

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18582

研究課題名(和文) 口腔内から採取したヒト組織幹細胞培養上清を用いたパーキンソン病への再生開発

研究課題名(英文) Development of regenerative medicine for Parkinson's disease using conditioned medium of human tissue stem cells collected from the oral cavity

研究代表者

高橋 悠 (Takahashi, Haruka)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師

研究者番号：90779802

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)：ヒト歯髄幹細胞の培養上清のサイトカインアレイでは、IGF-1、IL-1、MCP-1、M-CSF、MIP-1、TNF が無血清培養液と比較して増加している傾向を認めた。パーキンソンモデルラットの腹腔内へのヒト歯髄幹細胞の培養上清投与による機能的評価としては、アポモルフイン投与後の回転数を投与2、4週後に測定したが、いずれも減少を示さず、運動症状の改善は認められなかった。組織学的評価としては、HE染色および免疫組織化学染色を行った。歯髄幹細胞の培養上清投与4週後、神経変性を生じている患側においては、健側と比較してTH陽性細胞の消退を認め、ドパミン神経細胞変性の改善は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病の安全な根本的治療として、細胞移植療法でなく、口腔内から採取されるヒト組織幹細胞の培養上清を用いた治療開発を行った。なかでも、採取が容易であるヒト歯髄幹細胞の培養上清を用いて検討を行った。今回の研究で、ヒト歯髄幹細胞の培養上清は、成長因子が多く含まれていることがわかったが、パーキンソンモデルラットへの腹腔内投与により運動症状の改善や組織学的変化は認められないことが示された。培養上清を治療に用いるためには、脳組織内の神経変性部への直接投与や細胞の神経誘導後の培養上清を検討する必要があると考え、今後はさらに研究を進めたいと考える。

研究成果の概要(英文)：Cytokine array analysis of the conditioned medium of human dental pulp stem cells showed a tendency for IGF-1, IL-1, MCP-1, M-CSF, MIP-1, and TNF to increase compared to serum-free culture medium.

For functional evaluation of Parkinson's model rats administered conditioned medium of human dental pulp stem cells intraperitoneally, the number of rotations after apomorphine administration was measured 2 and 4 weeks after administration, but neither showed a decrease, and no improvement in motor symptoms was observed. For histological evaluation, HE staining and immunohistochemical staining were performed. Four weeks after administration of conditioned medium of dental pulp stem cells, disappearance of TH-positive cells was observed in the affected side with neurodegeneration compared to the healthy side, and no improvement in dopamine neuron degeneration was observed.

研究分野：Regenerative medicine

キーワード：human tissue stem cell

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病の根本的治療としては、細胞移植療法が多く検討されている。細胞移植療法においては、ES 細胞や胎生期の脳細胞などが検討されているが、倫理的問題が大きく、日本では臨床応用が困難である。iPS 細胞を細胞源に用いた検討も行われ、現在日本ではヒトへの治験も進められている。しかし、iPS 細胞移植による腫瘍形成リスクはゼロではなく、移植後は定期的な検査が必要とされている。組織幹細胞を細胞源にした細胞移植療法は、臨床的に腫瘍形成リスクが低く、iPS 細胞、ES 細胞や胎生期脳細胞よりも倫理的、免疫的問題や安全面においても問題ない。発生学的にも口腔内から採取できる組織幹細胞は、神経堤由来細胞を多く含むことから神経系細胞を分化誘導させ易いと考えられ、神経疾患に対する細胞移植療法には有用であり、注目されている。そのため、歯科領域で成人から採取可能な組織幹細胞として、申請者はヒト頬脂肪体由来幹細胞を細胞源として分化誘導した神経系細胞をパーキンソンモデルラット脳内の神経変性部へ移植することでラットの運動症状が改善されることを確認した。

これらの機序として、分化誘導した神経細胞の生着による働きだけでなく、細胞から分泌される成長因子が神経再生に重要な役割を果たしている可能性があると考えた。そこで、ヒト組織幹細胞移植療法以上に、感染や免疫にも、倫理的にも問題はなく、腫瘍形成のリスクもないパーキンソン病への再生治療として、細胞の培養上清を投与する治療法に着目した。近年、幹細胞の培養上清による研究は多く報告されている。とくに、乳歯歯髄幹細胞の培養上清を用いた研究は多数あり、骨の再生や肝疾患、糖尿病に対する治療など、再生医療も含めて様々な疾患に対して治療開発を目指した研究が報告されている。神経の再生医療についても有用であると報告されており、アルツハイマー型認知症や脊髄損傷に対する治療としても効果があるとされている。そこで、パーキンソン病治療に対しても、口腔内から採取される組織幹細胞の培養上清を用いて治療効果を示せるか否かの検討を行い、この領域の研究をさらに発展させていきたいと考えた。

2. 研究の目的

パーキンソン病は、現在薬物による対症療法のみで、根本的治療となり得る細胞移植療法においても、倫理的問題や免疫的問題から臨床応用をすぐ行うには多くの問題点が残っている。しかし、成人の口腔内から採取が可能であるヒト組織幹細胞の培養上清を用いた再生医療を開発することは、細胞移植療法と比較して、倫理的問題や免疫、腫瘍形成のリスク軽減による治療の安全性が大幅に向上する点で極めて有益である。それだけでなく、材料の規格化や製剤化、安定性、コスト低減化などの利点があり、細胞移植に伴う多くの問題が解決される。そのため、細胞療法よりも安全な根本的治療となる可能性があり、将来の臨床応用を目的として、ヒト組織幹細胞の培養上清を用いたパーキンソン病の治療法の開発を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯髄幹細胞の培養上清の採取と性質評価

コスモ・バイオ株式会社より購入したヒト歯髄幹細胞は、細胞が 70~80%コンフルエントになった段階で血清培養液から無血清培養液へ交換し、48 時間培養を行った。その後培養上清を回収し、1,500×g で遠心分離を行った後、0.45 μm フィルターで濾過したものをヒト歯髄幹細胞の培養上清として使用した。

採取したヒト歯髄幹細胞の培養上清の性質評価として、ELISA を VEGF および MCP-1 について、通法に従って行った。また、サイトカインアレイも行った。

(2) ヒト歯髄幹細胞の培養上清由来エクソソームの採取と性質評価

ヒト歯髄幹細胞の培養上清より超遠心法を用いてエクソソーム回収を行った。抽出したエクソソームは、タンパク濃度を測定し、WesternBlot にて同定を行った。

(3) パーキンソンモデルラットの腹腔内へのヒト歯髄幹細胞の培養上清投与による機能的評価、組織学的評価

購入したパーキンソンモデルラットに週 2 回、4 週間、1ml のヒト歯髄幹細胞の培養上清を腹腔内投与し、機能的評価および組織学的評価を行った。

機能的評価

ドパミン受容体作用薬であるアポモルフィンを腹腔内投与し、ヒト歯髄幹細胞の培養上清投与前後におけるモデルラットの回転数を比較した。7 回以上/分の異常回転が生じたラットをパーキンソンモデルラットとして使用した。

組織学的評価

4 週間のヒト歯髄幹細胞の培養上清投与後に屠殺を行い、脳組織を採取した。切片を作製し、HE 染色および免疫組織化学染色を行った。抗体は、Anti-TH (tyrosine hydroxylase) (AB152) を使用し、いずれも通法に従って行った。

4. 研究成果

(1) ヒト歯髄幹細胞の培養上清の性質評価

ELISA では、VEGF および MCP-1 について、無血清培養液と比較して有意に増加していた。サイトカインアレイでは、IGF-1、IL-1、MCP-1、M-CSF、MIP-1、TNF が無血清培養液と比較して増加している傾向を認めた。

(2) ヒト歯髄幹細胞の培養上清のエクソソームの性質評価

今回は、安定したタンパク量を有したエクソソームの採取を再現することが困難であった。WesternBlot にて CD9 や CD63 の発現を確認したが、再現性のあるデータの測定は困難であった。

(3) パーキンソンモデルラットの腹腔内へのヒト歯髄幹細胞の培養上清投与

機能的評価

パーキンソンモデルラットの回転数はヒト歯髄幹細胞の培養上清投与 2 週後、4 週後に測定したが、いずれも減少を示さず、運動症状の改善は認められなかった。

組織学的評価

歯髄幹細胞の培養上清投与 4 週後、神経変性を生じている患側においては、健側と比較して TH 陽性細胞の消退を認め、ドパミン神経細胞変性の改善は認められなかった (図 1)。

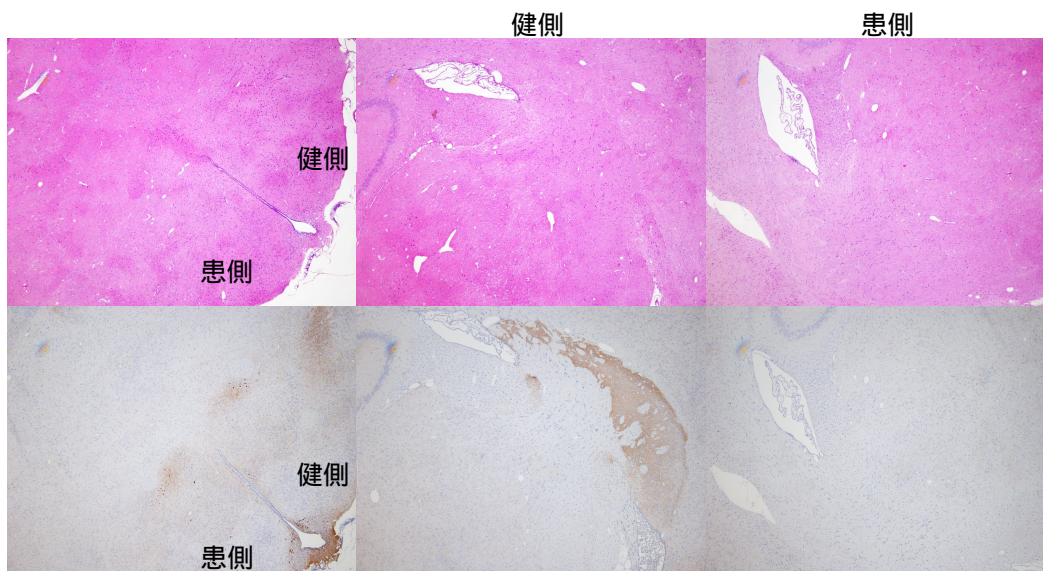


図 1 パーキンソンモデルラット脳組織の HE 染色像 (上段) および抗 TH 抗体を用いた免疫組織化学染色像 (下段)

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
---------	---------