

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593007

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞を用いた新しい末梢神経麻痺の根治的治療法の開発

研究課題名(英文) Effect of dental pulp stem cells for the peripheral nerve paralysis

研究代表者

栗田 賢一 (Kurita, Kenichi)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：40133483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではラット坐骨神経麻痺モデルにおいて、ヒト歯髄幹細胞移植によって形態学的解析により末梢神経再生が明らかとなった。また、ヒト歯髄幹細胞は多くの神経栄養・血管新生因子を発現し、*in vivo*においてシュワン細胞への直接分化を認めず、シュワン細胞の近傍に存在していた。これにより、ヒト歯髄幹細胞はシュワン細胞に対する神経栄養効果により末梢神経再生を促進している可能性が示唆された。また、歯髄幹細胞はシュワン細胞に対する増殖・遊走効果や、細胞の抗アポトーシス効果により末梢神経再生を促進している可能性も示された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that transplantation of dental pulp stem cells accelerated the healing of the injured peripheral nerve in the rat sciatic nerve defect model by morphological analyses. Dental pulp stem cells (DPSCs) expressed several neurotrophic/angiogenic factors both *in vivo* and *in vitro*. In addition, direct differentiation of DPSCs into Schwann cells was not shown *in vivo*. Transplanted DPSCs localized in the vicinity of the residual Schwann cells. Thus, these results suggest trophic effect of DPSCs on remaining/newly migrated Schwann cells, including enhanced proliferation and chemotaxis of Schwann cells and anti-apoptosis of adjacent cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：歯髄幹細胞移植 栄養因子 シュワン細胞

1. 研究開始当初の背景

末梢神経障害は口腔領域においては、外傷や炎症、腫瘍等の疾病および抜歯、下顎枝矢状分割術、唾液腺摘出等の各種手術操作などに伴って起こり、これによる QOL の低下で悩みを抱えている患者は少なくない。その治療法として、現在ではその神経損傷の程度に応じて投薬治療、神経縫合・移植、神経ブロック、ソフトレーザー等の治療が行われているが、有効な治療法が確立されておらず、その損傷状態によっては治療後も完全な回復が見込めない場合があり、画期的な治療法の開発が急がれている。

我々のグループでは、以前より歯の延命化を目指して、深い蝕や歯髄炎において歯髄を再生する新しい蝕・歯髄炎治療法の技術開発を進めてきた。まず、ブタあるいはヒト歯髄組織から血管新生・神経誘導能に優れた幹細胞 CD31-SP 細胞を分取し、in vivo にてマウス下肢虚血モデルに移植すると、血流を劇的に回復し血管新生を促進することを明らかにした。次に、ラット脳虚血モデルを作製して歯髄幹細胞を 24 時間後に移植すると、神経前駆細胞の増殖および神経細胞の分化が促進され、運動麻痺が劇的に回復した。これにより歯髄幹細胞は中枢神経の再生能も有することが明らかとなった。さらにこの歯髄幹細胞をイヌの生活歯髄切断面上あるいは抜歯後根管内に移植すると、血管新生および神経再生が促進され、歯髄が完全に再生された。これまで、歯髄幹細胞の神経再生能については、in vitro で乳歯歯髄幹細胞から分化させた神経前駆細胞を脳内に移植すると神経に分化することが知られていた。また、胎生期のトリの中脳に歯髄幹細胞を移植すると神経に分化することも知られていた。しかしながら、in vivo において、歯髄幹細胞そのものを、発生後の成体内に移植して末梢神経を再生させた報告は全くない。よって、血管新生・神経再生能に優れた歯髄幹細胞を末梢神経麻痺に応用する着想に至り、末梢神経麻痺モデルを作成し、歯髄幹細胞の末梢神経再生能、末梢神経麻痺治療への有用性を検討するに至った。

2. 研究の目的

現在、末梢神経完全麻痺の外科的標準治療は神経自家移植術である。しかし、神経採取の代償として移植片採取部位の神経障害を伴うため、これに代わる新たな治療法の開発が期待されている。ラット坐骨神経麻痺モデルへの骨髄、羊膜あるいは脂肪由来幹細胞を同種移植で、神経線維密度や直径などが回復することが知られている。そこで我々のグループは、歯髄幹細胞が骨髄、脂肪幹細胞に比べて高い神経・血管誘導能を有することに着目し、ラット坐骨神経麻痺治療における有用性を検討した。本研究はヒト歯髄幹細胞移植による末梢神経麻痺の新しい再生治療法の開発を目指した前臨床研究を行うことを目

的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯髄幹細胞分取：ヒト抜去歯より歯髄組織を酵素消化し、細胞成分を播種し形成したコロニーを分離・培養。さらに 2 代目で膜分取法にて歯髄幹細胞を分取、培養した。

(2) シュワン細胞に対するヒト歯髄幹細胞培養上清 (CM) の影響検討

1) ヒト歯髄幹細胞 CM の採取

2) シュワン細胞に対する CM の効果検討

増殖促進作用 (Tetra Color One)

抗アポトーシス効果：staurosporine
でシュワン細胞のアポトーシスを誘導 (Annexin V)

遊走作用 (TAXIScan-FL)

(3) 坐骨神経麻痺モデル作製・歯髄幹細胞移植

1) 坐骨神経麻痺モデル作製：10 週齢 Fischer ラットの左坐骨神経に 5.0 mm の実質欠損を作製

2) 歯髄幹細胞移植：移植前日より免疫抑制剤 (0.05 mg/kg/day) を腹腔内投与。人工神経で 1) の欠損部を再建し、3 群に分類

A 群：ヒト歯髄幹細胞 3.0×10^5 cells を Dil 染色後、希釈コラーゲンに混ぜ、人工神経内に注入

B 群：希釈コラーゲンのみを人工神経内に注入

C 群：自家移植 (180° 反転法)

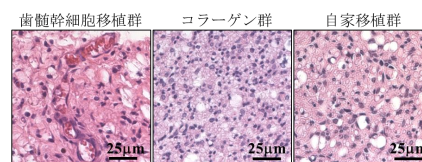
(4) 形態学的解析

術後 3 週で再生神経のパラフィン標本を作製し HE 染色を行った。また 5 週後、再生神経の semi-thin section をトルイジンブルー染色し、神経線維の密度・直径の比較検討。また、電顕用切片にてシュワン細胞の局在を検討。術後 2 週の再生神経の凍結切片にてシュワン細胞を染色し、移植細胞との局在性を検討。移植細胞からの trophic factor の発現を確認。

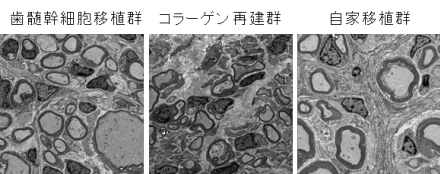
4. 研究成果

術後 1 週間経過後より、歯髄幹細胞移植群は歩行行動の劇的な改善を認めた。

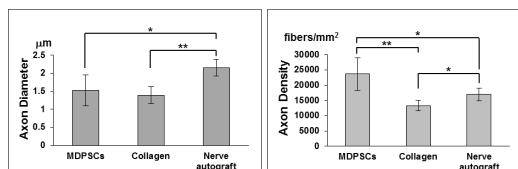
術後 3 週の HE 染色では歯髄幹細胞移植群では血球を伴った高分化の血管構造を多く認めた。一方、コラーゲン群では血管形成はほとんどみられなかった。



電子顕微鏡にて歯髄幹細胞移植群では細胞成分を多く含み、コラーゲン群ではコラーゲン線維や細胞残渣を多く含んだ細胞外マトリックス成分が多くみられた。

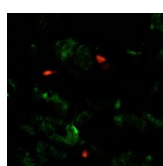


術後5週では、トルイジンブルー染色にていずれの群も有髄神経の再生軸索径および密度に関して統計学的評価を行ったところ、再生軸索の直径は歯髄幹細胞移植群およびコラーゲン群と比較して自家移植群で最も太かった。軸索密度においては歯髄幹細胞移植群が自家移植群より有意に高く、コラーゲン群が最も低かった。神経自家移植群との比較では、歯髄幹細胞移植群の再生軸索直径は細かったが、密度は有意に高かった。



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

また、移植後の歯髄幹細胞の局在を調べるため歯髄幹細胞をDiI標識して移植。2週間後に凍結切片を作製しS-100染色を行ったところ、歯髄幹細胞はS-100陽性のシュワン細胞に直接分化しておらず、S-100陽性シュワン細胞の近傍に存在していることがわかった。



緑：シュワン細胞、赤：歯髄幹細胞

そこで末梢神経再生促進メカニズム解明のため、神経栄養効果を調べた。BDNF, GDNF, NGF, IGF, VEGFの*in situ* hybridizationを実施したところ、上記すべての因子を発現していることがわかった。

*in vitro*において、歯髄幹細胞上清と株化シュワン細胞の共培養を行ったところ、シュワン細胞の増殖が有意に促進され、アポトーシスを有意に抑制した。また、TaxiscanFLを用いて歯髄幹細胞上清による株化シュワン細胞の遊走効果も確認された。

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 1 件)

山本翼、大迫洋平、村上真史、堀部宏茂、林勇輝、庵原耕一郎、奥井伸幸、平田仁、栗田賢二、中島美砂子：歯髄幹細胞がもたらす末梢神経麻痺細胞治療の新たな可能性. *Peripheral Nerve* 24(2): 436-437, 2013.

〔学会発表〕(計 4 件)

山本翼、栗田賢二、堀部宏茂、中島美砂子：歯髄幹細胞による末梢神経麻痺細胞治療の新たな可能性 第58回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会 福岡 2013年10月11日

山本翼、大迫洋平、村上真史、堀部宏茂、林勇輝、庵原耕一郎、奥井伸幸、平田仁、栗田賢二、中島美砂子：歯髄幹細胞がもたらす末梢神経麻痺細胞治療の新たな可能性 第24回日本末梢神経学会学術集会 新潟 2013年8月23日

山本翼、大迫洋平、村上真史、堀部宏茂、林勇輝、庵原耕一郎、栗田賢二、中島美砂子：歯髄幹細胞がもたらす末梢神経麻痺細胞治療の新たな可能性 第137回日本歯科保存学会秋季大会 広島 2012年11月22日

山本翼、栗田賢二、堀部宏茂、中島美砂子：歯髄幹細胞を用いた新しい末梢神経麻痺根治的治療法の開発 第57回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会 神奈川 2012年10月20日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗田賢一 (KURITA KENICHI)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：40133483

(2) 研究分担者

中島美砂子 (NAKASHIMA MISAKO)
国立長寿医療研究センター・歯科口腔先進
医療開発センター 再生歯科医療研究
部・部長
研究者番号：20207773

平田 仁 (HIRATA HITOSHI)
名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号：80173243

(3) 連携研究者

()

研究者番号：