

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890135

研究課題名(和文) ヒト歯髄幹細胞による自己免疫性脳炎の治療効果とそのメカニズムの検討

研究課題名(英文) Human dental pulp stem cell ameliorate Experimental autoimmune encephalomyelitis.

研究代表者

秋山 謙太郎 (Akiyama, Kentaro)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：70423291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：実験的脳脊髄炎に対するヒト歯髄由来幹細胞の全身投与の治療効果をヒト骨髄由来幹細胞と比較検討した結果、脊髄炎の症状である下肢の麻痺を含む臨床症状において、いずれの幹細胞投与群でも明らかな治療効果を認める事ができた。しかしながら、免疫学的観点から評価した場合、骨髄由来幹細胞投与群において、歯髄由来幹細胞投与群よりも、免疫寛容獲得の指標となる抑制性T細胞の誘導効果が高い事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the therapeutic effect of bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMMSCs) or dental pulp stem cells (DPSCs) systemic injection on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model mice. In the clinical evaluation, both BMMSCs and DPSCs showed significant the therapeutic effect including hind leg paralysis. However, BMMSCs injected group showed, in terms of immunological evaluation, higher up regulation of regulatory T cells (Tregs) in peripheral blood after 40days from EAE induction compare to DPSCs injected group.

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯髄幹細胞 神経疾患 幹細胞移植治療

1. 研究開始当初の背景

近年、間葉系幹細胞の免疫系との関わり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いる。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を全身投与することで、全身性エリテマトーデスや全身性強皮症およびデキストラン硫酸ナトリウム誘導性出血性大腸炎モデルにおいて治療効果を示してきた。

これらの全身性炎症性疾患に対する幹細胞の治療効果の報告は炎症性T細胞であるTh17の抑制と、抑制性T細胞の誘導という免疫寛容の獲得を背景にしているが、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とそれにかかる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、発生学的に神経溝由来である歯髄から発見された歯髄由来幹細胞は、骨髄幹細胞と同様に多分化能を有しているだけでなく、*in vitro*で神経細胞への高い分化能も有している。さらには、免疫細胞、特にT細胞に対して高い免疫抑制能を有していることが報告されている。したがって、歯髄幹細胞の全身投与も、上記のような全身性の免疫関連疾患に対して治療効果を有することが十分に推測される。また、神経溝由来という発生学的なバックグラウンドから神経系疾患の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

神経疾患モデルである実験的自己免疫性脳炎 (experimental autoimmune

encephalomyelitis; EAE) マウスに対してヒト歯髄幹細胞 (dental pulp stem cells; DPSCs) を全身投与し、その機能回復効果ならびに障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; BMMSCs) と比較・検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 幹細胞の培養

・ヒト抜去歯牙より既報(Gronthos et al. 2000) に従い、DPSCs を分離、培養する。培養したDPSCs は全身投与に必要な細胞数が得られまで継代・培養し、既報に従い、CD146, SSEA4, CD73 等の幹細胞マーカー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 BMMSCs 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

既報 (Perruche et al. 2008) に従い、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) 幹細胞の免疫抑制作用の検討

in vitro におけるT細胞共培養系を用いて、それぞれの幹細胞が抑制性T細胞 (Tregs) の分化誘導に与える影響を比較検討する。

(4) DPSCs, BMMSCs 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を尾静脈を介して全身投与 (1×10^6 Cell / mouse) する。コントロールとしてBMMSCs, 線維芽細胞、およびPBSを全身投与する。

(5) 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、40日間観察し下記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，40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，40日目に末梢血を回収し，Tregs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．

4．研究成果

(1)幹細胞の培養：通法に従いヒト抜去歯

牙より DPSCs を単離・培養した (図1)．また，フローサイトメトリー解析に

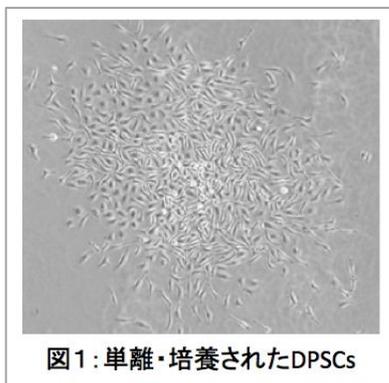
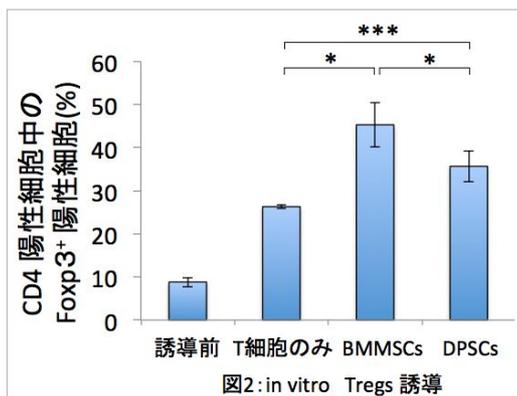


図1：単離・培養されたDPSCs

よる幹細胞マーカーの CD146, SSEA4, CD90, CD105 の発現は BMMSCs と差がない事を認めた．

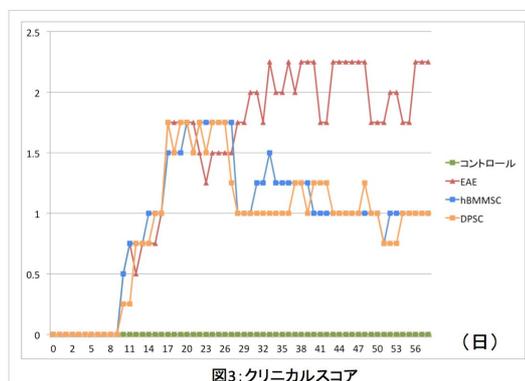
(2)EAE 誘導：既報に従い，EAE の誘導を行い，病状の指標となるクリニカルスコアの上昇を認めた (図3)．

(3)幹細胞免疫抑制作用の検討：in vitro 共培養により，未分化 T 細胞の Tregs への分化誘導に与える幹細胞の影響を検討した結果，BMMSCs, DPSCs ともに Tregs への誘導を促進した．しかしながら，DPSCs の誘導促進効果は BMMSCs よりも低い結果となった．(図2)．更に，炎症性 T 細胞である Th 1 7 細胞の分化抑制についても



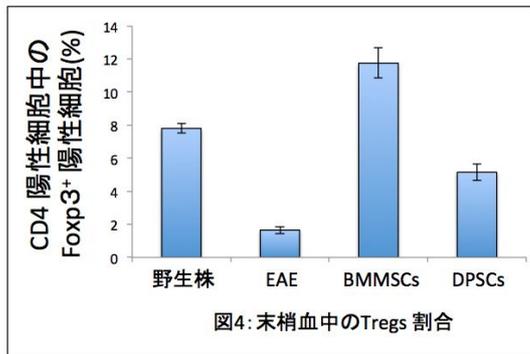
同様に共培養を行い，BMMSCs, DPSCs ともに抑制効果を示したものの，BMMSCs の方がより高い抑制効果を示した．

(4)幹細胞移植治療効果：EAE 誘導後 14 日で経尾静脈より幹細胞を全身投与し，臨床症状



を観測した結果，BMMSCs 投与群，DPSCs 投与群ともに，クリニカルスコアの低下を認め，症状が緩和している事が明らかとなった (図3)．しかしながら，BMMSCs 投与群と DPSCs 投与群に明らかな臨床症状の差は認められなかった．

さらには，幹細胞投与後 40 日において，末梢血をそれぞれの群より回収し，Tregs の割合を比較検討した結果，EAE 誘導群において，明らかに低下していた Tregs の割合が BMMSCs 投与群，DPSCs 投与群のいずれにおいても増加している事が明らかとなった．しかしながら，DPSCs 投与群に於ける Tregs 誘導効果は BMMSCs 投与群に比較して低いものであった (図4)．



(5) 結果のまとめと考察：今回，ヒト抜去歯牙より歯髄由来幹細胞である DPSCs を単離培養し，幹細胞マーカー発現解析による幹細胞純度を検定し，骨髄由来幹細胞である BMSCs と遜色ない事が分かった．さらに，これら幹細胞の免疫抑制作用を比較検討したところ，in vitro, in vivo のどちらにおいても，BMSCs の方が DPSCs よりも高い Tregs の誘導促進作用を示した．しかしながら，臨床所見であるクリニカルスコアにおける治療効果の評価では幹細胞投与群間に明らかな治療効果の差を認めなかった．今後は，より客観的な臨床症状の評価方法導入を検討する必要があると考える．さらに，Tregs 誘導促進メカニズムについての詳細な検討が必要である．

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)
該当事項なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)
該当事項なし

〔学会発表〕(計 0 件)
該当事項なし

〔図書〕(計 0 件)
該当事項なし

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
該当事項なし

取得状況 (計 0 件)
該当事項なし

〔その他〕
該当事項なし

ホームページ等
該当事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 謙太郎 (AKIYAMA KENTARO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：70423291

(2) 研究協力者

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 該当なし