

氏名（本籍）	松村 英明
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博甲第 9956 号
学位授与年月	令和 3 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	Induced neural cells from human dental pulp ameliorate functional recovery in a murine cerebral infarction model (ヒト歯髄組織から分化誘導した神経系細胞を移植することで脳梗塞モデルマウスの神経症状が改善する)
主査	筑波大学教授博士（医学） 家田 真樹
副査	筑波大学講師 博士（医学） 中馬越清隆
副査	筑波大学講師 博士（医学） 安部 哲哉
副査	筑波大学助教 博士（理学） 山下 年晴

論文の内容の要旨

松村英明氏の博士学位論文は、ヒト歯髄細胞から分化誘導した神経細胞を用いて、免疫不全脳梗塞モデルマウスに細胞移植して、その治療効果を検討したものである。移植されたマウスの神経再生機能の評価や免疫染色により、神経細胞移植により細胞の生着と機能回復を明らかにしている。その要旨は以下のとおりである。

（目的）

著者は、脳卒中は我が国の死因および要介護の原因の上位であり、脳梗塞は脳卒中の約 75%を占め、脳梗塞に対する急性期カテーテル血栓回収療法が有効な治療法であるが、その適応は限られ、またそのような治療を受けても後遺症に苦しむ患者が多く存在することを示している。著者は、そのような現状に対して、近年、脳梗塞に対する細胞治療が注目されており、脳梗塞に対する自家あるいは他家の骨髄由来間葉系幹細胞の静脈投与や動脈投与、脳内直接移植、急性期での他家骨髄由来間葉系幹細胞の静脈投与などの研究が行われているが、いずれも神経再生よりは栄養因子、抗炎症作用、免疫調整作用などによる神経保護効果に着目した研究が主であるとし、一方、iPS 細胞を用いた方法では分化誘導培養に時間がかかり、腫瘍化の可能性などの課題を挙げている。

これまで様々な細胞が再生医療のソースとして用いられているが、著者は、神経堤由来の口腔内間葉系幹細胞である歯髄幹細胞に着目し、これまでに歯髄幹細胞を用いた脳梗塞治療が行われており、幹細胞そのものの投与・移植でも神経症状が改善する事が報告されているが、その主な要因は抗炎症効果や脳血液関門の保護などに留まり、真の神経再生効果は少ないとされていることから著者は、歯髄組織を神経系細胞にまで分化誘導したうえで脳内に直接移植し、神経への分化による神経症状の改善を目指すこととした。さらに歯髄幹細胞移植群との効果も比較し、歯髄由来神経細胞による脳梗塞改善のメカニズムも解析することとした。

(対象と方法)

(1) ヒト歯髄細胞の採取と神経系細胞の誘導

著者は、通常は破棄される抜歯後のヒト歯髄を用いて研究を行った。歯髄細胞は、歯髄小片に 0.1% トリプシン/0.02% EDTA (PBS(-)) を 37°C 25 分反応させた後に遠心分離し、組織片と細胞を 60 mm の培養皿にまき採取した。細胞培養はすべて 37°C、4.7% CO₂ 湿潤下で行い、細胞が 70~80% confluent に達した後に、薄撒き法 (10,000 cells / 10 cm dish) にて 3 週間培養後、増殖能の高い最も大きな colony を歯髄幹細胞として実験に使用した。神経系細胞は、歯髄細胞を神経誘導培地で培養し、接着性が弱く小型球形細胞でスフェロイドを形成する細胞群を選別し、これをマトリゲル培養皿に播種し誘導した。実験には 4-6 継代して細胞数を増やしたものをを用いた。

(2) 培養細胞の免疫組織学的評価

著者は、培養細胞を固定後に、一次抗体を 4°C、一晚反応させた。その後 PBS で洗浄し、二次抗体を室温、60 分間、遮光状態で反応させた。スライドは蛍光顕微鏡 BZ-X710 (Keyence, Japan)、または Leica DMI8 (Leica Microsystems, Germany) を用いて観察した。

(3) マイクロアレイ、RT-PCR による遺伝子発現解析

著者は、Clariom S Human Assay を用い、歯髄幹細胞 (n = 3)、神経系細胞 (n = 3) の遺伝子発現をマイクロアレイにより解析した。遺伝子発現の変化を歯髄幹細胞と神経系細胞の間での遺伝子発現の差異を、Volcano plot 図と Hierarchical Clustering 図を作成し解析した。DAVID を用いて Gene Ontology (GO) タームを解析し、さらに Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を用いたエンリッチメント解析を行った。またパスウェイ解析を Ingenuity Pathways Analysis (IPA; QIAGEN, USA) を用いて行った。

(4) マルチ電極アレイ解析

著者は、多電極電位計測システム Multi Electrode Array MEA2100-System (Multi Channel Systems MCS GmbH, Germany) を用いて細胞外電位を測定した。

(5) 脳梗塞モデルマウスの作製、細胞移植、症状評価

著者は、光応答性を利用した photothrombotic middle cerebral artery occlusion model を作製して、中大脳動脈脳梗塞モデルを SCID マウスに作製した。脳定位装置を用いて細胞を脳に直接移植した。頭部定位固定器 (NARISHIGE, Japan) に固定し、頭部を正中で 2 cm 切開し骨に穴をあけた後にハミルトンシリンジ (Hamilton micro-syringes701RN, Hamilton Company, USA) を用いて細胞を移植した。脳梗塞作製の 5 日後 (血管新生期である亜急性期) に神経系細胞を 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 cells 移植し、最適な移植細胞数を決定した後に、同じ細胞数の歯髄幹細胞移植群、緩衝液投与群との比較を行った。症状評価はシリンダーテストを移植直前、移植後 4、7、11、14、18、21、25、28 日に施行した。シリンダーテストは動画撮影したファイルを保存し、移植細胞などの条件を盲検化して解析した。また実験終了後に、脳の組織学的評価を行った。

(結果)

(1) 分化誘導した神経系細胞の性質評価

著者は、歯髄初代培養細胞に神経分化誘導培地を添加し培養する事で、神経系細胞を得た。歯髄幹細胞は紡錘形の細胞であるが、誘導後の神経系細胞は多極の軸索様構造をもった形態へと変化した。そして、細胞は神経に特異的な蛋白を発現や電氣的活動を有しており、神経細胞への誘導に成功した。

(2) 歯髄幹細胞および分化誘導神経系細胞の網羅的遺伝子発現解析

著者は、歯髄幹細胞 (n = 3) と誘導後神経系細胞 (n = 3) の網羅的な遺伝子発現の比較をマイクロアレイを用いて行い、主成分分析、GO 解析、パスウェイ解析などから、神経系細胞で特徴的な遺伝子発現を確認した。さらに VEGF シグナル上昇や p53 低下など、高い血管新生能や抗アポトーシス作用を確認した。

網膜下の線維性組織の増生は術後 5 日目の検体の 66.7% に認められた。

(3) 細胞移植実験

著者は、脳梗塞処置後 5 日で神経系細胞を 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 cells ずつ移植 (n = 3, 4, 4) したところ、 1×10^5 cells 移植群で他の細胞数と比較して症状改善が強い傾向にあった事を示し、神経系細胞の移植 (n = 5) の効果を歯髄幹細胞移植群 (n = 6)、緩衝液投与群 (n = 6) と比較したところ、神経

系細胞の移植で移植 4 週後に優位に麻痺症状の改善、脳内での神経細胞生着を確認した。

(考察)

本研究により、著者は、ヒト歯髄組織から分化誘導した神経系細胞が脳梗塞に対する再生医療の細胞源として有用である事を明らかにしている。著者は、ヒト歯髄組織より分化誘導した神経系細胞は、歯髄幹細胞よりも低酸素・ストレス条件に対する耐性が強く、また移植後にはホストの脳内へと軸索構造を伸ばして神経症状の改善を得る事ができ、将来の再生医療実現に有益であると展望している。

審査の結果の要旨

(批評)

脳梗塞に対するカテーテル治療などの超急性期医療を受けられなかった患者や、それらの治療を受けたが重い後遺症に悩む患者が多くいる現状において、脳梗塞に対する再生医療が求められている。松村氏は脳梗塞モデルマウスを用いて、ヒト歯髄組織から分化誘導した神経系細胞が脳梗塞に対する再生医療の細胞源として有用であることを示した。またその分子機序も明らかにし、本研究成果は、新しい脳再生治療の実現に有益な知見をもたらすものである。

令和 3 年 1 月 15 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。