

筑波大学

博士（医学）学位論文

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)

2020

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

松村 英明

目次

第 1 章 本研究の背景

1-1 脳梗塞について

1-2 脳梗塞に対する細胞治療について

1-3 歯髄について

第 2 章 研究の目的

第 3 章 実験方法

3-1 歯髄組織からの歯髄幹細胞の採取

3-2 歯髄組織からの神経系細胞の分化誘導

3-3 培養細胞の免疫組織学的評価

3-4 RT-PCR での遺伝子発現解析

3-5 マイクロアレイ

3-6 フローサイトメトリー

3-7 OGD(oxygen and glucose deprivation)条件下での生
細胞アッセイ

3-8 カルシウム指示薬

3-9 マルチ電極アレイ

3-10 脳梗塞モデルマウスの作製

3-11 細胞移植

3-12 症状評価

3-13 脳萎縮評価および組織学的評価

3-14 統計学的手法

第4章 結果

4-1 歯髄幹細胞の性質評価

4-2 分化誘導した神経系細胞の性質評価

4-3 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

4-4 *In vitro* での低酸素培養下での神経系細胞の優位性

4-5 分化誘導した神経系細胞の電気的活動の評価

4-6 移植する細胞数の決定

4-7 移植後の神経症状改善

4-8 脳萎縮の評価

4-9 移植後細胞の評価

第5章 考察

第6章 結語

第7章 今後の展望

謝辭

參考文獻

第 1 章 本研究の背景

1-1 脳梗塞について

脳卒中は我が国の死因および要介護の原因の上位である。脳梗塞は脳卒中の約 75%を占める。一般的な治療方法として、血栓溶解薬である tPA (tissue plasminogen activator) 静注療法が従来行われてきたが[25]、近年、脳梗塞急性期におけるカテーテル血栓回収療法の有効性が証明された[4,6,7,8,12,13,31,32]。しかし、これらの治療が行えるのは発症 4.5~8 時間以内とごく短時間に限られる。本邦では脳梗塞年間発症数は 186,000 人と推定されており[44]、さらにその中で、これらの急性期カテーテル血栓回収療法の適応となりえる脳主幹動脈閉塞は約 24~46%程度[30]、つまり 45,000 (24%) ~ 86,000 人 (46%) 程度と推測される。しかし、カテーテル血栓回収療法が行われた症例は 13,000 人 (7%) にすぎない。脳梗塞に対する急性期カテーテル血栓回収療法は極めて有効な治療法だが、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。このような現状において、脳梗塞発症後の後遺症をいかに軽くするかが重要である。

1-2 脳梗塞に対する細胞治療について

カテーテルなどの急性期治療よりも therapeutic time window が長いと期待

される治療として、近年、脳梗塞に対する細胞治療が注目されている。現在、脳梗塞慢性期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[33,36,39]、急性期での他家骨髄由来間葉系幹細胞の静脈投与[16]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[5]。一方、iPS (induced pluripotent stem cells) 細胞を用いた研究では神経再生に主眼をおいたものがある[26,27]が、現時点では分化誘導培養に時間がかかるといった問題点や腫瘍化の可能性[20]、遺伝子操作を伴う為、臨床応用までのハードルがある。また ES (embryonic stem cells) 細胞や胎児由来神経幹細胞を用いた神経再生療法[10]がヨーロッパを中心に行われているが、日本では生命倫理の問題が大きく、解決のめどが立っていない。

脳梗塞に対する細胞治療は注目されているが、投与経路や用いる細胞の種類、対象治療的な神経保護目的なのか根治治療を目指した再生治療目的なのかなど、まだ多様な目的をもった研究開発と一部の治験が進行中の段階である。Cui らの脳梗塞に対するメタアナリシス[9]では2018年までの7677編の論文から動物実験355編、ヒト研究10編を抽出し、症状回復に最も関与する因子を検討した結果、投与経路は脳への直接移植、細胞種類としては間葉系幹細胞や単核球よりも神経幹細胞の移植が最も効果的であるという結果であった。同様にVuらのメ

タアナリシス[47]でも脳内直接移植が動脈投与や静脈投与と比較して最も効果量が高かった。

保護効果のみではなく組織再生を目指して、機能をもった細胞の直接移植による再生医療が研究されている。例えば、パーキンソン病に対する再生医療では、iPS 細胞由来のドパミン神経前駆細胞を脳内に直接移植し[21]、また重症心不全に対しては iPS 細胞由来の収縮力をもった心筋塊の移植[45]の研究がすすめられている。脳梗塞に対しても iPS 細胞から分化誘導した神経前駆細胞の移植研究が進んできているが[21]、成熟したニューロンの移植では生着率が低い[11]という問題点が残っている。

1-3 歯髄について

様々な種類の細胞が研究に用いられているが、本研究では、神経堤由来の口腔内間葉系幹細胞に着目した。神経堤は胎生期に神経外胚葉と表皮外胚葉の間に出現する移動性の多能性をもつ細胞集団であり、その重要性から外胚葉、中胚葉、内胚葉の三胚葉に続く、第四の胚葉ともいわれる。骨髄や皮下脂肪からの組織幹細胞よりも容易にかつ多量に神経系細胞に分化誘導する事が出来る。歯髄幹細胞は神経堤由来の口腔内体性幹細胞であり、智歯の抜歯などで容易に採取可能である。神経堤由来の歯髄幹細胞は山中 4 因子(Klf4, Sox2, c-Myc,

Oct4)や Nanog を発現している。これらの因子は自己複製能の促進と未分化な状態の維持にかかわる因子であり、多能性や増殖能の高さにつながる[48]。その結果、骨髄幹細胞よりも歯髄幹細胞は分化増殖能が高い事が報告されている[1]。

この歯髄組織由来の幹細胞を用いた脳梗塞治療が行われている[2,29,37,38]。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っていると考えられている[38]。

第2章 研究の目的

先述の如く、再生医療として、脳梗塞以外のいくつかの疾患や臓器障害に対する再生医療が、機能をもった細胞、すなわち幹細胞よりも各種臓器を構成する細胞に分化誘導した細胞を用いて行われている事から、脳梗塞においてもまた、歯髄幹細胞移植よりもそこから分化誘導し、より神経の系譜に方向づけた細胞(神経系細胞)を用いたほうが、保護効果のみならず、神経組織の再生を目指すのではないかという仮説をたてた。

以上より、骨髄幹細胞などの他の体性幹細胞よりも神経に分化しやすい歯髄組織を使用し、機能をもった神経系細胞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的とした本研究を立案した。

また、先行研究で他の研究機関で既に進んでいる歯髄幹細胞移植群[2,29,37,38]との効果の比較を合わせて行う事とした。

第 3 章 実験方法

3-1 歯髄組織からの歯髄幹細胞の採取

本研究は筑波大学附属病院の倫理委員会の承認を得て行った(承認番号：H30-181)。筑波大学附属病院歯科口腔外科外来にて、抜歯が必要であると診断された患者のうち同意を得られた者で、かつ視診やパノラマ X 線写真にて大きな齶窩がない歯を対象とした。通常は破棄される抜歯後の歯髄を用いて研究を行った。

歯科用局所麻酔剤 1.8 mL 程度を対象歯周囲に投与し抜歯を行った。抜去歯は 4°C に冷やした培地に保存し研究室まで運搬した。クリーンベンチ内で技工用モーターにて抜去歯を分割し、歯髄を採取し培養にうつした。

歯髄細胞採取には、抜去歯から採取した歯髄をメスで細切し、さらにその細切した歯髄小片に 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、組織片および細胞を少量の growth medium (GM) で懸濁し 60 mm の培養皿に移した。GM は 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, USA)、100 μ M glutamate (GlutaMAX I; Thermo Fisher Scientific, USA)、0.1% MEM Non-Essential Amino Acids (MEM-NEAA; Thermo Fisher Scientific, USA)、50 U/ml penicillin、50 μ g/ml streptomycin (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)、0.25 μ g/ml fungizone

(Cytiva, USA) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's nutrient mixture F12 培養液 (DMEM/F12; Thermo Fisher Scientific, USA) を用いた。培養開始 24 時間後、組織小片が培養皿から剥離しないよう注意しながら 2 mL の GM を培養皿の壁面から添加した。培養はすべて 37°C、4.7%CO₂ 湿潤下で行い、GM は 3~4 日おきに新しい培地に交換した。細胞が 70~80% confluent に達した後に継代培養(1:3 split)を行った後に、薄撒き法(10,000 cells / 10 cm dish) にて 3 週間培養後、増殖能の高い、すなわち最も大きな colony をトリプシンに浸した濾紙で採取し、歯髄幹細胞として実験に使用した[14,48]。

また、歯髄幹細胞の多能性を証明するために骨誘導、軟骨誘導、脂肪誘導をおこない、それぞれアリザリンレッド染色、アルシアンブルー染色、オイルレッド O 染色で評価した。

3-2 歯髄組織からの神経系細胞の採取・誘導

前項と同様の手順で歯髄を採取し、初代培養を行った。この初代培養に神経誘導培地を用いて、接着性が弱く、小型球形細胞で、かつスフェロイドを形成する細胞群を選別し、これをマトリゲルでコーティングした 60 mm 培養皿に播種した。この方法で得られた細胞を神経系細胞とした。実験には 4-6 継代して細胞数を増やしたものを用いた。神経誘導培地は DMEM/F12 を基本とし、5%

FBS, 10 μ M MEM-NEAAs, 2 mM GlutaMAX, 10 nM all trans-retinoic acids (Sigma-Aldrich, USA), 50 μ M ascorbic acid (Sigma-Aldrich, USA), 5 μ M insulin (Sigma-Aldrich, USA), 10 nM dexamethasone (Sigma-Aldrich, USA), 20 nM progesterone (Sigma-Aldrich, USA), 20 nM estradiol (Sigma-Aldrich, USA), 10 nM nerve growth factor (Sigma-Aldrich, USA), 10 ng/ml thyroxine (Sigma-Aldrich, USA), 50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, 0.25 μ g/ml fungizone を添加したものを使用した。神経維持培地は Neurobasal Plus medium (Thermo Fisher Scientific, USA)に B27 Plus Supplement (Thermo Fisher Scientific, USA)および 20 ng/ml epidermal growth factor (PeproTech, USA), 20 ng/ml fibroblast growth factor (PeproTech, USA)を添加したものを
用いた[43]。

3-3 培養細胞の免疫組織学的評価

培養細胞はリン酸緩衝食塩液(Phosphate Buffered Saline: PBS)で洗浄した後に 100%メタノール (Wako Pure Chemical Industries, Japan)を用いて 4°C、15 分間で固定した。ブロッキング溶液 Blocking One Histo (Nacalai Tesque, Japan)を室温、15 分作用させた後に表 1 に示す一次抗体を 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。

洗浄後、DAPI を含有する封入材 (Immunoselect Antifading Mounting Medium DAPI, Dianova GmbH, Germany) を用いてカバーガラスで封入した。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。ネガティブコントロールとして一次抗体を除いた染色を行った。

表 1. 使用した 1 次抗体および希釈濃度

antibody	company	catalog number	dilution (ICC)	dilution (IHC)
Nanog	proteintech	14295-1-AP	1:200	
Oct4	abcam	ab19857	1:350	
Sox2	Milipore	AB5603	1:500	
HNK-1	SIGMA	C6680	1:400	
P75	abcam	ab52987	1:200	
Nestin	SIGMA	n5413	1:200	1:200
GFAP	abcam	ab7260	1:1000	1:1000
Myelin Basic Protein	abcam	ab62631	1:200	
Doublecortin	abcam	ab18723	1:1000	1:1000
β III tubulin	abcam	ab18207	1:1000	
MAP2	SIGMA	M4403	1:500	1:500
Synaptophysin	Cell Signaling Technology	36406	1:100	
OLIG2	SIGMA	SAB1404798		1:500
NeuN	abcam	ab177487		1:500
CD31	BD Pharmingen	550274		1:100
VEGF	Bioss Inc	bs-0279R		1:100
STEM121	TaKaRa	Y40410		1:1000

ICC: Immunocytochemistry (免疫細胞染色)

IHC: Immunohistochemistry (免疫組織染色)

3-4 RT-PCR での遺伝子発現解析

培養細胞より TRIzol Reagent(Thermo Fisher Scientific, USA)を用いて RNA を抽出した。吸光度計 Eppendorf BioSpectrometer basic (Eppendorf, Germany)を用いて純度を確認した後に high-capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Thermo Fisher Scientific, USA)で cDNA の合成を行った。PCR 反応は Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO, Japan)キットを使用しメーカー推奨の方法で行った。Veriti 96-well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, USA)を用いた。PCR 産物は 2% (w/v)のアガロースゲル (NIPPON GENE, Japan)で電気泳動を行った後に 312 nm の UV トランスイルミネーター E-BOX VX2/20M (Vilber Lourmat, France)上で可視化した。プライマーは表 2 のものを用いた。

表 2. 使用したプライマー

gene name		sequence	size (bp)	accession number
GAPDH	Forward	5'-GTCAAGGCTGAGAACGGGAA-3'	613	NM_001256799.1
	Reverse	5'-GCTTCACCACCTTCTTGATG-3'		
Oct3/4	Forward	5'-GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG-3'	144	NM_001173531
	Reverse	5'-CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC-3'		
Nanog	Forward	5'-CAGAAGGCCTCAGCACCTAC-3'	111	NM_024865.3
	Reverse	5'-ATTGTTCCAGGTCTGGTTGC-3'		
Sox2	Forward	5'-AACCCCAAGATGCACAACCTC-3'	152	NM_003106
	Reverse	5'-CGGGGCCGTATTATAATC-3'		
Nestin	Forward	5'-AACAGCGACGGAGGTCTCTA-3'	220	NM_006617
	Reverse	5'-TTCTTGTCCCGCAGACTT-3'		
GFAP	Forward	5'-GGAAGATTGAGTCGTTGGAG-3'	164	NM_001242376.1
	Reverse	5'-ATACTGCGTGCGGATCTCTT-3'		
TBR2	Forward	5'-CACCGCCACCAAACCTGAGAT-3'	109	NM_001278182.1
	Reverse	5'-CGAACACATTGTAGTGGGCAG-3'		
NeuroD1	Forward	5'-AAGCCATGAACGCAGAGGAG-3'	380	NM_002500
	Reverse	5'-CTGAACGAAGGAGACCAGGT-3'		
β III tubulin	Forward	5'-TCCGCTCAGGGGCCTTTGGAC-3'	108	NM_001197181.1
	Reverse	5'-GCTCCGCCCCCTCCGTGTAG-3'		
NeuN	Forward	5'-GCGGCTACACGTCTCCAACATC-3'	189	NM_001350453
	Reverse	5'-ATCGTCCCATTCAGCTTCTCCC-3'		
MAP2	Forward	5'-AGTTCAGGCCACTCTCCCTCC-3'	127	XM_011511198.1
	Reverse	5'-GGGAGCCAGAGCTGATCCCCA-3'		
Tyrosinhydroxylase	Forward	5'-GTCCCCTGGTTCCCAAGAAAAGT-3'	332	NM_199292
	Reverse	5'-TCCAGCTGGGGGATATTGTCTTC-3'		
TPH2	Forward	5'-TTGACCCAAAGACAACCTTGCTTACA-3'	309	NM_173353
	Reverse	5'-AAAGATCATGCTGGCAACAACATAG-3'		
ChAT	Forward	5'-GGAGGCGTGGAGCTCAGCGACACC-3'	256	NM_020549
	Reverse	5'-CGGGGAGCTCGCTGACGGAGTCTG-3'		
Sox10	Forward	5'-CCTCACAGATCGCCTACACC-3'	161	NM_006941
	Reverse	5'-CATATAGGAGAAGGCCGAGTAGA-3'		
S100 β	Forward	5'-GGAAATCAAAGAGCAGGAGGT-3'	254	NM_006272
	Reverse	5'-ATTAGCTACAACACGGCTGGA-3'		

3-5 マイクロアレイ

Clariom S Human Assay (Thermo Fisher Scientific, USA)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。上述と同様の方法で培養細胞より total RNA を抽出し、吸光光度計を用いた純度評価および、1% (w/v)アガロースゲルを用いた total RNA 分解の有無の評価を行った後に、検体を Thermo Fisher Scientific 社に送付し、マイクロアレイを依頼した。得られた Raw データ(CEL ファイル)を用い、ソフトウェア Transcriptome Analysis Console version4.0 (Thermo Fisher Scientific, USA)を用いて正規化処理を施し CHP ファイルとして出力し、歯髄幹細胞および神経系細胞の遺伝子発現プロファイルの全体像を主成分分析で把握した。主成分分析はサンプル同士の類似性を空間的に把握する手法であり、各データの位置から外れ値がないか、あるいは異なる種類のサンプル同士での遺伝子発現プロファイルの違いを相対的に把握可能である。

その後、歯髄幹細胞および神経系細胞の間で発現差解析を行った。歯髄幹細胞での発現シグナル値を基準とした神経系細胞での発現シグナル値の比を倍率変化(Fold Change)とあらわした。また歯髄幹細胞および神経系細胞での発現シグナルの有意な差を FDR (False Discovery Rate) P value < 0.05 とした。FDR は網羅的遺伝子解析などの多くのデータを多重検定するときに用いる指標で、

「繰り返し検定を行った結果のうち、どの程度の割合でエラーが含まれているのを許容するか」を示す指標であり、一般的には5%がカットオフとなる。Fold Change と FDR の値で閾値を設定し、有意な発現変動遺伝子を抽出し以降の解析に用いた。

歯髄幹細胞と神経系細胞の間での遺伝子発現の差異を表す為に Volcano plot 図と Hierarchical Clustering 図を作成した。Volcano plot 図は横軸が Fold Change、縦軸が FDR P value(-log 10)を示す散布図であり、グラフ上部の両端に位置する遺伝子が、Fold Change が大きく、FDR P value が低い遺伝子を示している。Volcano plot 図を見る事で、2 群間での遺伝子発現の差異の全体像を把握する事が可能である。Hierarchical Clustering 図は FDR P value < 0.05 で、Fold Change が 2 より大きい、または-2 より小さい遺伝子を発現変動遺伝子として抽出して作成した。この抽出した遺伝子を、類似性を元に並べ替えたものである。歯髄幹細胞と神経系細胞の間での遺伝子発現プロファイルの違いが把握可能である。

それぞれでの遺伝子発現のエンリッチメント解析をオンラインソフトウェア The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)[17,18]と、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)[40]で行った。DAVID は National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)が提

供しているデータベースで、個々の遺伝子に割り当てられた注釈情報(アノテーション)を解析する事が可能である。FDR P value < 0.05 で、Fold Change が 5 より大きい遺伝子を発現変動遺伝子として抽出し、DAVID を用いてその遺伝子群がもつアノテーションの中に多く含まれる Gene Ontology(GO)タームを解析し、その上位を求めた。これにより発現変動遺伝子にどのような機能的特徴があるかを調べた。

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。DAVID では Fold Change や FDR p value などに、ある閾値を任意に設定して抽出した発現変動遺伝子のみの解析を行うが、GSEA では DAVID と異なり発現変動遺伝子のみの解析ではなくマイクロアレイで情報を得たすべての遺伝子およびそのシグナル値を用いて、ある特定の機能をもつ遺伝子セットの Normalized Enrichment Score (NES)を求める事ができる。この NES は Enrichment Score をサイズが異なる遺伝子セット間で比較できるように正規化した値である。Enrichment Score は累積スコア分布におけるゼロから最大のずれ幅(重み付き Kolmogorov Smirnov 統計量)である。GSEA を用いたエンリッチメント解析では、情報を得たすべての遺伝子群に対してどのような機能があるかを把握する事が可能である。

パスウェイ解析を Ingenuity Pathways Analysis (IPA; QIAGEN, USA)を用

いて行った。Fold Change が 2 より大きい、または-2 より小さい遺伝子を抽出して解析に用いた。IPA では発現変動遺伝子がどのような既知のシグナル伝達系に関連しているか解析可能であるが、さらに、関連した複数のシグナル伝達系の上流因子を求める事ができる。

3-6 フローサイトメトリー

培養細胞の性質をフローサイトメトリーを用いて評価した。細胞は accutase (Innovative Cell Technologies, USA)で培養皿から剥がした後に、ウシ血清由来アルブミン (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)でブロッキングを行い、その後抗体反応を用いて染色した。抗体は Yuan SH らの表面抗原を組み合わせたニューロン分離法の報告[49]に基づき、phycoerythrin (PE)標識 CD24, peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5 (PerCP-Cy5.5)標識 CD44, phycoerythrin -cyanin 7 (PE Cy7)標識 CD15, Allophycocyanin (APC)標識 CD184 (Becton Dickinson, USA)を用い、また未染色の細胞や、それぞれ対応する iso type コントロールを用いて蛍光漏れ込みの補正を行った。抗体は室温で 30 分反応させた。解析は FACSverse cytometer (Becton Dickinson, USA)および FACSsuite (Becton Dickinson, USA)を用いて行い、CD184(-)/CD44(-)/CD15(Low)/CD24(+)をニューロンとした。異なる 3 個体由来の神経系細胞で解析を行った。

3-7 OGD(oxygen and glucose deprivation)条件下での生細胞アッセイ

In vitro での脳梗塞による酸化ストレス環境を模したモデルである、OGD(oxygen and glucose deprivation)を行い、歯髄幹細胞と神経系細胞における生細胞を比較した。24well プレートに 4×10^4 cells/well になるように歯髄幹細胞と神経系細胞をそれぞれ播種し、12 時間経過後に OGD 処置を行った。OGD 群では無血清、無糖の DMEM/F12 培地 (Thermo Fisher Scientific, USA) で 6 時間、1%O₂(低酸素)下で培養した後に、通常の糖含有培地(歯髄幹細胞は DMEM/F12 FBS10%、神経系細胞は Neurobasal medium with B27 supplement)に戻し 18 時間 21%O₂(通常酸素)下で培養した後に、Cell Counting kit-8 (CCK-8) (DOJINDO, Japan)を用いて WST-8 生細胞アッセイを行った。CCK-8 を各 well に 50 μ L ずつ加え、37°C で 3 時間加温した後に、450 nm の吸光度を測定した。ウェルの均一性やウェルのキズなどの影響をキャンセルする為に、副波長として 620 nm の吸光度も求め、450 nm の吸光度との差を真の吸光度として扱った。コントロールとしてはそれぞれ歯髄幹細胞と神経系細胞をそれぞれ、通常の糖含有培地で 24 時間培養したのも同様に WST アッセイで吸光度を測定し、OGD 処置群との比をとった。それぞれ 3 個体由来の歯髄幹細胞、神経系細胞を用い、1 個体あたり 3wells に細胞を播種し、さらに吸光度は

1well あたり 3 回計測した。

3-8 カルシウム指示薬

分化誘導後の細胞の自発的な電気活動を評価する為にカルシウム蛍光指示薬 Fluo8 (AAT Bioquest, USA)を細胞に 4 μ M 添加し 37°C、40 分インキュベートし、蛍光顕微鏡 BZ-X710 (Keyence, Japan)で動画撮影を行った。FITC フィルターセットを用いた。得られたデータは画像解析ソフト ImageJ v1.52p (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)[35]で経時的な輝度評価を行った。

3-9 マルチ電極アレイ

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非侵襲的に長時間測定した。計測用電極が埋め込まれた培養皿は超純水に 1 時間浸して親水性を上げた後に、200 μ g/ml のマトリゲル 10 μ L を中央の電極部分にマウントし 1 時間 37°C で静置してコーティングを行い、その後細胞を 8×10^4 cells 播種した。自発的な活動電位を評価した。サンプリングレートを 20 kHz とし、100 Hz の high-pass filter をかけて 20 分間計測した。培養皿の中央部に 60 個の微小電極が配置されている。個々の電極において 10~20 μ V 程度の振幅で、ある標準

偏差をもって背景活動が記録されるが、この背景活動の標準偏差の 5 倍を越えた電位変化をスパイクとして抽出した[28]。得られたデータは解析用ソフトウェア、MC_Rack Version4.6.2 (Multi Channel Systems MCS GmbH, Germany) と LabChart (ADInstruments, New Zealand)を用いて解析し、ラスタプロットを作成した。縦軸が電極番号、横軸が時間を示す。1 つの黒線はその時間・電極においてスパイクが検出された事を示す。

3-10 脳梗塞モデルマウスの作製

本研究動物実験は筑波大学生命科学動物資源センター倫理委員会の承認のもと行った(承認番号：18-108)。また、すべての実験は「実験動物の管理と使用に関する指針」に従って実施した。

Pilot study ではローズベンガル (Sigma-Aldrich, USA) の光応答性を利用したマウスの脳梗塞モデルである、photothrombotic middle cerebral artery occlusion model を作製して使用した[46]。マウスは C.B17/Icr-scidJcl の SCID マウスの雄(6 週齢)を用いた。80 mg/kg ケタミン (ケタラール, Daiichi Sankyo Pharmaceutical, Japan)と 10 mg/kg キシラジン (セラクター, Bayer, Japan)の混合液を腹腔内注射して麻酔した。左目と左耳の間を縦に 1 cm ほど切開、側頭筋を付着部より剥がして頭蓋骨を露出させた。中大脳動脈を確認し、

腹腔内にローズベンガルを 150 mg/kg 投与し、5 分後に 532 nm 緑色のレーザー(熱吸収フィルター装着)を中大脳動脈に 2 分間レーザー照射を行った。照射終了後、皮膚を縫合し、手術終了後はあらかじめ温めていたケージに戻し、柔らかくした餌と水分は自由に補給可能な状況にして麻酔から覚醒させた。低体温を避ける為に、麻酔開始時から麻酔から十分覚醒するまでの間、常にヒーティングパッドで 37°C に保温した。

また、本実験では、同一日に均一な培養条件の細胞を多くのマウスに移植する為に、田口らの方法で作製した C.B17/Icr-scidJcl の SCID マウス雄(6 週齢)の脳梗塞処置マウス[41,42]を購入(CLEA Japan, Japan)して使用した。

3-11 細胞移植

脳定位装置を用いて細胞を脳に直接移植した。ケタミンとキシラジンの腹腔内注射にて麻酔したのちに頭部定位固定器 (NARISHIGE, Japan)に固定し、頭部の皮膚をアルコール滅菌後、正中で 2 cm 切開した。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。移植部位は脳梗塞巣辺縁部とするべく、bregma から左に 2.5 mm、深さ 1.5 mm とした。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。

移植細胞はトリプシン・EDTA で処理して培養皿から剥がしたのちに、細胞数をカウントし、予定の細胞数になるように Hanks' 液 (Nissui Pharmaceutical, Japan) で希釈して準備した。投与量は 2 μ l とし、細胞の漏れ出しを防ぐ為に緩徐に投与した。

3-12 症状評価

体重測定、シリンダーテスト[3,34]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直径 10 cm のプラスチック製の筒(シリンダー)にマウスをいれてシリンダー後方に鏡を 2 枚おき、全方向から観察できるようにし、左右の前肢の使用回数を計測した。マウスはシリンダー内面に前肢をつきながら立ち上がり動作、探索動作を行うが、左大脳半球に脳梗塞を作製した為、右前肢の運動、触覚、位置覚などが障害され、左右前肢の使用頻度に差が生じたり、あるいは右前肢にしっかりと体重がかけられずシリンダー内面を滑らせてしまうようになる。体重をかけてしっかりとシリンダー内面に前肢をつけた場合を「障害のない前肢の使用(non-impaired forelimb contacts)」、前肢を滑らせてしまった場合あるいは、手掌が完全に開かず不完

全にシリンダー内面に前肢をつけた場合を「障害のある前肢の使用(impaired forelimb contacts)」とした。①右前肢のすべての使用回数(合計 20 回)の内の right impaired forelimb contacts の割合②左右前肢の non-impaired forelimb contacts(合計 20 回)の内の right non-impaired forelimb contacts の割合を経時的に求めた[23]。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。

なお、移植直前の症状評価で、シリンダーテストにおける左右前肢の使用頻度の差がないマウスは解析から除いた。

3-13 脳萎縮評価および組織学的評価

ペントバルビタール (ソムノペンチル, Kyoritsu Seiyaku, Japan)を投与し疼痛刺激に反応がなくなった後に手早く開胸して右心耳切開、針を心室にさして Hanks'液、次いで 4% パラフォルムアルデヒド液(Paraformaldehyde; PFA, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)を灌流し、その後、脳を採取した。4%PFA で一晩浸漬固定したのちに、脳萎縮の程度を評価する為に、大脳の長径を計測し、正常側大脳半球との長さとの割合を求めこれを atrophy index とした[19]。脳はその後、30%スクロース (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)で脱水処置を行い、optimal cutting

temperature compound (Sakura Finetek Japan, Japan)に包埋し-80°Cで保存した。凍結切片はクリオスタット Leica CM1850 (Leica Microsystems, Germany)で 10 μm 厚で切り出した。切り出し後の切片は 0.1% Triton-X (Nacalai Tesque, Japan)で室温 10 分インキュベートした後に、室温 10 分でブロッキングした。その後 1 次抗体を 4°C overnight で反応させた後に、2 次抗体は室温 1 時間反応させ、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。ネガティブコントロールとして一次抗体を除いて染色したものを用いた。

3-14 統計学的手法

すべての統計は、平均±標準誤差で記載した。統計解析は IBM SPSS Statistics 26 (IBM, Japan)を用いて行った。2 群間の統計学的有意差の検定には Student's t test を用いた。ノンパラメトリックデータに関しては Mann-Whitney U test を用いた。3 群間以上の統計学的有意差検定には Kruskal-Wallis test を行い、その後、多重性を考慮し Tukey 法を用いて各群間解析を行った。P < 0.05 を有意と判定した。

第4章 結果

4-1 歯髄幹細胞の性質評価

歯髄組織の初代培養細胞より歯髄幹細胞を採取した。得られた細胞は間葉系幹細胞のポジティブマーカーである CD44, CD73, CD90 が陽性、ネガティブマーカーである CD14, CD34, CD45, CD105, CD146 が陰性であった(図 1)。

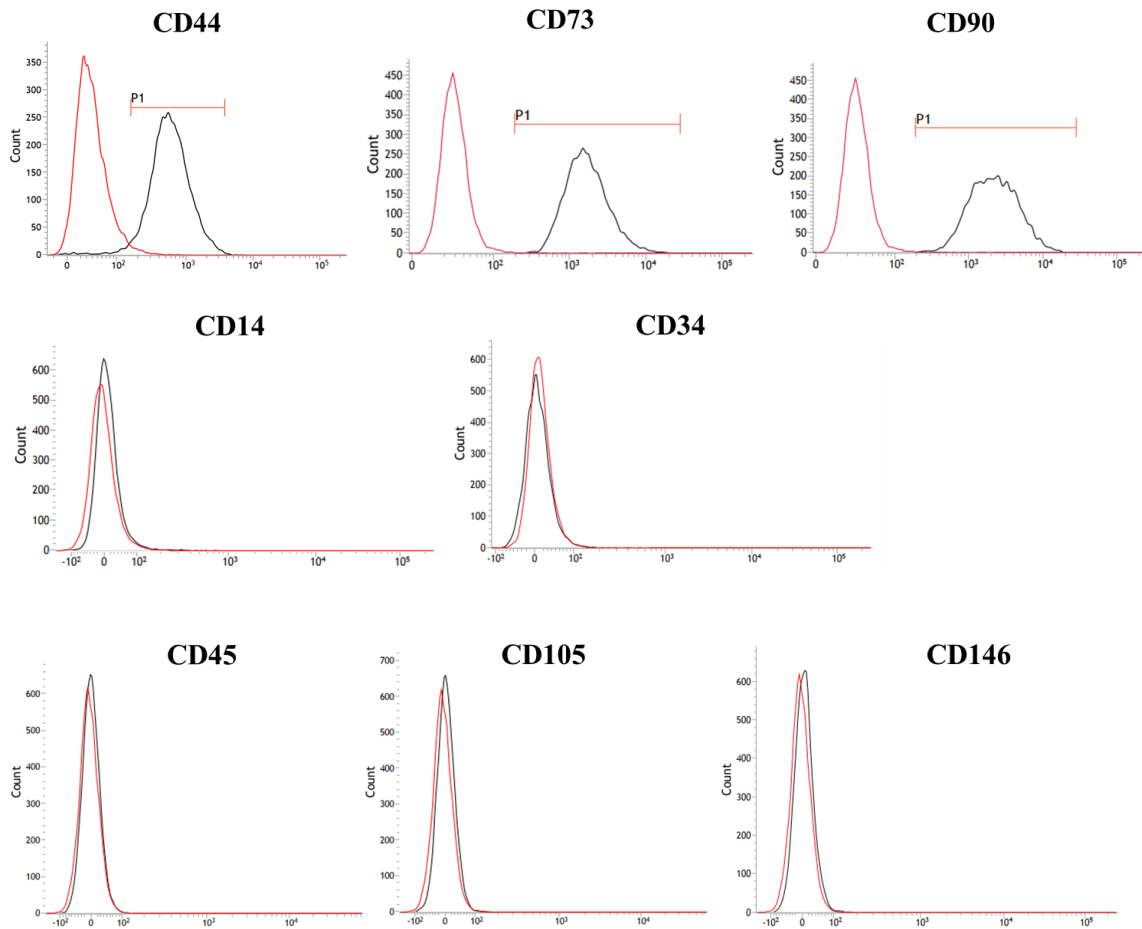


図 1. 歯髄幹細胞の表面抗原

赤線はアイソタイプコントロールを表す。

間葉系幹細胞のポジティブマーカーである CD44、CD73、CD90 が陽性であり、かつ間葉系幹細胞のネガティブマーカーである CD14、CD34、CD45、CD105、CD146 が陰性であった。本研究で用いている歯髄幹細胞は、表面抗原の特性において間葉系幹細胞の特徴を有している事が示された。

免疫染色では幹細胞マーカーである Nanog, Oct4, Sox2 が陽性であった(図 2)。

また、RT-PCR で幹細胞マーカーである Nanog、Oct3/4, Sox2 の発現を確認した(図 3)。

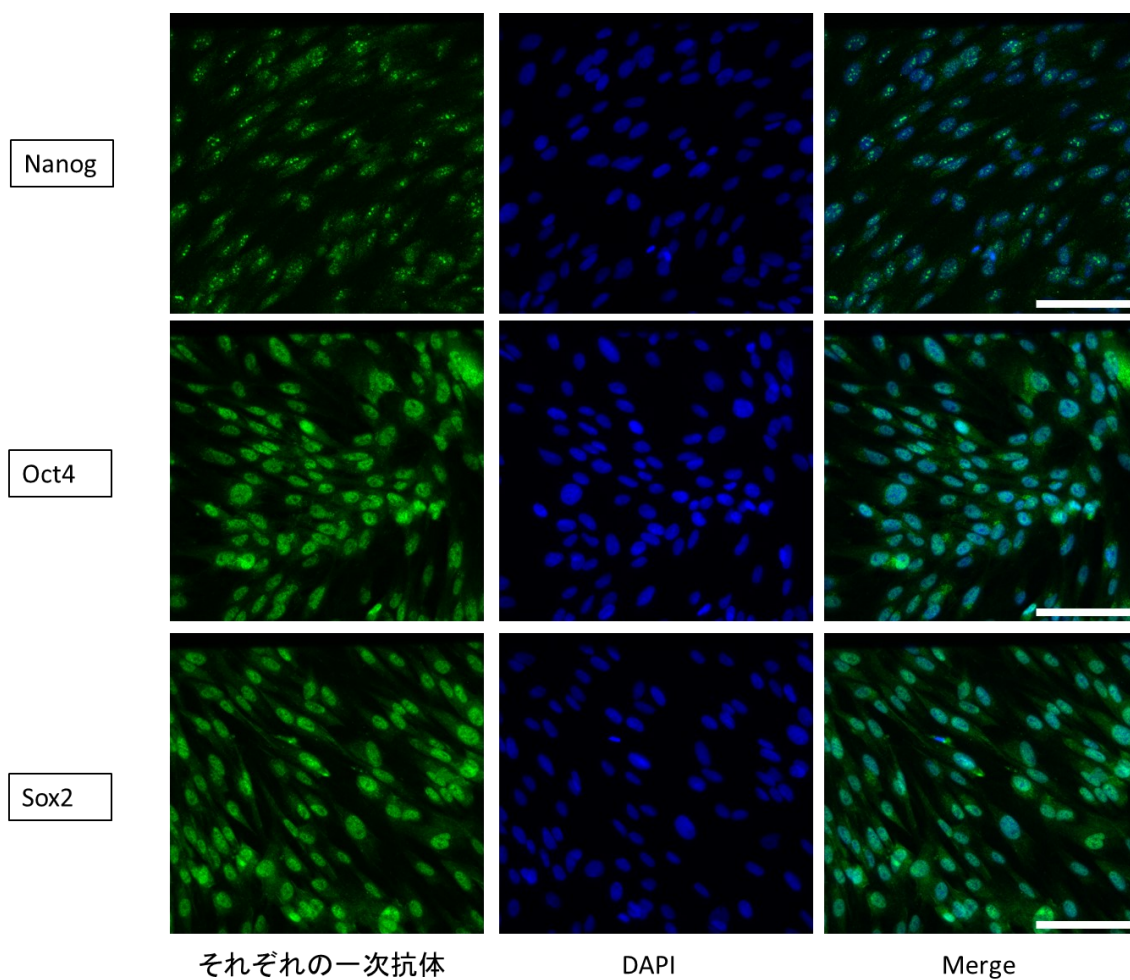
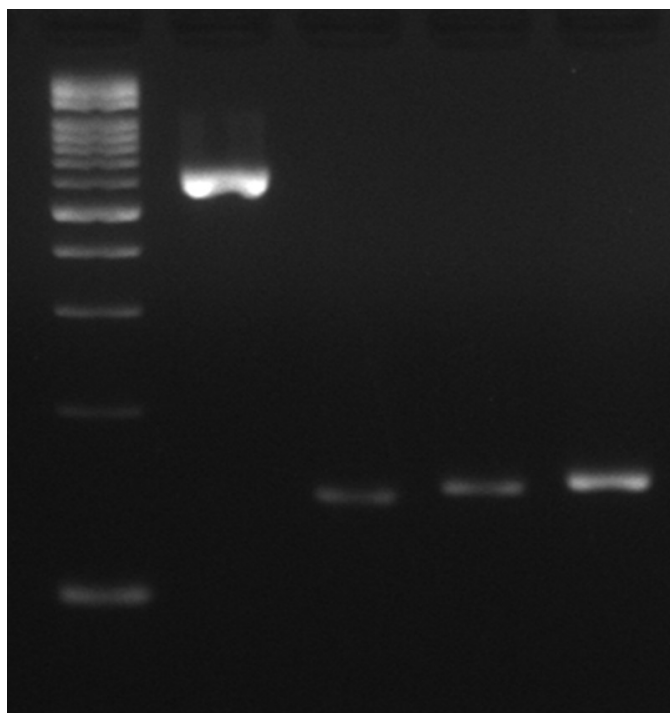


図 2. 歯髄幹細胞の免疫細胞染色

歯髄幹細胞は幹細胞マーカーである Nanog、Oct4、Sox2 陽性であった。

スケールバーは 100 μm を示す。



マーカー GAPDH Oct3/4 Nanog Sox2

図 3. 歯髄幹細胞の RT-PCR

歯髄幹細胞は、幹細胞のマーカである Oct3/4、Nanog、Sox2 の遺伝子が発現していた。GAPDH はリファレンスとなるハウスキーピング遺伝子。

また、歯髄幹細胞の多能性を評価するために骨誘導、軟骨誘導、脂肪誘導をおこない、それぞれアリザリンレッド染色、アルシアンブルー染色、オイルレッドO染色で評価した(図4)。その結果、歯髄幹細胞は多能性をもつことを明らかにした。

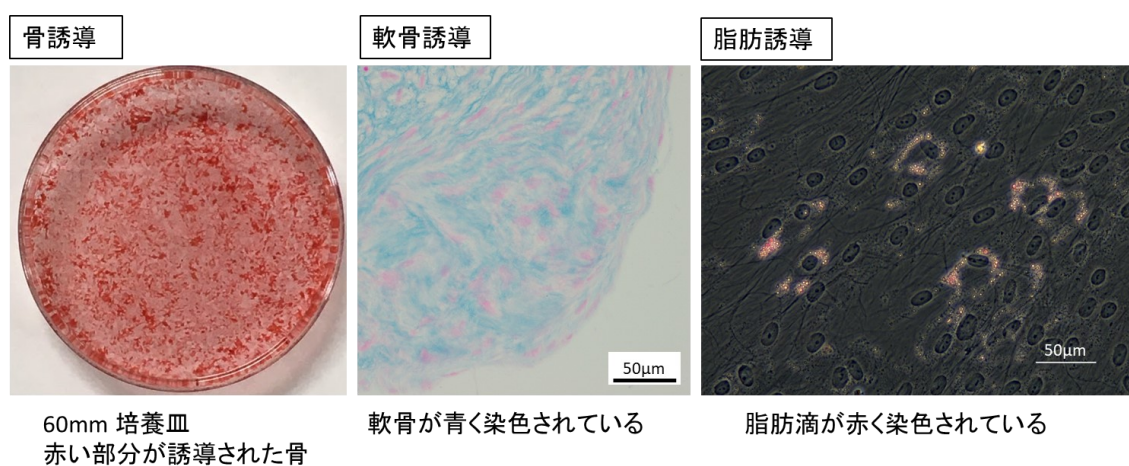


図4. 歯髄幹細胞の多能性評価

骨誘導：アリザリンレッド染色

軟骨誘導：アルシアンブルー染色

脂肪誘導：オイルレッドO染色

以上より、歯髄組織の初代培養を薄まきし、増殖能の高いコロニーを colonial cloning して得た細胞は幹細胞の特性を有している、歯髄幹細胞である事が示された。

4-2 分化誘導した神経系細胞の性質評価

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(図 5)。

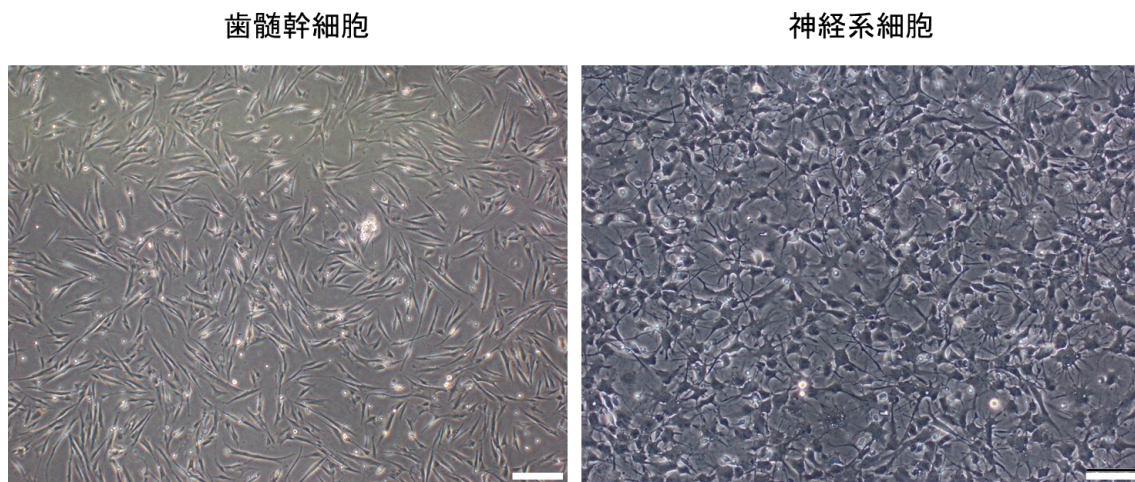


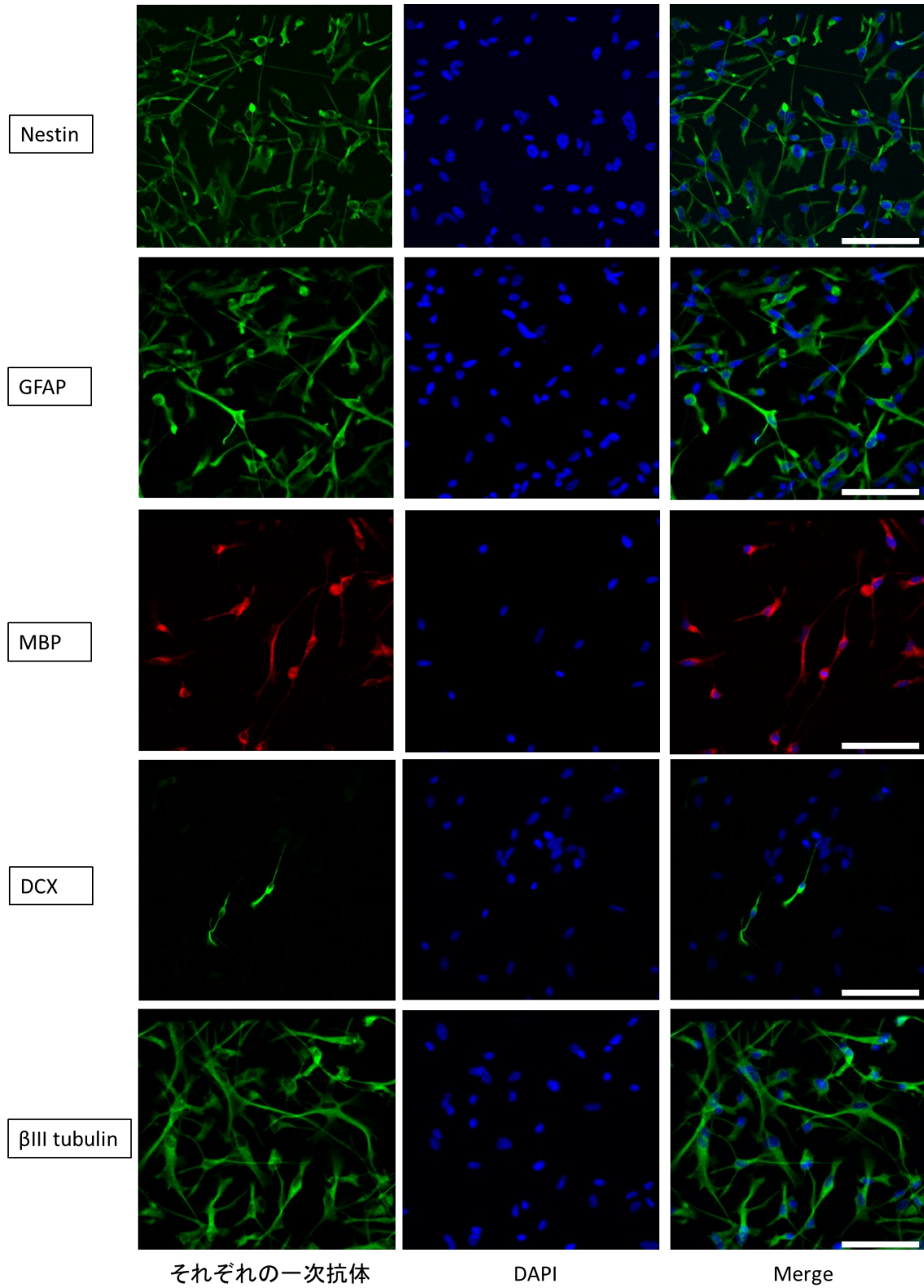
図 5. 歯髄幹細胞および神経系細胞の位相差顕微鏡像

歯髄幹細胞は紡錘形だが、分化誘導した神経系細胞は複数の突起構造をもつ。

スケールバーは 100 μm 。

この分化誘導した細胞の性質を評価する為に細胞免疫染色を行った。その結果、神経幹細胞のマーカーNestin やアストロサイトのマーカーである GFAP、オリゴデンドロサイトのマーカーである MBP に加え、幼弱なニューロンのマーカーである doublecortin(DCX)、 β III tubulin、成熟ニューロンマーカーの MAP2

や Synaptophysin が陽性であった(図 6)。神経堤細胞のマーカーである HNK1 と P75 に関しては共陽性の細胞をごく少数認めた(図 7)。成熟ニューロンのマーカーである MAP2 は 1 か月間程度と長期に培養を継続すると、その割合が増加した。この約 1 か月後時点での免疫染色では成熟ニューロン、未熟ニューロンのマーカー陽性の細胞に加え、アストロサイトのマーカーである GFAP 陽性細胞が多く存在した(図 8)。ニューロンのマーカー陽性細胞は約 30%程度であった。



(figure legend は次ページ)

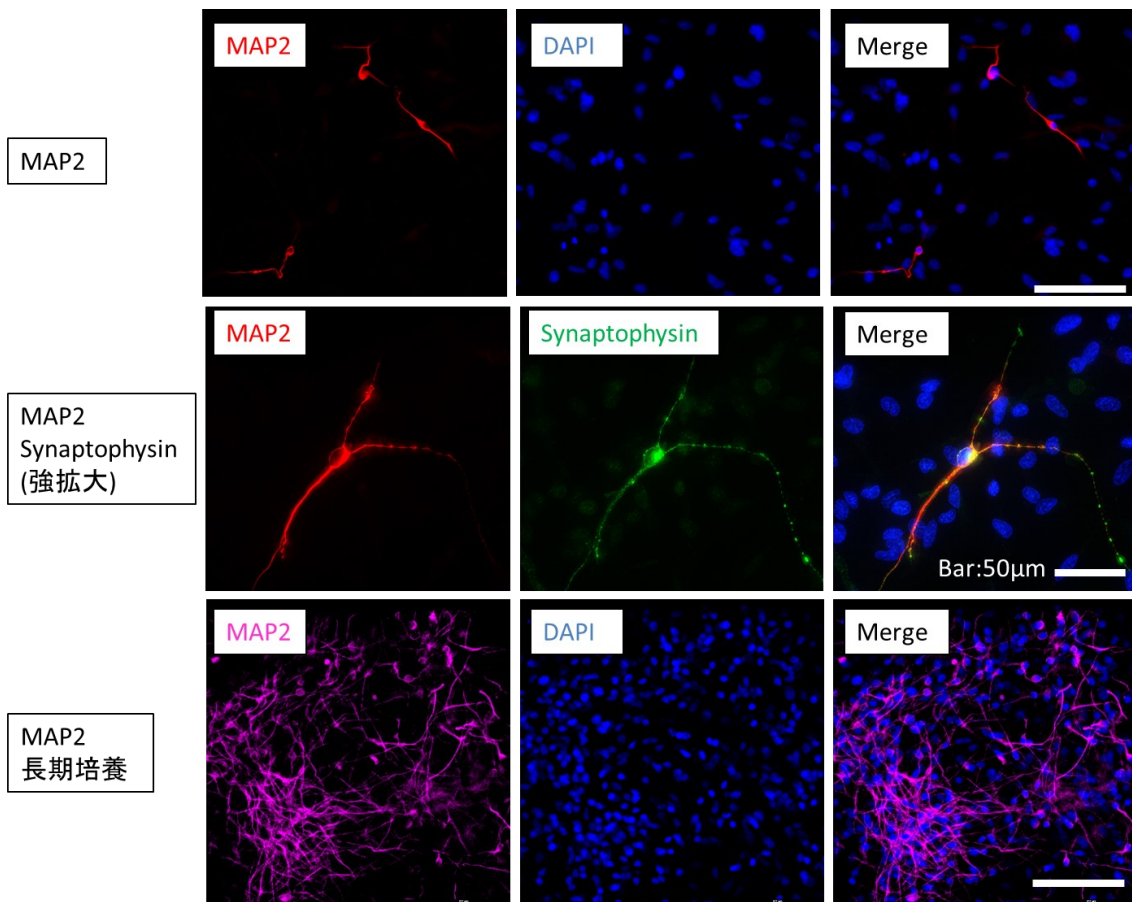


図 6. 神経系細胞の免疫染色

サブカルチャー後 3 日の神経系細胞の免疫染色。

スケールバーは MAP2 と Synaptophysin の二重染色(強拡大)のみ 50 µm。その他はすべて 100 µm。

MAP2 は成熟したシナプスに発現する前シナプスマーカーである Synaptophysin と共染色した。またサブカルチャー後 1 か月の免疫染色では MAP2 陽性細胞の割合が増加していた。

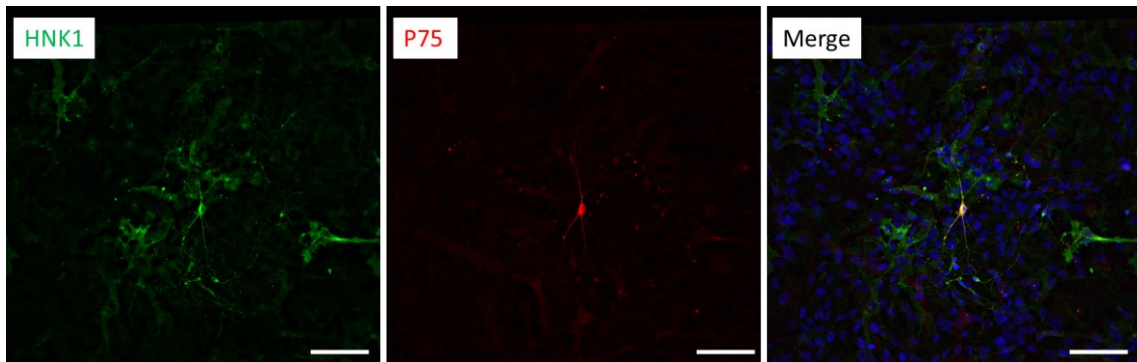


図 7. 神経系細胞の神経堤細胞関連の免疫染色

神経堤マーカーである HNK1(緑)、および P75(赤)が共に陽性である細胞(黄色)をごく少数認めた。スケールバーは 100 μ m を示す。

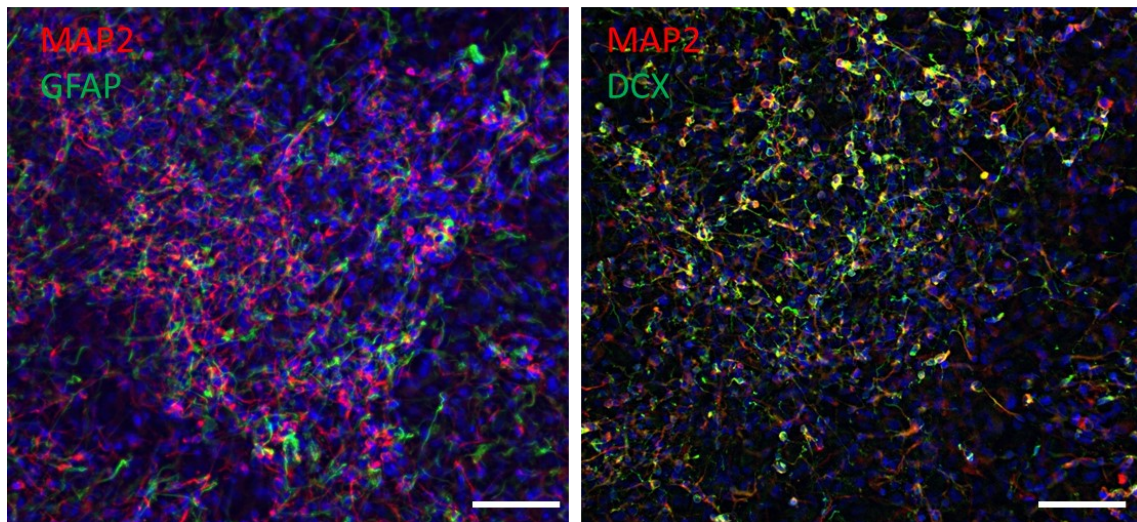


図 8. サブカルチャー後 28 日時点での細胞免疫染色

左 : MAP2(赤)、GFAP(緑)の二重染色

右 : MAP2(赤)、DCX(緑)の二重染色

スケールバーはいずれも 100 μ m を示す。MAP2、DCX 陽性細胞は長期培養するとその割合がサブカルチャー後 3 日に比して増加した。

このように神経系細胞はサブカルチャー後の日数に応じてニューロンの割合が変化するが、サブカルチャー後、約 7 日でコンフルエントになる為、後述する動物実験では、この時点の細胞を移植に用いた。その為、サブカルチャー後 7 日の時点での成熟ニューロン MAP2 や幼弱ニューロン DCX 陽性細胞の割合を細胞免疫染色とフローサイトメーターで計測した。各々 3 個体由来の細胞を評価した。細胞免疫染色では DCX 陽性細胞、MAP2 陽性細胞はそれぞれ $12.0 \pm 1.4\%$ 、 $10.0 \pm 1.0\%$ であった(図 9)。

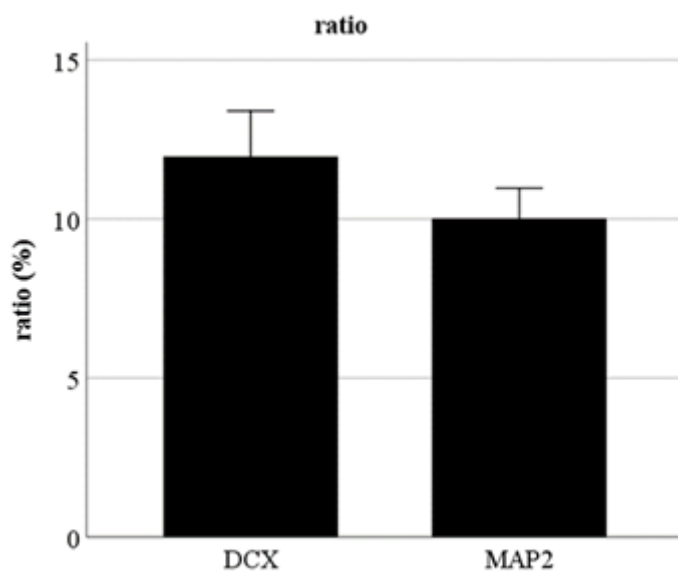


図 9. 移植細胞に含まれるニューロンの割合(免疫染色)

幼弱ニューロン DCX 陽性細胞の割合、成熟ニューロン MAP2 陽性細胞の割合を 3 個体それぞれで計測した。DCX 陽性細胞は約 12%、MAP2 陽性細胞は約

10%であった。サブカルチャー後 7 日の時点の細胞を評価した。エラーバーは標準誤差を示す。

同様にサブカルチャー後7日の細胞をフローサイトメトリーを用いて、表面抗原を調べた。その結果、CD184陰性、CD44陰性かつCD24陽性、CD15(Low)の細胞がニューロンであるが、その割合は $5.1 \pm 0.5\%$ であった(図10)。

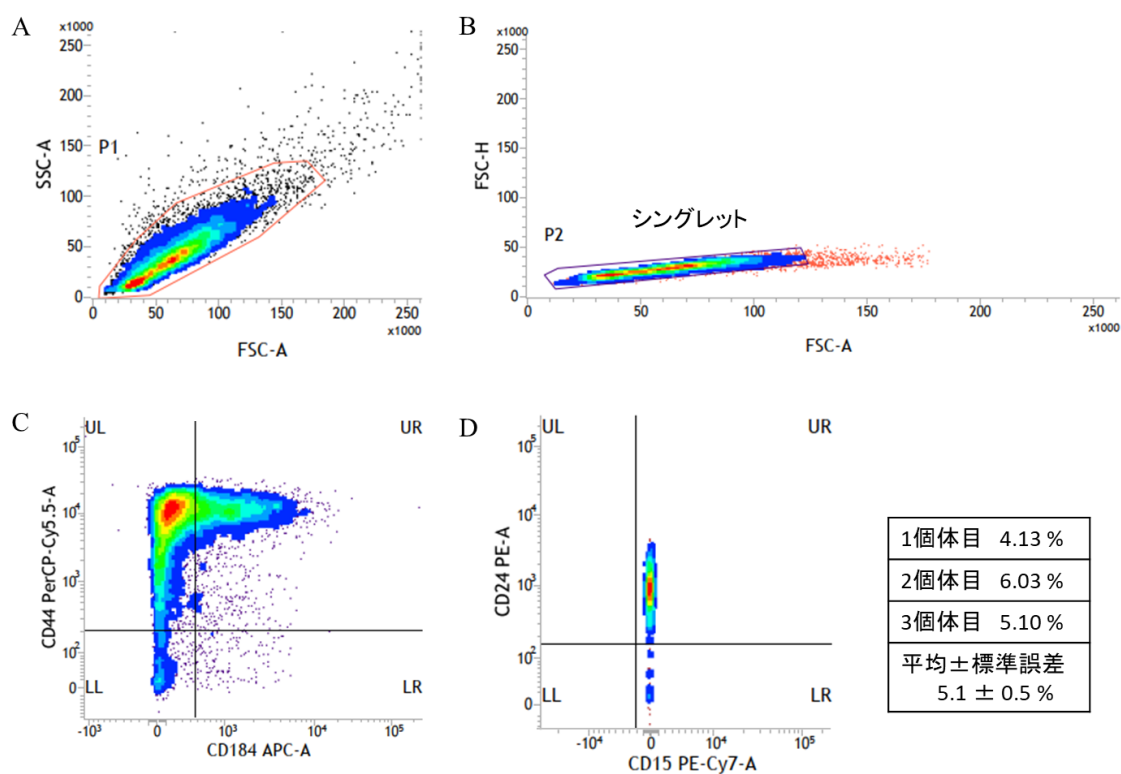


図10. 移植細胞に含まれるニューロンの割合(FACS)

A: 前方散乱光(FSC)と側方散乱光(SSC)で表した全細胞のプロット。前方散乱光は細胞の大きさや表面積を反映し、側方散乱光は細胞内部構造の複雑性を反映する。デブリなどの除去目的に、解析対象細胞をオレンジ枠内の部分とした。

B: 前方散乱光を用いてダブルット除去を施行。測定サンプル中には細胞が2つ以上凝集したもの(ダブルット)が混在している可能性がある為、紫色のゲートを

作成し、その内部が単一細胞(シングレット)、外部がダブレットと区別した。以降の解析はシングレットのみを対象とした。

C : CD184(横軸)と CD44(縦軸)でのヒストグラム。ニューロンは CD184, CD44 ともに陰性である為、第 3 象限(左下)に含まれる細胞を以降の解析対象とした。

D: CD15(横軸)と CD24(縦軸)でのヒストグラム。ニューロンは CD15 が弱陽性、CD24 が陽性である為、第 1,2 象限(右上、左上)に含まれる細胞を抽出してニューロンとした。

また、RT-PCR を用いて誘導後の神経系細胞の遺伝子発現を、歯髄幹細胞と比較した。誘導後には神経幹細胞のマーカである Nestin、神経系の前駆細胞である radial glia マーカーあるいはアストロサイトのマーカである GFAP、幼弱ニューロンのマーカである Tbr2、NeuroD1、 β III tubulin、成熟ニューロンのマーカである NeuN、MAP2、ドパミン作動性ニューロンマーカの Tyrosine hydroxylase (TH)、セロトニン作動性ニューロンマーカの Tryptophan hydroxylase (TPH)、コリン作動性ニューロンマーカの Choline acetyltransferase (ChAT)、オリゴデンドロサイトマーカの Sox10、アストロサイトのマーカの S100 β の遺伝子発現が増加している事がわかった(図 11)。

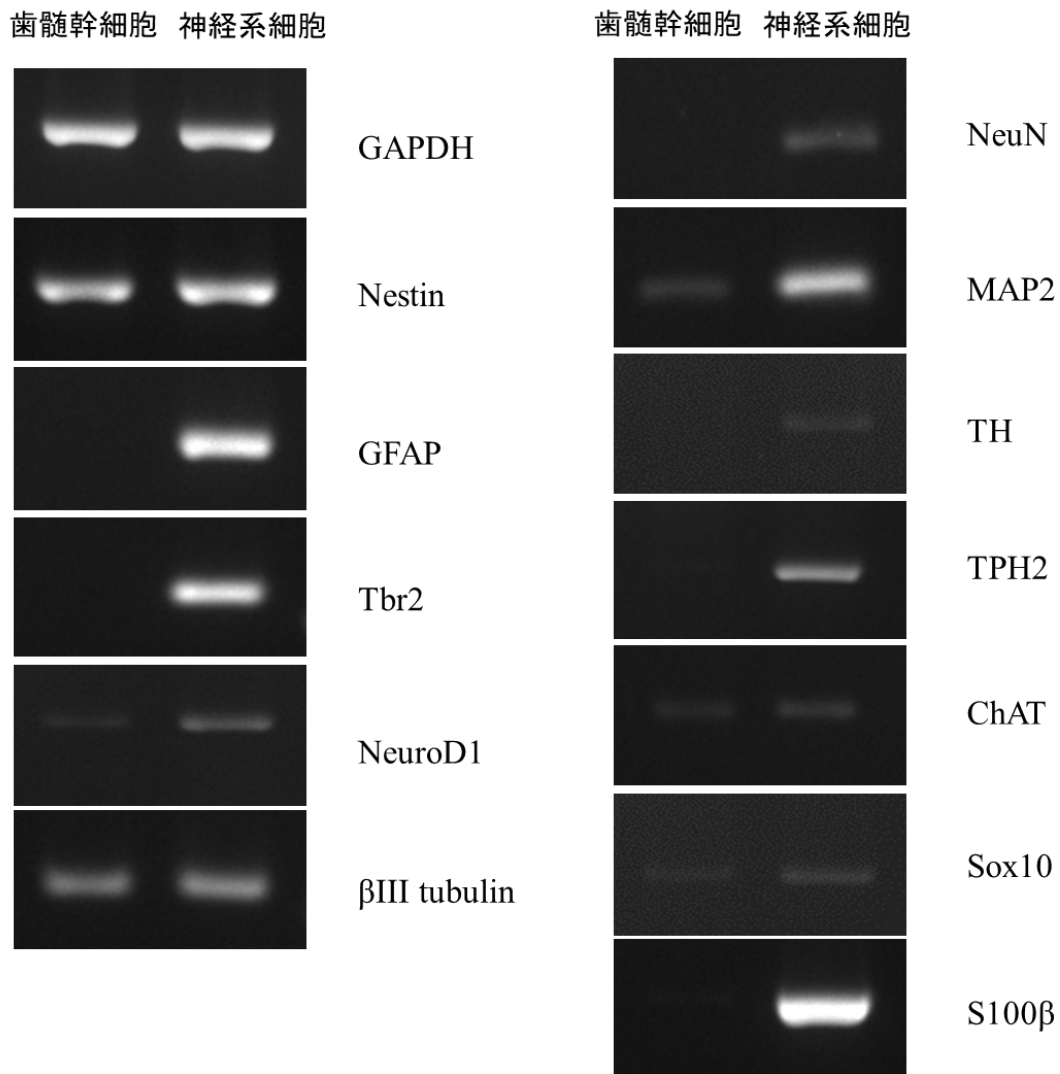


図 11. 歯髄幹細胞と神経系細胞の遺伝子発現の違い(RT-PCR)

誘導後には各種神経系の系譜の遺伝子発現が増加する事がわかった。

4-3 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

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った。主成分分析では歯髄幹細胞および誘導後神経系細胞において、それぞれ3個体の遺伝子発現プロファイルが類似している事、および歯髄幹細胞と誘導後神経系細胞では遺伝子発現プロファイルが異なる事が示された(図 12A)。歯髄幹細胞および神経系細胞の遺伝子のうち、FDR P value < 0.05 で、Fold Change > 2 または $-2 > \text{Fold Change}$ の遺伝子を発現変動遺伝子として抽出し、volcano plot 図や Hierarchical clustering 図でその違いを表した(図 12B,C)。

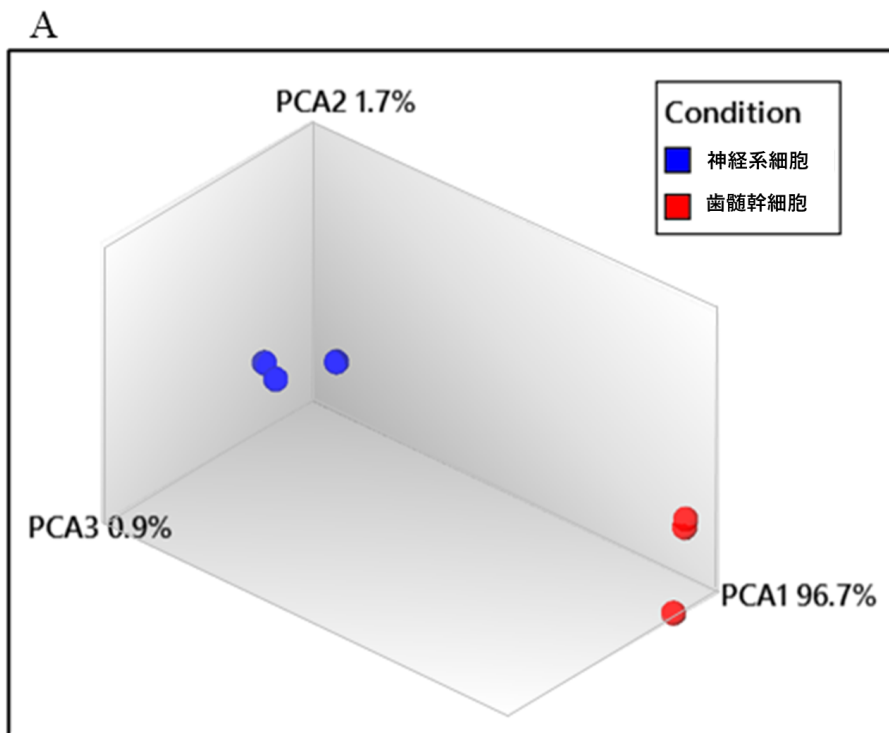


図 12. 歯髄幹細胞と神経系細胞の網羅的遺伝子解析

A : 主成分分析

神経系細胞(青)3 個体と歯髄幹細胞(赤)3 個体を、それぞれの遺伝子発現プロファイルに基づいて 3 次元空間に配置した図。

それぞれの 3 つの青い点、赤い点同士は近接しており、歯髄幹細胞 3 個体および神経系細胞 3 個体の遺伝子発現プロファイルにばらつきが少ない事が示された。また青い点と赤い点は離れており、神経系細胞と歯髄幹細胞の遺伝子発現プロファイルが異なる事がわかった。

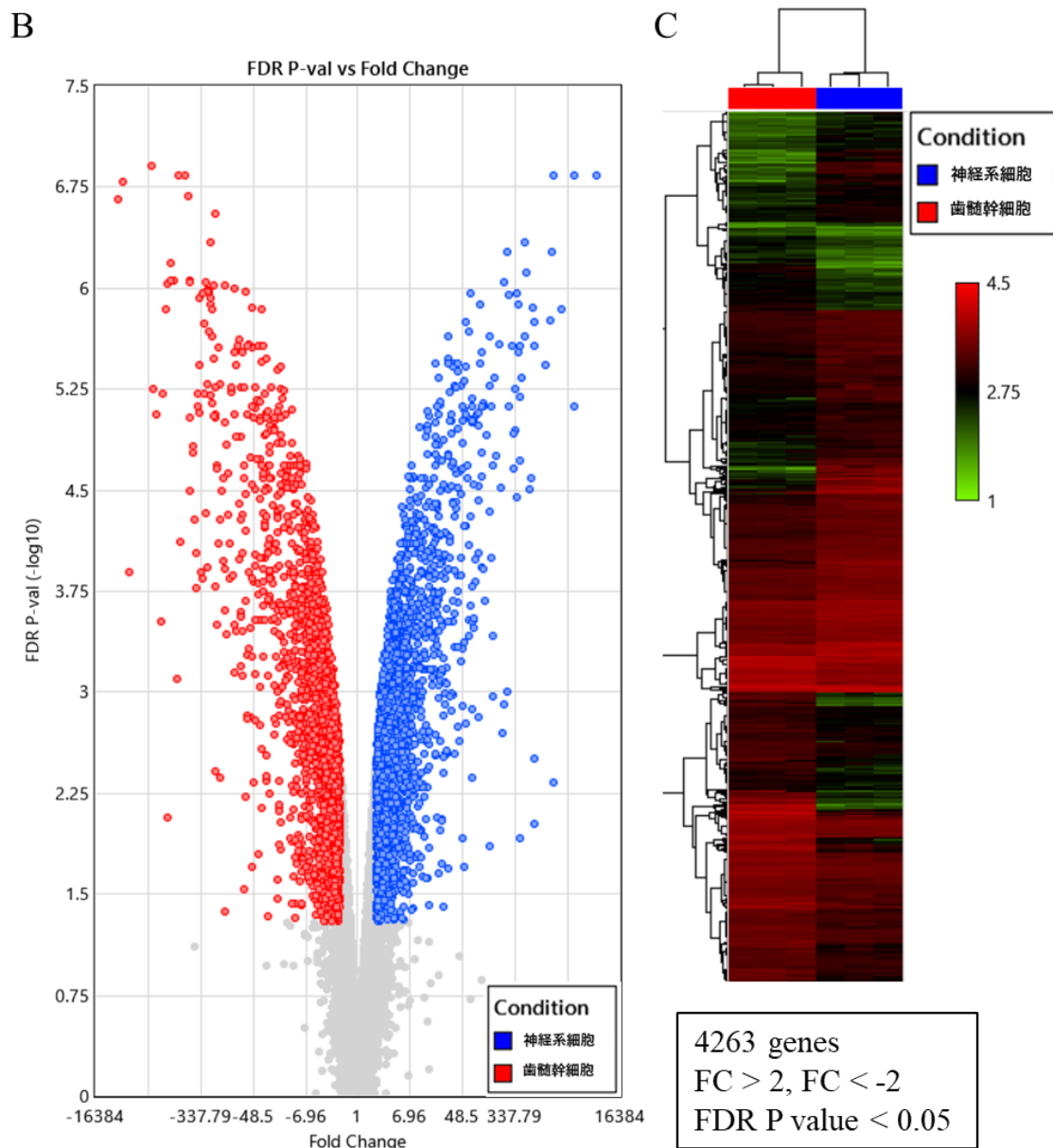


図 12. 歯髄幹細胞と神経系細胞の網羅的遺伝子解析(つづき)

B : 歯髄幹細胞と神経系細胞での遺伝子発現の違い(Volcano Plot 図)

FDR P value < 0.05 で、Fold Change が 2 より大きい、または-2 よりも小さい遺伝子をカラー (神経系細胞が青、歯髄幹細胞が赤)でプロットした。4263 個の遺伝子が有意差をもって高い倍率変化(Fold Change)を示した。以上より神経系

細胞と歯髄幹細胞の間には多くの遺伝子プロファイルの変化が含まれている事がわかった。

C : 歯髄幹細胞と神経系細胞での遺伝子発現の違い(Hierarchical Clustering 図)

Bと同じ条件の発現変動遺伝子(合計 4263 個)を抽出し類似性を元に並べなおしクラスタリングした。スケールバーの赤で示した部分は遺伝子発現が高く、黒は遺伝子発現の程度が中等度、緑は遺伝子発現が低い事を意味している。神経系細胞と歯髄幹細胞の遺伝子データを視覚化し、類似部分と相違部分が把握できた。

さらなる詳細な遺伝子解析の為に、Gene Ontology 解析を行った。発現変動遺伝子の数を絞る為に歯髄幹細胞に比して神経系細胞で多く発現している遺伝子を Fold Change>5, FDR P value <0.05 の条件で抽出した。マイクロアレイ解析を行った全 21448 個の遺伝子のうち 691 個の遺伝子を抽出した。この遺伝子セットにどのような機能的特徴があるかを調べる為に Gene Ontology 解析をウェブツール DAVID を用いて行った。歯髄幹細胞と比較し神経系細胞で有意に濃縮された GO term として生物学的機能パート(biological process)の上位 5 つは generation of neurons (FDR P value < 2.05E-20), nervous system

development (FDR P value < 6.56E-20), neurogenesis (FDR P value < 7.56E-20), neuron differentiation (FDR P value < 9.38E-18), regulation of nervous development (FDR P value < 1.62E-14)であり、ニューロンの形成や神経新生などの機能をもった細胞である事が示された。また、細胞構成成分パート(cellular component)で濃縮された上位5つは neuron part (FDR P value < 3.33E-13), neuron projection (FDR P value < 2.40E-10), synapse (FDR P value < 1.11E-08), synapse part (FDR P value < 8.91E-07), intrinsic component of plasma membrane (FDR P value < 1.61E-06)であり、やはりニューロンやシナプスなどに関連する遺伝子の発現が優位に増加している事がわかった(図 13)。

Gene Ontology Biological Process FAT Term	Count	FDR
GO:0048699~generation of neurons	129	2.05E-20
GO:0007399~nervous system development	172	6.56E-20
GO:0022008~neurogenesis	133	7.56E-20
GO:0030182~neuron differentiation	116	9.38E-18
GO:0051960~regulation of nervous system development	82	1.62E-14

Gene Ontology Cellular Component FAT Term	Count	FDR
GO:0097458~neuron part	113	3.33E-13
GO:0043005~neuron projection	86	2.40E-10
GO:0045202~synapse	70	1.11E-08
GO:0044456~synapse part	57	8.91E-07
GO:0031226~intrinsic component of plasma membrane	114	1.61E-06

図 13. DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)による Gene Ontology 解析

誘導後の神経系細胞は歯髄幹細胞と比して、ニューロンの形成や神経新生などの機能をもった細胞である事が示された。

さらにエンリッチメント解析を GSEA (Gene Set Enrichment Analysis)で行った。今回データを得た、全 21448 個の遺伝子およびその発現値に対してエンリッチメント解析を行ったところ、神経系細胞でエンリッチメントされている遺伝子セットの上位 10 個のうち、7 番目に高い増殖能などの幹細胞性に関連する遺伝子セットとして MUELLER_PLURINET (NES = 2.49、FDR q value < 0.001)、8 番目に WONG_EMBRYONIC_STEM_CELL_CORE (NES = 2.49、

FDR q value < 0.001)が含まれた(図 14)。Mueller PluriNet とは、胚由来のものや胎児由来のもの、成人由来のものなどの多様な種類のヒト幹細胞の特性解析と分類を秩序立てて行う為に、150 以上の細胞標品から得た転写プロファイルのデータベースを基にバイオインフォマティクス手法によって確立した「幹細胞分類基準」である[24]。つまり誘導後の神経系細胞は、胎児由来の幹細胞の特性や、あるいは Muller らが公開している多能性幹細胞の特性を含有している事がわかった。

NAME	SIZE	NES	NOM p-val	FDR q-val
MUELLER_PLURINET	284	2.49425	<0.001	<0.001
WONG_EMBRYONIC_STEM_CELL_CORE	311	2.49329	<0.001	<0.001

図 14. GSEA (Gene Set Enrichment Analysis)によるエンリッチメント解析

神経系細胞でエンリッチされた遺伝子セット上位 10 の内、幹細胞に関連するセットを抽出した。Mueller PluriNet と Wong Embryonic Stem Cell Core が高い NES をもって抽出された。

また神経系細胞で発現が優位に増加している遺伝子群およびその発現パターンを用いてパスウェイ解析を行った。解析は IPA (Ingenuity Pathways Analysis)を用い、Fold Change > 2 または -2 > Fold Change の 4517 個の遺伝

子を入力した。上流調節因子を検索したところ(図 15)、Top Upstream Regulator として VEGF(vascular endothelial growth factor, 血管内皮増殖因子)遺伝子の活性化(P = 8.81E-29)が上位 4 番目、TP53 の抑制化(P = 4.24E-27)が上位 5 番目として抽出された。VEGF 活性化は血管新生を促進し、TP53 抑制化はアポトーシスの抑制・細胞増殖に関わる。

上流制御因子	予測される状態	P-val
<i>TGFB1</i>	抑制化	1.06E-46
<i>beta-estradiol</i>	不明	1.05E-37
<i>ERBB2</i>	活性化	2.01E-31
<i>VEGF</i>	活性化	8.81E-29
<i>TP53</i>	抑制化	4.24E-27

図 15. 神経系細胞で有意に発現している上流調節因子

以上のマイクロアレイによる網羅的な遺伝子解析の結果より、誘導後の細胞は神経の lineage にあり、かつ高い血管新生能や細胞増殖能が予想された。

4-4 In vitro での低酸素培養下での神経系細胞の優位性

マイクロアレイの解析結果より、歯髄幹細胞と比して、神経系細胞は VEGF に関連する遺伝子が活性化しており、低酸素状態に強い可能性がある事が示された。加えて TP53 に関連する遺伝子が抑制化しており、増殖能が高い可能性が示された。その為、in vivo の実験的脳梗塞モデルである OGD 処置を行い、生細胞率を WST-8 assay で評価した。その結果、歯髄幹細胞は OGD 処置を行うと、細胞生存率が $79.1 \pm 2.6\%$ であったが、神経系細胞は $86.1 \pm 1.3\%$ と有意に神経系細胞の方が OGD 条件下での細胞生存率が高い事が示された(図 16)。

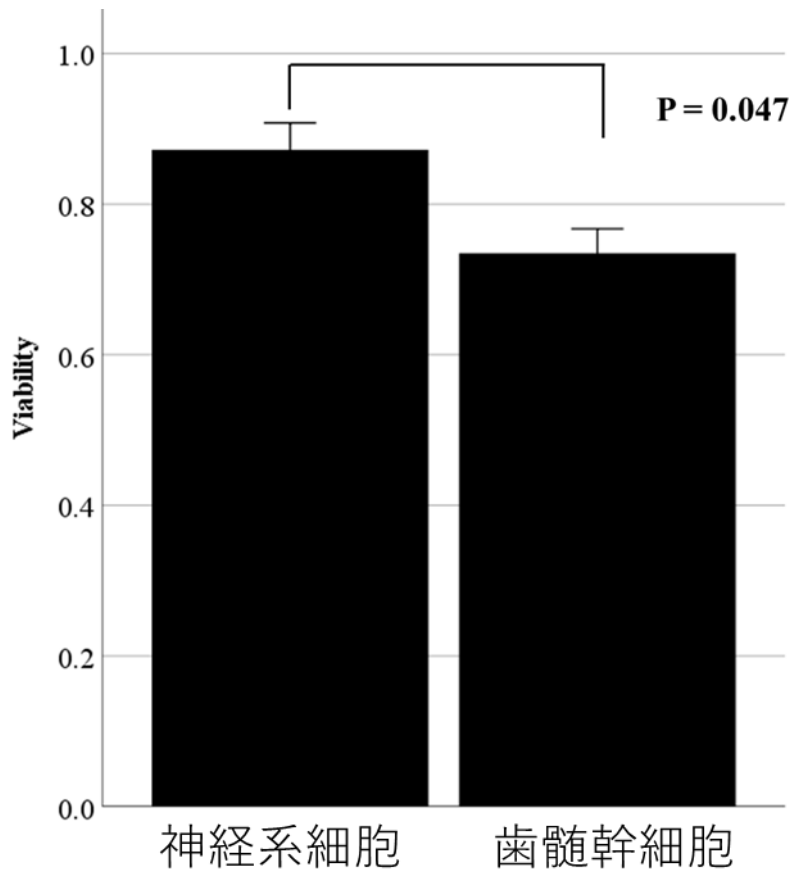


図 16. Oxygen and glucose deprivation (OGD)条件下での歯髄幹細胞および神経系細胞の viability 評価

神経系細胞(neural cells)と歯髄幹細胞(DPSCs)それぞれ 3 個体で OGD 条件による viability を評価。神経系細胞の方が優位に viability が高かった。エラーバーは標準誤差を示す。

4-5 分化誘導した神経系細胞の電氣的活動の評価

誘導後の細胞が神経系としての機能的な電氣的活動があるかどうかをカルシウム指示薬 Fluo8 でインキュベートした後に蛍光顕微鏡で動画撮影をした。その結果、細胞内のカルシウム濃度が特に電氣刺激の入力や薬剤の添加なしに、自発的に繰り返し上昇する事がわかった(図 17)。コントロールとして同様に歯髄幹細胞に Fluo8 を作用させて動画撮影をおこなったが、繰り返し増減する輝度変化は観察されなかった。

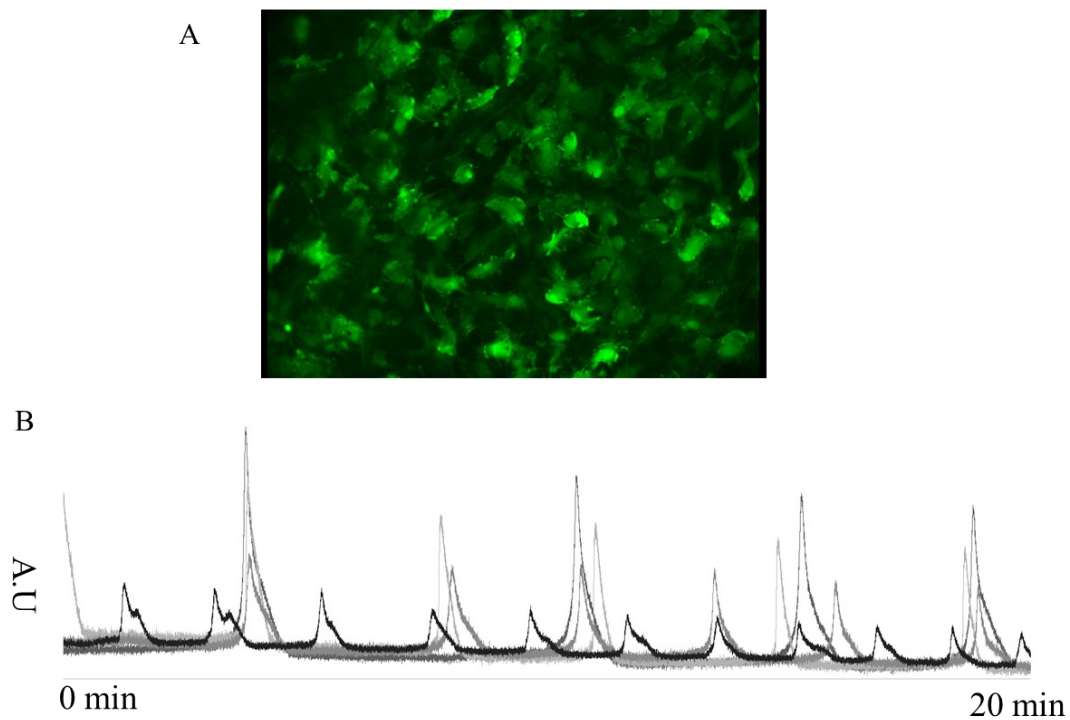


図 17. カルシウム指示薬での自発的な活動電位評価

A : カルシウム指示薬作用中の蛍光顕微鏡写真

B : A の写真中の任意の細胞 4 か所を抽出し、同部位の蛍光輝度の変化を表した図。横軸が時間(20 分間計測)、縦軸が各任意領域の蛍光輝度の変化(A.U)。各細胞において繰り返し自発的な活動電位が出現している事がわかった。

マルチ電極アレイでも同様に活動電位を観察した。各電極それぞれでスパイクが確認された時刻を経時的にプロットして作成するラスタープロット図を作成した。縦軸が電極番号、横軸が時間を示す。1 つの黒線はその時間にその電極

においてスパイクが検出された事を示す。ラスタープロットでは 60 個の電極での電気活動を俯瞰する事が可能である。その結果、培養開始約 1 週間の時点で、多くの電極で繰り返し活動電位が生じている事がわかった(図 18)。長期間培養する事で、電極間の同期した発火が確認できる可能性があるが、マルチ電極アレイの培養皿上で、本研究で用いた神経系細胞を長期間培養することが困難であったため、同期した発火は確認できなかった。

以上より、神経系細胞は自発的な電気的活動をする、機能をもった細胞である事が示された。

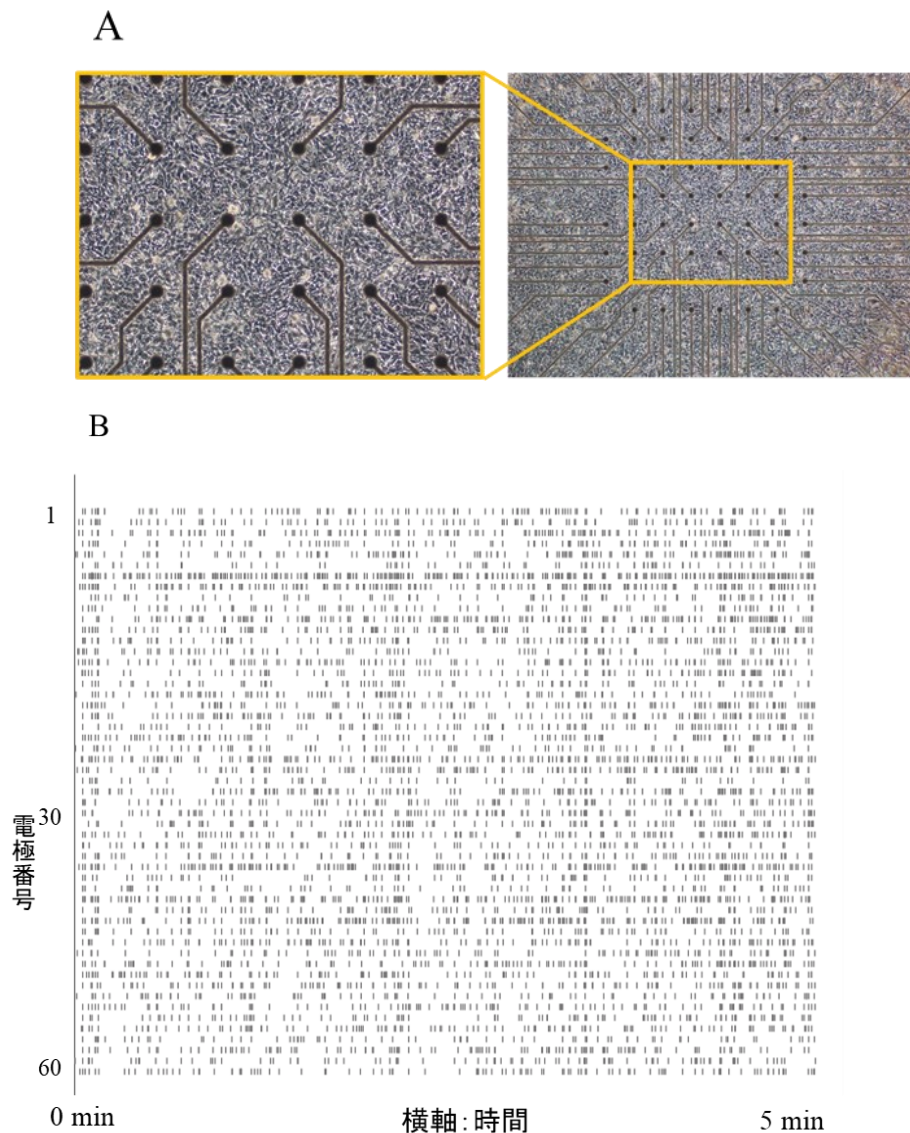


図 18. マルチ電極アレイでの自発的な活動電位の評価

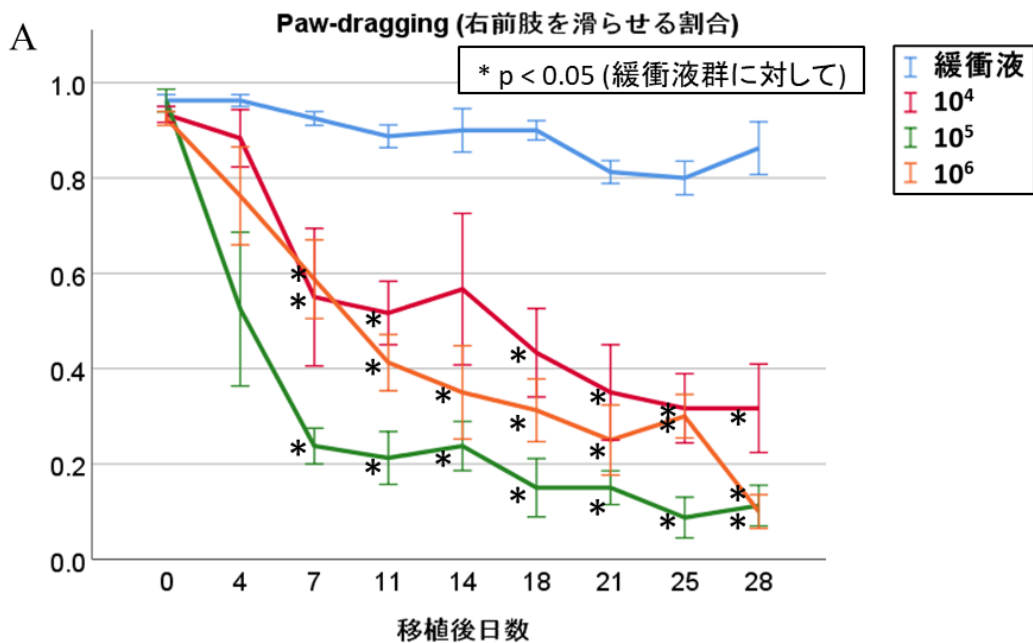
A: 電極が埋め込まれた培養皿の位相差顕微鏡写真。(左)強拡大、(右)弱拡大。

B: ラスタープロット。各電極で活動電位が観察されたタイミングで縦線を記入。

60 個の電極で、それぞれどのタイミングで活動電位が観察されたか俯瞰する事が可能である。解析の結果、各電極で自発的な活動電位が繰り返し出現している事が明らかになった。

4-6 移植する細胞数の決定

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。コントロールとして緩衝液注入群も n = 4 で作製した。経時的に症状評価を行ったところ移植群は緩衝液注入群に比して症状の改善が得られた。移植後 4 週間の時点では、移植細胞数による症状改善の程度に有意差はなかったが、 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為、その後の実験では移植細胞数を 1×10^5 cells とする事とした(図 19)。



経時測定データ

→線形混合モデルliner mixed model (LMM)

緩衝液群に比して移植群は有意に症状改善(*)

Day11: 10^4 vs 10^5 p = 0.033

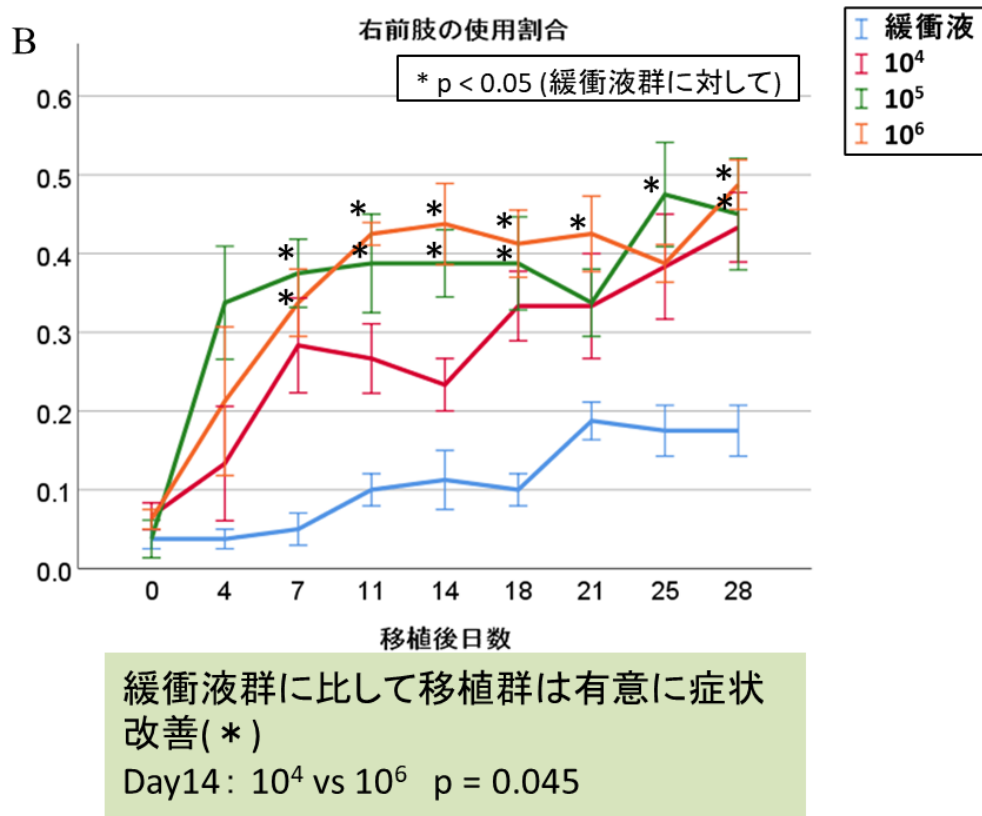


図 19. 移植細胞数による症状改善効果の比較

A : Paw-dragging(右前肢を滑らせる割合)

脳梗塞を作製すると右前肢の impaired forelimb contacts の割合が増え、値が 1 に近づく。麻痺がない正常時は右前肢の impaired forelimb contacts は極めて少ない為、値が 0 に近づく。細胞を移植すると、緩衝液投与群と比較して有意に症状の改善効果を確認した。

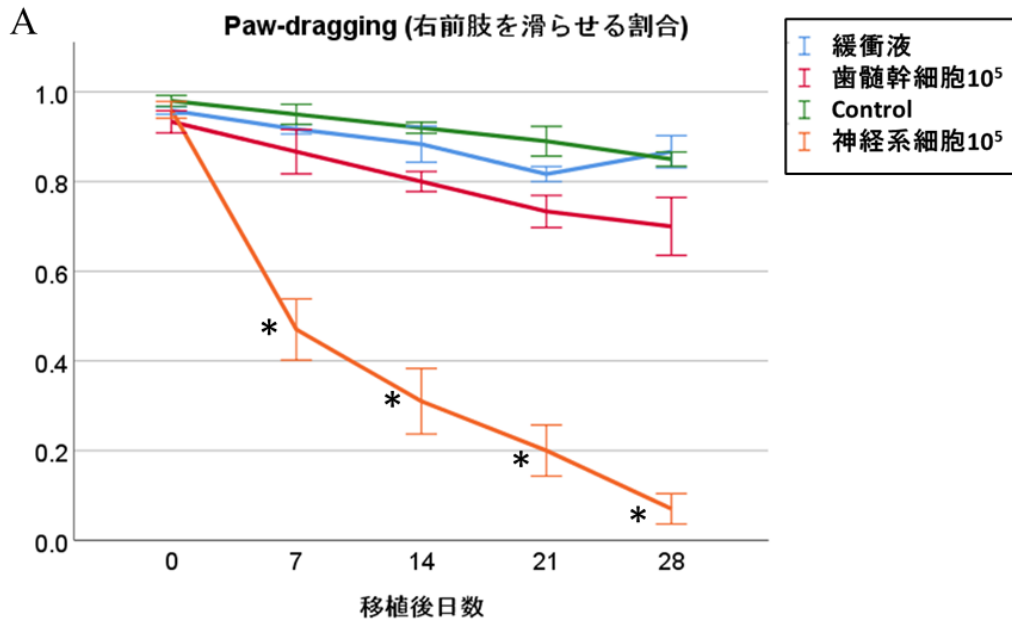
B : 右前肢の使用割合

脳梗塞を作製すると右前肢の麻痺が出現する為、左前肢と比して右前肢の

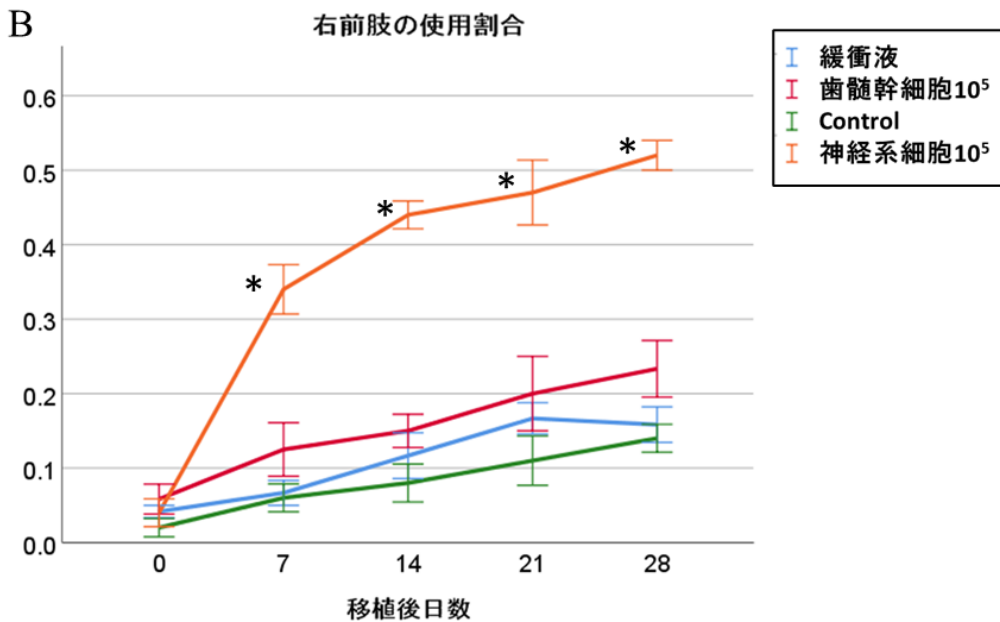
non-impaired forelimb contacts の数が減り、値が 0 に近づく。麻痺がない正常時は左右前肢を均等に使用する事が多い為、値が 0.5 に近づく。細胞を移植すると、緩衝液投与群と比較して有意に症状の改善効果を認めた。

4-7 移植後の神経症状改善

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。またげっ歯類特有である症状の自然改善も見る為に、脳梗塞作製後、経過観察する群(Control 群; n = 5)も作製した(図 20)。その結果、Tukey 法で多重検定を行うと、神経系細胞移植群では移植後 7,14,21,28 日時点全てにおいて、他の群に比して優位に症状が軽い事がわかった。



経時測定データ→線形混合モデルliner mixed model
 神経系細胞移植群は移植後day7,14,21,28において、
 他の3群よりも症状が有意に改善 (* $p < 0.05$)



経時測定データ→線形混合モデルliner mixed model
 神経系細胞移植群は移植後day7,14,21,28において、
 他の3群よりも症状が有意に改善 (* $p < 0.05$)

図 20. 移植後症状評価

A : Paw-dragging(右前肢を滑らせる割合)

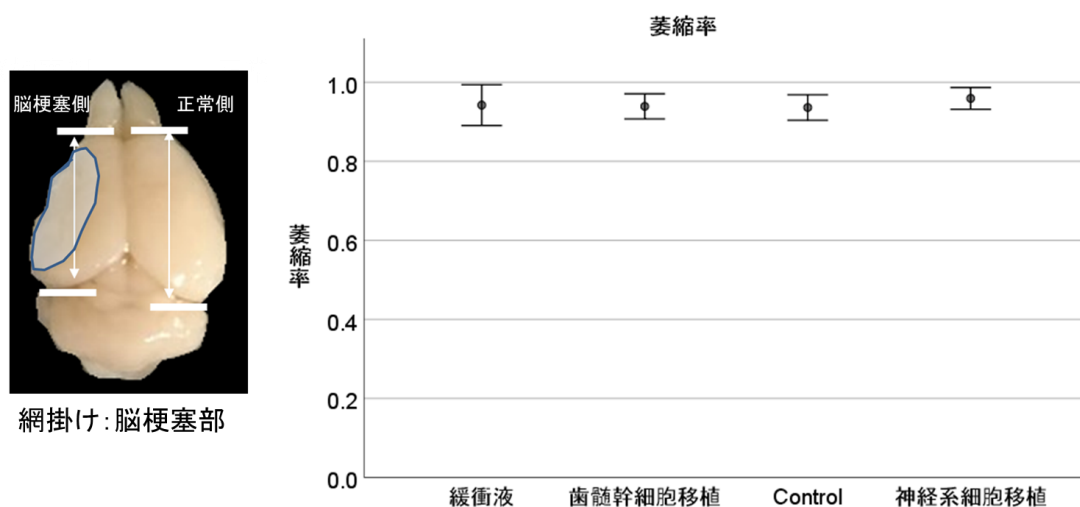
神経系細胞移植群は緩衝液投与群、歯髄幹細胞移植群、Control 群（脳梗塞後自然経過観察群）と比較して有意に症状の改善効果を認めた。

B : 右前肢の使用割合

神経系細胞移植群は緩衝液投与群、歯髄幹細胞移植群、Control 群（脳梗塞後自然経過観察群）と比較して有意に症状の改善効果を認めた。

4-8 脳萎縮の評価

摘出した脳の萎縮度を評価した(図 21)。脳梗塞作製後 5 日で移植という亜急性期で移植しているが、緩衝液投与群、歯髄幹細胞移植群、脳梗塞後自然経過観察群、神経系細胞移植群いずれにおいても萎縮率に有意な差はなかった。



多重比較 Tukey
各群間比較で統計学的有意差を認めなかった

図 21. 脳萎縮評価

萎縮率 = (脳梗塞側の大脳長径 / 正常側の大脳長径) として各群で計測。各群で萎縮率に統計学的有意な差はなかった。

4-9 移植後細胞の評価

移植後の細胞が脳内に存在しているか確認する為に、移植後 4 週間時点でヒト細胞質特異的マーカーSTEM121 による免疫染色を行った。その結果、脳梗塞辺縁部に移植したヒト歯髄組織由来の神経系細胞の存在を認めた(図 22)。この移植した神経系細胞がどのような細胞に分化しているか評価する為に成熟ニューロン MAP2、幼弱ニューロン DCX、アストロサイト GFAP、オリゴデンドロサイト Olig2 と STEM121 でそれぞれ二重染色を行った。その結果、移植細胞

の一部が成熟ニューロン(図 23)あるいは幼弱ニューロン(図 24)に分化している事が確認された。さらに移植部位からホストの脳内に細胞が遊走し、軸索構造を伸ばしている事が確認された(図 24)。移植した細胞の一部はニューロンに分化しているが、残りの多くの部分はアストロサイトに分化しており(図 25)、オリゴデンドロサイトに分化したものは極少数であった(図 26)。

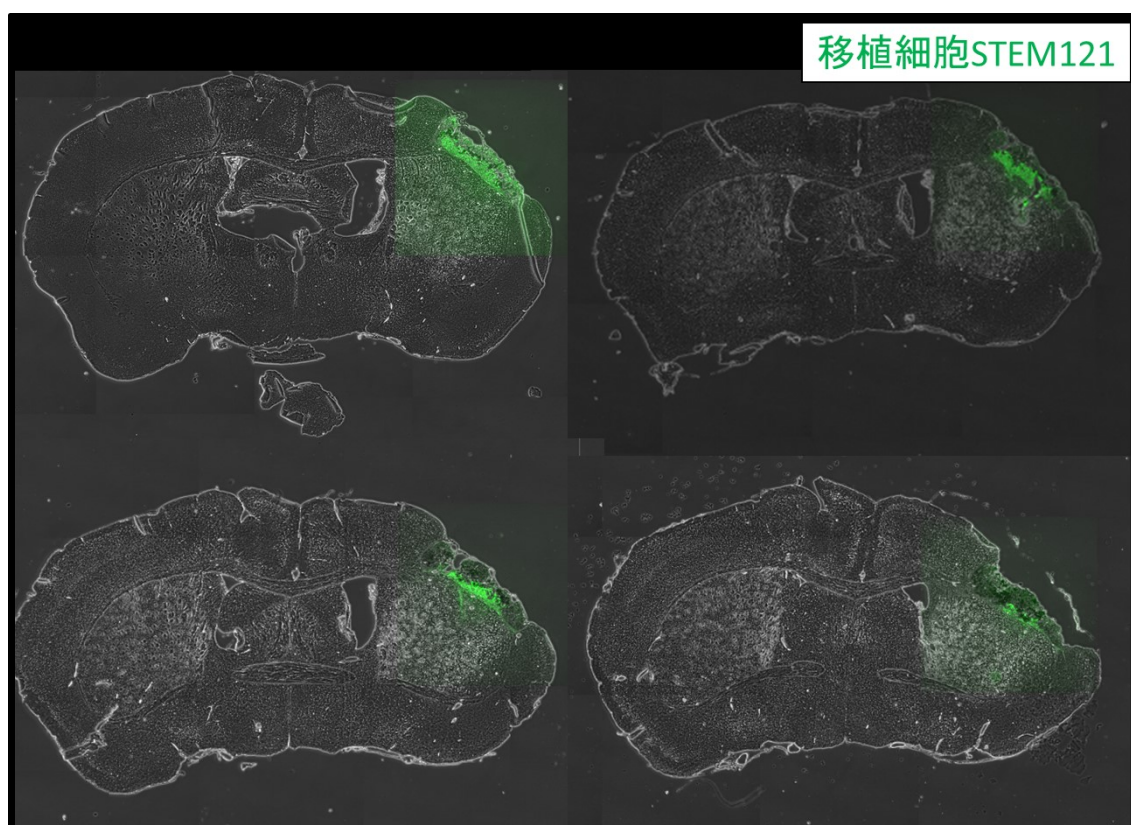


図 22. 移植後細胞の脳内分布

移植後 4 週間でのヒト細胞質特異的マーカーSTEM121 による染色。マウス 1 個体の異なる断面での移植細胞の分布を評価した。緑は移植細胞を示す。脳梗塞部位は萎縮しているが、その深部辺縁部に移植細胞の存在が確認できた。

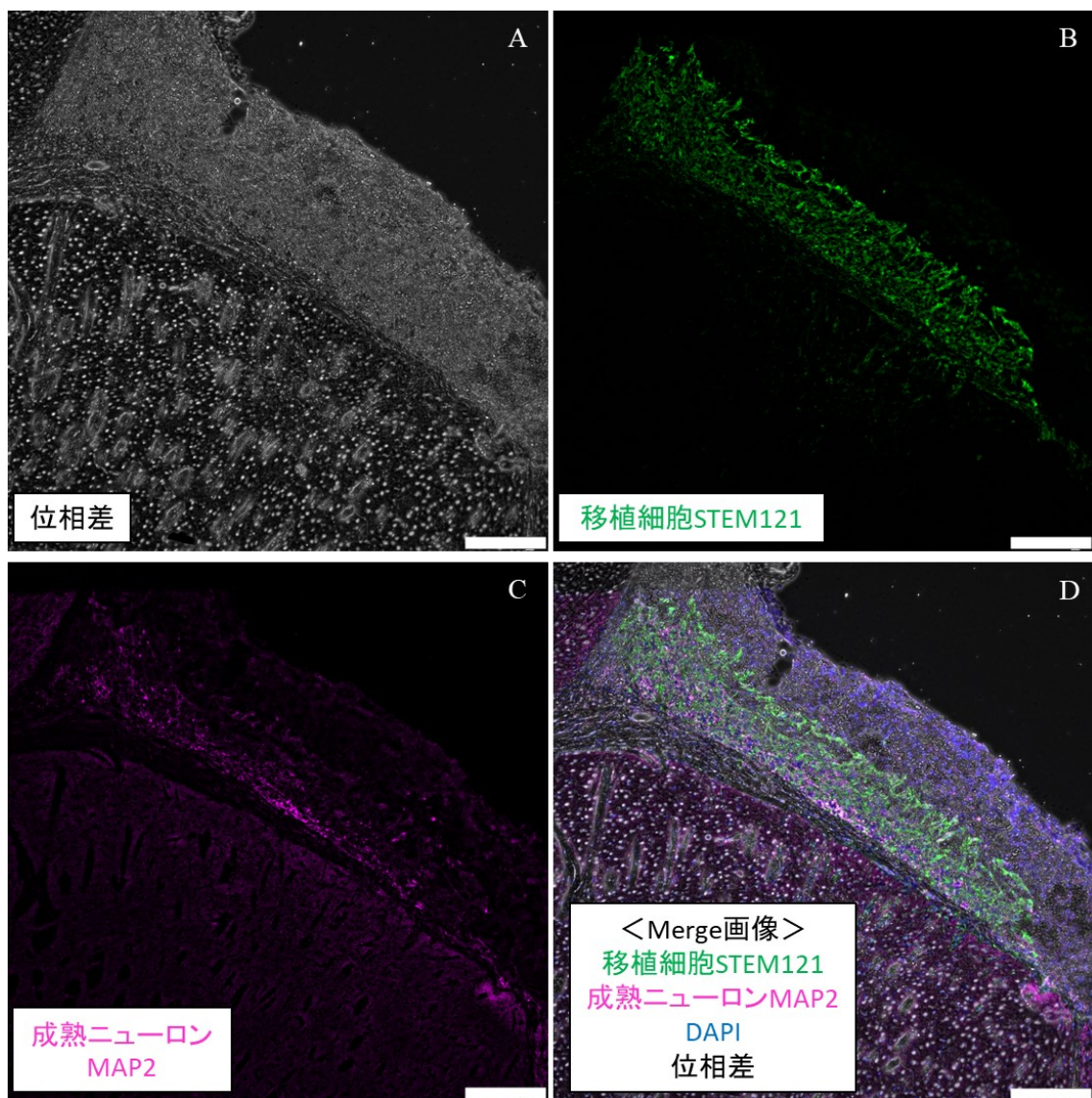


図 23. 移植後細胞と成熟ニューロン MAP2 の二重染色

A：脳梗塞部の位相差顕微鏡像。

B：移植細胞を示すヒト細胞質特異的マーカーSTEM121 での染色（緑）。

C 成熟ニューロン MAP2 での染色（紫）。

D：位相差、STEM121、MAP2、DAPI（青）の Merge 画像。紫と緑が重なった部分は移植細胞が成熟ニューロンに分化している事を示し、白色で表される。

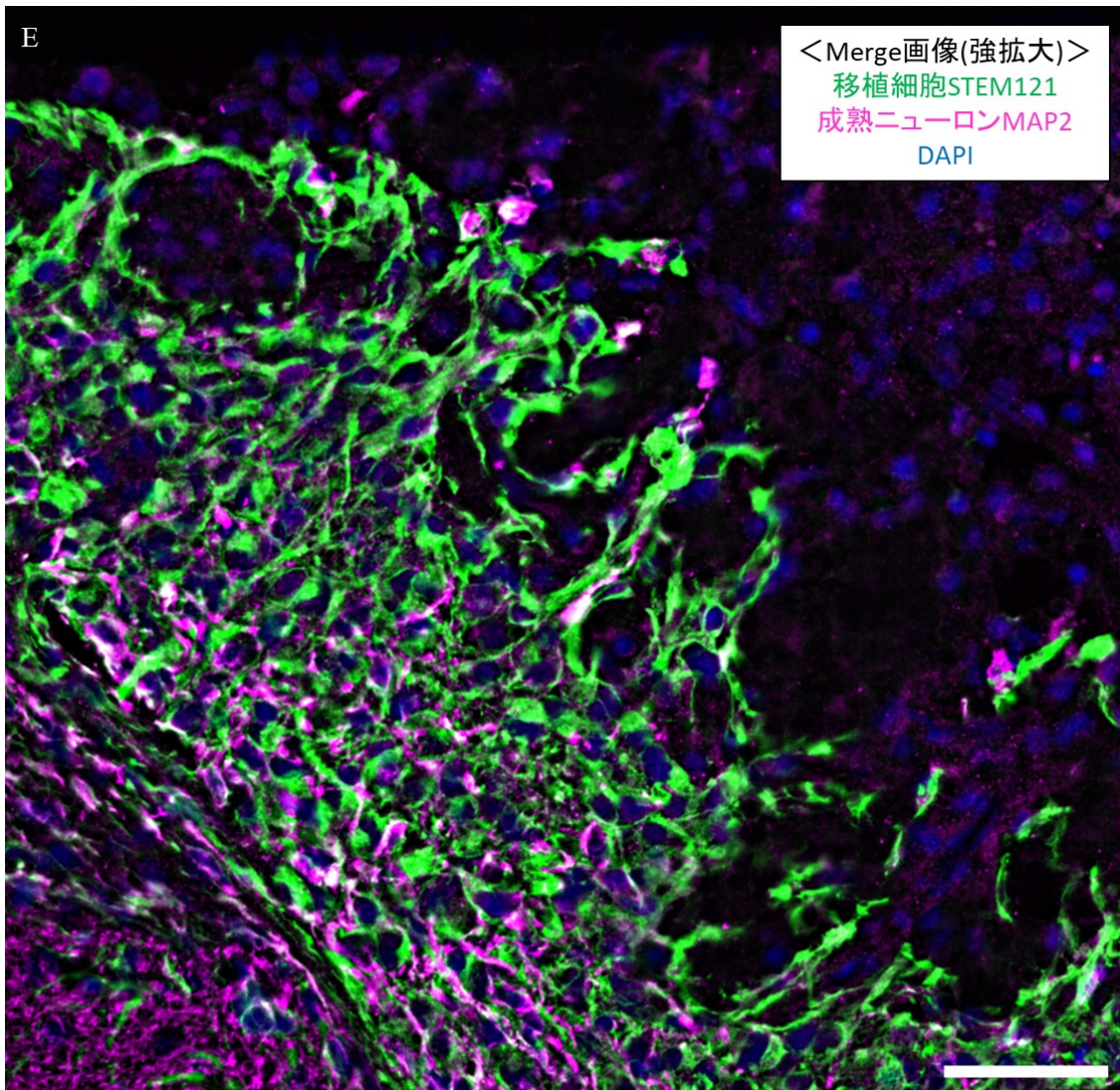


図 23. 移植後細胞と成熟ニューロン MAP2 の二重染色 (続き)

E : 位相差、STEM121、MAP2、DAPI の Merge 画像 (強拡大)。紫と緑が重なった部分は移植細胞が成熟ニューロンに分化している事を示し、白色で表される。移植細胞の一部が成熟ニューロンに分化している。MAP2 はマウス、ヒト共に交差性があり、移植細胞(緑)と重ならない部分はマウスのニューロンを表している。

A~D のスケールバーは 100 μm 、E のスケールバーは 50 μm を示す。

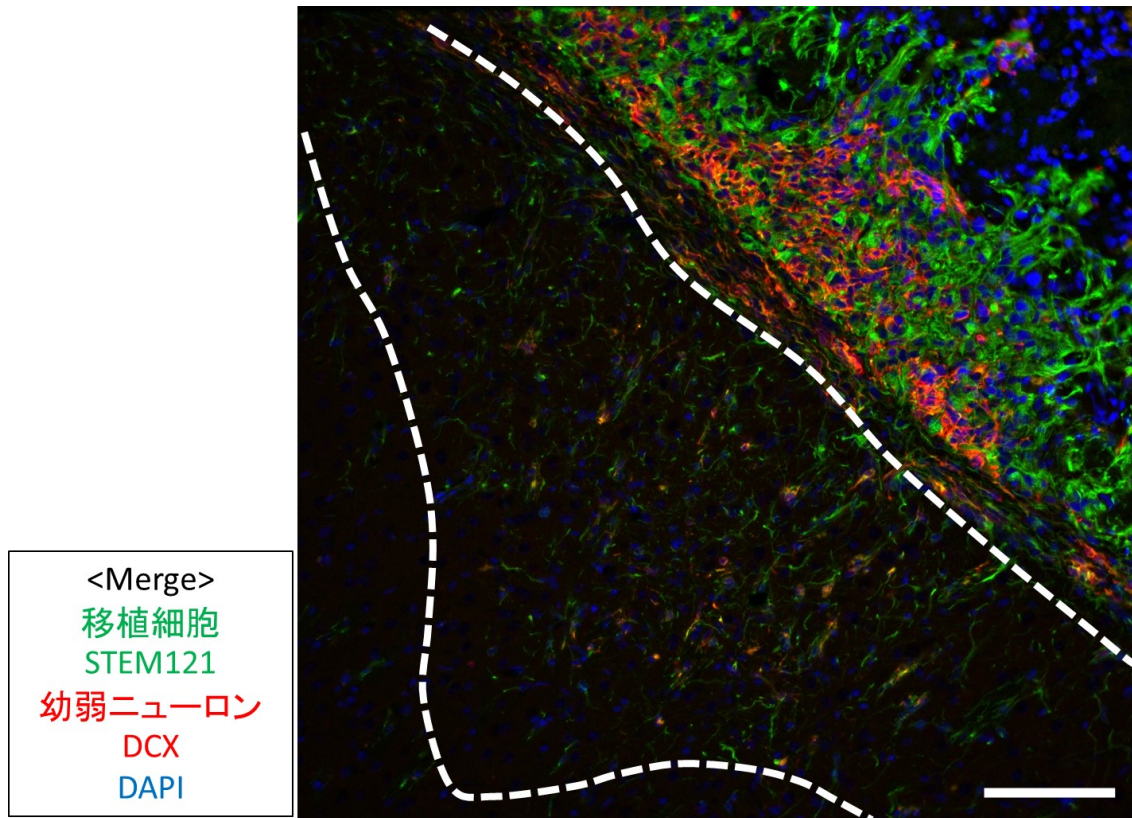


図 24. 移植後細胞と幼弱ニューロン DCX の二重染色

幼弱ニューロン DCX (赤)と STEM121 (緑)、DAPI (青)の Merge 画像。赤と緑が重なった部分は移植細胞が幼弱ニューロンに分化している事を示し、黄色で表される。移植細胞の一部は幼弱ニューロンに分化しさらに、移植部位からホストの脳内に軸索を伸ばしている(白色破線間の領域)。スケールバーは 100 μm を示す。

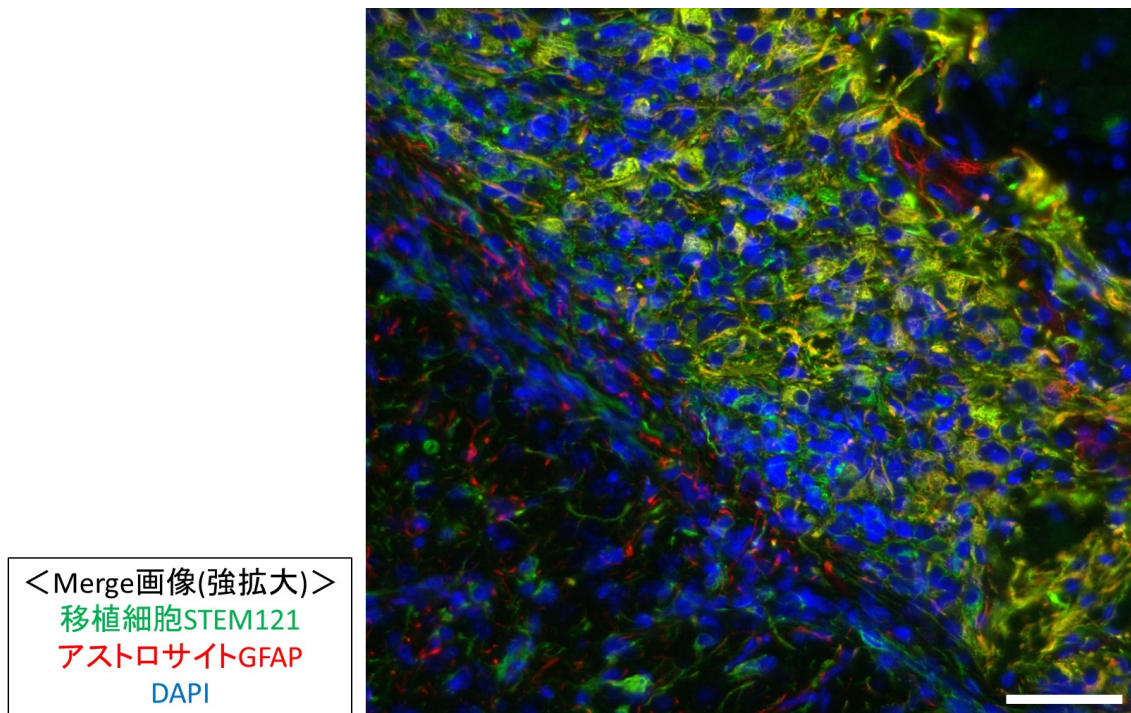


図 25. 移植後細胞とアストロサイト GFAP の二重染色

アストロサイト GFAP (赤)と STEM121 (緑)、DAPI (青)の Merge 画像。赤と緑が重なった部分は移植細胞がアストロサイトに分化している事を示し、黄色で表される。移植細胞の多くがアストロサイトに分化している。スケールバーは 50 μm を示す。

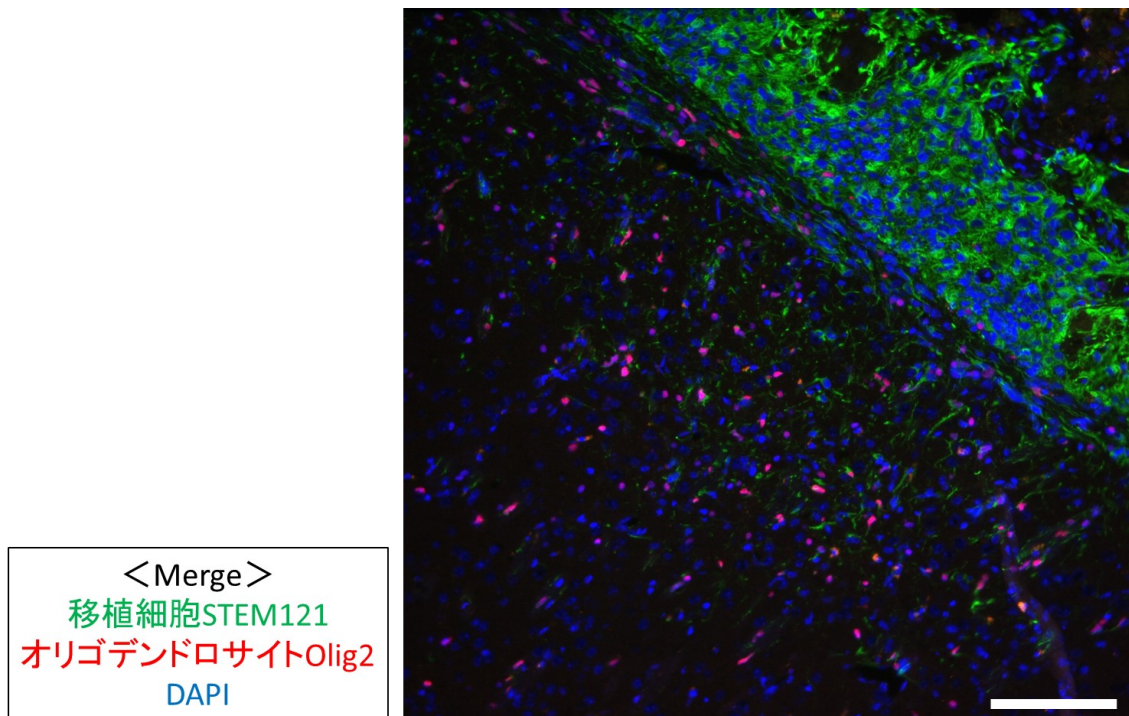


図 26. 移植後細胞とオリゴデンドロサイト Olig2 の二重染色

オリゴデンドロサイト Olig2 (赤)と STEM121 (緑)、DAPI (青)の Merge 画像。
移植細胞の極少数がオリゴデンドロサイトに分化している。スケールバーは 100 μm を示す。

神経系細胞の特徴として *in vitro* の網羅的遺伝子発現解析の結果、上流調節因子として歯髄幹細胞に比較して VEGF の活性化が予測されていた。その為、移植後細胞の VEGF を評価した。その結果、移植後 4 週間の時点で神経系細胞では移植後のヒト細胞が脳内に存在し、その細胞周囲に human VEGF を認めたが(図 27)、歯髄幹細胞移植群では移植後のヒト細胞は脳内に存在せず、human

VEGF を認めなかった。

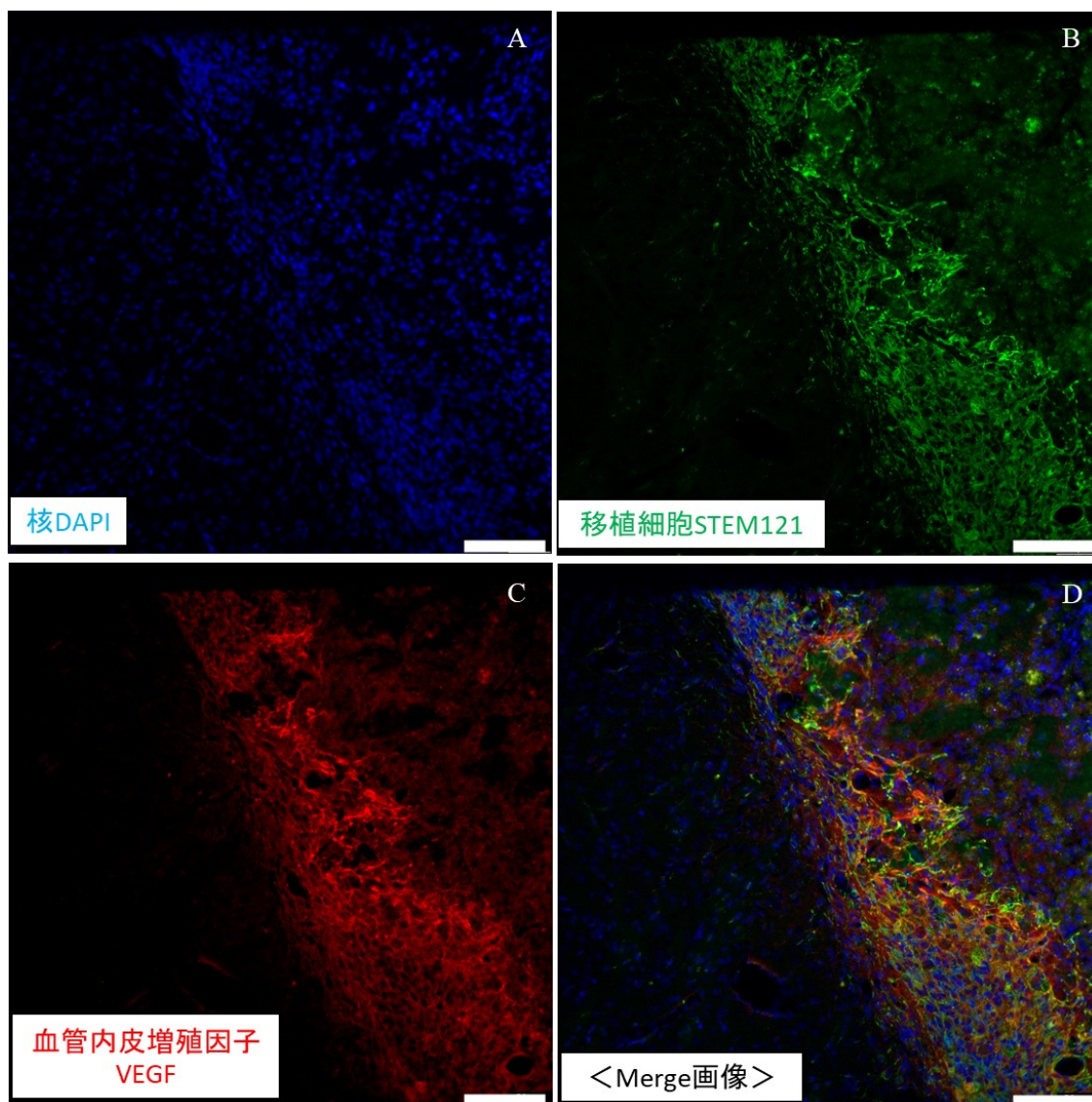


図 27. 移植後細胞と human VEGF の二重染色

移植細胞 STEM121 (緑)、human VEGF(赤)、DAPI (青)の Merge 画像。移植後 4 週間の神経系細胞の周囲に human VEGF を認めた。スケールバーは 100 μm を示す。

第5章 考察

本研究は神経堤由来である歯髄から電気的な自発活動をもった神経系細胞まで分化誘導し、これを脳梗塞巣周囲に直接移植した、再生医療の研究である。

これまで、骨髄や脂肪、歯髄などから幹細胞を採取して脳梗塞治療に用いる研究は存在したが、その治療効果の主な要因は栄養因子、抗炎症効果などの神経保護効果のみに留まる報告が多い為[38]、本研究では組織再生に適した、電気的自発活動をもった細胞まで分化誘導してから移植する事で、神経ユニットを再生させ、幹細胞移植と比較してより高い症状の改善効果を得られるという仮説のもと実験を進めた。

まずは分化誘導した神経系細胞の性質を免疫染色、フローサイトメトリー、RT-PCR、マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析などで多角的に評価した。その結果、誘導後の細胞は神経幹細胞やアストロサイト、オリゴデンドロサイト、ニューロンなどが混在した細胞群である事がわかった。極少数であるが神経堤幹細胞も含まれていた。今回移植実験に用いた細胞はサブカルチャーして7日の時点のものであるが、この時点でのニューロンの割合は免疫染色、フローサイトメトリーの結果から約5-10%程度であったが、このニューロンの割合は経時的に増加していく事が図6, 8の免疫染色で示された。経時的に増加していく理由のひとつとしては、分化誘導直後の神経系細胞には神経幹細胞や幼弱ニュー

ーロンなどが混在しており、これらが、培養を継続していくうちに成熟ニューロンへ分化していく為と考えられる。

脳梗塞はパーキンソン病と異なり、ニューロンのみが脱落する疾患ではなく、脳を構成するアストロサイト、オリゴデンドロサイト、ニューロンなどの全ての種類の細胞が障害される病態である。パーキンソン病はドパミン産生性細胞が減少する為、それを iPS 細胞由来のドパミン前駆細胞の移植で補うというコンセプトで進められている研究があるが、脳梗塞に関しては単一種類の細胞が失われる疾患でない為、再生を得る為には複数種類の細胞移植が必要と考える [21]。また、成熟したニューロンは増殖能が低い [11]。その為、脳梗塞の細胞治療では増殖能の低い成熟したニューロンのみを移植するのではなく、本研究で用いた神経系細胞のような、脳を構成する成分が混在し、かつ増殖能のある細胞群を移植する方が望ましいと考えた。

マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析の結果では図 13 に示されるように、歯髄幹細胞と比較して神経系細胞で有意に発現が増えた遺伝子群は Gene Ontology 解析の結果から、神経新生、ニューロンへの分化などに関連する事が示された。この結果からは、脳梗塞に対する再生医療を目指す上で、歯髄幹細胞よりも神経系細胞の方が、移植細胞ソースとして適していると考ええる。それと同時にエンリッチメント解析では PluriNet という「幹細胞分類基準」に当て

はまる細胞である事も示された。これは、神経系細胞が神経新生、ニューロンへの分化といった側面のみならず、幹細胞自体の特性を内包している事を示しており、移植後に場のニッチに応じて分化する可能性や、高い増殖能がある事を示唆する結果と考える。

さらにパスウェイ解析で発現変動遺伝子の上流因子を調べたところ、VEGFが up regulate されている事がわかった。脳梗塞に対する細胞治療の限界として、生着率の低さがあげられる[11]。脳梗塞巣およびその周囲は低酸素・低栄養・高酸化ストレスといった、細胞の生存に非寛容的な環境となっている。このような環境に耐える為には、移植後に早期にホストからの血流が得られる必要がある。神経系細胞で VEGF 遺伝子が up regulate されている事は、移植後に血管新生を誘導しやすい為、移植細胞の生着といった観点からは歯髄幹細胞よりも有利と考えた。

以上の in vitro の結果をもとに、免疫不全脳梗塞モデルマウスへの移植実験を行った。本研究では、血管新生が生じるとされる脳梗塞亜急性期での移植をターゲットとするために、脳梗塞作製後 5 日で細胞移植をおこなった。本実験に先立ち、最適な移植細胞数を定める為に 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 cells の細胞を移植した結果、移植後 4 週間の最終時点での細胞数の違いによる、有意な神経症状改善効果の違いはなかったが、 1×10^5 cells 移植群が他の細胞数の移植群に

比して症状改善効果が高い傾向にあった。移植細胞は、 $2\mu\text{l}$ の緩衝液で懸濁して脳内に投与したが、 $1\times 10^6\text{cells}$ を $2\mu\text{l}$ で懸濁した場合は、細胞数が緩衝液の量に比して極めて多く、懸濁液の細胞濃度が高すぎるため、移植細胞への酸素や血流が十分に供給されず、 $1\times 10^5\text{cells}$ 移植群よりも症状改善効果が弱い傾向にあったと考えられた。その為、本実験ではそれぞれ $1\times 10^5\text{ cells}$ の歯髄幹細胞移植群と神経系細胞移植群を設定し、症状の改善効果の違いを評価した。その結果、神経系細胞移植群で歯髄幹細胞移植群や緩衝液投与群に比して有意に症状の改善効果を認めた。

移植後 4 週間の時点で移植した神経系細胞は脳内に存在し、その一部が幼弱ニューロンや成熟ニューロンに分化している事が明らかとなった。さらに図 24 に示すように移植部位からホストの脳内に軸索構造が伸びている事がわかった(白破線の中の領域)。移植細胞のうち、ニューロンに分化したものは一部であり、大部分がアストロサイトに分化していたが、脳は生理的にひとつのニューロンを、その約 10 倍の量のアストロサイトで支持、介在してユニットを形成しており、今回の移植細胞のニューロンとアストロサイトへの分化の割合も生理的な範囲であると考え[15]。今回の移植は脳梗塞亜急性期(脳梗塞作製後 5 日)で行っており、ある程度、脳梗塞の大きさ自体は既に確定している時期での移植である為、細胞を移植する事による脳の萎縮率に差はでなかったが(図 21)、神経

系細胞群では移植細胞が脳内で増殖しホストの脳内に軸索構造を伸ばし、神経回路を形成している為、症状が改善したと考える。

第6章 結語

本研究ではヒト歯髄から分化誘導した神経系細胞の性質を評価し、さらにそれを免疫不全マウス脳梗塞モデルに直接移植し、治療効果について検討した。その結果から、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が示された。

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・高酸化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、神経症状の改善を得る事ができた。従来行われている、神経保護効果を主目的とした歯髄幹細胞の移植よりも高い症状の改善効果が得られた。

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、今後の脳梗塞再生医療の臨床応用に向けて、本研究がその一端に貢献できたものとする。

第 7 章 今後の展望

本研究にはいくつかの **limitation** がある。一つは神経系細胞が移植後 4 週間の時点で脳内に存在し、さらにホストの脳内へ軸索構造を伸ばしている事は明らかとなったが、どこまでその軸索が伸び、ホストの神経回路と有効な接続ができていないか不明な点である。これには冠状断での組織評価だけではなく、矢状断での組織切片の切り出しで移植部位である皮質から基底核、脊髄への軸索構造の連続性を評価する事[22]や、逆行性神経軸索トレーサーをホストの神経回路に投与し、トレーサーが皮質に移植した細胞まで取り込まれるかを検証していく必要があると考えている。

二つ目は移植のタイミングである。今回は、脳梗塞亜急性期での移植を行ったが、より長い **therapeutic time window** での効果として、慢性期での移植においても同様に症状の改善効果があるか、ホストの脳へ軸索構造を伸ばすかどうかは検証する必要がある。

三つ目は細胞の規格化である。臨床応用を目指していく上で、今後の方針として自家移植および他家移植に大きく分かれる。アストロサイト、オリゴグングロサイト、ニューロンなどが混在し、増殖能をもつ事が、本研究で用いた神経系細胞の特性ではあるが、自家移植にせよ、他家移植にせよ、細胞製剤としての規格化が必要になってくる。本研究で用いた異なる 3 個体から分化誘導し

た神経系細胞は、サブカルチャー後 3~7 日の時点でのニューロンの割合が 5~10%程度含まれている細胞群であった。細胞製剤としての規格化を進めていくためには、継代数の違いによるこれらの細胞の割合の変化など、細胞自体の特性もさらに解明していく必要があると考える。

現在、臨床応用を目指した骨髄幹細胞を用いた脳梗塞治療の治験が複数行われている為、これらの **limitation** を踏まえて更なる研究をすすめ、将来的には、骨髄幹細胞移植と、本研究の歯髄由来神経系細胞移植の比較をおこなっていく必要がある。

現在、抜去歯の歯髄由来の細胞を保存しておくバンク事業が複数稼働しはじめている。将来的には、脳梗塞を発症した後から歯髄組織を採取し、細胞培養を開始して亜急性期から慢性期に自家移植する事のみならず、抜けた乳歯や智歯(親知らず)由来の細胞をあらかじめバンクに保存しておき、脳梗塞発症後早期に神経系細胞に分化誘導して急性期から亜急性期に自家移植する事が考えられる。また、骨髄幹細胞などと比較して歯髄組織由来の細胞は増殖能が高い為[1]、大量培養を行ってストックし、他家移植の細胞源として使用する事も考えられる。

本研究では脳梗塞に対する再生医療を目的としたが、脳梗塞以外にも脳出血や脳挫傷、脳腫瘍摘出後の脳損傷、低酸素脳症といった、現在の医療技術では

リハビリ介入以外に有効な治療法がない疾患に関しても応用し、広く社会に貢献できる可能性があると考ええる。

謝辞

今回、このような貴重な研究の機会をいただき、ご指導・ご鞭撻頂きました、筑波大学医学医療系脳神経外科、松丸祐司教授、松村明前教授に感謝申し上げます。また、研究手法および論文作成など直接的かつ具体的にご指導を頂きました、筑波大学医学医療系脳神経外科、丸島愛樹先生に感謝申し上げます。

細胞培養、その解析手法および論文作成のご指導を頂きました、筑波大学医学医療系脳神経外科、石川博先生、大山晃弘先生、豊村順子先生、渡邊美穂先生に感謝申し上げます。

抜去歯の提供にご協力いただきました方々および、抜去歯をいただきました、筑波大学医学医療系歯科口腔外科、武川寛樹教授、高岡昇平先生に感謝申し上げます。

マルチ電極アレイを用いた細胞の電気生理学的解析および論文作成のご指導頂きました筑波大学医学医療系循環器内科、村越伸行准教授、岡部雄太先生に感謝申し上げます。

検体の解析等において、ご指導・ご協力いただきました筑波大学大学院人間総合科学研究科(脳神経外科)技官の塚田喜子さん、宮川牧子さんに感謝申し上げます。

参考文献

1. Alge DL, Zhou D, Adams LL, Wyss BK, Shadday MD, Woods EJ, et al: Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. **J Tissue Eng Regen Med** 4:73-81, 2010
2. Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S: Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. **Stem Cells** 26:1787-1795, 2008
3. Balkaya M, Kröber JM, Rex A, Endres M: Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab** 33:330-338, 2013
4. Berkhemer OA, Fransen PSS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, et al: A Randomized Trial of Intraarterial Treatment for Acute Ischemic Stroke. **N Engl J Med** 372:11-20, 2014
5. Bliss TM, Andres RH, Steinberg GK: Optimizing the success of cell transplantation therapy for stroke. **Neurobiology of Disease** 37:275-283, 2010
6. Broderick JP, Berkhemer OA, Palesch YY, Dippel DW, Foster LD, Roos YB, et al: Endovascular Therapy Is Effective and Safe for Patients With Severe Ischemic Stroke: Pooled Analysis of Interventional Management of Stroke III and Multicenter Randomized Clinical Trial of Endovascular Therapy for Acute Ischemic Stroke in the

Netherlands Data. **Stroke** **46**:3416-3422, 2015

7. Campbell BC, Hill MD, Rubiera M, Menon BK, Demchuk A, Donnan GA, et al: Safety and Efficacy of Solitaire Stent Thrombectomy: Individual Patient Data Meta-Analysis of Randomized Trials. **Stroke** **47**:798-806, 2016
8. Campbell BC, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, et al: Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. **N Engl J Med** **372**:1009-1018, 2015
9. Cui LL, Golubczyk D, Tolppanen AM, Boltze J, Jolkkonen J: Cell therapy for ischemic stroke: Are differences in preclinical and clinical study design responsible for the translational loss of efficacy? **Ann Neurol** **86**:5-16, 2019
10. Flax JD, Aurora S, Yang C, Simonin C, Wills AM, Billingham LL, et al: Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. **Nat Biotechnol** **16**:1033-1039, 1998
11. Fricker-Gates RA, Shin JJ, Tai CC, Catapano LA, Macklis JD: Late-stage immature neocortical neurons reconstruct interhemispheric connections and form synaptic contacts with increased efficiency in adult mouse cortex undergoing targeted neurodegeneration. **J Neurosci** **22**:4045-4056, 2002
12. Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, Eesa M, Rempel JL, Thornton J, et al: Randomized

- assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. **N Engl J Med** **372**:1019-1030, 2015
13. Goyal M, Menon BK, van Zwam WH, Dippel DW, Mitchell PJ, Demchuk AM, et al: Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. **Lancet** **387**:1723-1731, 2016
 14. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A** **97**:13625-13630, 2000
 15. Herculano-Houzel S: The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. **Glia** **62**:1377-1391, 2014
 16. Hess DC, Wechsler LR, Clark WM, Savitz SI, Ford GA, Chiu D, et al: Safety and efficacy of multipotent adult progenitor cells in acute ischaemic stroke (MASTERS): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. **Lancet Neurol** **16**:360-368, 2017
 17. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA: Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. **Nucleic Acids Res** **37**:1-13, 2009
 18. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA: Systematic and integrative analysis of

- large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nat Protoc** 4:44-57, 2009
19. Kasahara Y, Yamahara K, Soma T, Stern DM, Nakagomi T, Matsuyama T, et al: Transplantation of hematopoietic stem cells: intra-arterial versus intravenous administration impacts stroke outcomes in a murine model. **Transl Res** 176:69-80, 2016
 20. Kawai H, Yamashita T, Ohta Y, Deguchi K, Nagotani S, Zhang X, et al: Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain. **J Cereb Blood Flow Metab** 30:1487-1493, 2010
 21. Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Magotani H, Onoe H, Hayashi T, et al: Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. **Nature** 548:592-596, 2017
 22. Kitahara T, Sakaguchi H, Morizane A, Kikuchi T, Miyamoto S, Takahashi J: Axonal Extensions along Corticospinal Tracts from Transplanted Human Cerebral Organoids. **Stem Cell Reports** 15:467-481, 2020
 23. Li X, Blizzard KK, Zeng Z, DeVries AC, Hurn PD, McCullough LD: Chronic behavioral testing after focal ischemia in the mouse: functional recovery and the effects of gender. **Exp Neurol** 187:94-104, 2004
 24. Müller FJ, Laurent LC, Kostka D, Ulitsky I, Williams R, Lu C, et al: Regulatory networks define phenotypic classes of human stem cell lines. **Nature** 455:401-405, 2008

25. National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group: Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. **N Engl J Med** **333**:1581-1587, 1995
26. Oki K, Tatarishvili J, Wood J, Koch P, Wattananit S, Mine Y, et al: Human-induced pluripotent stem cells form functional neurons and improve recovery after grafting in stroke-damaged brain. **Stem Cells** **30**:1120-1133, 2012
27. Palma-Tortosa S, Tornero D, Grønning Hansen M, Monni E, Hajy M, Kartsivadze S, et al: Activity in grafted human iPS cell-derived cortical neurons integrated in stroke-injured rat brain regulates motor behavior. **Proc Natl Acad Sci U S A** **117(16)**:9094-9100, 2020
28. Prentice JS, Homann J, Simmons KD, Tkačik G, Balasubramanian V, Nelson PC: Fast, scalable, Bayesian spike identification for multi-electrode arrays. **PloS one** **6**:e19884-e19884, 2011
29. Raza SS, Wagner AP, Hussain YS, Khan MA: Mechanisms underlying dental-derived stem cell-mediated neurorestoration in neurodegenerative disorders. **Stem Cell Res Ther** **9**:245, 2018
30. Rennert RC, Wali AR, Steinberg JA, Santiago-Dieppa DR, Olson SE, Pannell JS, et al: Epidemiology, Natural History, and Clinical Presentation of Large Vessel Ischemic

Stroke. **Neurosurgery** **85**:S4-s8, 2019

31. Ribo M, Molina CA, Cobo E, Cerdà N, Tomasello A, Quesada H, et al: Association Between Time to Reperfusion and Outcome Is Primarily Driven by the Time From Imaging to Reperfusion. **Stroke** **47**:999-1004, 2016
32. Saver JL, Goyal M, Bonafe A, Diener HC, Levy EI, Pereira VM, et al: Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. **N Engl J Med** **372**:2285-2295, 2015
33. Savitz SI, Yavagal D, Rappard G, Likosky W, Rutledge N, Graffagnino C, et al: A Phase 2 Randomized, Sham-Controlled Trial of Internal Carotid Artery Infusion of Autologous Bone Marrow-Derived ALD-401 Cells in Patients With Recent Stable Ischemic Stroke (RECOVER-Stroke). **Circulation** **139**:192-205, 2019
34. Schaar KL, Brenneman MM, Savitz SI: Functional assessments in the rodent stroke model. **Exp Transl Stroke Med** **2**:13, 2010
35. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW: NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Methods** **9**:671-675, 2012
36. Shichinohe H, Kawabori M, Iijima H, Teramoto T, Abumiya T, Nakayama N, et al: Research on advanced intervention using novel bone marrow stem cell (RAINBOW): a study protocol for a phase I, open-label, uncontrolled, dose-response trial of autologous

- bone marrow stromal cell transplantation in patients with acute ischemic stroke. **BMC Neurol** **17**:179, 2017
37. Song M, Lee JH, Bae J, Bu Y, Kim EC: Human Dental Pulp Stem Cells Are More Effective Than Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Cerebral Ischemic Injury. **Cell Transplant** **26**:1001-1016, 2017
38. Sowa K, Nito C, Nakajima M, Suda S, Nishiyama Y, Sakamoto Y, et al: Impact of Dental Pulp Stem Cells Overexpressing Hepatocyte Growth Factor after Cerebral Ischemia/Reperfusion in Rats. **Mol Ther Methods Clin Dev** **10**:281-290, 2018
39. Steinberg GK, Kondziolka D, Wechsler LR, Lunsford LD, Coburn ML, Billigen JB, et al: Clinical Outcomes of Transplanted Modified Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Stroke: A Phase 1/2a Study. **Stroke** **47**:1817-1824, 2016
40. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al: Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proc Natl Acad Sci U S A** **102**:15545, 2005
41. Sugimori H, Yao H, Ooboshi H, Ibayashi S, Iida M: Krypton laser-induced photothrombotic distal middle cerebral artery occlusion without craniectomy in mice. **Brain Res Brain Res Protoc** **13**:189-196, 2004
42. Taguchi A, Kasahara Y, Nakagomi T, Stern DM, Fukunaga M, Ishikawa M, et al: A

Reproducible and Simple Model of Permanent Cerebral Ischemia in CB-17 and SCID

Mice. **J Exp Stroke Transl Med** 3:28-33, 2010

43. Takahashi H, Ishikawa H, Tanaka A: Regenerative medicine for Parkinson's disease using differentiated nerve cells derived from human buccal fat pad stem cells. **Hum Cell** 30:60-71, 2017
44. Takashima N, Arima H, Kita Y, Fujii T, Miyamatsu N, Komori M, et al: Incidence, Management and Short-Term Outcome of Stroke in a General Population of 1.4 Million Japanese - Shiga Stroke Registry. **Circ J** 81:1636-1646, 2017
45. Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, et al: Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Cell Stem Cell** 12:127-137, 2013
46. Umemura K, Higo K, Sakata T, Yuki S, Iwata K, Yamaguchi K: Effects of alteplase, a thrombolytic agent, in a rat photothrombotic middle cerebral artery occlusion model. **Pathophysiol Haemost Thromb** 36:245-250, 2008
47. Vu Q, Xie K, Eckert M, Zhao W, Cramer SC: Meta-analysis of preclinical studies of mesenchymal stromal cells for ischemic stroke. **Neurology** 82:1277-1286, 2014
48. Yalvac ME, Ramazanoglu M, Rizvanov AA, Sahin F, Bayrak OF, Salli U, et al: Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of

young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis.

Pharmacogenomics J 10:105-113, 2010

49. Yuan SH, Martin J, Elia J, Flippin J, Paramban RI, Hefferan MP, et al: Cell-surface marker signatures for the isolation of neural stem cells, glia and neurons derived from human pluripotent stem cells. **PLoS One** 6:e17540, 2011