

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791899

研究課題名（和文） 脳梗塞に対する歯髄由来神経幹細胞の応用に関する研究

研究課題名（英文） Effect of dental pulp stem cell therapy for cerebral ischemia

研究代表者

豊下 祥史（TOYOSHITA YOSHIFUMI）

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：20399900

研究成果の概要（和文）：ラット歯髄より得られた歯髄細胞をニューロスフェア法により培養したところ、神経細胞への分化が可能な神経幹細胞が得られた。次に実験的に脳梗塞を引き起こしたラットにこれらの歯髄由来神経幹細胞を移植したところ、それらの細胞が脳梗塞巣の周囲から検出され、脳梗塞巣に到達していたことが明らかとなった。さらに歯髄由来神経幹細胞を移植したラットでは後遺症である運動機能障害や学習記憶機能障害の回復に促進が認められた。

研究成果の概要（英文）：Rat dental pulp cells were differentiated into neural stem cells and these cells were transplanted to rat middle cerebral artery occlusion models. The therapeutic transplantation promotes recovery of the disorders after cerebral infarction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：脳梗塞・歯髄・神経幹細胞・分化・細胞移植

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は、日本人の死亡原因の中でも多くの割合を占めており、後遺症を残して介護が必要となることが多く、介護・福祉の面でも大きな社会問題となっている。現在、脳梗塞の急性期治療には、血栓溶解療法、脳保護薬、低体温療法など数多くの治療方法が存在するが、いずれの治療も、治療の有効性やエビデンスが十分に検討されているとは言えず、脳梗塞を完治させる治療方法は現在のところ確立していない。

2. 研究の目的

歯髄細胞は種々の細胞から構成され、その中には多能性を持つ間葉系幹細胞の存在が報告されている。それらは、骨細胞や脂肪細胞に分化することが確認されている。神経幹細胞の集合体であるニューロスフェアを形成させるニューロスフェア法による培養によって、歯髄細胞から神経幹細胞が分離できることが確認されており、脳梗塞治療に歯髄細胞から得られた神経幹細胞を応用することは十分可能であると考えられる。

本研究では、歯髄細胞から得られた神経幹

細胞を分離し、それらの細胞の脳梗塞後遺障害の回復に対する効果を検討することによって、「歯髄細胞を利用することにより、より安全で効果的な脳梗塞治療の方法を確立する。」ことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 歯髄からの神経幹細胞の分離

イソフルランによる麻酔下にて、4 週齢 Wistar 系雄性ラットの下顎門歯より、歯髄を一塊にして取り出した。歯髄はコラゲナーゼ処理を行い、個々の細胞に分離した後、Paceyらの方法 (Neural Stem Cell Culture: Neurosphere generation, microscopical analysis and cryopreservation, Nature Protocols, Protocol Exchange. doi:10.1038/nprot.2006.215 Published online 25 August 2006.) に従い、表 1 に示す培地にて 37°C、5%CO₂ の条件下で 1 週間培養を行った。

表 1 培地の組成

DMEM/F12	94.3ml
30%Glucose	428mg
1M HEPES Buffer	59.57mg
Progesterone	3.14ug
Putrescine	480ug
B27 Growth Supplement	1000ul
EGF	1ug
FGF	0.25ug
ITSS	0.5mg
Heparin	90ug

(培地 100ml 当たり)

1 週間の培養後、神経幹細胞のマーカーであるネスチンおよび CD81 に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

(2) 神経細胞への分化能の検証

(1) の方法で培養した細胞を神経細胞へ分化誘導する培地 (NeuroCult NS-A Differentiation Medium, Stem cell technologies) を用いてさらに 1 週間培養した。培養後の細胞は、神経細胞マーカーである neuron specific enolase (NSE) に対する抗体を用いて免疫染色を行った。また、細胞の mRNA を抽出した後、神経栄養因子の一つである brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の発現を調べるため、Taqman probe (Rn02531967, Applied Biosystem) を用いて、リアルタイム RT-PCR を行った。ラットの大脳皮質および歯髄細胞を対照試料として、同

様の実験を行った。

(3) 脳梗塞モデルラットへの神経幹細胞の移植

10 週齢の Wistar 系雄性ラットを用い、脳梗塞モデルラットの製作を行った。脳梗塞の製作術式は以下の通りである。

①外頸動脈と内頸動脈分岐の同定

②総頸動脈の一次的結紮

③外頸動脈の切断後、外頸動脈側からの栓塞用物質の内頸動脈さらに中大脳動脈への挿入

④総頸動脈の一次的結紮の解除

⑤外頸動脈切断部の結紮

⑥栓塞用物質挿入から 90 分後に栓塞用物質を除去し再灌流させた。

再灌流から 90 分後すなわち脳梗塞発症から 3 時間後に、(1) の方法で 1 週間培養した細胞を脳梗塞モデルラット 1 匹当たり、 1×10^6 個大脳静脈より移植した。

移植細胞の代わりに生理食塩水を用い、上記と同様の実験を行う対照群を設定した。

(4) 神経幹細胞の梗塞巣への到達と梗塞巣への影響に関する検証

(3) で用いる移植細胞を細胞追跡試薬である Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit で処理を行い、細胞移植を行った。移植から 2 週間後に、ラットを安楽死させ、頭蓋より脳組織を一塊として取り出し、4%パラホルムアルデヒドで固定をした。パラフィン包埋後、梗塞巣を含む大脳皮質を前頭面で切断し、薄切切片を製作した。ヘキストによる核染色を行ったのち、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。

また、ラットを安楽死させ脳を摘出した後、-20°C 15 分間凍結を行った。凍結後、前頭面切片を作製するため、大脳と小脳の境界から嗅球の間を 2 mm 厚で 6 枚のスライスを作製した。2%2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 溶液にて 37°C で 30 分間インキュベートし、TTC 染色を行った。なお、脳梗塞体積は各切片の梗塞面積から測定し NIH ImageJ software によって算出した。

(5) 神経幹細胞移植後の運動感覚機能の評価

脳梗塞後の感覚運動機能障害の回復過程の評価に、四肢の感覚運動能を容易に観察することが可能である Limb placement test (LPT) を用いた。実験者によってラットを扱い、机の端や上を利用して前肢と後肢の運動感覚機能の評価を行った。評価項目は前肢 6 項目、後肢 2 項目であり、各項目のスコアは 3 段階に分けられる。各スコアは、「肢を置くことができない」場合には 0 点を、「遅延する、もしくは肢を置くことができる」場合

には1点を、「すぐに肢を置くことができる」場合には2点を付与した。その合計点数が高いほど障害の程度は軽度とした。最大値は16点である。なお、LPTは脳梗塞後1日目、3日目、7日目、14日目に行った。

さらに、協調運動機能の回復を評価するため、脳梗塞後14日目にローターロードテストを行った。毎分15回で回転するシャフト上にラットを乗せ、シャフトから転落するまでの時間を落下潜時として計測した。

(6) 神経幹細胞移植後の学習記憶機能の評価

脳梗塞後の学習記憶機能障害の回復過程の評価に、長期記憶の保持を指標とするステップスルー型受動的回避試験を用いた。脳梗塞後14日目に、明室に入れられたラットが暗室内に移動した際、電気刺激を受けその記憶を獲得し、暗室へ移動しなくなるまでの過程を繰り返した。なお、300秒間暗室へ移動しないことで、ラットが明室に留まることを学習したと判断した。24時間経過後に再びラットを明室に入れ、明室に留まった時間を反応潜時として測定した。

4. 研究成果

(1) ニューロスフェアの形成

歯髄細胞培養後、1週間で直径50~200 μ mの球状の細胞塊(スフェア)を形成した(図1)。



図1 歯髄細胞から形成された細胞塊。

1 \times 10⁶個の歯髄細胞を1週間培養することで、約1 \times 10⁶個のスフェアを形成する細胞が得られた。得られたスフェアを遠心分離により回収し継代したところ、細胞の増殖により約1.2倍の細胞が得られた。

(2) 形成されたスフェアがもつ神経幹細胞マーカー

スフェアを回収し、神経幹細胞のマーカーであるネスチンおよびCD81に対する抗体と反応させ、さらに蛍光色素を結合させた2次抗体で処理し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、ネスチンおよびCD81の発現が認められた(図2)。

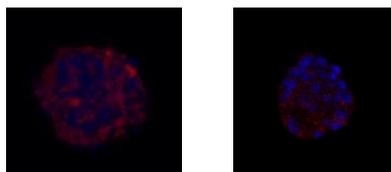


図2 各マーカー抗体で染色されたスフェア。左:抗ネスチン抗体による染色、右:抗CD81抗体による染色。

(3) 形成されたスフェアの神経細胞への分化能

形成されたスフェアを神経細胞への分化誘導培地に懸濁し、1週間培養したところ、多角形の細胞を認めた。これらの細胞は、神経細胞マーカーであるNSEを発現していた(図3)。さらに、神経栄養因子の一つであるBDNFの遺伝子発現が認められ、その発現量は正常脳組織の約50%であった。培養前の歯髄においては、ほとんど発現が認められなかった(図4)。

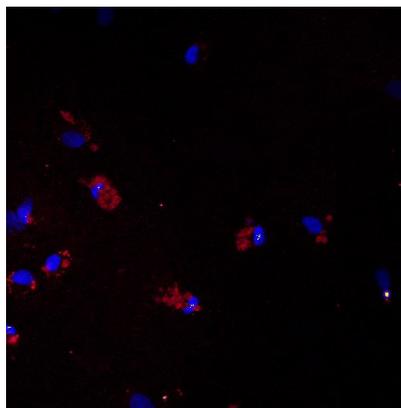


図3 神経細胞への誘導培地で培養した細胞像。赤色がNSE。青色はヘキストにより染まった核。

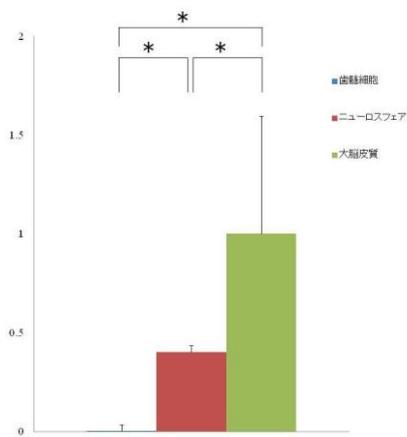


図4 BDNFの遺伝子発現量の比較。

以上の結果から、歯髄細胞には神経幹細胞の

集団であるニューロスフェアを形成することが可能な細胞を含んでおり、これらの細胞から形成されたニューロスフェアは神経細胞に分化する能力を持合わせていることが示唆された。

(4) 脳梗塞モデルラットに移植されたニューロスフェアの行方と脳梗塞巣への影響

歯髄細胞から得られたニューロスフェアを細胞追跡試薬で処理し、脳梗塞モデルラットへ移植した。移植された細胞は肝臓でトラップされていたが、一部の細胞は梗塞巣の周囲へ集積していた(図5)。正常な脳組織は血液脳関門により細胞が容易には通過できないようになっているが、細胞移植を行った脳梗塞後3時間前後は血液脳関門が破壊されることが報告されており、本研究で用いた細胞は、大腿静脈から心肺循環へ入り、大動脈から内頸動脈さらには梗塞を起こした中大脳脈を通過し、破壊された血液脳関門から梗塞巣に遊走していったと考えられる。

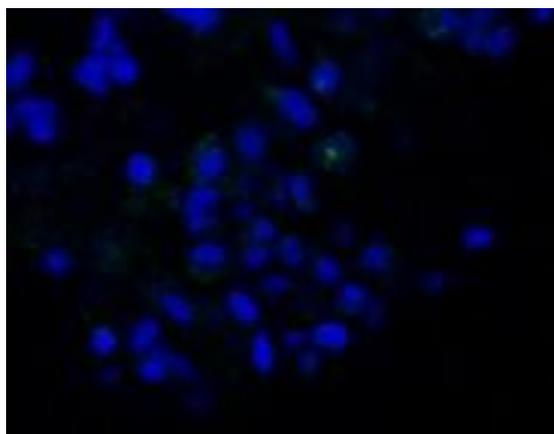
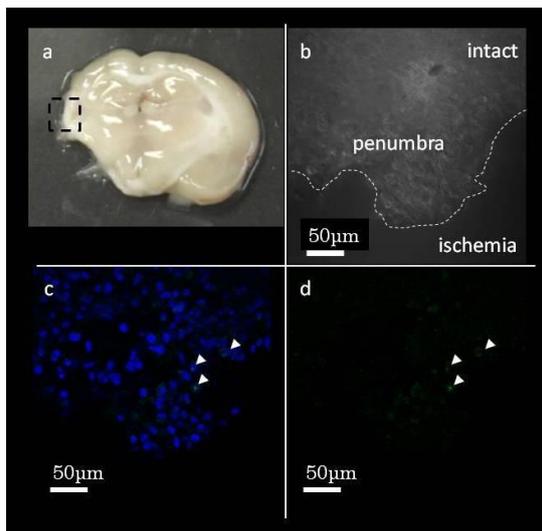
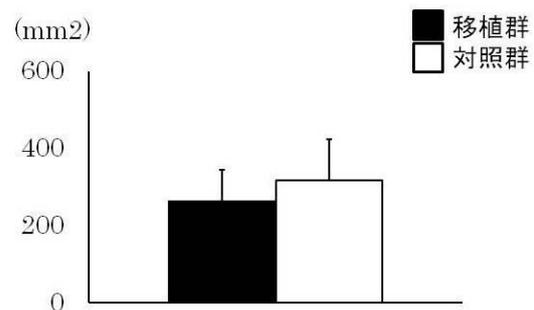


図5 上段 a: 脳梗塞を起こした脳の断面。点線で囲まれた部分が観察部位。b: 点線より上部が正常組織、下部が脳梗塞巣。点線の

すぐ上部には反影帯が認められる。c: 細胞追跡試薬(緑色部)を含む移植細胞。矢印は細胞追跡色素を示す。下段 移植細胞の拡大像。

また、脳梗塞発症から14日後に脳梗塞巣の体積について神経幹細胞を移植した移植群と、生理食塩水のみを静脈注射した対照群で比較したところ、対照群に比較して移植群の梗塞巣体積が縮小している傾向を認めた(図6)。

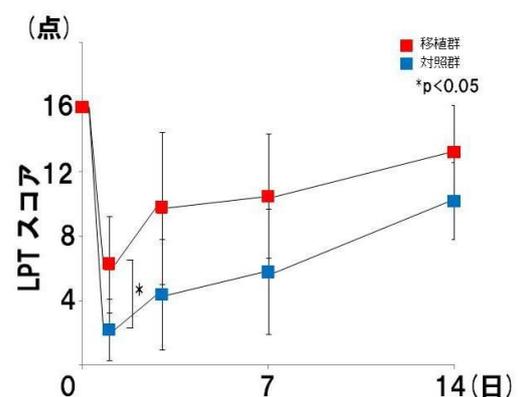
図6 脳梗塞発症から14日後の脳梗塞巣体積の比較



(5) 神経幹細胞移植後の運動感覚機能の評価

脳梗塞後の感覚運動機能障害の回復過程を図7に示す。移植群、対照群ともに、脳梗塞発症前は16点であった。脳梗塞1日後に移植群が有意なLPTスコアの上昇を示した。脳梗塞後から14日後まですべての時点において、対照群に比較して移植群の回復が早い傾向を示した。

図7 脳梗塞後のLPTスコアの推移



また、ローターロードテストによる協調運動の回復においても、移植群は対照群に比較して有意に高い値を示した(図8)。これらの結果から、歯髄から得られた神経幹細胞の脳梗塞モデルラットへの移植は、脳梗塞後遺障害の一つである運動障害の回復に有効であ

ることが示唆された。

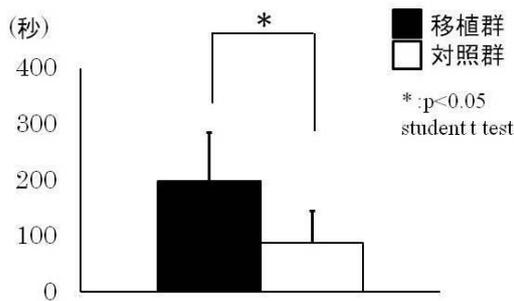


図8 脳梗塞発症から14日後のローターロッドテストの落下潜時の比較

(6) 神経幹細胞移植後の学習記憶機能の評価

脳梗塞発症から14日後のステップスルー型受動的回避試験の結果を図9に示す。移植群は対照群に比較し、約2倍の時間明室にとどまる事ができ、記憶の保持が有意に高かった。これらの結果から、歯髄から得られた神経幹細胞の脳梗塞モデルラットへの移植は、脳梗塞後遺障害の一つである学習記憶機能障害の回復に有効であることが示唆された。

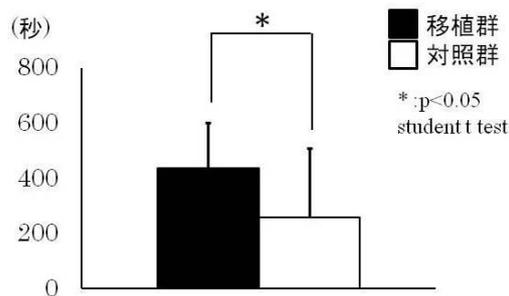


図9 脳梗塞発症から14日後のステップスルー型受動回避試験の反応潜時の比較

以上の結果から、歯髄には神経栄養因子を作り出す神経細胞に分化可能な神経幹細胞が存在し、それらの細胞を脳梗塞患者に移植すると、脳梗塞巣へ到達し、幹細胞の増殖、神経細胞への分化、BDNFの分泌を介し、梗塞巣周囲の環境を整え、梗塞巣の縮小へ寄与していることが明らかとなった。さらに、この結果は脳梗塞後遺障害である運動機能や学習機能の早期回復に有効であることが示唆された。

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6件)

① Yoshifumi Toyoshita、Satoshi Nuka、

Kastuya Kawanishi、Mai Kono、Hideki Aita、Hisashi Koshino、The correlation among practical training components in preclinical training of complete denture prosthodontics、北海道医療大学歯学会雑誌、査読有、印刷中、2013

② 川西克弥、豊下祥史、越野 寿、河野 舞、松原国男、会田康史、會田英紀、池田和博、守屋信吾、三浦宏子、東日本大震災の被災地における歯科医療支援活動と栄養・食生活支援活動との関連について、日本咀嚼学会雑誌、査読有、22巻、2012、52-61

③ 豊下祥史、会田康史、額 諭史、川西克弥、會田英紀、池田和博、守屋信吾、越野 寿、定高齢者候補者の咀嚼機能と基本チェックリストの各因子との相関、日本補綴歯科学会誌、査読有、4巻、2012、49-58

④ Moriya Shingo、Tei Kanchu、Toyoshita Yoshifumi、Koshino Hisashi、Inoue Nobuo、Miura Hiroko、Relationship between periodontal status and intellectual function among community-dwelling elderly persons、Gerodontology、査読有、29巻、2012 e368-e374

DOI: 10.1111/j.1741-2358.2011.00483.x

⑤ Toshihiro Hirai、Youngnam Kang、Hisashi Koshino、Katsuya Kawanishi、Yoshifumi Toyoshita、Yasuhiro Ikeda、Mitsuru Saito、Occlusal-masticatory function and learning and memory - Immunohistochemical, biochemical, behavioral and electrophysiological studies in rats -、Japanese Dental Science Review、査読有、46巻、2010、143-149

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdsr.2009.12.002>

⑥ Katsuya Kawanishi、Hisashi Koshino、Yoshifumi Toyoshita、Maki Tanaka、Toshihiro Hirai、Effect of Mastication after Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats、Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases、査読有、19巻、2010、398-403

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2009.07.011>

[学会発表] (計10件)

① Toyoshita Yoshifumi、Kawanishi Katsuya、Sasaki Mizuho、Aita Hideki、Koshino Hisashi、Potential for differentiation of dental pulp cells into neuron、91th General Session & Exhibition of the IADR、2013年3月23日、アメリカ合衆国シアトル

② 佐々木みづほ、川西克弥、豊下祥史、會田

英紀、越野 寿、脳梗塞モデルラットの脳内における細胞増殖への咀嚼の影響、日本咀嚼学会第23回総会・学術大会、2012年10月14日、札幌

- ③佐々木みづほ、川西克弥、豊下祥史、會田英紀、越野 寿、脳梗塞モデルラットにおける海馬歯状回の細胞増殖への咀嚼の影響、第23回日本老年歯科医学会、2012年6月23日、筑波
- ④Watanabe Shinya、Toyoshita Yoshifumi、Aita Hideki、Koshino Hisashi、Hirai、Toshihiro、The Effect of Mastication on the Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Rat Brain、14th Biennial Meeting of the International College of Prosthodontists、2011年9月9日、アメリカ合衆国ハワイ
- ⑤佐々木みづほ、豊下祥史、渡辺真也、川西克弥、會田英紀、橋川美子、小西洋次 伊東由紀夫、越野 寿、平井敏博、脳梗塞モデルラットにおける神経栄養因子発現への咀嚼の効果、社団法人日本補綴歯科学会第120回記念学術大会、2011年5月20日、広島
- ⑥佐々木みづほ、豊下祥史、川西克弥、河野舞、會田英紀、越野 寿、脳梗塞モデルラットにおける後遺障害の回復に咀嚼が及ぼす影響、口腔先端応用医科学研究会第3回学術会議、2011年1月22日、東京
- ⑦渡部真也、豊下祥史、會田英紀、越野 寿、平井敏博、ラットの液体飼料飼育が脳由来神経栄養因子の発現に及ぼす影響、平成22年度 社団法人日本補綴歯科学会 東北・北海道支部総会ならびに学術大会 2010年10月23日、札幌
- ⑧佐々木みづほ、豊下祥史、川西克弥、越野 寿、平井敏博、脳梗塞モデルラットにおける短期および長期記憶の形成に咀嚼が及ぼす影響、日本咀嚼学会第21回学術大会、2010年10月1日、東京
- ⑨Toyoshita Yoshifumi、Koshino Hisashi、Sasaki Mizuho、Kawanishi Katsuya、Kanazawa Kaoru、Aita Hideki、Miura Yoshihide、Hirai Toshihiro、Effect of dental pulp stem cell therapy for cerebral ischemia、88th General Session & Exhibition of the IADR、2010年7月15日、スペインバルセロナ
- ⑩Kanazawa Kaoru、Toyoshita Yoshifumi、Koshino Hisashi、Hirai Toshihiro、Miura Yoshihide、Effects of dental pulp cell transplantation on global ischemia model、88th General Session & Exhibition of the IADR、2010年7月15日、スペインバルセロナ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊下 祥史 (TOYOSHITA YOSHIFUMI)
北海道医療大学・歯学部・講師
研究者番号：20399900