

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592997

研究課題名(和文) 歯髄組織に由来するニューロスフェアを用いた前脳虚血病態の改善

研究課題名(英文) Improvement of outcome of forebrain ischemia by use of dental pulp derived neurospheres

研究代表者

三浦 美英 (MIURA, Yoshihide)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：50241716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：全脳虚血病態の転帰改善を得るために、歯髄に存在するside population細胞から形成されるneurosphereを用いた。想定される転帰改善の機序について脳内サイトカイン反応とBDNF発現を想定し検討した。ラット重症前脳虚血モデルの再灌流3時間後に歯髄細胞、あるいはneurosphere由来細胞を経静脈的に投与したところ組織学的転帰の改善がneurosphere群で認められた。しかし、脳内サイトカインとBDNFのmRNAの発現量に群間差は認められなかった。Neurosphere投与による全脳虚血病態の転帰改善はサイトカインやBDNFによらないことが推測された。

研究成果の概要(英文)：To improve outcome of global cerebral ischemic pathophysiology, the effect of neurospheres, which was formed from side population cells in dental pulp tissue, were examined. Cerebral expressions of cytokines and BDNF, brain derived neuronal factor, were also examined as expected mechanisms of neuroprotection associated with neurosphere treatment. Post-ischemic intravenous implantation of neurosphere re-derived cells after 3 hours of reperfusion improved histological outcome. However, mRNA expressions either of cytokines or BDNF were not significantly different among groups. It was surmised that outcome improvement from neurosphere treatment was caused by mechanisms other than cerebral inflammation process or BDNF overexpression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：前脳虚血モデル 歯髄 neurosphere ラット

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表は脳保護を指向した麻酔・全身管理について研究してきた。ラット脳虚血モデルにおいて、脳温を正常に維持した場合、イソフルラン 1MAC を虚血前から投与すると組織学的転帰は有意に改善した。その作用には用量反応性があり、高濃度では神経毒性に作用した。しかし、セボフルランには明らかな用量反応性は認められなかった(論文投稿中)。低血圧麻酔に用いられるプロスタグランジン E_1 は脳保護作用を示した。イヌ出血性ショックモデルを用いた検討では、正常動脈血炭酸ガスを維持することが脳の酸化代謝に有利であった。また臨床における後ろ向き研究では、脳腫瘍摘出術症例の麻酔管理では吸入麻酔よりも静脈麻酔が術後早期の神経学的転帰を改善した。これらの知見は麻酔管理上有用と思われる。

しかし、脳虚血病態のほとんどは手術室外で発症し、治療介入は虚血後相当の時間経過後に開始されるのが一般的である。部分脳虚血(脳梗塞)に対しては既に血栓溶解療法が確立しており、tPA 静注療法は発症後 4.5 時間まで適応がある。一方、心停止に代表される全脳虚血病態を改善する可能性のある薬理学的な手段は知られておらず、自己心拍再開患者に対しては低体温療法が行われている。低体温療法は蘇生ガイドライン上推奨されており、その有用性について多く報告されているが、無作為臨床研究の結果は得られていない。また本法の適応は自己心拍再開までの時間が 30 分以内と短いことも問題である。脳低温療法が有用で脳蘇生が得られた患者においても重度の障害が残存するもの、あるいは軽度障害でも高度脳機能障害に苦しむ患者は多い。全脳虚血病態には、時間的により幅が広く、かつ、より有効性の高い治療法が求められている。

(2) 近年脳虚血病態や脊髄損傷に対して幹細胞を用いることが広く研究されている。私どもは全脳虚血病態の発症後に幹細胞を投与することで転帰の改善が得られるのではないかと発想を得た。

歯髄組織に存在する side population 細胞は神経系幹細胞を含む neurosphere を形成することが知られている。我々はまず、幼若ラット歯髄組織由来細胞が浮遊培養により neurosphere を形成し、神経系前駆細胞のマーカー (nestin、CD-81) を発現することを確認した。

これまでの動物実験での報告は細胞を脳室内に投与している。この手法は、既に重症な虚血に陥っている動物にさらなる侵襲を加えることになるほか、転帰に影響する可能性もある (spreading depression 現象により脳保護的に作用する可能性がある)。我々は、このような問題のない静脈投与を行うこととした。予備的実験により、歯髄細胞ならびに neurosphere より得られた細胞の静脈投与

は虚血後ラットの生存率に影響しないことを確認した。

2. 研究の目的

(1) 脳虚血後の転帰改善の可能性を探求するために、神経系前駆細胞を用いる。神経系前駆細胞の供給源として歯髄組織より得られた neurosphere を用いる。ラットの前脳虚血モデルを用い、虚血後に neurosphere に由来する細胞を経静脈的に投与し、その転帰への影響を検討する。

(2) neurosphere 由来細胞の投与により予想される脳虚血後転帰改善の機序として、脳組織の炎症反応抑制、並びに neurosphere 由来細胞からの液性因子として BDNF (brain derived neurotrophic factor) 増加を想定した。虚血後の脳組織サイトカインと BDNF の mRNA 発現について RT-PCR により経時的に測定し、これら因子の関与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 歯髄組織の採取

第 5 週齢雄性 Sprague-Dawley (S-D) ラット 6 匹を用いる。ラットをエーテル麻酔で鎮静後に頸椎脱臼により安楽死とし、下顎中切歯より歯髄組織を一塊として摘出する(合計 12 歯)。その際、歯髄組織より結合組織と血管を可能な限り除去する。

(2) neurosphere の形成および neurosphere 由来細胞の調整

本法は Pacey らの方法を参考に行った (http://www.natureprotocols.com/2006/08/25/neural_stem_cell_culture_neuro.php)。具体的には、歯髄組織をコラゲナーゼ type 1 で 4~5 時間処理し、EGF、FGF 等を加えた無血清培地で浮遊細胞培養を 1 週間行う。虚血実験の当日、neurosphere の形成状況を確認し、実体顕微鏡中拡大視野の計測で neurosphere 数約 40 個/1 視野以上の培養系を移植実験に用いる。培養液を回収後、200g、5 分間で遠心し、上清除去後 TrypLE 2.0ml を加え 37°C 恒温槽で 20 分間 incubation する。次に 500g、5 分間で遠心後、上清を除去し、SFM 1ml を加え triturate し、neurosphere 由来の細胞を得る。移植直前に遠心を行い、上清を除去し、生理食塩水に浮遊させ細胞数 1×10^6 個になるよう調整し移植に用いる。

(3) 歯髄組織由来細胞の調整

虚血実験当日に歯髄組織を採取する。コラゲナーゼ type 1 で 4~5 時間処理し、(2) と同様の方法により歯髄組織由来の細胞を得る。生理食塩水に浮遊させ細胞数 1×10^6 個に調整する。

(2) と (3) における細胞の調整は虚血実験の進行に合わせて進め、再灌流 3 時間の直前に生理食塩水 1ml 中 1×10^6 個の細胞が提供されるように時間を調整する。

(4) 実験群の設定

対照群 (Control)、Sham 手術群 (Sham)、生食群 (Saline)、歯髄細胞移植群 (Pulp)、そして neurosphere 由来細胞移植群 (Sphere) の 5 群を設定する。ただし、慢性実験では Control は除いた 4 群とした。実験プロトコルを設計した段階では、凍結した neurosphere を解凍した細胞を移植する群を計画したが、予備的研究の段階で研究期間内に終了できないことが判明したため、この群設定は割愛した。

(5) 慢性実験

全脳虚血侵襲 (global ischemic insult) を与える慢性実験として、両総頸動脈閉塞に全身性低血圧を併用する前脳虚血モデル (forebrain ischemia model) を適応した。実験には 8-11 週齢、体重 270-350 g 前後の雄性 S-D ラットを用いた。全身麻酔薬は転帰への影響が少ないハロタンを用いた。

一晩絶食させたラットをハロタン 5% で麻酔導入し、気管挿管後にハロタンを 1.5% とし、FI02 0.3 で人工呼吸を行った。術創に 1% リドカインにより浸潤麻酔を行った。側頭筋膜下に頭蓋近傍温測定用の針電極を刺入し、両側頭筋と鼻部に脳波測定用の針電極を刺入した。頭蓋近傍温は実験中 37°C を維持するよう、赤外線ランプと頭部への送風によりサーボコントロールした。尾動脈と尾静脈にカニューレーションを行い、尾動脈は血圧測定、血液ガス測定、輸液投与ルートに用い、尾静脈は細胞投与ルートに用いた。頸部を切開し、内頸静脈にカニューレーションを行い、脱血用に用いた。両総頸動脈より迷走神経幹と交感神経叢を剥離し、総頸動脈に絹糸をかけた。虚血手術終了後、ハロタン 1% とし 30 分間の安静にした。この間に血液ガス分析を行い、正常炭酸ガス血症となるよう人工呼吸器を調整した。なお、対照群はハロタン麻酔下の挿管のみとし、Sham 群は虚血手術を行うものの虚血侵襲は与えないものとした。

次に前脳虚血侵襲を 11 分間与えた。サクシニルコリン 1 mg 投与後、脱血により平均動脈圧を 30 mmHg まで低下させた後、動脈瘤クリップを用いて両総頸動脈を閉塞した。虚血の効果は脳波で確認し、平坦脳波に至らない場合は実験を中止した。虚血時間は通常では 10 分であるが、細胞投与効果をより明確に示すために 11 分間とした (予備実験による死亡率; 11 分: 約 30%、12 分: 100%)。虚血終了時に返血し、両総頸動脈閉塞を解除し、頸部を閉創した。再灌流中も正常炭酸ガス血症を維持した。再灌流 3 時間後、Saline では生食 1ml、Pulp では歯髄組織由来細胞、Sphere では neurosphere 由来細胞を静脈内投与した。

上記処置後ラットを覚醒させ、14 日間生存させた。第 12 日から 3 日間連続で水迷路試験を行い、第 14 日に神経運動機能試験を行

った。水迷路試験は墨汁を用い、プラットフォームが見えない環境で施行した (1 日 4 セッション、1 回最長 90 秒)。神経運動試験終了後、ハロタン麻酔下に経心臓的ホルマリン投与を行い、背側海馬領域を含む 5 μ m の厚さの HE 標本を作成した。海馬 CA1 領域の神経細胞死亡率を算出し、組織学的転帰とした。

(6) 急性実験

リアルタイム PCR により虚血後の脳組織サイトカイン (TNF- α , IL-1 β , IL-6)、脳由来向神経因子 (BDNF) の mRNA 発現状況について、Control, Sham, Saline, Pulp, Sphere の各群の経時的発現を比較検討する。

平成 17 年度科学研究費補助金を得た研究で、各サイトカイン mRNA は虚血後 24 時間前後にピークが見られたことから、脳組織摘出のタイミングは 24 時間までの時系列、すなわち、細胞投与後 0 時間、3 時間、6 時間、12 時間、そして 24 時間と設定した。Control, Sham, Saline, Pulp, Sphere の各群と合わせ、計 23 群で計測を行うこととした (0 時間は Control, Sham, Saline の 3 群のみ)。

慢性実験の各群において、細胞投与後の各時点で高濃度ハロタンを投与しラットをサクリファイスした。心停止確認後、直ちに断頭し、脳を速やかに摘出した。Bregma -4mm の位置で 1mm 圧の脳組織を冠状断で切り出し、RNeasy Lipid Tissue Midi Kit[®] を用いて total RNA を抽出した。次に High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit[®] を用いて cDNA を作成し、TaqMan Gene Expression Assay[®] によりリアルタイム PCR を行った。ハウスキーピング遺伝子として GAPDH を用いた。検体は測定まで -80°C で保存した。

4. 研究成果

(1) 慢性実験-転帰-

すべての動物において、実験中の生理学的パラメータ (虚血前の血圧、血糖値、ヘマトクリット値、血液ガス諸数値) は正常範囲内に制御された。頭蓋近傍温は虚血中、再灌流直後を除いて 37 \pm 0.1°C に維持された。また、すべての動物で、虚血中の脳波が平坦となったことを確認した。

① 虚血後痙攣発症と生存

Sham 9 匹、Saline 11 匹、Pulp 9 匹、Sphere 9 匹について実験を行った。生存/死亡は Sham 9/0, Saline 8/3, Pulp 9/0, Sphere 9/1 であり、死亡率に有意差はなかった (カイ二乗検定; P=0.2437)。Sphere 群の死亡は手術中の異常低血圧持続のため継続を断念したものであり、細胞投与に伴うものではなかった。また、Saline で 1 匹、虚血第 1 日に痙攣が発症した。

②神経運動試験(NMT: Neuromotor Test) 図1
虚血実験 14 日後のラットに 3 種類の身体機能 (棒上での平衡維持、垂直にした金網への

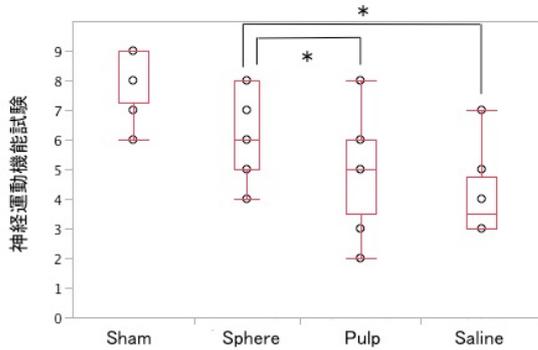


図1 神経運動機能試験

しがみつき、ロープへのぶら下がり) を施行した。各項目 3 点で、最良が 9 点である。神経運動機能試験には有意差があり (Kruskal-Wallis検定: $P < 0.001$)、Shamは他の群よりも有意に良好であった。虚血を生じさせた 3 群において、SphereはSaline, Pulpよりも有意に良好な結果であった。

③水迷路試験 図2

プラットフォームに到達する時間は全ての群で経日的に有意に短縮した (repeated

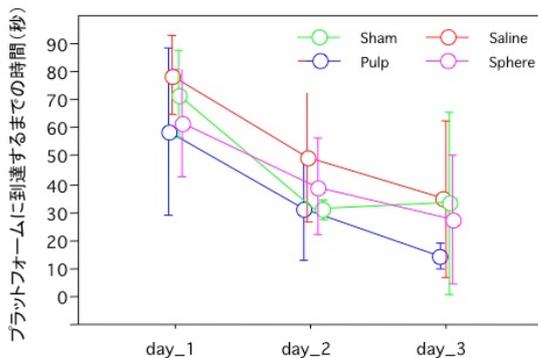


図2 水迷路試験

ANOVA; $P < 0.001$). post hoc test では Pulp の変化は Saline よりも全体として低値であった。しかし、各時点 (day 1 から day 3) での検討では群間差は認められなかった。

④海馬 CA1 神経細胞死亡率 図3

海馬 CA1 領域の神経細胞を強拡大視野で観察し、細胞質のエオジン好性を示すもの、細胞質内に空胞が認められるもの、あるいは細胞形態が崩壊しているものを死亡細胞としてカウントし、神経細胞の死亡率を算出した。計測は両側海馬について行い、左右のうちより高い値を採用した。神経細胞死亡率の計測にあたっては、群分けについて知らされていない研究分担者 (金澤香) が行った。

Sham においても神経細胞死の基準に合致する細胞が一定数認められた。虚血を生じさ

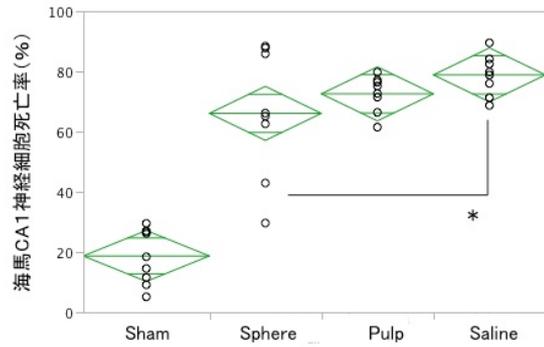


図3 海馬CA1神経細胞死亡率

せた 3 群においては、Sphere は Saline よりも神経細胞死亡率が有意に低値であった ($P = 0.0486$)。ただし、Sphere の組織学的所見には大きなばらつきが認められた。

(2)急性実験-脳組織におけるサイトカインと BDNF の mRNA 発現- 図 4~7

脳組織におけるサイトカインおよび BDNF の mRNA 発現の経時的変化を測定することにより、細胞投与による虚血後転帰改善機序の一端を明らかにしようとして計画した。測定は大脳皮質と海馬に分けて行った。縦軸は mRNA 発現量の相対値である。

研究の方法の(6)に記したように、本研究には 23 群と膨大な群が必要と考えられ、大脳皮質と海馬の測定、さらには Sphere と Pulp においては 1 検体 (脳組織) を得るのに成体ラット 1 匹と幼若ラット 6 匹が必要であった。時間的・予算的制約から各群 3 検体 (脳組織) に制限せざるを得なかった。

測定を行ったいずれの項目についても統計学的な有意差を認めることはできなかった。

①TNF- α 図 4

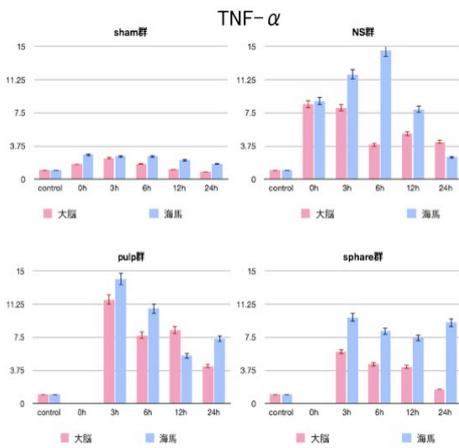


図4 脳組織TNF- α mRNA発現量

Sham では経時的変動が観察されなかった。虚血を行った群において、虚血後、特に海馬で高値が持続する傾向が見られた。

②IL-1 β

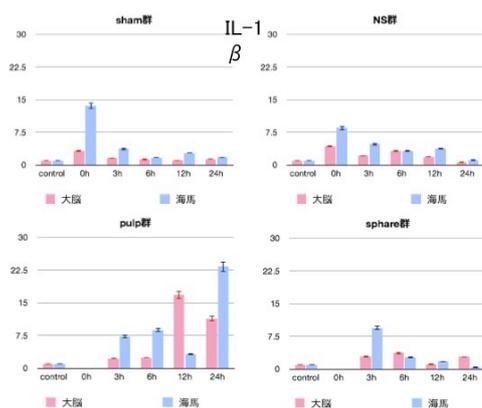


図5 脳組織IL-1 β mRNA発現量

Pulpにおいて、虚血後経時的に増加する傾向が見られた。

③IL-6

虚血侵襲に伴う IL-6 の増加は Sphere でやや

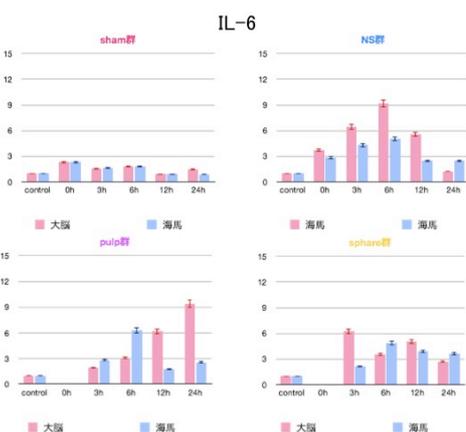


図6 脳組織IL-6mRNA発現量

抑制される傾向が見られた。

④BDNF

Pulp における海馬での発現量は他群よりも

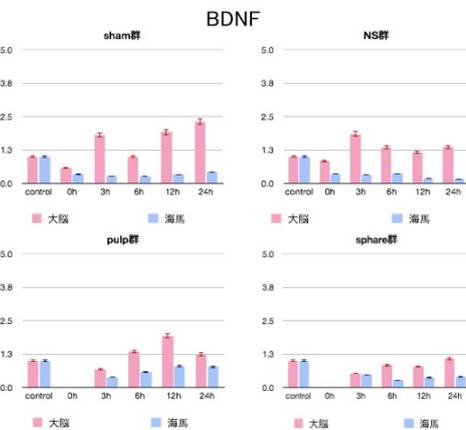


図7 脳組織BDNF mRNA発現量

高い傾向があった (P=0.097)。Sphere では予想に反し、観察期間中ほとんど変化しなかった。

(3) 結果のまとめ

Sphere に由来する細胞を、重症前脳虚血侵襲後に静脈投与することで、神経運動機能試験と組織学的転帰の改善が得られた。全脳虚血が生じた後の介入で転帰の改善が得られたことは大きな成果であると考えられる。しかし、Sphere における海馬 CA1 神経細胞死亡率には大きなばらつきが見られた。これは活性を有する細胞の割合の相違が影響したのかもしれない。一方、Pulp は Saline に比べ死亡例はなく、転帰については Sphere と Pulp の中間であった。これは予想以上の結果であった。

研究開始時の仮説として、Sphere では炎症反応が抑制され、BDNF が増加するだろうと考えたが、サイトカインと BDNF の有意な変化は観察されなかった。慢性実験の結果と合わせ考えると、Sphere における転帰改善の効果はサイトカインと BDNF 以外の因子によると考えなければならない。

今後、細胞による全脳虚血病態の改善の研究を進めるためには、適切な組織、指摘細胞量、投与方法について検討を行う必要がある。Sphere における組織学転帰のばらつきを考えると、フローサイトメトリーにより活性の高い細胞を選択して投与するという方法も考慮に値するものと思われる。

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)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① 内澤理恵、吉本裕代、大桶華子、三浦美英、セボフルランを用いた上下顎移動術の術後にテント状 T 波から高カリウム血症と高ミオグロビン血症が判明した 1 症例、歯科麻酔学会誌、査読あり、42 巻、2014、14-15
- ② Miura Y, In reply: Superior recovery profiles of propofol-based regimen as compared to isoflurane-based regimen in patients undergoing craniotomy for primary brain tumor excision: a retrospective study, J Anesth, 査読あり, vol 27, 2013, 477-478
- ③ Miura Y, Kamiya K, Kanazawa K (他 4 名), Superior recovery profiles of propofol-based regimen as compared to isoflurane-based regimen in patients undergoing craniotomy for primary brain tumor excision: a retrospective study, J Anesth, 査読あり, Vol 26, 2012, 721-727
- ④ 熊坂愛里、三浦美英、下顎枝矢状分割術中に三叉迷走神経反射を起こした 2 症例、歯科麻酔学会誌、査読あり、41 巻、2013、47-48
- ⑤ 三浦美英、デスフルラン、北海道医療大学歯学雑誌、査読なし、31 巻、2012、126

- ⑥ 大桶華子、金澤香、三浦美英 (他 4 名)、
歯科治療時の吸入鎮静の目的で用いた亜酸化窒素が線維筋痛症患者の鎮痛に有用であった 1 症例、歯科麻酔学会誌、査読あり、40 巻、2012、320-321
- ⑦ 大桶華子、工藤勝、三浦美英、本邦歯学部における浸潤麻酔注射の教育に関する実態調査、歯科医学教育学会誌、査読あり、28 巻、2012、3-11

[学会発表] (計 14 件)

- ① Kumasaka A, Kanazawa K, Miura Y, The effects of dental pulp cells and dental pulp cell-derived neurospheres on the expression of Brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat brain after global ischemia, European Society of Anesthesiology, June 1, 2014, Stockholm, Sweden
- ② Kumasaka A, Kanazawa K, Miura Y, Comparisons of propofol and isoflurane at electroencephalographically equivalent doses on outcomes from severe forebrain ischemia in the rat, European Society of Anesthesiology, June 1, 2013, Barcelona, Spain
- ③ 大桶華子、金澤香、三浦美英 (他 5 名)、
分野を超えた実習の取り組み 歯科麻酔・保存科の合同による局所麻酔下コンポジットレジン修復相互実習、日本歯科医学教育学会、2013 年 7 月 12 日、札幌市
- ④ 大桶華子、工藤勝、三浦美英、トレーナーを導入した下顎孔伝達麻酔注射実習に対する学生の評価は学生相互実習の履修時期により変わるのか、日本歯科医学教育学会、2013 年 7 月 12 日、札幌市
- ⑤ 内澤理恵、金澤香、三浦美英 (他 3 名)、
ロクロニウム臭化物投与直後に発作性上室性頻拍を発症した全身麻酔下歯科治療の一例、日本歯科麻酔学会総会、2013 年 10 月 3 日、横浜市
- ⑥ 工藤勝、大桶華子、内澤理恵、金澤香、三浦美英、歯科麻酔・保存科合同による実習の導入と保存科教員の意見、日本歯科麻酔学会総会、2013 年 10 月 3 日、横浜市
- ⑦ 工藤勝、大桶華子、三浦美英、下顎孔伝達麻酔注射実習への新複合型トレーナー導入に対する有用性と教育効果、日本歯科医学教育学会、2012 年 7 月 20 日、岡山市
- ⑧ 吉本裕代、金澤香、三浦美英 (他 3 名)、
麻酔導入時に著明な高血圧と頻脈を認めた顎変形症の一例、日本歯科麻酔学会総会、2012 年 10 月 5 日、福岡市
- ⑨ 内澤理恵、金澤香、三浦美英 (他 3 名)、
全身麻酔下でアドレナリン添加リドカインによる浸潤麻酔が循環動態に与える影響 ビジレオモニターの有用性、日本歯科麻酔学会総会、2012 年 10 月 5 日、福岡市
- ⑩ 大桶華子、金澤香、三浦美英 (他 3 名)、
実習時期による新複合型下顎孔伝達麻酔

注射用トレーナーへの学生評価の違い、日本歯科麻酔学会総会、2012 年 10 月 5 日、福岡市

- ⑪ 三浦美英、金澤香、(他 5 名)、プレガバリンは顎顔面領域の疼痛に効きにくい?、日本歯科麻酔学会総会、2011 年 10 月 8 日、神戸市
- ⑫ 大桶華子、金澤香、三浦美英 (他 4 名)、
線維筋痛症を発症した歯科治療恐怖症患者の鎮静管理に笑気が有用であった 1 症例、日本歯科麻酔学会総会、2011 年 10 月 8 日、神戸市
- ⑬ 金澤香、三浦美英 (他 5 名)、歯髄由来神経幹細胞の重症前脳虚血侵襲ラットへの影響について、日本歯科麻酔学会総会、2011 年 10 月 8 日、神戸市
- ⑭ 工藤勝、金澤香、三浦美英 (他 4 名)、
下顎孔伝達麻酔注射トレーナーの開発と改良 複合型トレーナーに関するアンケート調査、日本歯科麻酔学会総会、2011 年 10 月 8 日、神戸市

[図書] (計 2 件)

- ① 三浦美英 (他 12 名)、スタンダード全身管理・歯科麻酔学第 2 版、学建書院、2011、91-134
- ② 三浦美英 (他 12 名)、スタンダード全身管理・歯科麻酔学第 3 版、学建書院、2014、91-134

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦美英 (MIURA, Yoshihide)
北海道医療大学歯学部病態機能・生理学系
歯科麻酔科学分野・教授
研究者番号：50241716

(2) 研究分担者

金澤 香 (KANAZAWA, Kaoru)
北海道医療大学歯学部病態機能・生理学系
歯科麻酔科学分野・助教
研究者番号：40453279