

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月 24日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23659914

研究課題名（和文）

ヒト歯髄幹細胞の培養上清をもちいた中枢神経再生療法の開発

研究課題名（英文）

Development of new regenerative therapy for central nerve system using the conditioned media derived from human dental pulp stem cells

研究代表者

上田 実 (UEDA MINORU)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00151803

研究成果の概要（和文）：ヒト歯髄幹細胞無血清上清をラット脊髄損傷モデルへ持続投与した結果、「炎症・免疫制御」「ミエリン脱髄抑制」「神経軸索伸長促進」「神経系細胞のアポトーシス抑制」効果により、下肢運動機能が著しく改善した。歯髄幹細胞培養上清中には約80種類の液性因子群が含有しており、*In vitro* 解析において初代培養神経細胞の神経突起伸長効果、初代培養ミクログリアにおける抗炎症型への転換効果が認められた。本研究により、ヒト歯髄幹細胞由来液性因子群は脊髄損傷などの中枢神経系疾患への治療有用性が高いことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We found that conditioned medium (CM) from stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth (SHED), administered intrathecally into the severely injured adult rat SC, resulted in marked functional recovery. SHED-CM treatment inhibited SCI-induced apoptosis, preserved neural fibers and myelin sheaths, and promoted descending serotonergic raphespinal axon growth. Importantly, these pathophysiological recoveries were supported by a remarkable immunoregulatory function of SHED-CM, which converted the pro-inflammatory SCI conditions to a tissue repair/regenerating platform by modulating the microglia/macrophage phenotype. SHED-CM directly induced IL-10-producing M2 microglia synergistically with a major glial-scar extracellular matrix component, chondroitin sulphate proteoglycan, *in vitro*. Thus, SHED-CM may enable new stem-cell-based regenerative therapies for SCI that do not involve cell transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：再生医学

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：ヒト歯髄幹細胞、培養上清、脊髄損傷、難治性中枢神経系疾患

1. 研究開始当初の背景

ヒト歯髄幹細胞の神経再生能力は極めて高く、ラット完全脊髄切断モデルに移植すれば下肢運動機能が回復する。我々はこれらの再生効果は、移植した幹細胞から分泌される神経再生因子群によるところが大きいと考えた。中枢神経再生効果を有する因子群が同定されれば、細胞移植を伴わない安全で臨床応用しうる理想的な治療法を確立できることが期待される。

2. 研究の目的

本研究はヒト歯髄幹細胞由来の分泌因子群に着目し、ヒト歯髄幹細胞由来の無血清培養上清を急性期脊髄損傷モデルへ投与し、その治療効果を確認した。さらに、その治癒メカニズムを急性期投与による培養上清の炎症・免疫調節能への影響に着目し、*in vivo* および *in vitro* で詳細に解析することで、新規中枢神経再生治療薬開発の可能性を検証することを目的とした。

平成 23 年度研究成果

平成 23 年度では、歯髄幹細胞培養上清の急性期脊髄圧挫損傷モデルへの持続投与による治療効果の検討を行った。

平成 24 年度研究成果

平成 24 年度では、歯髄幹細胞培養上清の急性期脊髄圧挫損傷モデルへの投与での治癒メカニズムをその炎症・免疫調節能について解析した。

3. 研究の方法

(1) 平成 23 年度

1) *In vitro* 細胞培養系

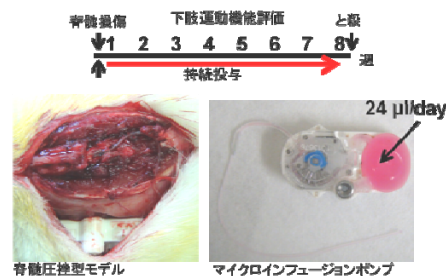
①ヒト歯髄幹細胞無血清培養上清に含まれる成長因子群の網羅的蛋白発現解析 (RayBio 社 Human Cytokine Antibody Array G Series

4000) を行い、培養上清中に含まれる成長因子群を解析した。

②神経再生阻害因子である MAG(ミエリンタンパク)や CSPG(コンドロイチン硫酸)をコーティングした培養皿上で PC12 細胞(神経細胞のモデル細胞株)や初代培養のラット小脳顆粒細胞を培養し、中枢神経損傷部位における環境を *in vitro* で再現する。そこへ無血清培養上清を作用させ、軸索伸長・細胞死抑制効果を検証した。

2) *In vivo* 脊髄損傷モデル

8 週齢雌 SD ラットを用いて、圧挫型脊髄損傷のラットモデルを制作した。損傷直後より完全埋め込み型マイクロインフュージョンポンプにて脊髄くも膜下腔にヒト歯髄幹細胞無血清培養上清を持続的に投与、8 週間経過観察し、下肢運動機能、組織学的評価を行った(下図参照)。



(2) 平成 24 年度

1) *In vitro* 細胞培養系

脊髄損傷における炎症・免疫反応の主役となるミクログリアを用い、その初代培養系を LPS で刺激、炎症/組織破壊系ミクログリアへ誘導し、その環境下で歯髄幹細胞培養上清を作用させ、炎症性サイトカインの遺伝子発現変動や、細胞障害性因子であるグルタメートや一酸化窒素産生の変動を解析した。また、非活性型ミクログリアへ歯髄幹細胞培養上清を作用させた時に抗炎症/組織修復系ミクログリアへ誘導できるかどうか検討した。

2) *In vivo* 脊髄損傷モデル

8週齢雌SDラットを用いて、圧挫型脊髄損傷のラットモデルを制作した。損傷直後より完全埋め込み型マイクロインフュージョンポンプにて脊髄くも膜下腔にヒト歯髄幹細胞無血清培養上清を持続的に投与した。投与後12時間、24時間、3日、7日で脊髄よりRNAを抽出し、遺伝子発現解析を行った。さらに、投与後3日目で組織学的解析を行い、急性期に損傷部へ集積したミクログリア/マクローファージの動態を観察した。

(倫理面への配慮)

1) 本研究では動物実験を行うので、名古屋大学医学部付属動物実験施設に動物実験の申請を行う。動物実験の施行に際しては、名古屋大学医学部の動物実験ガイドラインに準拠して行う。すなわち、実験に使用する動物数の可能な限りの削減・実験動物の苦痛を可能な限り軽減するなどである。

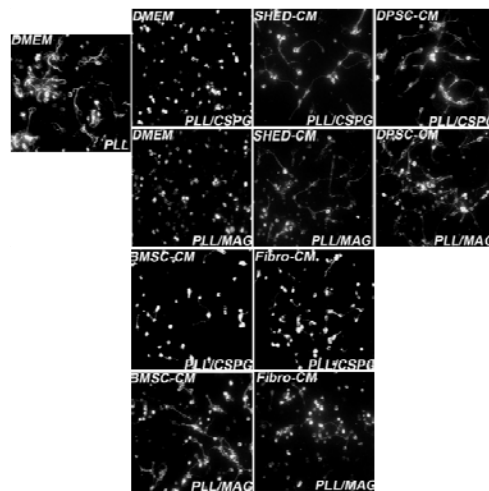
2) 本研究はすべてヘルシンキ宣言、厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する倫理指針」にのっとり、研究対象者に対する安全保護・人権擁護に、下記の通り十分注意して行う。

- 研究を実施する前に、治験等審査委員会で承認の得られた同意説明文書を用いて患者に研究の内容および患者の権利等を文書および口頭により十分な説明を行い、患者本人の自由意志による同意を文書(記名・捺印または署名、同意年月日の記入)にて得る。
- 試験実施に係る生データ類および同意書等を取り扱う際に、被験者の秘密保護に十分配慮する。病院外に提出する症例報告書等では、被験者識別コード等を用いて行う。試験の結果を公表する際は、被験者を特定できる情報を含まないようにする。試験の目的以外に、試験で得られた被験者のデータを使用しない。
- 被験者の検体等を病院外に持ち出して測定等を行う場合は、匿名化・保管・廃棄方法、閲覧者の範囲等について規定する。あらかじめ被験者の同意を得ないで、同意説明文書で特定された利用目的の達成に必要な範囲を超えて、個人情報を取り扱わない。また、患者が本試験に参加しない場合、または途中で試験からの離脱を希望された場合にも不利益を受けることのないよう、通常通りの治療を行う。

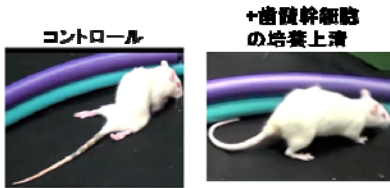
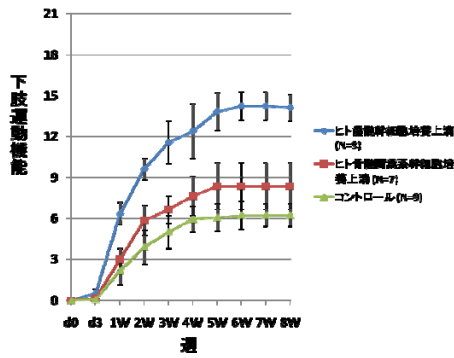
4. 研究成果

(1) 平成23年度

*In vitro*実験系: 網羅的蛋白発現解析により、ヒト歯髄幹細胞培養上清中には約80種類のタンパク質が含まれていることが分かった。また、神経再生阻害因子コーティング上で2種の細胞を培養し、そこへ歯髄幹細胞由来無血清培養上清を作用させると、神経突起の伸長が促進され、細胞死が抑制されるということが示された。これは、比較実験として行った他の無血清培養上清(ヒト骨髄間葉系幹細胞由来培養上清、ヒト線維芽細胞由来培養上清)では認められない作用であった(下図参照。小脳顆粒細胞における神経突起伸長効果。SHED-CM: ヒト乳歯由来歯髄幹細胞培養上清。DPSC-CM: ヒト永久歯由来歯髄幹細胞培養上清。BMSC-CM: ヒト骨髄由来幹細胞培養上清。Fibro-CM: ヒト線維芽細胞培養上清。)

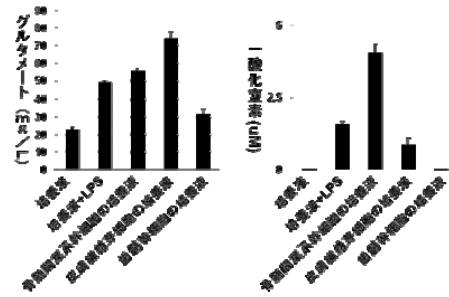
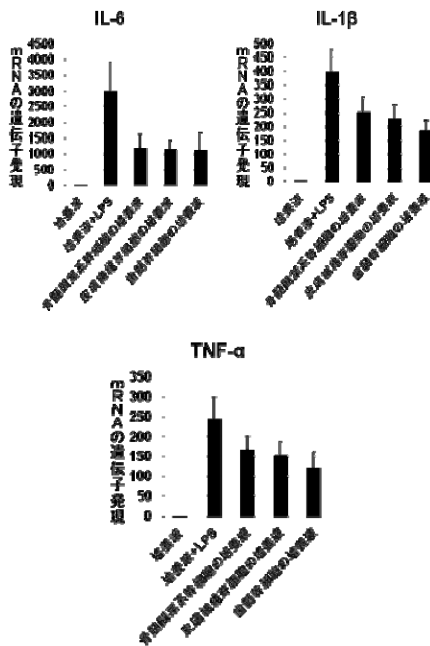


*In vivo*実験系: 圧挫型脊髄損傷モデルラットにおいて、歯髄幹細胞由来無血清培養上清投与後に著明な下肢運動機能の回復が認められた(下図参照)。また、組織学的評価により、無血清培養上清投与群において、急性期における神経細胞死を最小限に抑え、神経再生阻害因子の作用を抑制し、神経回路の再編を促進するという結果が得られた。

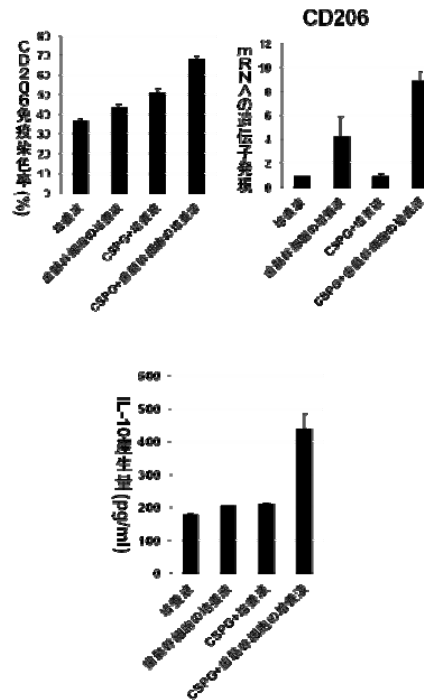


(2) 平成 24 年度

In vitro 実験系：歯髄幹細胞培養上清は LPS で活性化されたミクログリアの炎症性サイトカイン IL-6、IL-1 β 、TNF- α の発現を抑制した。これは骨髄間葉系幹細胞培養上清および繊維芽細胞培養上清でも同様の傾向を示した。また、ミクログリアからの細胞障害性因子グルタメートや一酸化窒素の産生は歯髄幹細胞培養上清が特異的に阻害した（下図参照）。

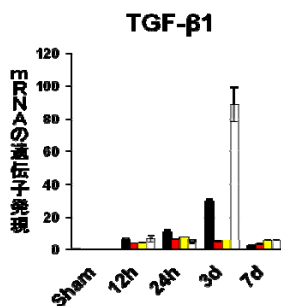
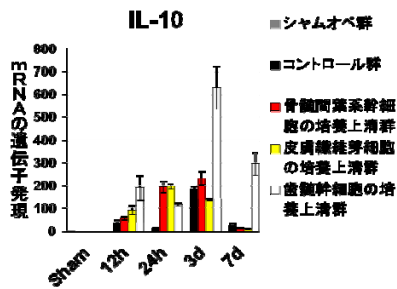


さらに、非活性型ミクログリアへ歯髄幹細胞培養上清を作用させると、CSPG（神経軸索伸長阻害因子であるが、近年脊髄損傷急性期におけるミクログリア刺激因子の一つとして報告されている）を介し、抗炎症/組織修復系ミクログリアマーカーである CD206 を発現し、かつ強力な抗炎症性サイトカイン IL-10 を産生するミクログリアへと誘導された（下図参照）。

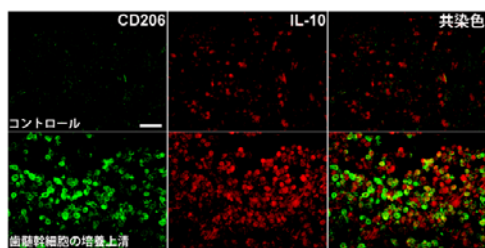


In vivo 実験系：歯髄幹細胞培養上清投与後 12 時間、24 時間、3 日、7 日での脊髄での炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカインの遺伝子発現変動解析の結果、コントロール群と比較して、歯髄幹細胞培養上清投与群では各タイムポイントにおいて炎症性サ

イトカイン IL-6、IL-1 β 、TNF- α の有意な発現抑制がみられた。これは、骨髄間葉系幹細胞培養上清および皮膚繊維芽細胞培養上清投与群においても同様の傾向であった。一方、抗炎症性サイトカイン IL-10、TGF- β 1 は投与後 3 日目において歯髄幹細胞培養上清投与群においてのみ有意な発現上昇を認めた (下図参照)。



また、投与後 3 日目の組織学的解析により、歯髄幹細胞培養上清群では、急性期に損傷部へ集積したミクログリア/マクロファージの多くが抗炎症/組織修復系ミクログリアマーカーである CD206 および抗炎症性サイトカイン IL-10 を発現するミクログリア/マクロファージであった (下図参照)。



(3) 研究成果のまとめ

本研究結果よりラット脊髄損傷モデルにおいて、ヒト歯髄幹細胞由来の無血清培養上清

を用いてその中枢神経再生効果・治癒メカニズムを *In vitro* および *In vivo* 実験系で実証した。このことから歯髄幹細胞培養上清中のタンパク質が新規中枢神経再生治療薬となりうるということが示された。このような知見はこれまでに例がなく、本研究結果で得られた歯髄幹細胞培養上清の特異的効果である「活性化ミクログリア/マクロファージに対する炎症・免疫調節能」、「神経細胞アポトーシス死抑制能」、「神経軸索伸長促進能」を軸として網羅的に神経再生効果を担う分泌性分子群を同定することで、製薬化を目指す上で世界的にも初めての重要な結果を提示するものになると思われる。今後はさらなる本格的なプロテオーム解析が必要となってくると思われる。効果の認められたタンパク質が複数に渡る可能性も高く、最終的には、それらのリコンビナントタンパクによるカクテルを作製し、同等の神経再生効果が認められることが確認できれば新規中枢神経再生治療薬として開発が大いに期待できると考えている。

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 10 件)

(査読有り)

- 1) K. Sakai, A. Yamamoto, K. Matsubara, S. Nakamura, M. Naruse, M. Yamagata, K. Sakamoto, R. Tauchi, N. Wakao, S. Imagama, H. Hibi, K. Kadomatsu, N. Ishiguro, and M. Ueda, “Human Dental Pulp-Derived Stem Cells Promote Locomotor Recovery after Complete Transection of the Rat Spinal Cord by Multiple Neuro-Regenerative Mechanisms”, *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 122, No. 1, (2012), pp. 80-90.

(査読有り)

- 2) M. Yamagata, A. Yamamoto, E. Kako, N. Kaneko, K. Matsubara, K. Sakai, K. Sawamoto and M. Ueda, “Human dental pulp-derived stem cells protect against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice”, *Stroke*, Vol. 44, No. 2, (2013), pp. 551-554.

〔学会発表〕(計 10 件)

- 1) 松原弘記, 山本朗仁, 酒井陽, 野田万里子, 松下嘉泰, 錫村明生, 上田実, “ヒト歯髄幹細胞由来無血清培養上清を応用した急性期脊髄損傷治療と治癒メカニズ

ムの解析”，第 11 回日本再生医療学会
総会・学術大会，C-4-23，横浜，6/12-14，
2012

- 2) 松原弘記，山本朗仁，酒井陽，松下嘉泰，
上田実，“ヒト歯髄幹細胞由来液性因子
を応用した急性期脊髄損傷治療”，第 57
回日本口腔外科学会総会・学術大会，
2-C2-2，横浜，10/19-21，2012

〔図書〕（計 1 件）

上田実、他、朝倉書店、歯学系 再生医療叢書、
2012. 11. 30

〔産業財産権〕

出願状況（計 2 件）

- 1) 発明の名称：組織再生ミクログリア・マ
クロファージ誘導型抗炎症製剤

種類：特願

番号：2013-25119

出願年月日：2013/2/13

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 実 (UEDA MINORU)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00151803

(2) 研究分担者

山本 朗仁 (YAMAMOTO AKIHITO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50244083

(3) 連携研究者なし