様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　３０　年　　６　月　２１　日現在

機関番号：　１２１０２
研究種目：　挑戦的萌芽研究
研究期間：　2016～2017
課題番号：　１６Ｋ１５８１７

研究課題名（和文）ヌードラット末梢神経損傷に対するヒト歯髄幹細胞の神経再生効果

研究課題名（英文）Effect of dental pulp stem cell on peripheral nerve regeneration: An experimental study in the nude rat model.

研究代表者

武川　寛樹（Bukawa, Hiroki）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：８０１７３５５８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ヌードラット坐骨神経損傷モデルにおいて、ヒト歯髄幹細胞から分化・誘導された神経系細胞を生着させたⅠ型コラーゲンチューブを利用して神経再建を行うことで、Ⅰ型コラーゲン単体、自家移植での再建と比較することによって、神経系細胞の誘導やその機能評価を行うことを目的としている。Ⅰ型コラーゲンチューブのみでの再建において、10㎜の切断した神経再建部位が、14日で神経線維で断端が架橋されることが確認できた。チューブ内での歯髄幹細胞の培養法については、さらなる条件の検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to examine the mechanism and regenerative potential of dental pulp stem cells for peripheral nerve regeneration compared with control conduits without dental pulp stem cells and autografts in a system of nude rat sciatic nerve defect. A 10 mm gap in sciatic nerve regenerate 2 weeks after injury in control conduits without dental pulp stem cells. It need more investigation of method for culturing dental pulp stem cells in collagen tube as scaffold.

研究分野：　口腔外科学分野

キーワード：　歯髄幹細胞　神経再生

１．研究開始当初の背景

再生医療は近年飛躍的な進歩を遂げている。しかし iPS 細胞は多大の夢とみらいへの希望をもたらしたが、その安全性は依然としてがん化や奇形種の形成など困難を伴う可能性がある。また、ES 細胞は受精卵を利用することから倫理性の問題がある。我々は、安全性や倫理性の面より体性幹細胞である歯髄幹細胞に着目してきた。体性幹細胞の代表である骨髄幹細胞は、正常細胞であり遺伝子の異常はなく、iPS 細胞に比べて安全性に優れるが、増殖能・分化能などの機能性はまだ十分とはいえない。一方、歯髄幹細胞は間葉系幹細胞であると同時に神経堤由来の外胚葉系幹細胞の性質を有し、比較的多分化能を有することが示されている。歯髄幹細胞は骨髄幹細胞の 3～4 倍の増殖能を有し、分化能も優れる。我々はヒト歯髄幹細胞を同定し、間葉系幹細胞(MSC)を誘導した。この歯髄由来 MSC は骨髄幹細胞と比較し、細胞増殖能が活発であり、優位に骨分化能が高く、骨形成能も優れていることを証明している。また、研究分担の日本歯科大学においてすでに歯髄バンクも稼働しつつあり、第 2 種再生医療等の承認を得ている。将来の安全で実用的な再生医療の根拠となる基本データを出すことで実用化が急速に進む。

外傷性末梢神経障害を受けた場合、完全断裂では自然回復は期待できない。現在の治療法として自家神経移植や人工神経の神経吻合があるが、自家神経移植は健康な神経を採取するための更なる外科処置が必要になることや、人工神経の利用については改善効果が十分でないことなど、これらの問題点は多い。日本歯科大学では中原・石川らが、発生学的に歯髄と同じく神経堤由来の間葉系細胞から神経系細胞の誘導・分化に成功し、さらには神経シート様構造の作製も可能になっている。これまでは神経シート様構造の電気信号を評価する方法をとってきたが、今回はヌードラット坐骨神経損傷モデルを作製し、神経再生効果を解析、評価することで、新しい末梢神経再生の開発ができないかと考え本研究の着想に至った。

２．研究の目的

本研究は歯髄幹細胞を用いた神経系細胞を利用し、再生末梢神経の誘導・機能評価を目的としている。同時に腫瘍かの有無などの安全性も評価することで、将来の安全で実用的な再生医療の開発につなげることも目的とする。今回その評価に坐骨神経損傷モデルを使用することで、再建手術もしやすくなり、神経再生効果を経時的に観察できるのは本給の優れた特徴である。

３．研究の方法

インフォームド・コンセントが得られた患者で、抜歯が必要とされた智歯を使用する。智歯の歯髄細胞を分離し、explant 法で歯髄幹細胞を得る。歯髄幹細胞を専用の培地で神経系細胞へと誘導・分化し血管内在神経細胞シート作製を行う。内腔 1.7㎜Ⅰ型豚コラーゲンチューブを使用する。チューブ内に歯髄幹細胞から分化・誘導された神経系細胞または神経シートを充填する。ヌードラットの坐骨神経を 10㎜ 切離することで坐骨神経損傷モデルを作製する。切離した神経の両断端にコラーゲンチューブを 10-0 ナイロンを用いて顕微鏡下で縫合する。コラーゲンチューブの内腔に神経系細胞を充填した再建群、コラーゲンチューブのみで再建する群とに分ける。また、神経自家移植群として、10㎜ の坐骨神経を切離した後、180 度回転させて近遠心を入れかえるように縫合した群を作製する。再建したヌードラットの下肢運動機能回復を評価するために、Sciatic function index (SFI) を用いて移植後 2, 4, 6, 8, 10, 12 週に測定する。移植後 12 週に各 3 群のヌードラットの再建坐骨神経を露出させ、電気生理学的評価を行う。その後に再生神経を採取し、病理組織標本を作製する。トルイジンブルー染色の病理組織学的に再生軸索数や軸索半径などの評価を行う。また、抗 S-100 抗体、抗 PCNA 抗体を使用して増殖活性シュワン細胞の確認や、抗ヒトミトコンドリア抗体を使用してヒト細胞の確認を免疫組織学的に評価する。

４．研究成果

インフォームドコンセントを行い、同意を得た患者の抜去歯を分割することで、内部の歯髄を採取した。10～15% fetal bovine serum、100 μM glutamate、0.1％ MEM Non-Essential Amino Acids、50 U/ml penicillin、50 μg/ml streptomycin、0.25 mg/ml Fungizone を添加した Dulbecco’s modified Eagle’s medium/Ham’s nutrient mixture F12（DMEM/F12）培地を使用して歯髄幹細胞を得た。そこから得た歯髄幹細胞さらに 1% fetal bovine serum, 0.1mM デキサメサゾン、10mmM b-glycerol-2-phosphate, 0.2mM アスコルビン酸、50ng/mL ヒト EGF を添加した IMDM でさらに誘導・分化することで神経系細胞を得ることに成功した。

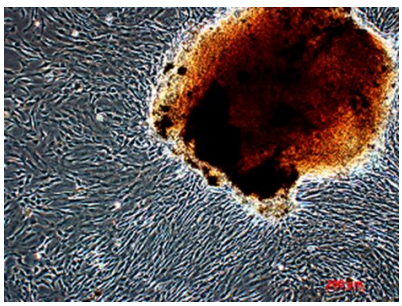


写真１　explant 法で得られた歯髄幹細胞

研究分担者である石川は、発生学的に歯髄と同じく神経堤由来の間葉系細胞が多数存在する頬脂肪体幹細胞から神経系細胞（神経細胞と神経膠細胞)の誘導・分化に成功し、誘導神経系細胞をパーキンソンモデルラットの脳内に移植しパーキンソン病症状の改善に成功している。さらに歯髄幹細胞からの神経細胞誘導にも成功しているが、今後は分化誘導条件を最適化する必要がある。さらに歯髄幹細胞から誘導・分化した神経細胞シート構造の作製、神経束の作製に成功した。しかし、神経系細胞は酸素要求性が非常に強く、コラーゲンチューブ内の限定された空間での培養は困難であり、コラーゲンチューブ内で歯髄幹細胞を神経系細胞へ誘導・分化する方法、神経系細胞をチューブ内で培養する方法は確立できていない。培養法についてはさらなる条件の検討が必要である。

ヌードラットの坐骨神経を 10㎜ 切断しヌードラット坐骨神経損傷モデルを作製し、家移植群、Ⅰ型コラーゲンチューブのみでの再建を行ったコラーゲンチューブのみで神経再建を行った個体については、14 日で近遠位の神経断端を架橋することがわかった。病理学的にアクソンの伸長が確認できた。また、再生神経部には血管新生も確認できた。

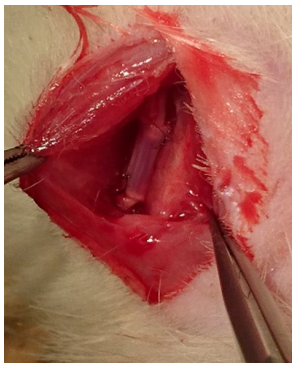


写真 2　Ⅰコラーゲンチューブで再建されたヌードラット坐骨神経

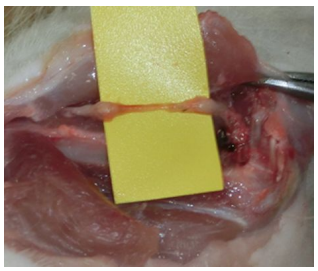


写真 3　架橋された神経

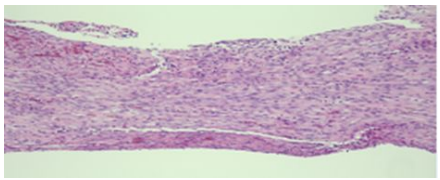


写真 4　HE 染色

今後はチューブ内での神経系細胞の培養法を確立させ再建を行う予定である。また、歯髄幹細胞から作製した神経束での移植も行う予定である。

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　1 件）

1. Haruka Takahashi, Hiroshi Ishikawa, Akira Tanaka.: Regenerative medicine for Parkinson's disease using differentiated nerve cells derived from human buccal fat pad stem cells. *Human cell*, 2017 Apr;30(2):60-71. doi: 10.1007/s13577-017-0160-3. Epub 2017 Feb 16.

〔学会発表〕（計　7 件）

1. 渡邊美穂，大山晃弘，豊村順子，石川博，田中彰
   リモデリング能獲得が示唆された in vitoro における微細血管網を含む 3 次元骨組織形成
   第 62 回　公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会（2017 年 10 月 20 日　京都府京都市　国立京都国際会館)
2. 高橋悠，大山晃弘，畑-川上未有希，豊村順子，石川博，田中彰
   外胚葉性間葉であるヒト頬脂肪体幹細胞から誘導分化させた神経系細胞によるパーキンソン病治療
   第 16 回日本再生医療学会総会（2017 年 3 月 7 日　宮城県仙台市　仙台国際センター)
3. 渡邊美穂，大山晃弘，豊村順子，石川博，田中彰
   ヒト歯髄幹細胞を用いた神経および微細血管網を含む 3 次元骨組織形成
   第 16 回日本再生医療学会総会（2017 年 3 月 7 日　宮城県仙台市　仙台国際センター)
4. 中原　貴，豊村順子，大山晃弘，吉田和正，荘司洋文，佐藤英明，石川　博
   歯髄細胞バンクの現状と将来展望
   日本歯科大学校友会学術フォーラム 2017 (2017 年 2 月 26 日 東京都千代田区　日本歯科大学生命歯学部)
5. 佐藤英明，中原　貴，豊村順子，大山晃弘，荘司洋文，吉田和正，石川　博
   日本歯科大学・セントラルクリニック歯髄細胞バンクの現状と将来展望 2016 (第 2 報) 平成 28 年度日本歯科大学歯学会第 3 回ウインターミーティング（2016 年 12 月 10 日　新潟県新潟市　日本歯科大学新潟生命歯学部)

6．高橋悠，大山晃弘，畑-川上未有希，豊村順子，石川博，田中彰
ヒト類脂肪体由来幹細胞より分化誘導した神経系細胞細胞移植によるパーキンソン病治療
第 34 回日本ヒト細胞学会学術集会(2016 年 7 月 16 日　奈良県奈良市　東大寺総合分化センター)

7．中原　貴, 豊村順子, 大山晃弘, 石川　博
日本歯科大学・セントラルクリニック歯髄細胞バンクの現状と将来展望 2016
平成 28 年度日本歯科大学歯学会大会･総会（2016年6月4日　東京都千代田区 日本歯科大学生命歯学部)

〔図書〕（計　0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　0 件）

名称：人工血島
発明者：石川　博、豊村順子、大山晃弘、渡邊美穂、武川寛樹、渡邊美隆
権利者：医療法人社団　土合会
種類：人工組織
番号：DAIP1701
出願年月日：
国内外の別： 国内

○取得状況（計　0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
武川　寛樹（BUKAWA, Hiroki）
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号： 80173558

(2)研究分担者
石川　博　（ISHIKAWA Hiroshi）
日本歯科大学・生命歯学部・客員教授
研究者番号： 30089784

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし