

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18539

研究課題名（和文）歯髄幹細胞の神経再生におけるPDGFR の機能解析と脳梗塞の細胞治療への応用

研究課題名（英文）Human dental pulp stem cells promote after cerebrovascular disease by neuro-regenerative mechanisms

研究代表者

祐田 明香（YUDA, ASUKA）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20814081

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、歯髄幹細胞のオリゴデンドロサイト分化に関わる可能性があるPDGFRに着目し、歯髄幹細胞の神経再生におけるPDGFRの影響に関して検討を行った。マウス歯乳頭細胞(mDP細胞)を使用し、PDGFがオリゴデンドロサイト関連遺伝子発現、細胞増殖、創傷治癒部への細胞遊走性、細胞走化性に及ぼす影響を評価した。PDGF刺激により、細胞増殖、創傷治癒に対する細胞の遊走性および細胞走化性が有意に促進し、また、オリゴデンドロサイト関連遺伝子発現を促進する傾向が示された。以上より、本研究から、PDGFRは、神経障害部位に歯髄幹細胞を誘導し、オリゴデンドロサイト分化を誘導することが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯髄幹細胞はオリゴデンドロサイトへの分化の可能性を有しており、さらに、オリゴデンドロサイトへの分化の過程で、PDGFRが分化促進に関与する可能性があるのではないかと仮説を立て検討を行った。歯髄幹細胞のオリゴデンドロサイト分化への可能性、PDGFRのオリゴデンドロサイト分化への関与が証明されれば、PDGFRをターゲットとした歯髄幹細胞の移植は、有害事象を呈することなく、より機能的に神経組織修復を行える、脳梗塞の細胞移植療法のひとつとして応用できる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we studied the effects of PDGFR on oligodendrocytes differentiation of DPSCs. we investigated the effects of PDGF on association with oligodendrocyte-related gene expression, proliferation, wound healing and migration activity of mDP cells. PDGF promoted proliferation, wound healing and migration activity of mDP cells. In addition, PDGF has a tendency to upregulate oligodendrocyte-related gene expression of mDP cells. Thus, these data suggest the PDGFR may lead to oligodendrocytes differentiation of DPSCs.

研究分野：歯科保存学

キーワード：PDGFR オリゴデンドロサイト 歯髄幹細胞 脳血管障害 細胞移植療法

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害は主要な死因の一つであり、また機能障害を来す最大の原因疾患である。脳梗塞の治療に関しては様々な研究がなされており、新規抗血栓薬の開発による予防治療、静中療法・カテーテルによる血栓回収療法など超急性期治療の進展等が認められるようになってきた。しかしながら、超急性期以降の急性期および慢性期の治療に関しては大きな進展はなく、一度失った機能を回復させる治療は、現在、リハビリテーションのみである。近年、幹細胞研究の発展により、新たな脳梗塞の治療法として細胞治療に注目が集まっている。細胞治療は、生体内にもともと存在する神経幹細胞を活性化させて機能回復を目指す方法と、細胞を体外から投与・移植する方法に大別される。細胞を体外から投与・移植する細胞として ES 細胞、iPS 細胞、骨髄由来の幹細胞、脂肪由来の幹細胞、歯髄由来の幹細胞等が知られている。細胞治療による機能回復として、損傷神経組織の細胞による置換、血管新生、神経新生の促進等が起こると考えられている。以前、ラットの脳梗塞モデルにヒト iPS 細胞を移植した場合、移植細胞により梗塞部位の回復が認められる一方で、移植細胞による腫瘍形成が観察されることが報告されている (Oki Ket al., Stem Cell. 2012; Chen Y et al., Stem Cells Dev. 2011.)。

以上のことから、移植細胞が移植後、有害事象を呈することなく機能的に働く細胞治療が待望されている。

ヒトの歯髄組織は、歯の中心部を占める疎水性の結合組織であり、未分化間葉系細胞・象牙芽細胞・樹状細胞・免疫系血球細胞など、様々な細胞成分、コラーゲン線維、神経、血管で構成されている。以前、ヒト歯髄幹細胞をラットの脊髄損傷モデルに移植した結果、神経再生を活性化し、脊髄損傷部の機能が回復されることが報告されている (Sakai K et al., J Clin Invest. 2012.)。また、歯髄幹細胞は、中枢神経系において、ミエリンを形成するオリゴデンドロサイトへの分化に関与する可能性が知られている (Young FI et al., Stem cells Int. 2016.)。

PDGF は主に間葉系幹細胞に対し遊走・増殖刺激活性を有するタンパク質であり、その受容体は PDGFR および PDGFR の 2 種類が知られている。歯髄幹細胞においては PDGFR およびオリゴデンドロサイトの分化マーカーである Olig2 の遺伝子発現が認められることが報告されている (Moayeri A et al., Basic Clin Neurosci. 2017.)。PDGF-B/PDGFR は脳組織損傷時に限定して発現が誘導されることが知られており、さらに脳梗塞後に脆弱化した血液脳関門を維持・修復するために、ペリサイトにおける PDGFR の発現誘導が重要な役割を担う可能性があることが報告されている (Arimura K et al., Curr Neurovasc Res. 2012.)。しかしながら、歯髄幹細胞における PDGFR およびオリゴデンドロサイトの関連については知られていない。

以上のことから、歯髄幹細胞はオリゴデンドロサイトへの分化の可能性を有しており、さらに、オリゴデンドロサイトへの分化の過程で、PDGFR が分化促進に関与する可能性がある。本研究から得られる結果により、PDGFR をターゲットとした歯髄幹細胞の移植は、新たな脳梗塞の細胞移植療法のひとつとして応用できる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、歯髄幹細胞のオリゴデンドロサイト分化に関わる可能性がある PDGFR に着目し、PDGFR ヘテロノックアウトマウスの歯髄組織でのオリゴデンドロサイト分化マーカーの発現解析を行い、また、歯髄幹細胞のオリゴデンドロサイトへの分化、シグナリング経路の解析を行い、歯髄幹細胞の神経再生における PDGFR の影響に関して検討し、評価を行うことで、PDGFR をターゲットとした歯髄幹細胞の移植治療を、新たな脳梗塞の細胞移植療法のひとつとして応用を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PDGFR ヘテロノックアウトマウスの歯髄組織における PDGFR タンパクの発現解析：PDGFR ^{+/+} および PDGFR ^{-/-} マウス (九州大学病院・第二内科より譲渡予定) を、灌流固定後、顎

骨を摘出し、凍結切片を作製する。PDGFR タンパクにて免疫蛍光染色を行い、発現を評価した。
 (2) 歯髄幹細胞における PDGFR の発現解析：マウス歯乳頭細胞 (mDP 細胞) を培養し、回収後、ウエスタンブロット解析を行い PDGFR の発現を評価した。
 (3) PDGF が mDP 細胞の細胞増殖能、創傷治癒能 (細胞遊走能)、細胞走化性に及ぼす影響の解析：PDGF にて刺激後、細胞増殖能を CCK-8 Assay kit を使用し測定し評価する。創傷治癒能 (細胞遊走能) はスクラッチアッセイにて評価し、細胞走化性はインサートウェルを使用し評価した。
 (4) mDP 細胞のオリゴデンドロサイト分化における PDGF の機能解析：PDGF を添加し mDP 細胞を培養し、オリゴデンドロサイト関連マーカーを評価した。

4. 研究成果

(1) PDGFR ^{+/+} および PDGFR ^{+/-} マウスの歯髄を比較した結果、PDGFR ^{+/+} マウスの歯髄にて PDGFR の発現が顕著に認められた (図 1)。

(2) 培養後の mDP 細胞にて、ウエスタンブロット解析を行った結果、PDGFR の発現が認められた。

(3) mDP 細胞を PDGF (0, 10, 50, 100 ng/ml) で刺激し、48 時間後、コントロールと比較し、細胞増殖能が PDGF 10, 50 ng/ml で有意に促進されることが認められた。さらに、PDGF で刺激し、スクラッチアッセイにて創傷治癒能を解析した結果、10 時間後に、PDGF 10, 50 ng/ml で有意に促進されることが認められた。また、細胞走化性を解析した結果、24, 48 時間後、PDGF は濃度依存的に細胞走化性が有意に促進されることが認められた。

(4) mDP 細胞を PDGF (0, 10, 50, 100 ng/ml) で刺激し、48 時間後のオリゴデンドロサイト関連遺伝子発現 (Olig2, MBP, PDGFR α) を評価した結果、PDGF 50, 100 ng/ml にてオリゴデンドロサイト関連遺伝子を促進する傾向が示された。

以上より、本研究から、PDGFR は、神経障害部位に歯髄幹細胞を誘導し、オリゴデンドロサイト分化を誘導することが推察された。

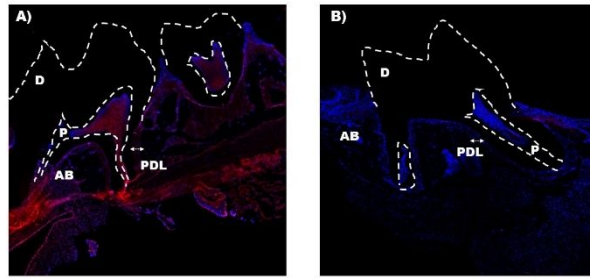


図 1. PDGFR ^{+/+}(A)、PDGFR ^{+/-}(B) マウスにおける PDGFR の蛍光抗体法によるタンパク発現解析：上顎左側の垂直断組織切片。AB: 歯槽骨、PDL: 歯根膜、P: 歯髄組織、D: 象牙質、核染色: DAPI、両頭矢印は、歯根膜の範囲を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------