

## 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：2010 ～ 2012

課題番号：22390372

研究課題名（和文）

歯髄幹細胞による中枢神経組織再生

研究課題名（英文）

Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can regenerate central nervous system

研究代表者

山本 朗仁 (YAMAMOTO AKIHITO)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50244083

研究成果の概要（和文）：歯髄幹細胞の性状解析を行い神経系譜に近い性状を示す細胞集団であることを明らかにし、歯髄幹細胞を効率的にドーパミン神経細胞に分化誘導することに成功した。歯髄幹細胞を用いた神経再生医療の実現を目指し、脊髄損傷、脳室周囲白質軟化症、パーキンソン病治療への歯髄幹細胞移植による治療効果を検証した。歯髄幹細胞は骨髄間葉系幹細胞を遥かにしのぐ神経再生効果を発揮する間葉系幹細胞であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We have characterized the multi-differentiation potency, phenotypic marker expression and transcriptome profile of dental pulp derived stem cell from adult wisdom teeth (DPSC) and exfoliated deciduous teeth (SHED). The data showed that both SHED and DPSC expressing multiple neural lineage markers are able to differentiate neuron, astrocyte, oligodendrocyte, osteoblast, adipocyte and chondrocytes. Furthermore, we have optimized the protocol allowing a specific differentiation of SHED and DPSC to tyrosine hydroxylase expressing dopaminergic neurons. In pre-clinical analysis, we have found remarkable therapeutic benefits of SHED and DPSC for treatment of spinal cord injury, hypoxic brain injury and Parkinson's disease. In addition to their remarkable neuro-regenerative activities, we did not observe the malignant transformation of engrafted SHEDs 8 weeks after their implantation. SHEDs and DPSCs can be obtained from exfoliated deciduous and impacted adult wisdom teeth without adverse health effects. Thus, there are few ethical concerns regarding their clinical use. We propose that tooth-derived stem cells may be an excellent and practical cellular resource for the treatment of various CNS diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
2011年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2012年度	2,000,000	600,000	2,600,000
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：顎顔面外科学

科研費の分科・細目：再生歯科

キーワード：神経再生、歯髄幹細胞、性状解析、脊髄損傷、低酸素脳症、パーキンソン病

## 1. 研究開始当初の背景

昨今、ヒト胎児やES細胞、iPS細胞由来の神経幹細胞を用いた細胞移植治療が難治性神経疾患の治療法として認識されているが、倫理性や安全性に大きな問題を抱えており、実用的な“幹細胞源”については今も模索状態である。医療廃棄物であるヒト乳歯歯髄幹細胞 (SHED) や智歯由来の永久歯歯髄幹細胞 (DPSC) は、移植における安全性が高く、倫理的問題も極めて少ない、実用的な“幹細胞源”である。歯髄幹細胞の移植が難治性神経疾患治療に有用であることが明らかとなれば、極めてユニークかつ重要な「医療廃棄物の有効利用のモデルケース」を提示するとともに、低侵襲・安全性の高い自己幹細胞を用いた再生医療の実現に貢献が期待できる。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、低侵襲で採取可能かつ移植安全性の高い自己幹細胞である歯髄幹細胞を用いた再生医療の実現を目指すことであり、難治性神経疾患治療への歯髄幹細胞応用の可能性を検討し、臨床実用化への道を開拓することである。

(2) ヒト乳歯歯髄幹細胞 (SHED) や智歯由来の永久歯歯髄幹細胞 (DPSC) は、1) 低侵襲で採取可能な体性幹細胞集団であること、2) 神経堤由来の細胞集団、すなわち神経系譜に近い性状を持つ幹細胞集団であるため神経細胞への分化誘導に高い反応性を示すこと、3) 自己由来の成体幹細胞を採取可能であること、4) 幹細胞の性状維持に外部からの遺伝子導入は不要であること、などの特性から、移植における安全性が高く、倫理的問題も極めて少ない、実用的な“幹細胞源”である。

(3) 本研究では、①いまだ未知の部分が多い歯髄幹細胞の神経系譜への分化能を詳細に解析し、難治性神経疾患への応用の基盤データを得る、②移植治療に必要な神経細胞などを、高効率で再現性良く、高品質を保ちながら簡便に用意できる方法を確立する、③難治性神経疾患モデル動物を作成し、歯髄幹細胞から誘導した神経細胞の移植治療の有効性・機能回復効果および安全性の検討を行う、という3点を目的とし、実用化可能な治療法確立のための基盤データを得る。本研究では脊髄損傷、脳室周囲白質軟化症、パーキンソン病をターゲットとし、疾患モデル動物を用いた移植治療効果の検討を行う。最終的にはヒトにおける歯髄幹細胞を用いた難治性神経疾患の治療法の確立に貢献することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### 2010年度

歯髄幹細胞の神経分化能の検討：未分化な歯

髄幹細胞と分化誘導した歯髄幹細胞とで、神経分化を評価し得るマーカー分子の発現を特異的抗体で検出した。また、マイクロアレイ解析にて骨髄間葉系幹細胞と歯髄幹細胞の性状を比較検討した。

### 2011年度

脊髄損傷モデルへの細胞移植治療効果の検討：ラットの脊髄を第10頸椎レベルで完全切断し、切断部にSHEDを移植した。移植後はBBBスコアにて下肢運動機能を評価した。さらに、歯髄幹細胞の神経再生効果の詳細を組織化学的に検証した。

### 2012年度

(1) 脳室周囲白質軟化症モデルへの細胞移植治療効果の検討：新生児マウスの片側中大脳動脈を結紮し永久梗塞モデルを作製。その後、低酸素チャンバーで20分間インキュベート。梗塞部にSHEDを移植した。組織学的に梗塞領域を評価した。

(2) 歯髄幹細胞のドーパミン神経分化誘導方法の確立：歯髄幹細胞をドーパミン神経細胞に分化誘導し、効率的な誘導方法を模索した。歯髄幹細胞を低酸素下で培養し、PCRで遺伝子的評価を行った。分化誘導の添加因子を5種類試し、効率的な分化誘導方法を模索した。分化誘導効率の評価はTH陽性細胞の割合で評価した。

(3) パーキンソンモデルへのドーパミン神経分化誘導 SHED の移植治療効果の検討：ラットの右側線条体に6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA) を注入し、ドーパミン神経細胞を特異的に破壊してパーキンソン病様症状を誘発した。その後線条体にドーパミン神経細胞に分化誘導したSHEDを移植し、神経症状の評価をメタンフェタミン誘発回転数の測定で行った。

## 4. 研究成果

### 2010年度

#### 歯髄幹細胞の神経分化能の検討

名古屋大学倫理委員会の承認を得て、口腔外科外来患者から得たヒト乳歯歯髄幹細胞 (SHED) や智歯由来の永久歯歯髄幹細胞 (DPSC) の性状解析を細胞染色やフローサイトメトリー、マイクロアレイを用いて解析を行った (Fig. 1)。SHED、DPSC 共に90%以上の歯髄幹細胞が神経幹細胞・幼弱神経細胞・アストロサイト・未成熟オリゴデンドロサイトのマーカーを共発現していた。その一方で、成熟型神経細胞や成熟オリゴデンドロサイトのマーカーは発現していなかった。このことから、歯髄幹細胞は神経細胞のみならず、アストロサイトやオリゴデンドロサイトへの分化能も持ち合わせた、未成熟状態にある、ユニークな細胞集団であることが見出され

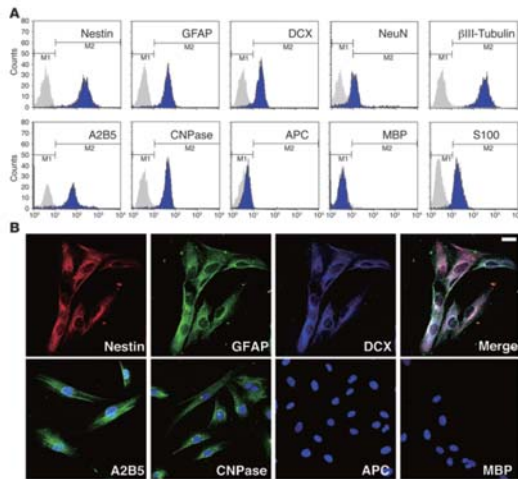


Fig. 1 SHED の細胞染色とフローサイトメトリーによる性状解析

た。また、マイクロアレイによる解析にて、SHED が細胞外・細胞表面分子や細胞増殖分子を、骨髄間葉系幹細胞 (BM) と比較し 2 倍以上発現する活発な細胞であることを見出した。(Fig. 2)

Functional gene classification in SHEDs versus BMSCs

Term	Changed gene up	Total gene	P
Extracellular region	343	2,865	$2.52 \times 10^{-14}$
Skeletal system development	104	661	$1.46 \times 10^{-6}$
Extracellular matrix	101	678	$9.20 \times 10^{-6}$
Extracellular space	147	1,134	$2.00 \times 10^{-6}$
Extracellular matrix organization	43	195	$4.86 \times 10^{-6}$
Multicellular organismal development	643	6,683	$9.36 \times 10^{-8}$
Collagen fibril organization	20	57	$4.97 \times 10^{-7}$
Anatomical structure morphogenesis	346	3,339	$9.52 \times 10^{-7}$
Mitotic cell cycle	146	1,184	$1.11 \times 10^{-6}$
Proteinaceous extracellular matrix	82	578	$1.36 \times 10^{-6}$
Organ morphogenesis	144	1,182	$2.43 \times 10^{-6}$
Vasculature development	98	732	$3.76 \times 10^{-6}$
Embryonic morphogenesis	96	728	$7.04 \times 10^{-6}$
Cell proliferation	245	2,288	$7.17 \times 10^{-6}$
Cell cycle	230	2,135	$9.74 \times 10^{-6}$
Blood vessel development	93	707	$1.31 \times 10^{-5}$
Response to wounding	191	1,738	$2.02 \times 10^{-5}$
Receptor protein serine/threonine kinase signaling	56	369	$2.12 \times 10^{-5}$
M phase of mitotic cell cycle	77	567	$2.40 \times 10^{-5}$
Cell surface	86	671	$3.26 \times 10^{-5}$
Organ development	362	3,675	$3.68 \times 10^{-5}$
Collagen binding	21	90	$3.90 \times 10^{-5}$
Glycosaminoglycan binding	42	262	$4.65 \times 10^{-5}$
Mitotic spindle organization	12	33	$7.15 \times 10^{-5}$
Cell adhesion	183	1,693	$7.76 \times 10^{-5}$
Skeletal system morphogenesis	42	260	$8.16 \times 10^{-5}$
Tissue development	185	1,720	$8.76 \times 10^{-5}$
Cell surface receptor linked signaling pathway	368	3,785	$8.98 \times 10^{-5}$
Mitosis	73	554	$9.98 \times 10^{-5}$
Regulation of cell cycle	127	1,103	0.000109

Fig. 2 マイクロアレイによる遺伝子解析

### 2011 年度

#### ラット脊髄完全切断モデルへの歯髄幹細胞移植による治療効果の検討:

脊髄損傷モデルラットの損傷急性期に SHED を移植した。PBS コントロール群では下肢運動機能が完全に麻痺した。一方、SHED 移植群は下肢の運動機能が著しく回復し、3 関節を動かして歩くまでに回復した (Fig. 3)。移植した SHED は切断された軸索の再生を促進し、抗アポトーシス作用により神経を保護

し、オリゴデンドロサイトに分化する等多面的な神経再生効果を発揮した (Fig. 3)。(本研究は Snyder, E. Y., & Teng, Y. D. Stem cells and spinal cord repair. The New England journal of medicine, 2012. において特筆すべき研究成果として紹介された)

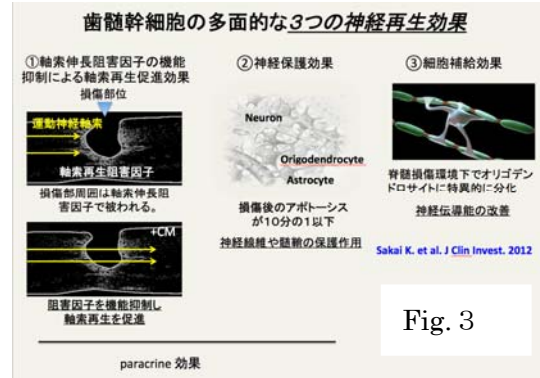


Fig. 3

### 2012 年度

#### (1) 脳室周囲白質軟化症モデルへの細胞移植治療効果の検討:

低酸素虚血傷害部に SHED を移植した。SHED 移植群は脳の組織構造が維持されており、病理学的にも治療効果を確認した。また、SHED がパラクライン効果で治療を促進するか検証するため SHED の無血清培養上清 (SHED-CM) を細胞移植と同様の手法で脳内に注入した。

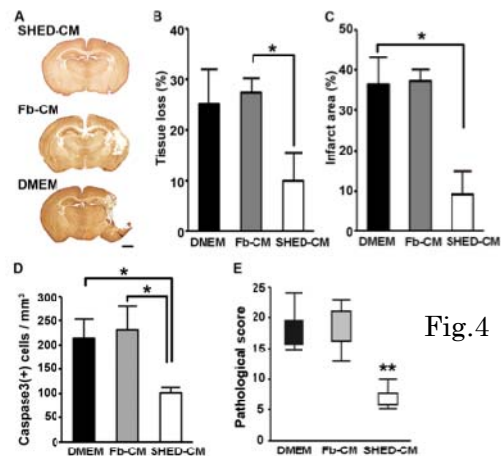
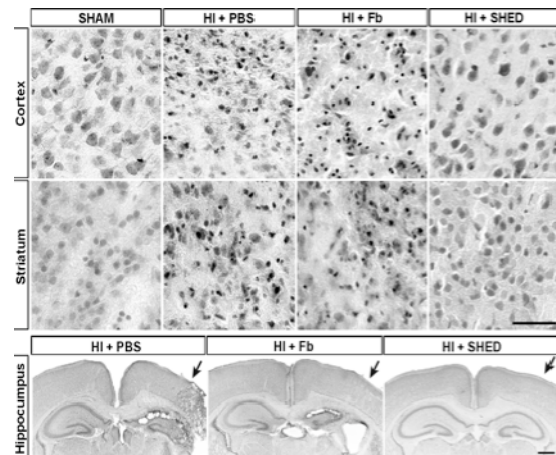
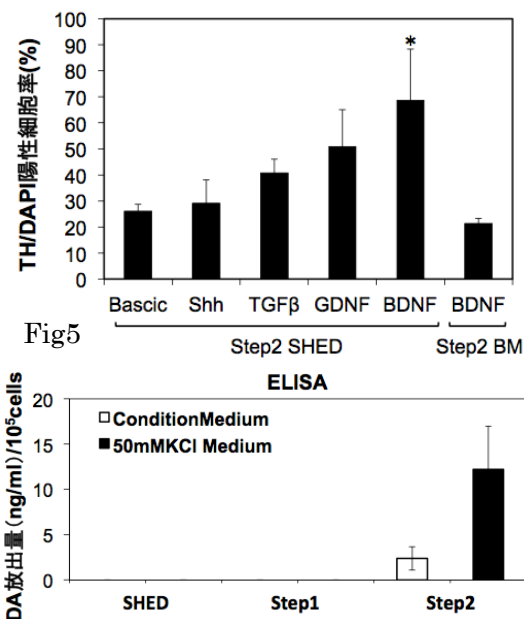


Fig. 4

SHED-CM 投与群も SHED 移植群と同様に脳の組織構造の維持、梗塞領域の縮小、神経細胞死の抑制効果を発揮した (Fig. 4)。

## (2) 歯髄幹細胞のドーパミン神経分化誘導方法の確立:

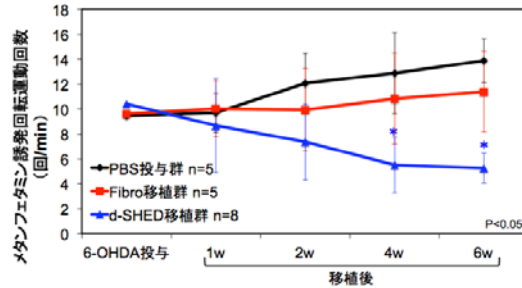
歯髄幹細胞を 2 段階でドーパミン神経細胞に分化誘導した。誘導後ドーパミンの産生マーカーの TH (チロシン水酸化酵素) の発現細胞が高率に誘導できた。また、ドーパミン神経細胞が発生の過程で発現する遺伝子の発現を認めた。さらに、1%の低酸素下で培養することにより、分化誘導した歯髄幹細胞の生存率の向上を認めた。分化誘導の添加因子としては、有用と思われる 5 種類を試し、SHED と骨髄間葉系幹細胞 (BM) で分化誘導効率を比較した。その結果、BDNF を step2 で添加する方法が最も効率的で、7 割を超す細胞が TH 陽性となった。骨髄間葉系幹細胞の場合も BDNF を添加する方法が最も効率的であったが、分化誘導効率は SHED と比べ優位に劣っていた。また、ドーパミン神経分化誘導 SHED のドーパミンの分泌能を ELISA で評価した。培養液中にドーパミンの分泌を認め、KCl 刺激により多量の分泌を認めた。(Fig. 5)



以上の結果から、我々は SHED のドーパミン神経細胞への効率的な分化誘導方法を確立したと言える。しかし、このドーパミン神経分化誘導 SHED にパッチクランプを行ったところ、活動電位の発生に必須な電位依存性 Na チャネルの発現が認められず、電位依存性 K チャネルの発現もわずかであった。今後は分化誘導方法を再検討し、電気生理学的にも神経細胞として機能する分化誘導方法の確立を目指す。

## (3) パーキンソンモデル動物への細胞移植の有効性・機能回復効果・安全性の検証:

パーキンソンモデルラットの線条体にドーパミン神経分化誘導 SHED を移植した。ドーパミン神経分化誘導 SHED 移植群は移植後 4 週間で回転数が有意に減少し、神経症状の改善を認めた。(Fig. 6)



## 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 5 件)

1) M. Yamagata, A. Yamamoto, E. KAKo, N. Kaneko, K. Matsubara, K. Sakai, K. Sawamoto and M. Ueda

“Human dental pulp-derived stem cells protect against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice”  
Stroke. 2013 Feb, 44(2):551-4  
査読有

2) K. Sakai, A. Yamamoto, K. Katsubara, S. Nakamura, M. Naruse, M. Yamagata, K. Sakamoto, R. Tsuchi, N. Wakao, S. Imagawa, H. Hibi, K. Kadomatsu, N. Ishiguro and M. Ueda

“Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms”  
Journal of Clinical Investigation. 2012 Jan 3, 122(1):80-90  
査読有

[学会発表] (計 20 件)

1) 藤井裕美 山本朗仁 伊藤美佳子 大野欽司 上田実

“ドーパミン作動生ニューロンへ分化させたヒト歯髄幹細胞のパーキンソンモデルへの移植治療効果の検討”  
第 12 回日本再生医療学会総会  
2013 年 3 月 21 日神奈川県パシフィコ横浜

2) 山形まり 山本朗仁 松原弘記 酒井清 上田実

低酸素虚血脳傷害モデルマウスに対する歯

髄幹細胞移植の治療効果  
第33回日本炎症再生学会  
2012年7月5日福岡県ホテル日航福岡

3) 酒井清 山本朗仁 松原弘記 上田実  
“ Engrafted Dental Pulp Stem Cells  
Promoted Functional Recovery of  
Completely Transected Rat Spinal Cord”  
International society for stem cell  
research 9<sup>th</sup> annual meeting  
2011年6月10日カナダ トロント

〔図書〕（計1件）

上田実、他、朝倉書店、歯学系 再生医療叢書、  
2012. 11. 30 208 ページ

〔産業財産権〕

出願状況（計2件）

- 1) 発明の名称：歯髄幹細胞を用いた神経疾患治療用組成物  
種類：特願  
番号：2010-092585  
出願年月日：2010/4/13
- 2) 発明の名称：歯髄幹細胞の培養上清を用いた中枢神経疾患治療用組成物  
種類：特願  
番号：2011-037028  
出願年月日：2011/2/23

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本朗仁 Akihito Yamamoto  
名古屋大学 医学系研究科 准教授  
研究者番号：50244083

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし