

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19550

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞由来の中枢神経原基を用いた機能的脳脊髄神経の再生医療法の創出

研究課題名(英文) Development of a regenerative medicine for a cerebrospinal injury using dental pulp stem cell-derived central nervous system primordium

研究代表者

丸島 愛樹 (Marushima, Aiki)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：40722525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄から歯髄幹細胞を得て、胚様体を還流培養し、3胚葉性の胚子様構造体を生育させ、中枢神経原基を作成する技術において、神経導管と血管内在神経束を作製した。マウス顔面神経損傷モデルを作成し移植後の神経症状評価、組織評価、電気生理学的評価を行い、移植神経束がホストの神経再生を促進させる可能性が示唆された。ネコ脊髄損傷モデルに対する神経束移植の実験系を確立し、神経症状の改善過程を明らかにするとともに、呼吸機能の電気生理学的評価、組織学的評価を行った。神経導管と血管内在神経束の作成技術を確立し、これらは末梢神経損傷や脊髄損傷に対する新たな再生医療技術となることを検証することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷や疾病による脳神経や脊髄神経の障害では、神経支配領域に関わる運動感覚障害、自律神経障害により身体機能が低下する。広範囲な神経の挫滅や欠損では、顕微鏡下の神経断端吻合は困難である。現行の神経再生では、移植神経の長さや太さ、及び運動神経や感覚神経、自律神経の神経機能再生の視点は欠けており、脳神経、脊髄神経の再生医療には課題がある。本技術は、これらの課題を克服できる技術として開発しており、将来的には、第I～XII脳神経や脊髄神経、末梢神経再生のための新たな神経作製技術と、神経機能再生を可能にする新たな神経再生医療の技術基盤となる。

研究成果の概要(英文)：Embryoid bodies derived from dental pulp stem cells were cultured to grow three embryonic germ-like structures to create nerve conduits and vascular intrinsic nerve bundles in a technique to create central nerve primordia. A mouse model of facial nerve injury was created and post-transplantation neurological, histological, and electrophysiological evaluations were performed, suggesting that the transplanted nerve bundles may promote nerve regeneration in the host. We established an experimental system for nerve bundle transplantation into a mouse spinal cord injury model and clarified the process of improvement of neurological symptoms, as well as electrophysiological and histological evaluation of respiratory function. We established a technique for creating nerve conduits and vascular intrinsic nerve bundles, and were able to verify that these would be a new regenerative medical technology for peripheral nerve injury and spinal cord injury.

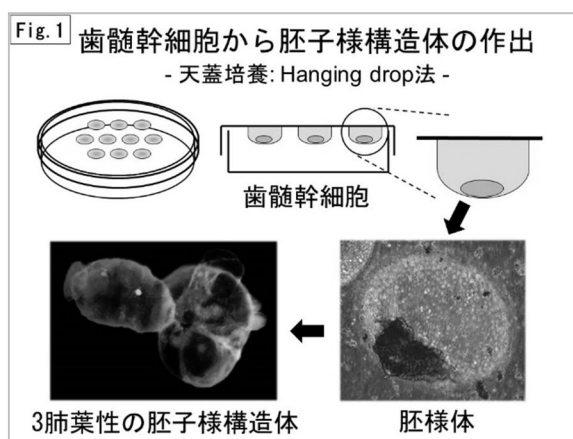
研究分野：神経再生

キーワード：神経再生 歯髄幹細胞 神経導管 神経束 脊髄損傷 末梢神経損傷

1. 研究開始当初の背景

外傷や疾病による脳神経や脊髄神経の障害では、神経支配領域に関わる運動感覚障害、自律神経障害により身体機能が低下する。広範囲な神経の挫滅や欠損では、顕微鏡下の神経断端吻合は困難である。そのような神経の挫滅欠損には、自家神経移植や神経再生誘導チューブを足場とした神経再生が行われている。しかし、自家神経移植は移植片として採取できる長さや太さに限界があり、手術侵襲が問題である。神経再生誘導チューブは、神経長 40mm、太さ 4mm までしか対応できず、必要な神経長が長くなるほど宿主からの神経再生効果は低下する。さらに、現行の神経再生には運動神経や感覚神経、自律神経の神経機能再生の視点は欠けており、脳神経、脊髄神経の再生医療には課題がある。

研究代表者らは、神経再生の課題を解決する医療材料として、歯髄由来間葉系幹細胞に着目してきた。体性幹細胞が多いとされるヒト歯髄に、間葉系マーカー(CD20,CD105,CD90)とES細胞マーカー(SSEA-3)が存在し、歯髄幹細胞は多能性を有することを見出した。さらに、歯髄は第一鰓弓の神経堤由来であるため、他組織由来の間葉系幹細胞よりも中枢神経系細胞への分化能が高いことを示した。このような増殖能と多能性をもつ歯髄幹細胞を、Embryotrophic factor (Ishikawa.Human cell 2000) から embryo-growth factor を作製し、Hanging drop 法により培養すると、その約 20%は胚様体を形成した。さらにこの胚様体を還流培養すると、胚様体は発育して約 4 週間後に 3 胚葉性の胚子様構造体を作出させることができた(Fig. 1)。このような研究開発の背景を基に、第 I~XII 脳神経や脊髄神経再生のための新たな神経導管作製技術を開発し、さらに運動神経や感覚神経、自律神経など、神経の機能特性に合わせた新たな神経再生医療の技術基盤を開発する。

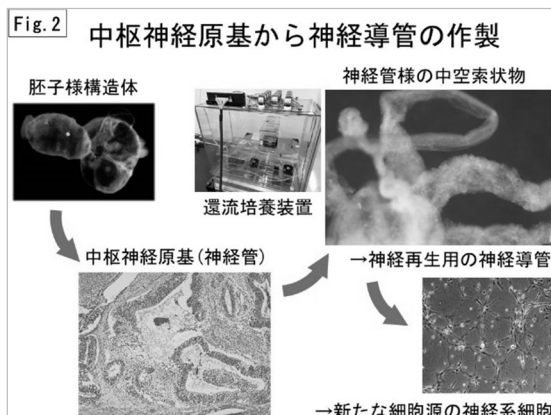


2. 研究の目的

本課題では、これまでの研究成果を基盤として、歯髄由来の神経系細胞の作成から、脊髄や末梢神経再生に活用できる血管内神経束の作成する技術を確認する。また、歯髄幹細胞から 3 胚葉性胚子様構造体を作出し、胚子様構造体内に多くの容積を占めている中枢神経原基から得られた神経管様の中空索状物を用いて神経導管を作製する技術を確認する。これらの、神経束や神経導管の構造を組織学的に明らかにするとともに、神経損傷動物モデルに移植し、神経再生効果を検証する研究開発を行い、従来の医療では回復困難であった重症脊髄損傷や、神経移植に課題がある末梢神経損傷に対する新たな神経再生医療の基礎的研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

歯髄から歯髄幹細胞を得て、胚様体を還流培養することで、3 胚葉性の胚子様構造体を生育させる。この胚子様構造体には、中枢神経原基の神経管、メラニン細胞をもつ中脳黒質原基や網膜原基を認め、さらには心臓、肺、消化管、骨、軟骨、皮膚、そして歯の原基も存在する。胚子様構造体の中枢神経原基には、とぐるを巻くような神経管様の中空索状物が出現しており、これを採取した(Fig. 2)。この神経管様の中空索状物の還流培養を継続し、神経再生医療に十分な長さを持つ神経導管を作成した。血管内神経束は、歯髄から神経系細胞を分化誘導し、歯髄由来神経系細胞を作製する過程において、グリア幹細胞から希突起膠細胞とシュワン細胞を採取した。それらの細胞と血管内皮細胞を用いて、脊髄・末梢神経の移植に使用できる血管内神経束(バイオナーブ: 商願 2021-017100)を作成した。組織学的解析として、細胞の評価は、Nestin, 3tubulin, MAP2, NeuN (神経幹細胞)



胞（未熟・成熟神経細胞）、GFAP、Oligo2、Iba1（グリア細胞）により評価し、シナプス結合はNF200（有髄神経）、SynaptophysinとPSD95（Pre-,post-synaptic marker）により評価し、神経導管と血管内在神経束を構成する細胞の特性を明らかにした。マウス顔面損傷モデルに対する血管内在神経束移植では、Whisker movementにより神経症状評価、神経線維の組織評価、血管内在神経束の活動電位の評価を行った。脊髄損傷に対する移植試験は、ネコの脊髄半切による脊髄損傷・呼吸運動障害モデルにより、血管内在神経束移植3ヶ月経過後の損傷側の前後肢運動麻痺、及び呼吸運動障害の回復を検証した。延髄呼吸中枢から脊髄呼吸中枢、及び横隔神経への呼吸性ニューロンと吸息性ニューロンの活動電位を評価した。また、移植した血管内在神経束が、ホスト脊髄との神経回路の再構築を組織学的に検証した。

4. 研究成果

歯髄から歯髄幹細胞を得て、胚様体を還流培養し、3胚葉性の胚子様構造体を生育させ、中枢神経原基の神経管、中脳黒質原基、網膜原基、心臓、肺、消化管、骨、軟骨、皮膚、歯など各種の原基を作成する技術において、培養条件を変えることで、これらの原基の発育に変化があることを発見した。そのため、各種器官の原基を作成させるための培養条件の最適化を進め、その結果をもって、特許出願するための明細書の作成を進めた。歯髄幹細胞から、神経系細胞を分化誘導し、血管内皮細胞、周皮細胞、シュワン細胞、オリゴデンドロサイト、線維芽細胞を用いて、末梢神経用と中枢神経用の血管内在神経束を作製した。この技術は特許出願後に、PCT出願から指定国移行へ権利化申請を進めた。作製した血管内在神経束を用いて、動物モデルを用いた神経移植の基礎的実験を行った。作製した血管内在神経束は、電気生理学的評価で活動電位が得られること、神経線維、シュワン細胞（末梢神経用）、オリゴデンドロサイト（中枢神経用）、血管内皮を含むことを組織学的に確認し、作成した神経束内に、血管網が形成されていることを明らかにした。マウス顔面神経損傷モデルを作成し移植後の機能評価としてWhisker movementの改善が得られることを確認し、組織評価では、移植神経束がホストの神経との連続性を保ちながらホストの神経再生を促進させる可能性が示唆された。ネコ脊髄損傷モデルに対する神経束移植の実験系を確立し、神経束移植後の呼吸機能評価として、延髄孤束核からの移植神経束を介した肋間筋や横隔膜の活動電位を評価する実験系を確立した。ネコの頸髄の半切モデルを作成し、中枢神経用血管内在神経束を移植し、ネコの神経症状の改善過程を明らかにするとともに、呼吸機能の電気生理学的評価では、延髄から脊髄にかけての吸息性ニューロン、呼吸性ニューロン刺激を行い、横隔神経の活動電位を評価する実験系を確立し、脊髄損傷後の血管内在神経束が脊髄再生を促進させる過程を評価することができた。組織学的評価では移植神経束内に、神経線維と血管内皮が生存していることを確認することができた。神経導管と血管内在神経束の作成技術を確立し、これらは末梢神経損傷や脊髄損傷に対する新たな再生医療技術となることを検証することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takaoka Shohei, Uchida Fumihiko, Ishikawa Hiroshi, Toyomura Junko, Ohyama Akihiro, Watanabe Miho, Matsumura Hideaki, Marushima Aiki, Iizumi Seichiro, Fukuzawa Satoshi, Ishibashi-Kanno Naomi, Yamagata Kenji, Yanagawa Toru, Matsumaru Yuji, Bukawa Hiroki	4. 巻 35
2. 論文標題 Transplanted neural lineage cells derived from dental pulp stem cells promote peripheral nerve regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 462 ~ 471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-021-00634-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumura Hideaki, Marushima Aiki, Ishikawa Hiroshi, Toyomura Junko, Ohyama Akihiro, Watanabe Miho, Takaoka Shohei, Bukawa Hiroki, Matsumura Akira, Matsumaru Yuji, Ishikawa Eiichi	4. 巻 18
2. 論文標題 Induced Neural Cells from Human Dental Pulp Ameliorate Functional Recovery in a Murine Model of Cerebral Infarction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reviews and Reports	6. 最初と最後の頁 595 ~ 608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12015-021-10223-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirata Koji, Marushima Aiki, Nagasaki Yukio, Ishikawa Hiroshi, Matsumura Hideaki, Mujagi? Arnela, Hirayama Aki, Toyomura Junko, Ohyama Akihiro, Takaoka Shohei, Bukawa Hiroki, Matsumura Akira, Ishikawa Eiichi, Matsumaru Yuji	4. 巻 36
2. 論文標題 Efficacy of redox nanoparticles for improving survival of transplanted cells in a mouse model of ischemic stroke	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 1703 ~ 1715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-023-00940-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸島 愛樹、石川 博、松丸 祐司、石川 栄一.
2. 発表標題 疾患が細胞環境に与える変化と影響 - 細胞保護、神経再生、機能再生への挑戦 -
3. 学会等名 第40回日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Arnela Mujagic, Aiki Marushima, Hiroshi Ishikawa, Yuji Matsumaru, Eiichi Ishikawa
2. 発表標題 Establishment of Neuronal Cells Differentiated from Dental Pulp Stem Cells-derived iPS Cells.
3. 学会等名 第40回日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸島愛樹、松村英明、石川博、豊村順子、大山晃弘、渡邊美穂、高岡昇平、武川寛樹、石川栄一、松丸祐司
2. 発表標題 ヒト歯髄由来分化誘導神経系細胞による虚血性脳卒中に対する再生医療の研究開発
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第80回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸島愛樹、松村英明、石川博、豊村順子、大山晃弘、渡邊美穂、高岡昇平、武川寛樹、石川栄一、松丸祐司
2. 発表標題 ヒト歯髄由来分化誘導神経系細胞による脳梗塞に対する細胞治療
3. 学会等名 第64回日本脳循環代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸島愛樹、平田浩二、石川博、長崎幸夫、文湊湖、Arnela Mujagic、豊村順子、大山晃弘、松丸祐司、石川栄一
2. 発表標題 虚血性脳卒中に対する高分子ラジカル消去剤を用いた神経保護と細胞治療
3. 学会等名 第41回日本ヒト細胞学会 学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丸島愛樹、平田浩二、長崎幸夫、石川博、文湊湖、Arnela Mujagic、豊村順子、大山晃弘、石川栄一、松丸祐司
2. 発表標題 高分子ラジカル消去剤を用いた移植細胞保護と脳卒中中の再生医療
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

〔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
研究 分担者	石川 博 (Ishikawa Hiroshi) (30089784)	筑波大学・医学医療系・研究員 (12102)	
研究 分担者	武川 寛樹 (Bukawa Hiroki) (80173558)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	

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