

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670837

研究課題名(和文) 難治性神経疾患の新規治療法開発-歯髄由来幹細胞の新たな生物学的機能-

研究課題名(英文) Therapeutic effect of human dental pulp stem cell on Experimental autoimmune encephalomyelitis.

研究代表者

秋山 謙太郎 (Akiyama, Kentaro)

岡山大学・大学院・講師

研究者番号：70423291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は難治性神経疾患モデルとして広く使用されている実験的脳脊髄炎モデルマウスに対して、ヒト歯髄由来間葉系幹細胞(DPSCs)ならびに骨髄由来間葉系幹細胞(BMSCs)を全身投与し、その治療効果の検討ならびに神経再生メカニズム解明を目的として行った。その結果、DPSCs、BMSCsともに全身投与後下肢の麻痺症状改善が見られただけでなく、免疫学的観点から制御性T細胞の回復ならびに炎症性Th17細胞の抑制も観察されたことから、DPSCsの治療効果がBMSCsと遜色無い事が判明した。しかしながら傷害神経部位への投与幹細胞の検出には至らず、神経再生のメカニズム解明は不明のままである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated therapeutic effect of human dental pulp stem cells (DPSCs) against experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model mice. In comparison with human bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMSCs) injection, DPSCs ameliorate clinical symptom including hind leg paralysis and immunological status (up-regulation of regulatory T cells and down-regulation of inflammatory Th 17 cells). However, the accumulation of injected cells into injured nerve system wasn't detected. Thus nerve regeneration mechanism still unclear.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯髄幹細胞 難治性神経疾患 免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

近年、間葉系幹細胞の宿主免疫系との相互作用が大きな注目を集めている。実際にヒトにおいても、宿主対移植片病、多発性強皮症、糖尿病などの全身性免疫疾患患者に対する骨髄由来間葉系幹細胞の全身投与が疾患の寛解に繋がっている事が報告されており、その治療効果に対する期待は非常に大きい。申請者を含む研究グループでもこれまでに、骨髄由来間葉系幹細胞の全身投与により、全身性エリテマトーデス (SLE, Sun and Akiyama et al., 2009) や全身性強皮症、およびデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導出血性大腸炎モデルなどの全身性免疫疾患に対する有効性を報告してきた (Akiyama et al., 2012)。これらの全身性免疫疾患に対する幹細胞の治療効果は、炎症性ヘルパーT細胞である Th17 抑制と抑制性 T 細胞促進という免疫トレランスの誘導に基づいているが、骨髄由来間葉系幹細胞はその採取が侵襲的であること、治療効果は明らかではあるが効果を得るには多量の細胞の投与が必要であることや多額の費用など問題点も多く、その改善が望まれている。

ところで、神経溝由来である歯髄由来間葉系幹細胞は、骨髄由来幹細胞と同様に多分化能を有しているだけでなく、神経細胞への高い分化能も有している。さらには、宿主免疫担当細胞、特にヘルパーT細胞に対して高い免疫調節能を有していることが報告されている。したがって、歯髄由来幹細胞を全身投与した際も、全身性免疫関連疾患に対して治療効果を有することが十分に期待される。さらには、発生学的なバックグラウンドから考えると、難治性の神経系疾患治療においては骨髄由来幹細胞を凌駕する治療効果を有する可能性も期待されている。

2. 研究の目的

難治性中枢神経傷害モデルである実験的自己免疫性脳炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) モデルマウスにおけるヒト歯髄由来間葉系幹細胞 (dental pulp stem cells; DPSCs) の全身投与による、機能回復効果ならびに傷害神経組織の再生効果を骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells; BMSCs) と比較する。さらには、傷害神経部位よりホーミング幹細胞を経時的に採取することで間葉系幹細胞由来神経再生因子の候補を検索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 幹細胞の培養

ヒト抜去歯牙歯髄より Gronthos ら (2000) の方法に従って、歯髄間葉系幹細胞である DPSCs を単離、培養する。DPSCs は研究に必要な細胞数が得られまで継代・培養した後、代表的な幹細胞マーカーとして多数報告されている SSEA4, Sca-1, CD146 を用いて幹細胞としての純度を確認し実験に用いる。ヒト BMSCs は市販されているものを購入し、DPSCs と同様に培養する。

(2) EAE モデルマウスの誘導

Perruche ら (2008) の方法に従い、6 週齢、雌 C57BL6J マウスに MOG₃₃₋₅₅ ペプチド、M. Tuberculosis 死菌、百日咳毒を背部皮下および腹腔内に注射し、実験的脳脊髄炎を誘導する。

(3) DPSCs, BMSCs の全身投与

EAE 誘導後、症状が安定する 20 日目に PBS に懸濁した DPSCs を経尾静脈的に全身投与 (2×10^6 Cell/mouse) する。コントロールとして BMSCs, および PBS を全身投与する。

(4) 治療効果の評価

臨床 (神経行動学的) 評価; 幹細胞の全

身投与後, 20 日間観察し以下の臨床スコアを記録する.

0: 正常, 1: 尾のトーンス低下, 2: 尾の完全下垂, 3: 歩行異常, 4: 後肢の完全脱力, 5: 前肢麻痺を含む後肢の完全脱力, 6: 死亡

病理学的評価; 幹細胞投与後, 20 日目に屠殺し, 通法に従い脊髄の薄切切片を作成し, 脱髄の有無を確認する.

免疫学的評価; 幹細胞投与後, 20 日目に末梢血を回収し, 制御性 T 細胞ならびに炎症性 Th17 細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析し, 全身の免疫状態を評価する.

投与幹細胞の傷害神経部位への集積の検討: DPSCs ならびに BMSCs 全身投与後, 20 日目に屠殺し, 脊髄及び骨髄を回収, 酵素処理後, 細胞懸濁液を培養皿に播種し, CFSE 陽性細胞の有無を検討する. 同時に脊髄 4% パラフォルムアルデヒドにて固定し, 4mm 凍結切片を作成し, CFSE 陽性細胞の有無を検討する.

4. 研究成果

(1) 幹細胞培養

ヒト歯髄より単離した DPSCs を経代し, 経代 6 代目で細胞表面抗原の発現を確認し, 幹細胞の純度を検討した結果, 市販の BMSCs とほぼ同程度の発現強度であった (図 1).

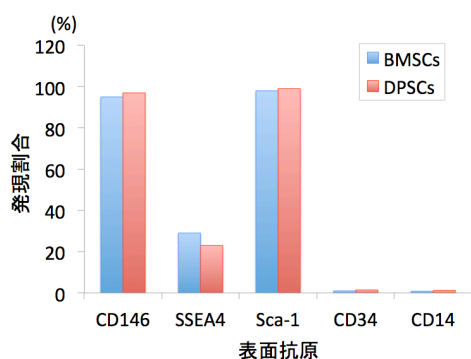


図1: BMSCsおよびDPSCsの表面抗原発現割合

(2) EAE モデルの誘導及び治療効果の評価

① 臨床スコア

前述の評価基準に従って神経行動学的評価を行った結果, EAE 誘導後, 尾や下肢の異常が認められ, EAE の誘導が適切になされている事が分かった (図 2).

さらには, 幹細胞投与後は BMSCs 投与群では著明な改善は認められなかったものの, PBS 投与群と比較して低いスコアを示した. 一方で, DPSCs 投与群では著明な臨床スコア改善が認められた (図 2).

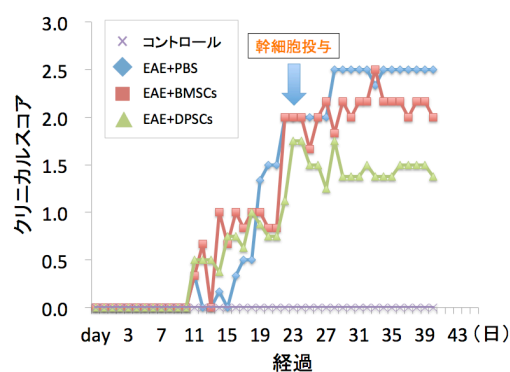


図2: クリニカルスコアの変化

② 制御性 T 細胞の変化

EAE 誘導後, コントロール群と比較して, 制御性 T 細胞の著明な低下が認められた. また, 幹細胞投与後には低下していた制御性 T 細胞の割合がコントロール群と同程度まで回復していた (図 3).

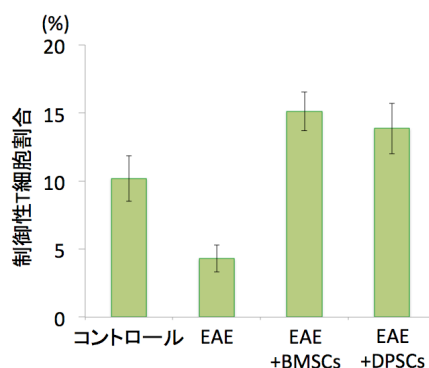


図3: 末梢血中の制御性T細胞割合

③ 炎症性 TH17 細胞の変化

EAE 誘導後, コントロール群と比較して炎症性の Th17 細胞の割合が著明に増加している事が分かった. さらには, 幹

細胞投与後にコントロールと同程度まで低下している事が分かった (図4).

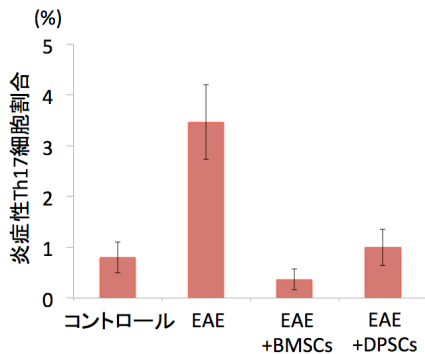


図4:末梢血中の炎症性Th17細胞割合

④ 投与幹細胞の傷害部位への集積の検討

神経傷害局所への移植幹細胞の集積の検討する為に、CFSE 陽性細胞の有無を組織学的に検討するとともに、全身的なホーミングの有無を骨髓細胞の単離、培養にて検討した。しかしながら、組織学的に CFSE 陽性細胞の検出にはいたらなかった。また、骨髓由来細胞にも CFSE 陽性細胞は単離されなかった。

今回の結果から、全身投与により症状改善が報告されている BMSCs と比較して、臨床症状の改善、免疫学的な指標である制御性 T 細胞の回復および炎症性 Th17 細胞の抑制等 DPSCs の難治性神経疾患に対する治療効果は十分に期待できるものであると思われる。さらには、傷害部への集積が検出されなかったことから、治療効果を得る為には傷害部位への直接的な修復よりもむしろ全身的な免疫調節を行う事で宿主の再生効果を促進させた可能性が考えられる。しかしながら、幹細胞投与後の集積タイミングについては今後のさらなる検討が必要と考える。

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 件)
該当無し
[学会発表] (計 件)

該当無し

[図書] (計 件)

該当無し

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

該当無し

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 件)

該当無し

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

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山謙太郎 (AKIYAMA KENTARO)

岡山大学病院・講師

研究者番号: 70423291

(2) 研究分担者

窪木拓男 (KUBOKI TAKUO)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 00225195

大野充昭 (ONO MITSUAKI)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 60613156

大島正充 (OSHIMA MASAMITSU)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 00548307

(3) 連携研究者

該当無し