

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 3 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659756

研究課題名(和文) 歯髄細胞を用いた網膜再生治療法の開発

研究課題名(英文) Development of retinal treatment with dental pulp cells

研究代表者

中澤 徹 (NAKAZAWA, Toru)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30361075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：失明に至る重篤な網膜疾患に対し、歯髄由来体性幹細胞移植による新たな網膜神経保護もしくは再生治療の可能性を模索した。まず歯髄由来細胞をラット眼に眼内注射するだけで一部の細胞が網膜内に接着し、神経突起が形成されることを確認した。さらに細胞操作方法の検討を行い、(1)浮遊培養にて神経及び幹細胞関連分子の遺伝子発現が活性化すること、(2)CD105をポジティブマーカーとしたセレクションで細胞塊形成能を有する細胞群を濃縮できること、(3)浮遊培養を低酸素で行うことにより、軸索再生関連分子の発現が活性化すること等を確認した。

研究成果の概要(英文)：The transplantation of dental pulp-derived cells to the eye was explored for the possibility of the novel neuroprotection and regenerative treatments to the critical retinal diseases that results in vision loss. Firstly, the isolated dental pulp-derived cells were directly injected into normal rat vitreous, and it was confirmed that some of the injected cells adhered to the retina and formed the neuronal process. Furthermore, several cell manipulation methods were examined to enrich stem cell population and up-regulate neuron-related molecular expression. Specifically, (1) gene expression of nerve and stem cell related molecule were activates by sphere-forming floating culture, (2) sphere-forming cells can be enriched by cell sorting of CD105-positive dental pulp-derived cells, (3) the expression of an axonal regeneration related molecule was promoted by applying hypoxic culture to the sphere-forming culture.

研究分野：眼科学

キーワード：細胞治療 歯髄 網膜障害 神経再生

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の成人中途失明の約 60%を占める上位 4 疾患（緑内障、糖尿病網膜症、網膜色素変性症、加齢黄斑変性症）は網膜神経細胞が不可逆的に障害され失明に至る眼疾患である。一度障害された網膜組織の再生は極めて困難で、視力回復は望めない。そのため、神経保護治療による網膜神経細胞死の遅延が唯一の治療法とされている。しかし人工多能性幹（iPS）細胞の開発以来、視力低下に至った患者に対する治療法として iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞シート等の再生医療への取り組みが本格化している。

再生医療の分野では細胞ソースの選定が重要な課題の一つであり、主に iPS 細胞等の多能性幹細胞と組織由来の体性幹細胞が検討されている。多能性幹細胞は無限増殖能と全能性を有するが、分化制御が困難で造腫瘍性等の課題があり現段階では臨床応用への敷居は高い。その反面、体性幹細胞は表現系を維持した増殖や分化転換に難はあるが、癌化の危険性は低く、臨床応用への敷居は低い。既に本邦では体性幹細胞による角膜や食道への上皮系細胞シート移植や心臓への筋芽細胞シート移植など様々な細胞移植治療が行われている。しかしながら、失明に至る網膜疾患を対象とした細胞移植治療が奏効したことが臨床研究にて認められた例は未だにない。

本研究ではこれらの背景を踏まえ、体性幹細胞による網膜疾患の根治的治療法の開発を最終目標とし、特に低侵襲で採取しやすい細胞ソースとして、神経再生能を有する歯髄由来細胞に着目した研究を展開することを計画した。歯髄幹細胞研究と歯髄幹細胞を用いた顔面神経再生治療法の開発に取り組んでいる。すでに歯髄由来細胞が *in vitro* で神経細胞に分化すること (Eu J Neurosci 2008) や、顔面神経切断モデルにおいて神経欠損部の断端をチューブで橋渡し、歯髄由来細胞でチューブ内の神経欠損部を充填した場合良好に神経が再生されることが確認されている。緑内障等の難治症例に対する歯髄由来細胞移植の検討は依然行なわれておらず、有効性が認められれば失明患者に対する画期的治療法の実現に繋がる可能性がある (図 1)。

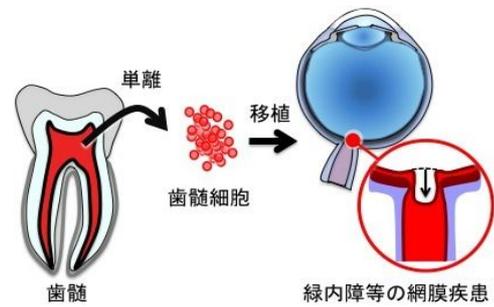


図 1. 歯髄由来細胞移植による難治性網膜疾患に対する新しい根治的治療法

## 2. 研究の目的

本研究では網膜障害モデル動物に対して歯髄由来細胞を移植し、網膜細胞への分化能や神経保護効果を検証することを最終目的とした。細胞移植実験を行うと共に歯髄由来細胞の培養、移植方法等も同時に検討し、幹細胞を効果的にセレクションする方法を検証することを初期段階の目標とした。

## 3. 研究の方法

東北大学動物実験専門委員会の承認を得て以下の実験を実施した。

- (1) 歯髄由来細胞の単離：8-12 週齢の SD ラット (雄) を頸椎脱臼にて安楽死し、抜歯後に歯髄を摘出し、コラゲナーゼ及び DNase 処理を経て歯髄由来細胞のシングルセルサスペンションを調整した。
- (2) 歯髄由来細胞の培養：平面培養法と浮遊培養法を検討した。平面培養には細胞接着性の培養皿を使用し、浮遊培養には細胞非接着性の超親水性高分子コート培養皿を使用した。低酸素培養には酸素濃度が 1% になる様に設定されたインキュベーターを使用した。
- (3) 細胞・組織解析：摘出した歯髄組織の凍結切片に発現する幹細胞に関連する表面マーカーの発現と局在を免疫染色法にて確認した。さらに FACS を用いて幹細胞性を有する細胞群の濃縮を試みた。
- (4) 動物に対する眼内細胞移植：正常ラットもしくは NMDA をあらかじめ眼内注射した網膜障害モデルに対して、細胞懸濁液を眼内注射した。細胞の局在を確認するため、歯髄由来細胞を Dil で染色し、摘出後に蛍光顕微鏡で観察し

た。さらに網膜中の網膜神経節細胞マーカーの遺伝子発現を定量解析した。

#### 4. 研究成果

本研究ではまず歯髄由来細胞の細胞懸濁液を眼内移植し、その局在や神経保護効果を確認した。まず歯髄由来細胞のシングルセルサスペンションを作成した後 DiI 染色し、正常ラット眼に眼内注射したところ、図2のように網膜内に生着伸展する DiI 陽性細胞が存在することを確認した。

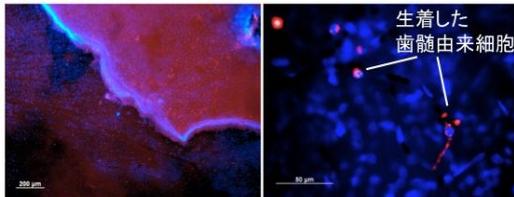


図2. 単離した歯髄由来細胞を DiI で蛍光染色し、ラット眼内に注射後、網膜を摘出して蛍光顕微鏡観察。網膜内に接着進展した歯髄由来細胞を確認。

次に NMDA 障害モデルに対して、歯髄由来細胞を眼内注射し、網膜保護効果を確認することを試みた。初年度網膜神経節細胞マーカーである Brn3a,b,c の遺伝子発現量を定量解析したところ、移植群で有意な発現上昇を認め、しかしながら次年度以降同様の実験で、保護効果の再現性を確認することができなかった。

一方で本研究実施中に歯髄由来細胞を平面培養して増幅させた細胞を網膜神経節細胞が障害される視神経挫滅モデルラット眼に眼内注射し、細胞死抑制効果が得られることが他のグループから報告された (IOVS 2013)。そこで培養法等の細胞操作の検討を中心に研究展開することとした。特に網膜組織が神経組織であることに着目し、主に浮遊培養系で行うニューラルスフェア法を活用した培養系の検討を行った。

まず歯髄由来のセルサスペンションを浮遊培養したところ、2日目以降に細胞塊の形成を確認した (図3)。次に表面マーカーによる細胞塊形成能を有する細胞群の濃縮を検討した。まず幹細胞に関連する主要な表面マーカー (CD90、CD29、CD105、CD44、CD61、CD117) の歯髄組織での局在を免疫染色法で確認した。間葉系幹細胞マーカーの一つである CD105 が、歯髄幹細胞が存在すると考えられている Odontoblast layer に局在することを確認した。次に FACS で CD105 陽性細胞を単離し、浮遊培養系で培養することとした。すると CD105 陰性細胞群を浮遊培養した際には細胞塊が形成されなかった

のに対して、陽性細胞群では細胞塊が確認され、CD105 陽性分画に細胞塊形成能を有する細胞集団が存在することを確認した。

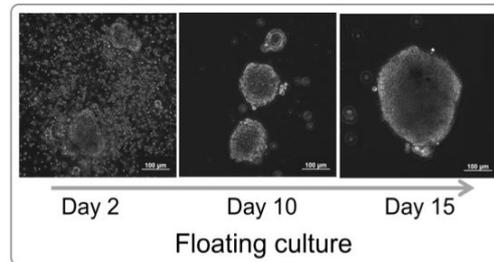


図3. ニューラルスフェア法により形成した歯髄由来細胞の細胞塊。

一方抗原抗体反応や FACS を使用せずに治療効果のある細胞群をセレクションする手法は細胞治療の臨床応用を考える際に有用である。本研究では低酸素培養の効果に着目した。酸素濃度 1% で培養した際には常酸素と比較して細胞塊の大きさの分布には変化はないが、数が半減することが分かった。定量的 PCR で遺伝子発現量を確認したところ *Phd3*、*Hif1*、*Vegfa* 等の低酸素応答関連分子の発現が上昇していることに加えて、軸索再生等において重要な役割を果たすことが示唆されている *Sprr1a* の発現量、さらには免疫染色で Odontoblast layer に局在し、細胞塊形成細胞マーカーとして有用性を確認した *CD105* の発現量も上昇していることが明らかになった。そこで免疫染色法にて *SPRR1A* と *CD105* のタンパク質発現量と局在を確認した。すると、小さい細胞塊では細胞塊の中付近、大きい細胞塊では細胞塊の周辺部分に *SPRR1a* が局在し、低酸素培養によりその発現量が上昇していることが確認された。

ニューラルスフェア法、細胞純化、低酸素培養等により、性質の異なる細胞群を準備できることが確認できた。培養操作を加えずとも眼内注射で歯髄由来細胞が網膜内に生着することが分かっており、これらの細胞操作法を活用することで治療効果を引き出すことが期待される。

#### 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 13 件)

Yasuda M, Tanaka Y, Ryu M, Tsuda S, Nakazawa T. RNA sequence reveals mouse retinal transcriptome changes early after axonal injury. PLoS One. 査読有り, 9(3),

2014, e93258-1-11,  
doi:10.1371/journal.pone.0093258.

Nagai N, Kaji H, Nishizawa M, Nakazawa T, Abe T (他 2 名). A polymeric device for controlled transscleral multi-drug delivery to the posterior segment of the eye. *Acta Biomater*, 査読有り, 10, 2014, 680-687. doi: 10.1016/j.actbio.2013.11.004.

Hagiwara K, Nakazawa T (他 6 名). Molecular and cellular features of murine craniofacial and trunk neural crest cells as stem cell-like cells. *PloS One*, 査読有り, 9(1), 2014, e84072-1 – 13. doi: 10.1371/journal.pone.0084072.

Himori N, Nakazawa T (他 5 名). Critical role of Nrf2 oxidative stress-induced retinal ganglion cell death. *J Neurochem*, 査読有り, 127, 2013, 669-680. doi: 10.1111/jnc.12325.

Shi D, Funayama T, Nakazawa T (他 13 名). Association of HK2 and NCK2 with normal tension glaucoma in the Japanese population. *PLoS One*. 査読有り, 8(1), 2013, e54115. doi: 10.1371/journal.pone.0054115.

Piao W, Tsuda S, Tanaka Y, Nakazawa T, Hanaoka K (他 10 名). Development of azo-based fluorescent probes to detect different levels of hypoxia. *Angew Chem Int Ed Engl*, 査読有り, 52, 2013, 13028-13032. doi: 10.1002/anie.201305784.

Shi D, Takano Y, Nakazawa T, (他 4 名). Molecular genetic analysis of primary open-angle glaucoma, normal tension glaucoma, and developmental glaucoma for the VAV2 and VAV3 gene variants in Japanese subjects. *BiochemBiophys Res Commun*. 査読有り, 432(3), 2013, 509-512. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.003.

田中佑治、中澤徹、緑内障に対する神経保護薬の研究開発、眼科、査読なし、55 (5)、2013、601-607.

Hisatomi T, Nakao S, Murakami Y, Noda K, Nakazawa T (他 8 名). The Regulatory Roles of Apoptosis- Inducing Factor in the Formation and Regression Processes of Ocular Neovascularization. *The American Journal of Pathology*. 査読有り, 181(1), 2012, 53-61. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.03.022.

Shanab AY, Nakazawa T, Ryu M, Tanaka Y (他 10 名). Metabolic stress response implicated in diabetic retinopathy: the role of calpain, and the therapeutic impact of calpain inhibitor. *Neurobiol Dis*. 査読有り, 48(3), 2012, 556-567. doi: 10.1016/j.nbd.2012.07.025.

Ryu M, Yasuda M, Nakazawa T (他 8 名). Critical role of calpain in axonal damage- induced retinal ganglion cell death. *J Neurosci Res*. 査読有り, 90(4), 2012, 802-815. doi: 10.1002/jnr.22800.

津田聡、中澤徹、緑内障における神経保護治療、*Medical Science Digest*、査読なし、40(3)、2014、14-17.

中澤徹、神経保護治療の可能性、眼科 2012 年 9 月臨時増刊号、査読なし、2012、1338-1339.

[学会発表](計 15 件)

中澤徹、緑内障、神経保護治療からのアプローチ、函館眼科医会学術講演会、2013 年 10 月 18 日、函館。

中澤徹、近未来の緑内障神経保護治療へのアプローチ、アイファガン発売 1 周年記念口演、2013 年 9 月 28 日、幕張。

田中佑治、安田正幸、中澤徹、RNA-Seq によるマウス視神経挫滅早期における網膜網羅的遺伝子発現定量解析、第 24 回日

本緑内障学会、2013年9月21日-2013年9月23日、東京。

山本耕太郎、中澤徹（他2名）、視神経挫滅モデルにおけるROCK阻害薬K-115の神経保護効果、第24回日本緑内障学会、2013年9月21日-2013年9月23日、東京。

中澤徹、基礎研究を踏まえた夢のある近未来治療、山口大学眼科 Grand Rounds、2013年9月14日、山口。

津田聡、田中佑治、國方彦志、花岡健二郎、中澤徹（他4名）、低酸素応答生理活性蛍光プローブを用いた網膜低酸素領域のin vivo イメージング、第117回日本眼科学会総会、2013年4月4日-4月7日、東京。

中澤徹、ナノ粒子による副腎皮質ステロイド治療薬開発、第117回日本眼科学会総会、2013年4月4日-4月7日、東京。

安田正幸、田中佑治、中澤徹（他8名）、エリストロボエチンノックアウトマウスを用いた網膜・神経の組織学的検討、第117回日本眼科学会総会、2013年4月4日-4月7日、東京。

横山悠、田中佑治、中澤徹（他4名）、酸化ストレスによる網膜神経節細胞死におけるカルパインの働き、第117回日本眼科学会総会、2013年4月4日-4月7日、東京。

田中佑治、國方彦志、中澤徹、眼科分野のニーズを捉えた異分野融合への試み、第2回超異分野学会、2013年03月16日、すみだ中小企業センター

中澤徹、Advances in basic sciences: implications for clinical management of glaucoma, The 1st Asia-Pacific Glaucoma Congress (APGC2012), 2012年12月7日-2012年12月9日、インドネシア。

中澤徹、The molecular mechanism of glaucomatous optic neuropathy: learning from a mouse model of axonal damage-induced RGC death、韓国老化学会、2012年11月24日、韓国

中澤徹、緑内障神経保護治療、Tokyo Ophthalmology Club、2012年6月29日、東京。

田中佑治、医療医学のニーズを捉えたエンジニアリングへの試み、第44回ナノバイオ磁気工学専門研究会、2012年6月28日、早稲田大学、東京。

中澤徹、緑内障の役者たち、細胞レベルの考察、Ophthalmic Seminar in 多治見、2012年6月24日、松山

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計1件)

名称：視神経障害発症リスクの判定方法  
発明者：田中佑治、安田正幸、面高宗子、中澤徹  
権利者：東北大学  
種類：特許  
番号：特願2014-17481  
出願年月日：2014年1月31日  
国内外の別：国内

取得状況(計0件)

〔その他〕  
東北大眼科  
<http://www.opht.med.tohoku.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中澤 徹 (NAKAZAWA, Toru)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：30361075

### (2) 研究分担者

田中 佑治 (TANAKA, Yuji)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：40625513

### (3) 連携研究者

佐々木 亮 (SASAKI, Ryo)  
東京女子医科大学大学院・医学研究科・講師  
研究者番号：60524709