

医療としてめざましい発展の一途をたどっている。再生医療の重要な因子である“細胞”に関しては、ヒトES細胞、さらに人工多能性幹細胞(iPS細胞)が発見され、究極の万能細胞と期待されているが、社会的、倫理的問題、安全性などの点から臨床への実用化までに時間を要するのが現状である。現在、体性幹細胞、中でも間葉系幹細胞が有効であると考えられており、その供給源として骨髄や臍帯血などが検討されている。申請者らはこれまでに骨髄由来未分化間葉系幹細胞(MSCs)を応用し、骨再生技術を開発している。この再生技術は、臨床応用へと実用化されており、適応症としてはインプラント、顎裂部、骨延長部、歯周病等が挙げられ、良好な結果を得ている。このように組織工学、再生医療を実際に臨床応用まで行い、良好な結果を得ている研究は世界的に見てもほとんど見受けられない。しかし、骨髄は加齢に伴い幹細胞数が減少することや、骨髄穿刺が患者への負担になること、症例によっては採取できない等の問題を抱えている。また、臍帯血に関しては、間葉系幹細胞の存在頻度が低いことや、分娩から細胞採取までの時間や臍帯血量に影響を受けやすいことから、効率や確実性に劣る。そこで、申請者らは、再生医療に用いる細胞供給源として、医療廃棄物とされている乳歯歯髄及び永久歯(智歯など)に着目した。近年、歯髄には間葉系幹細胞である歯髄幹細胞が存在すると報告されている。また、特に乳歯歯髄幹細胞は、永久歯歯髄幹細胞と比較して増殖能が高いことが示されており、より未分化な細胞源になり得る。そこで、歯髄組織より多能性を有する幹細胞を単離し、将来起こりうる組織障害に対する再生医療の細胞供給源として細胞を利用、保存するシステムを確立することを目的とする。また、同種移植の可能性についても検討し、歯槽骨

など顎顔面領域の組織再生はもとより、難治性全身疾患に対する再生医療の細胞供給源として、応用・実用化することを目指す。

2, 研究の目的

難治性疾患に対しては、臓器移植、胚性幹細胞(ES細胞)の応用が考えられているが、移植医療は臓器不足により停滞を示し、ES細胞による臨床応用は倫理的ハードルから時期を待たざるをえない。再生医療も臨床応用されているものも散見される中で、歯槽骨の再生医療は臨床応用においても良好な結果を示し、実用化段階にある。しかし、幹細胞源については、患者負担などの面で検討すべきことも多く、難治性疾患への応用も臨床応用が待たされているにすぎない。そこで、本申請では、“乳歯、あるいは、不要となった永久歯”に着目した。元来、乳歯は永久歯への交換に伴いその生体内での役割を終えて、脱落・廃棄されるものとされてきた。しかし、近年その乳歯の歯髄組織中に、高い増殖能を示し、多分化能を有する幹細胞の存在が報告された。そこで、申請者らは、この乳歯及び永久歯歯髄より幹細胞を分離・培養した後、冷凍保存することにより、将来、骨・軟骨・神経等の難治性疾患に対する細胞治療への利用という形で合理的に有効活用することを発案した。本研究では、歯髄幹細胞の効率的かつ安全な分離・培養・保存方法の確立、そして種々の全身疾患への応用について検討し、新規再生医療システムの開発を目的とする。

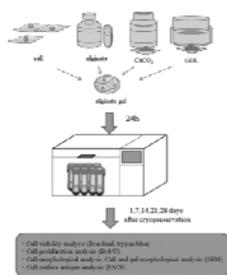
3, 研究方法

(1) 細胞バンキング技術の最適化

幹細胞を患者の治療ニーズに合わせて増やし、細胞機能を発揮しやすい三次元的スキャホールドに埋め込む操作は、大掛かりで、効率が悪く、急性疾患などに対応するのが難しい。われわれは、歯髄幹細胞の凍結とスキ

キャホールド（封入材料）の最適化を試みた。最適化が達成できれば、凍結保存した歯髄幹細胞を必要に応じて解冻し、迅速に患部へ移植できるようになる。スキャホールドとしては移植安全性、安価、生体内分解性、操作の容易性の要件を満たすアルジネートを用いた。凍結条件を評価する指標は、①解冻後の細胞生存率、②細胞増殖活性、③SEM像による細胞形態の変化、④フローサイトメトリーによる細胞表面マーカーの発現変化とした。

（倫理面への配慮）本研究におけるヒト組織の取り扱いについては、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得て、口腔外科外来で医療廃棄物となった脱落乳歯や永久歯親知らずから、患者の同意を得て採取した。ヒト歯髄幹細胞の採取および管理は、ヘルシンキ宣言、厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する倫理指針」に従って行った。動物実験は、名古屋大学医学部の動物実験ガイドラインに従った。また、採取した歯髄幹細胞を、脳梗塞モデル動物に移植、また、歯髄幹細胞から得られた無血清培養上清を骨欠損モデル動物、



及び、劇症肝炎モデル動物に投与し、治療効果を検証した。

(2) 脳梗塞モデル動物への幹細胞移植治療効果の検討

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。脳梗塞発症後、24時間でハミルトンシリンジにて歯髄幹細胞(1×10^6 個)を移植した。コントロールとして生理食塩水(PBS)を同様に投与した。梗塞16日後に屠殺した試料において、梗塞領域を評価し、また、運動麻痺スコアの変化をLekerらの運動麻痺ス

コアを若干改変し、評価した(表1)。スコアは、最小を0点、最大を10点とした。計測時期は梗塞後1, 3, 6, 9, 12, 15日とした。また、神経細胞、神経幹細胞、神経前駆細胞をdoublecortin(DCX)、neurofilament(NF)、NeuNで、血管内皮細胞をRECA-1の抗体を用

表1 運動麻痺スコアの評価基準

評価基準:
1. 尻尾をもってもち上げたとき、麻痺側の下肢を突っ張らない(1点)
2. 麻痺側の下肢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さらに傾く(1点)
4. 歩行させても歩けない(1点)
5. 50 cmの門のなかから
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. 麻痺側の下肢に上方向の抵抗を加えると突っ張らない(1点)
6-2. 麻痺側の下肢に前方向の抵抗を加えると突っ張らない(1点)
6-3. 麻痺側の下肢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。

いて脳梗塞部位を免疫組織化学染色にて評価を行った。

(3) 幹細胞培養上清由来成長因子による骨・歯周組織再生能の検討

骨髄幹細胞培養上清に含まれる成長因子に着目し、幹細胞培養上清(以下MSC-CM)の移植により、血管新生を促し内在性幹細胞を遊走させ、骨・歯周組織再生を促す新たな骨再生医療の確立を目的とした。

MSC-CMに含まれるサイトカインをELISAにより定量化した。ラットMSCにMSC-CMを添加し、Migration assayにて遊走能を、リアルタイムRT-PCRにて骨形成関連遺伝子の発現を評価した。また血管内皮細胞を用いて血管新生の評価を行った。MSC-CMをラット頭蓋骨骨欠損モデルに移植し、 μ CTと組織学的手法により評価した。さらに生体内でのラットMSCの動態を蛍光in vivo imagingと免疫組織化学的手法により評価した。また、MSC-CMを犬歯周病モデル(一壁性骨欠損モデル)に移植し組織学的手法により評価した。

骨・歯周組織再生能の検討

(4) ヒト歯髄幹細胞由来無血清培養上清(以下SHED-CM)による難治性肝疾患の治療効果の検討

著しい肝障害を誘発する D-galactosamine 溶液を Sprague-Dawley rat (200~250g) に腹腔内投与する (1.2g/kg)。24 時間後に採血し、AST, ALT 値の測定にて肝障害の誘導を評価。同時に SHED-CM、骨髄幹細胞由来無血清培養上清 (以下 BMSC-CM)、脂肪幹細胞由来無血清培養上清 (以下 ADSC-CM) を静脈内投与し、病態改善を検証した。

① 生存率解析と血液検査

治療介入しない場合や細胞培養培地 (DMEM) 投与群の処置後 1 週間生存率は 20%程度であった。治療介入による生存率や肝障害 (AST, ALT 値の測定) の変化を検証した。

② 病理学的解析

劇症肝炎患者の肝臓では、広範な肝細胞死が認められる。肝細胞死は、HE 染色、TUNEL 染色、また、肝臓組織再生に関与する肝幹細胞の活性を、Ki-67、DLK1、AFP、CK19 抗体染色により評価を行った。また、クッパー細胞を CD68 抗体にて検出し、M1、M2 マクロファージの動態を iNOS, CD206 などのマーカーで解析した。

③ 遺伝子発現解析

M1 が産生する炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β)、および M2 が産生する抗炎症性サイトカイン (IL-10、TGF- β 、VEGF) の発現をリアルタイム QPCR 法にて解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞バンキング技術の最適化

① スキャホールドの最適化

ゲルの均一性と封入された細胞の生存率を指標として評価した結果、三つの試薬 2% アルジネート : 100mM CaCO₃ : 200mM glucono- δ -lactone を 1~6 : 1 : 1 の割合で混合することにより、アルジネートの良好なゲル化が得られ、細胞生存率も向上した。

② 凍結保護材の最適化

解凍後の歯髄幹細胞の生存率と SEM 像を指

標として評価した結果、細胞の状態が最も良かったのは、10%EG/ 1M Su/ 0.75mM PVP であった。細胞表面抗原の発現や細胞増殖率に大きな変化は検出されなかった。

(2) 脳梗塞モデル動物への幹細胞移植治療効果の検討

梗塞 16 日後に屠殺した試料において、コントロールの PBS 投与群と比較し、歯髄幹細胞移植群で有意に梗塞領域の縮小が認められた。運動麻痺スコアの変化は、PBS 投与群と比較して歯髄幹細胞移植群で有意に運動麻痺の回復が認められた。また、神経細胞、神経幹細胞、神経前駆細胞は歯髄幹細胞移植群において梗塞部位で増加し、血管内皮細胞も歯髄幹細胞移植群で増加していた。歯髄幹細胞移植群により梗塞領域の神経および血管の再生が促進されたことが示唆された。以上のことから、歯髄幹細胞を用いた脳梗塞治療の有効性が明らかになった。

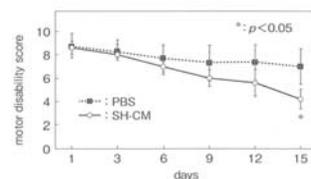


図 2 運動麻痺スコアの比較
PBS 投与群と比較して SH-CM 投与群で、有意に運動麻痺の回復が認められた。スコアは表 1 参照。

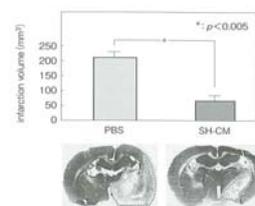


図 1 脳梗塞領域の計測
脳梗塞 16 日後に屠殺した試料において左はコントロールの PBS 投与群、右は SH-CM 投与群で、SH-CM 投与群では有意に梗塞領域の縮小が認められる。

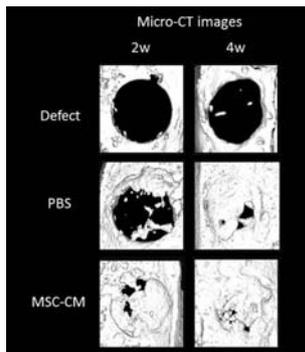
(3) 幹細胞培養上清由来成長因子による

骨・歯周組織再生能の検討

MSC-CM には IGF-1 や VEGF 等のサイトカインが含まれ、ラット MSC の遊走能を有意に増加させ骨形成関連遺伝子の発現を有意に上昇させた。また VEGF とほぼ同等の血管新生能をもつことが確認された。ラットへの移植実

験では細胞移植群と比較して有意に大きい骨占有面積が確認され、移植部位における血管新生と細胞の集積が確認された。犬への移植実験で MSC-CM 移植群では歯槽骨及びセメント質の再生が認められた。

当科および関連施設では院内倫理委員会の承諾を得て、インプラント外科における骨増生や歯周疾患を対象に臨床研究を開始している。



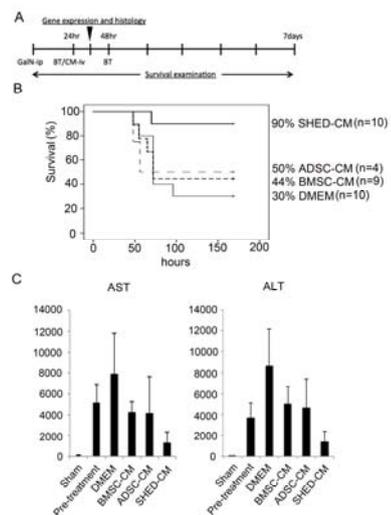
(4) ヒト歯髄幹細胞培養上清由来成長因子による難治性肝疾患の治療効果の検討

D-galactosamine (1.2g/kg) 溶液を Sprague-Dawley rat (200~250g) に、腹腔内投与すると著しい肝障害が引き起こされ、1週間生存率が 30%以下に低下することを確認した (DMEM, n=10)。劇症肝炎発症後 24 時間における、肝細胞傷害の示標値は、AST=6000U/L, ALT=4000U/L であった。

SHED-CM は、劇症肝炎の発症後 24 時間で頸静脈から静注すると、SHED-CM 静注群においてのみ劇的に病態が改善された。1週間生存率は 90%であった。SHED-CM 投与後 24 時間

(D-galactosamine 投与から 48 時間後) における AST、ALT はともに 2000U/L 以下であった。一方、や BMSC-CM、ADSC-CM 投与群では病態改善効果が得られなかった。BMSC-CM 投与群の生存率は 40%、AST=5000U/L, ALT=6000U/L、ADSC-CM 投与群の生存率は 50%、AST=5000U/L, ALT=5000U/L であった。また、肝細胞死を HE 染色、及び TUNEL 染色により

評価を行った結果、DMEM 投与群では激しい空砲変性や、多くの TUNEL 陽性細胞 (全肝臓細胞中 20%) を検出した。SHED-CM 投与後 12 時間の組織像は正常肝組織様であった。肝臓組織再生に関与する肝幹細胞の活性を、Ki-67、DLK1、AFP、CK19 抗体染色にて評価した結果、SHED-CM 投与群においてのみ、肝幹細胞活性が促進していた。QPCR による遺伝子解析の結果、DMEM 投与群では、炎症性サイトカインの発現が上昇していたが、SHED-CM 投与群では炎症性サイトカインの発現が抑制され、抗炎症性サイトカインの発現が促進していた。以上の結果より、SHED-CM の劇症肝炎モデルラットへの静脈内投与は、有用な治療手段となることが明らかになった。



5, 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 13 件)

1) M. Osugi, W. Katagiri, R. Yoshimi, T. Inukai, H. Hibi and M. Ueda, "Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects", *Tissue Engineering Part A*, Vol. 18, No. 13-14, (2012), pp. 1479-1489.

(査読有り)

2) E. Umemura, Y. Yamada, S. Nakamura, K. Ito, K. Hara and M. Ueda, "Viable cryopreserving tissue-engineered

cell-biomaterial for cell banking therapy in an effective cryoprotectant”, *Journal of Tissue Engineering*, Part C, Methods (2011). (査読有り)

3) M. Sugiyama, K. Iohara, H. W. H. Hattori, M. Ueda, K. Matsushita, M. Nakashima “Dental Pulp Derived CD31-/CD146- Side Population Stem/Progenitor Cells Enhance Recovery of Focal Cerebral Ischemia in Rats”, *Tissue engineering part A*, (2010)
(査読有り)

[学会発表] (計 13 件)

1) M. Osugi, W. Katagiri, R. Yoshimi, T. Inukai, T. Kawai, H. Hibi and M. Ueda, “Conditioned media from bone marrow derived mesenchymal stem cells and adipose derived stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects”, *3rd TERMIS World Congress*, Vienna, Austria, (5-8 Sep. 2012), pp.283.

2) K. Hara, Y. Yamada, S. Nakamura, Y. Nishino, E. Umemura, T. Inukai, K. Ito, W. Katagiri, M. Ueda, The Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons 55th Congress and Workshop, Award for excellence of oral presentation, “Characterized Studies for SHED Compared to BMMSCs by Genes Profiling” 千葉(幕張メッセ), 18 Oct. 2010.

[産業財産権]

○出願状況 (計 8 件)

1) M. Ueda, H. Hattori, M. Sugiyama, T. Inoue, “Using culture conditioned medium for cerebral infarction and brain regeneration” 61/437,697(US), Jan. 31, 2011.

2) M. Ueda, Y. Yamada, K. Ebisawa, A. Yamamoto, K. Sakai, K. Matsubara, H.

Hattori, M. Sugiyama and T. Inoue, “Composition for treatment of damaged part”, Patent application number WO 2011/118795, 29 Sep. 2011.

3) M. Ueda, A. Yamamoto, K. Sakai, “Dental pulp stem cells derived composites for neuronal disease treatment”, Patent application number 2010-092585(2010).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 実 (UEDA MINORU)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00151803

(2) 研究分担者

山本 朗仁 (YAMAMOTO AKIHITO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50244083

田中 光郎 (TANAKA MITUROU)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：0143596

國貞 隆弘 (KUNISADA TAKAHIRO)

研究者番号：30205108

(3) 連携研究者

なし