

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：23701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670654

研究課題名(和文) 脊髄損傷修復作用をもつヒト歯髄由来細胞の特性の解明とその医学的応用

研究課題名(英文) Characterization and medical application of human dental pulp cells for spinal cord injury

研究代表者

古川 昭栄 (Furukawa, Shohei)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90159129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： 以前の研究から、脊髄損傷モデルラットに線維芽細胞増殖因子(FGF2)を投与すると脊髄内在性の間質系細胞の誘導を介し、軸索再生を促し後肢の運動機能が顕著に回復することを明らかにしていた。また、近年、類縁の間質系細胞である歯髄細胞を脊髄損傷モデルに移植すると、同様の治療効果が得られることが報告された。

本研究では、この2つの併用による相乗効果の可能性を検討した。FGF2 処理した歯髄細胞は無処理の細胞よりも顕著な移植治療効果を示した。また、治療効果にはドナーによる差を認めた。さらに、FGF2 注入と歯髄細胞の移植はそれぞれ単独で顕著な治療効果を示したが、2つの併用は効果増強にはつながらなかった。

研究成果の概要(英文)： In previous study, we have revealed that the locomotor function of rats are improved by injection of basic fibroblast growth factor (FGF2) into the spinal cord, immediately after the complete transection, via stimulating the proliferation of resident fibroblast-like cells [FGF2-induced fibroblast-like (FIF) cells]. On the other hand, transplantation of dental pulp cells (DPCs) also improved the locomotor functions: DPCs are derived from mesenchymal stem cells as FIF cells. In this study, we investigated the possibility whether both treatments would provide additive and/or synergistic effects on the function recovery. The effect of the DPCs on the locomotor function was improved when the cells were treated with FGF2 before transplantation. Further investigations revealed that both FGF2 injection and DPCs transplantation are comparable and highly effective for locomotor function recovery: however, additive and/or synergistic effects were not observed in the combinations.

研究分野：神経化学

キーワード：脊髄損傷 細胞移植 FGF2 歯髄細胞

1. 研究開始当初の背景

脊髄に損傷を受けると、運動・知覚機能が失われる。国内の受傷者数6千人/年、患者総数は約11万人である。根本治療法はない。小動物を用いた基礎研究では、1) ES細胞由来細胞、骨髄間質系幹細胞、嗅粘膜グリアの移植(細胞療法)、2) 神経突起伸長を阻害する生体内分子の阻害剤の投与(化学療法)などの効果が報告されている。

すでに、臨床試験に入った療法もあるが、いずれも自然経過以上の効果を確認できるような成果は得られていない。

2. 研究の目的

以前、ラットの脊髄損傷部に塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF2)を注入すると脊髄由来の間質系細胞(FGF2-誘導性線維芽細胞:FIF細胞)が増え、顕著に運動機能が改善することを明らかにした(Kasai et al., *J. Neurotrauma*, 2014)。同等の活性を有する細胞を抽出が容易な組織中に探索する過程で、FGF2に応答性の歯髄由来細胞を移植すると、FIF細胞に匹敵する臨床改善効果を示すことを見出した。FIF細胞と歯髄由来細胞は共通点多いが、組織内での挙動が異なる。FIF細胞は損傷部を埋め尽くし、2次的損傷による組織の空洞化を防ぐ。歯髄由来細胞は空洞化の抑制効果はないが、強力な軸索誘引作用を持つ。本研究では2つの細胞特性を最大限に引き出し、より実効性の高い細胞移植法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究はすべて、岐阜薬科大学・岐阜大学の生命倫理委員会、バイオセイフティー(DNA組換え実験)委員会、動物実験・飼育管理委員会の審査・承認を受けて行った。

(1) ヒト歯髄細胞の調製と管理

本研究で使用した異なるドナー由来の歯髄細胞(dental pulp: 以下、DPXXのように表記する。数字は抽出、調製した歯髄細胞の累積記番号を意味する。)は、岐阜大学医学部において、すべて連結不可能匿名化された上で採取されており、個人情報厳密に守られ、歯髄細胞は厳重に保存されている。

この歯髄細胞の共同研究契約を締結後、譲渡され、実験に用いた。

(2) ヒト歯髄細胞の培養

供与されたヒト歯髄細胞をFGF2含有、あるいは不含基本培地で10cmシャーレで培養した。3-7日に1度1枚から3枚に植え継ぎ、5-6継代したものを移植細胞として用いた。また、一部の移植細胞は継代数の早い段階でレンチウイルスをもちいて、蛍光緑色タンパク質(green fluorescence protein: GFP)遺伝子を導入した。

(3) ラット FIF 細胞の調製と培養

(4)の脊髄損傷モデルの作製法に従って、脊髄を損傷後、FGF2を吻側、尾側部の両方にマイクロインジェクターを用いて注入し、その2日後に損傷部周辺の脊髄組織を摘出し、髄膜を剥離して除いた後、薄切した脊髄組織切片をコラーゲンコートしたシャーレ上に静かに置き、FGF2を含む培地で培養することで、FIF細胞を誘導、10cmシャーレにコンフルエントになった時を0継代とし、3日に一度、3等分して植え継ぎ、3継代目のものを移植実験に用いた。

(4) 脊髄損傷モデルの作製

麻酔下、ラット背部の第10胸椎付近で正中線に沿って、2cmを切開し、脂肪および筋組織を剥離して、脊柱を露出させた。第10胸椎の椎弓を剥離し、鋭利な刃物で第10胸髄を横断的に完全に切断する。

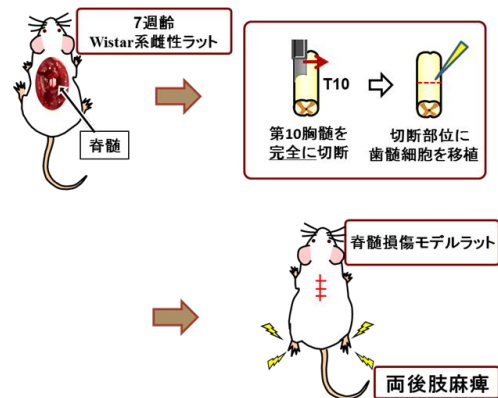


図 脊髄損傷モデルの作製法

(5) 細胞移植: 歯髄細胞の単独移植: (2)の条件下で培養したヒト歯髄由来細胞あるいは(3)の条件で培養したラット FIF細胞を PBS に懸濁し、切断した脊髄の断面に注入(10⁶個/頭)した。FGF2の直接注入とヒト歯髄細胞移植の併用: FIF細胞誘導の時と同様の手法、FGF2を損傷脊髄の実質内に注入し[あるいは調製したFGF2徐放化ハイドロゲルを(メドジェル:添付文書に従う)注入し]、その後細胞を(5)の条件で細胞移植を行なった。

(6) 運動機能評価法: BBB スケール(Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 1995; 12:1-21)に基づいて評価する。第10胸髄の損傷では、ラットは後肢を全く動かさなくなる。このときBBBスケールは0点。また、脊髄の損傷手術を受けていない正常ラットの講師の運動機能をBBBスケールでは21点と評価する。

(7) 組織化学的解析

脊髄完全切断および細胞移植7週後のラットの脊髄組織を再生軸索のマーカー(growth

associated protein: GAP-43)およびアストロサイトのマーカー (glial fibrillary acidic protein: GFAP) を特異的に認識する抗体を用いて免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) 移植歯髄細胞の培養条件およびドナーの違いによる運動機能回復効果: 1種のドナー由来の歯髄細胞 (DP31) を用いて、培養条件の違いが脊髄損傷モデルラットの運動機能回復に及ぼす効果を検討した (FGF2 不含培地で培養した歯髄細胞, DP31S; FGF2 含有培地で培養した歯髄細胞, DP31F)。これらの細胞を脊髄損傷ラットの損傷部に移植したところ、DP31S 移植群では細胞非移植群と同様に顕著な運動機能の回復は認められなかったが、DP31F 群では BBB score 5.0 (平均) まで回復した。同培養法を用いて、HLA 抗原型ハプロタイプホモドナー由来の歯髄細胞を含むドナーの異なる3種の歯髄細胞を培養し移植した (DP31F, DP4F, DP264F, 内 DP74 がハプロタイプホモドナーの歯髄細胞) と、DP264F では運動機能の回復効果が認められなかったが、HHH ドナー由来の DP74F 移植モデルラットでは DP31F 移植群と同様の運動機能回復が見られた (表1)。

表1 脊髄損傷7週後の各群の BBB スコア

control	DP31S	DP31F
0.9±0.2	2.5±0.5	5.7±0.6
	DP74F	DP264F
	4.5±0.7	2.3±0.6

(2) 歯髄細胞を移植したラットの脊髄組織の免疫染色法による解析: 脊髄損傷後7週間を経過したモデルラットの損傷部位を含む脊髄切片を作成し、GFAP と GAP43 に対する蛍光免疫二重染色を行った。対照群、歯髄細胞移植群いずれも吻側、尾側の切断部位が GFAP で縁取りされており、1) 脊髄が過去にこの場所で一旦全切断されたこと、2) その損傷が引き金となってアストロサイトが増殖し、広く損傷部位に集積したこと、を示唆している (アストロ癩痕の形成)。

また、同じドナー由来の移植細胞で比較すると、FGF2 含有培地で培養した DP31F 細胞を移植した群では、損傷部位の中心に GAP-43 陽性の線維状の構造が観察されたが、DP31S 細胞移植群や対照群では GAP43 陽性線維がほとんど認められなかった。

更に、ドナーの異なる歯髄細胞を移植した脊髄組織で比較すると、顕著な臨床改善効果の認められた DP74F 移植群では DP31F 移植群と同様に損傷部位の中心に GAP-43 陽性の線維状の構造が観察されたが、臨床改善効果のない DP264F 細胞移植群では GAP43 陽性線維がほとんど認められなかった。以上のことから、歯髄細胞は顕著な軸索再生を介して、運動機能の改善している可能性が示唆され

た。

(3) FGF2 投与と歯髄細胞移植の併用療法のモデルラットに対する臨床症状改善効果: FGF2 単独の脊髄組織への投与は、ガラスキャピラリーを用いて直接脊髄実質内に注入した場合も、ハイドロゲルを用いて徐放性に投与した場合も、ヒト歯髄細胞移植とほぼ遜色のない運動機能の回復を示した。

一方で、FGF2 投与と歯髄細胞移植を併用しても、BBB スコアはそれぞれを単独で適応した場合と大きな差は認められなかった。また、FIF 細胞と歯髄細胞の両方を移植した際にも促進効果は観察されなかった (表2)。ひとつの可能性として、今回用いた脊髄を完全に切断するモデルでは、治療法によらず、これ以上の臨床症状の改善効果が得られない可能性がある。

表2 脊髄損傷7週後の各群の BBB スコア

FGF2	FGF2+DP31F
5.7±0.66	5.5±0.4

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)

- Shibata S, Inuma M, Soumiya H, Fukumitsu H, Furukawa Y, Furukawa S. A novel 2-decenoic acid thioester ameliorates corticosterone-induced depression- and anxiety-like behaviors and normalizes reduced hippocampal signal transduction in treated mice. *Pharmacol Res Perspect*. 2015 3(2):e00132. doi: 10.1002/prp2.132. (査読あり)
- Yasuda S, Yoshida M, Yamagata H, Iwanaga Y, Suenaga H, Ishikawa K, Nakano S, Okuyama S, Furukawa Y, Furukawa S, Ishikawa T. Imipramine Ameliorates Pain-related Negative Emotion via Induction of Brain-derived Neurotrophic Factor. *Cell Mol Neurobiol*. 34 1196-1208 (2014). (査読あり)
- Toratani A, Soga H, Fukumitsu H, Soumiya H, Furukawa Y, Furukawa S Caffeic acid phenethyl ester ameliorates deep depression- and anxiety-like behaviors of mice exposed to chronic mild stress *J Neurophysiol Neurol Disord* 1: 1-8 (2014). (査読あり)
- Endou M, Aoki H, Kobayashi T, Kunisada T. Prevention of hair graying by factors that promote the growth and differentiation of melanocytes. *J Dermatol*. 41, 716-723,

2014. (査読あり)

5. Tamaoki N, Takahashi K, Aoki H, Iida K, Kawaguchi T, Hatakeyama D, Inden M, Chosa N, Ishisaki A, Kunisada T, Shibata T, Goshima N, Yamanaka S, Tezuka K. The homeobox gene DLX4 promotes generation of human induced pluripotent stem cells. Sci Rep. 2014 4:7283. (査読あり)
6. Ohtsuka M, Soumiya H, Hanai M, Furukawa S, Fukumitsu H. Neurotrophin-3 influences the number and the laminar fate of cortical progenitors in the developing cerebral cortex through the MEK/ERK1/2 signaling pathway. Biomed Res. 2013; 34 (5):231-239 (査読あり)
7. Makino A, Iinuma M, Fukumitsu H, Soumiya H, Furukawa Y, Furuakwa S. Anxiolytic-like effect of trans-2-decenoic acid ethyl ester in stress-induced anxiety-like model mice. Biomed Res. 2013; 34 (5):259-267 (査読あり)
8. Iida K, Takeda-Kawaguchi T, Hada M, Yuriguchi M, Aoki H, Tamaoki N, Hatakeyama D, Kunisada T, Shibata T, Tezuka K. Hypoxia-enhanced Derivation of iPSCs from Human Dental Pulp Cells. J Dent Res. 92, 905-910, 2013. (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 長島 光助、福光 秀文、宗宮 仁美、國貞 隆弘、柴田 敏之、手塚 建一、古川 昭栄 ヒト歯髄細胞の移植による脊髄損傷モデルラットの運動機能回復に関する研究 第 60 回 日本薬学会東海支部会、2014 年 7 月 5 日、鈴鹿
2. 福光 秀文、長島 光助、宗宮 仁美、後 大輔、三輪 高大、柴田 敏之、國貞 隆弘、手塚 建一、古川 昭栄 FGF2 で処理したヒト歯髄細胞の移植による脊髄損傷モデルラットの運動機能回復効果 日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 28 日、神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.gifu-pu.ac.jp/info/organization/list/bunsei>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 昭栄 (FURUKAWA, Shoei)
岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：90159129

(2) 研究分担者

福光 秀文 (FUKUMITAU, Hidefumi)
岐阜薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：00308280

宗宮 仁美 (SOUJIYA, Hitomi)
岐阜薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：20548713

國貞 隆弘 (KUNISADA, Takahiro)
岐阜大学・医学部・教授
研究者番号：30205108

手塚 建一 (TEZUKA, Kenichi)
岐阜大学・医学部・准教授
研究者番号：50236973

柴田 敏之 (SHIBATA, Toshiyuki)
岐阜大学・医学部・教授
研究者番号：50226172