

筑波大学

博士（医学）学位論文

歯髄幹細胞から分化誘導した神経系細胞は  
末梢神経再生を促進させる

2021

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

高岡昇平

# 目次

第1章 序論	5
1-1. 幹細胞とは	5
1-2. 歯髄幹細胞とは	5
1-3. 中枢神経系と末梢神経系	6
1-4. 末梢神経損傷とその再生機序	7
1-5. 神経誘導管を用いた末梢神経再生	8
1-6. 末梢神経再生に向けた細胞移植	9
第2章 本研究の目的	12
第3章 歯髄から分化誘導された神経系細胞に関する研究	13
3-1. 目的	13
3-2. 材料と方法	13
3-2-1. 歯髄幹細胞の単離・培養	
3-2-2. 歯髄幹細胞の脂肪・軟骨・骨・神経誘導	
3-2-3. Flow Cytometry	
3-2-4. 蛍光免疫染色	
3-2-5. RT-PCR	
3-2-6. 神経系細胞によるスフェロイド形成	
3-2-7. 透過型電子顕微鏡	

3-2-8. マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析	
3-2-9. Calcium imaging	
3-2-10. 統計学的処理	
3-3. 結果	19
3-3-1. 歯髄幹細胞の評価	
3-3-2. 歯髄幹細胞から分化誘導した神経系細胞の評価	
3-3-3. 神経系細胞の成熟, 分化	
3-3-4. RT-PCR による歯髄幹細胞と神経系細胞の発現遺伝子比較	
3-3-5. 歯髄幹細胞と神経系細胞の網羅的遺伝子解析	
3-4. 考察	22
3-5. 小括	23
第4章 神経系細胞を用いた末梢神経再生に関する研究	25
4-1. 目的	25
4-2. 材料と方法	25
4-2-1. 神経系細胞培養上清の回収	
4-2-2. WST8 cell proliferation assay	
4-2-3. Migration assay	
4-2-4. Tube formation assay	
4-2-5. Neurite regeneration assay	
4-2-6. 実験動物と細胞移植	
4-2-7. 蛍光免疫染色	
4-2-8. 歩行解析評価	

4-2-9. 電気生理学的評価	
4-2-10. 再生軸索評価	
4-2-11. 透過型電子顕微鏡	
4-2-12. 腓腹筋筋質重量評価	
4-2-13. 統計学的処理法	
4-3. 結果	30
4-3-1. 神経系細胞が産生する生理活性物質の血管内皮細胞(HUVEC), シュワン細胞(IFRS1), 神経細胞への影響	
4-3-2. ラット末梢神経再生部位におけるヒト神経系細胞の分化	
4-3-3. 神経系細胞の末梢神経再生能と再生坐骨神経機能評価	
4-4. 考察	32
4-5. 小括	35
第5章 総括	36
5-1. 総括	36
5-2. 今後の展望と課題	36
5-3. 結語	37
表と図	38
謝辞	54
出典	55

学会発表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 56

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 57

## 1. 序章

### 1-1. 幹細胞とは

幹細胞は胚性幹細胞(embryonic stem cells: ES 細胞)や人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells: iPS 細胞)のような万能細胞と、体性幹細胞とに大別される。万能細胞はその名の通り無制限の自己複製能を持ち、体のすべての細胞に分化することができる(1)。また、神経幹細胞や造血幹細胞、間葉系幹細胞などの体性幹細胞は組織や臓器の中に存在し、限られた分化能と自己複製能で組織や臓器を維持している。間葉系幹細胞は骨髄幹細胞や脂肪幹細胞、歯髄幹細胞などの間葉に由来する幹細胞であり、骨や軟骨、脂肪などの中胚葉性の組織に容易に分化し、その多分化能が広く知られている(2)。万能細胞は、その万能性において脊髄損傷、糖尿病、加齢黄斑変性症などに対する細胞治療の細胞源として有望な細胞源とされており、臨床試験でもすでに使用されている(1)。しかしながら、ES 細胞は受精卵を用いるため倫理的な問題が排除できず、iPS 細胞は移植細胞の癌化のリスクが排除できていない。そこで近年、体性幹細胞である間葉系幹細胞を用いた細胞治療が注目されている。

### 1-2. 歯髄幹細胞とは

間葉系幹細胞の 1 つである歯髄幹細胞は、歯の表層の硬組織であるエナメル質と象牙質に覆われている歯髄の中に存在する。骨髄幹細胞や脂肪幹細胞などの間葉系幹細胞は中胚葉にその由来を持つが、歯髄幹細胞は神経上皮と表皮外胚葉の間に出現する神経堤にその由来を持つとされる(3)。歯髄幹細胞の正確な役割はまだ十分に理解されていない。しかしいくつかの研究において、歯の外傷や炎症後の回復において、歯髄幹細胞が硬組織の内側に象牙質を新生させることで感染性物質から歯髄を保護し、さらに免疫調節能力を示すことが報告さ

れている(4). 不均一な細胞集団である歯髄幹細胞の明確な細胞表面抗原は明らかになっていないが、骨髄幹細胞や脂肪幹細胞などの間葉系幹細胞のマーカールと非常に似た性質を持つことが知られている。国際細胞治療学会 (International Society for Cellular Therapy) によると、歯髄幹細胞を含む間葉系幹細胞は標準的な培養方法でプラスチック培養皿に接着し、CD29, CD44, CD49, CD51, CD73, CD90 を発現している。また、CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a, ヒト白血球型抗原(HLA)-DR を発現しないとされている(4).

歯髄幹細胞は脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、神経細胞、筋細胞、幹細胞、膵臓細胞、象牙芽細胞など、多系統の細胞に分化誘導できることが知られている(5). 歯髄幹細胞は抜歯後に廃棄される智歯や矯正抜歯歯、さらには小児期に脱落する乳歯などから非侵襲的に採取が可能であるため、他の間葉系幹細胞よりその採取が容易である。また、間葉系幹細胞で最も研究が行われている骨髄幹細胞と比較し、歯髄幹細胞の方が優れた増殖能を有していることが報告されている(6). さらに歯髄幹細胞はそのほとんどの細胞において多くの神経関連マーカーが発現しており(7), 歯髄幹細胞の採取の容易さ, 高い増殖能, 神経原性の高さから神経再生への応用が期待されている。

### 1-3. 中枢神経系と末梢神経系

神経系とは、神経細胞が連続することで神経伝達物質を介した興奮が伝わる機能から成立している。ヒトを含めた脊椎動物の神経系は、中枢神経系と末梢神経系の2つに大別することができる。発生学的には、神経外胚葉が内側にくぼむことで神経管が形成され、その際に表皮外胚葉との境に神経堤が一過性に出現することで2つの神経系の発達が始まる。神経管からは脳や脊髄などの中枢神経系が形成され、神経堤からは末梢神経系を形成する細胞などが作られる



(8). 中枢神経系では、その発生と発達において神経管を形成する神経上皮由来の神経幹細胞が非常に重要な役割を担っている。神経幹細胞は自己複製能を持ち、神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化することができる幹細胞である。神経幹細胞である神経上皮細胞は主に対称分裂で自身の細胞集団を拡大し、のちに放射状グリアに移行する。放射状グリアはその初期において非対称分裂で神経細胞を生み出し、自身が生み出した神経細胞が遊走するための足場としても働く(9)。その後はオリゴデンドロサイト前駆細胞を生み出し、自身はアストロサイトへと分化していくことで中枢神経系を発達させる。オリゴデンドロサイトは神経細胞を髄鞘化し、アストロサイトは神経細胞や血管の様々な機構を調整している(10)。

また、末梢神経系の発生と発達においては神経堤細胞が重要となる。神経堤細胞は神経堤から遊走する多能性の細胞集団であり、非常に高い遊走能を持つため体の様々な場所に移動する。局所において感覚神経系、自律神経系、腸管神経系の神経細胞や、シュワン細胞やサテライト細胞といったグリア細胞などの神経系の細胞に分化するだけでなく、心臓の平滑筋細胞やメラノサイト、頭蓋顔面骨の骨、軟骨、結合組織などにも分化することが知られている(11)。シュワン細胞が神経細胞を髄鞘化し、サテライト細胞は神経節において神経細胞を取り囲むことでその維持に働く。

#### 1-4. 末梢神経損傷とその再生機序

末梢神経の重要な構成要素は神経軸索、シュワン細胞、血管であり、これらを線維芽細胞や細胞外基質が支持している。シュワン細胞には、跳躍伝導を可能にするために神経軸索を髄鞘化している髄鞘形成シュワン細胞と、髄鞘を形成せずに無髄神経軸索を保護する髄鞘非形成シュワン細胞が存在する。

中枢神経系とは対照的に、末梢神経系は神経再生が顕著であり、その神経再生にシュワン細胞の働きと血管新生が大きく寄与する。軸索が崩壊するほどの神経損傷や、神経が完全に裂段する程の重度の神経損傷では、損傷部以遠においてワラー変性と呼ばれる神経組織の変性、断片化、除去という一連の変化が起こる。損傷部以遠のシュワン細胞はすぐに脱分化・増殖し、髄鞘や軸索の分解を開始する。また、炎症性因子を産生・分泌することでマクロファージを遊走させ髄鞘や軸索の分解をさらに加速させる。神経再生のために各種栄養因子を産生・分泌することで中枢からの軸索再生を間接的に促し、シュワン細胞を足場に伸長する再生神経軸索は、シュワン細胞により直接的にも軸索再生を促される。近遠位の両断端部の血管の伸長はシュワン細胞に先行し、シュワン細胞はその遊走の足場に血管を利用する。シュワン細胞によって、局所にさらに増えたマクロファージは低酸素状態であることを感知し、血管内皮細胞増殖因子をより発現するようになり、これに反応することでさらに血管内皮細胞の遊走能は高められる。両断端部からのシュワン細胞と血管が合流し両断端を架橋することで、再生神経軸索はこれらを足場に中枢から遠位に向けて伸長する(12)。このように、末梢神経損傷後は神経軸索、シュワン細胞、血管の複雑な相互作用により神経再生が行われる。

#### **1-5. 神経誘導管を用いた末梢神経再生**

重度の末梢神経損傷に対する治療は自家神経の移植が主流である。しかしながら顕微鏡手術法の発展と神経再生機序の理解の向上にも関わらず、依然として重度の末梢神経損傷の治療後に満足のいく機能回復を得ることが困難である状況が続いている。健全な自己神経を切断・採取し、移植に用いることを避けるために人工の神経誘導管が開発されている。神経誘導管は神経再生のために細

胞の足場かつ軸索伸長のガイドとなるものである。本邦において、末梢神経損傷に対して保険適応されている神経誘導管は、ポリグリコール酸の外筒物部と豚真皮由来コラーゲンがその内部に充填されたナーブリッジ®と、外筒部とその内部に充填された線維束がコラーゲンで構成されるリナーブ®の 2 種類あるが、使用できる神経欠損の長さには限界があり、神経再生の結果は自家神経移植を超えるものではないとされている。

さらに神経再生を促すために、様々な神経誘導管が報告されている(13)。コラーゲンやラミニンのゲルを填入した神経誘導管、フィラメントやマルチチャンネルなどが内部に存在することで神経再生のための足場を提供する神経誘導管、導電性ポリマーを使用することで電気刺激による軸索伸長を誘導する神経誘導管、様々な成長因子が持続的に徐放される神経誘導管、神経再生を促す細胞を填入した神経誘導管など、末梢神経再生に向けた様々な治療戦略が存在する。神経誘導管を用いた末梢神経再生の動物実験は、主にラット坐骨神経切断モデルが使用されている。坐骨神経切断部に神経誘導管を移植し、近位より伸長する坐骨神経の再生を評価するものである。一般的に、機能的な評価として足底の幅および長さを測定することにより計測する坐骨神経機能指数(sciatic nerve index: SFI)、坐骨神経を直接刺激することによる電気生理学的評価、さらに再生神経の軸索や髄鞘、下腿筋に対し組織学的評価を行うことで、坐骨神経再生の結果は多角的に評価される。

#### **1-6. 末梢神経再生に向けた細胞移植**

神経誘導管と併用した神経再生を促す細胞の末梢神経損傷部位への移植は、今後の末梢神経再生治療法として非常に期待されている(14)。前述したように、末梢神経再生はシュワン細胞が非常に重要な役割を担っている。そのため、末

梢神経損傷部位への移植細胞としてシュワン細胞が理想的であるとされているが、自家シュワン細胞移植のためには正常自家神経の犠牲が必要であること、かつその大量培養が困難であることから、現在様々な種類の幹細胞からシュワン細胞の分化誘導が試みられている(15)。しかしながら移植に最適なシュワン細胞の分化度などにおいて統一された見解はなく、さらにその移植結果も十分でないため、シュワン細胞に代わる様々な細胞種をモデル動物に移植する実験が広く行われている(15)。ここでは移植細胞の末梢神経再生促進の評価とともに、移植後の細胞分化について評価されている。

その中において近年中枢神経系の細胞も注目され、そのモデル動物の末梢神経損傷部位への移植について多くの報告がなされている(14,16,17,18)。歯髄幹細胞由来オリゴデンドロサイト前駆細胞を末梢神経損傷部位へ移植し、神経再生を促進したとの報告や(17)、オリゴデンドロサイト前駆細胞の末梢神経損傷部位への同種移植において、移植後にシュワン細胞の表現型を得たとの報告もある(18)。

さらに、中枢神経系における体性幹細胞である神経幹細胞は自己複製能を持ち、中枢神経系の様々な細胞（神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト）に分化するため、パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患、脳血管障害や外傷性損傷などの中枢神経系疾患に対する治療の理想的な細胞種であると考えられている(19)。神経幹細胞の中枢神経疾患への移植は、喪失した細胞の補充とともに抗炎症作用や神経保護作用、さらに神経誘導因子の分泌などで神経再生に貢献する(20,21)。末梢神経損傷への神経幹細胞の移植においても、中枢神経損傷への移植時と同様なモデレーターとしての働きは示されており(14)、さらに末梢神経損傷部位移植された神経幹細胞がシュワン細胞様細胞へ分化したとの報告もある(16)。神経幹細胞の定まった細胞表面抗原の見解はない

ため、現在その培養において神経幹細胞と前駆細胞とを明確に区別することはできない。したがってこれらをまとめて神経幹/前駆細胞と呼ぶ。神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを生み出すヒト神経幹/前駆細胞は生体脳から採取するか、ES細胞、あるいはiPS細胞のような万能細胞から誘導することで得ることができない(22,23,24)。したがって倫理的な問題や腫瘍化のリスクから、その臨床応用は限られてしまっている。

## 第2章 本研究の目的

ヒト歯髄幹細胞を神経誘導し、分化誘導された神経系細胞を評価する。さらに、神経系細胞を末梢神経損傷部位に移植することでその末梢神経再生能と細胞分化を評価する。末梢神経再生における神経系細胞移植の有効性を示すことで、歯髄幹細胞由来神経系細胞を末梢神経再生への新たな細胞源として提示することを本実験の目的とする。

## 第3章 歯髄から分化誘導された神経系細胞に関する研究

### 3-1. 目的

抜去歯から歯髄を採取し、ヒト歯髄幹細胞を単離し評価する。さらにヒト歯髄幹細胞を遺伝子導入やフィーダー細胞を使用せずに神経系細胞に分化誘導し、その特性を評価する。

### 3-2. 材料と方法

#### 3-2-1. 歯髄幹細胞の単離・培養

ヒト歯髄は筑波大学臨床研究倫理審査委員会の承認(承認番号:H29-173)に従って、筑波大学附属病院歯科口腔外科で抜歯した新鮮な抜去歯(7歳から30歳)から得た。歯髄幹細胞の単離と培養は Takahashi ら(11)の報告にしたがって行った。無菌的に歯を分割することで得た歯髄組織を細切し、outgrowth法を用いて歯髄細胞を得た。細胞培養は60-mm dishにおいて、Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12 (DMEM/F12; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA), 100  $\mu$ M GlutaMAX I (Thermo Fisher Scientific, USA), 0.1% MEM Non-Essential Amino Acids (MEM-NEAA; Thermo Fisher Scientific, USA), 50 U/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan), 0.25  $\mu$ g/ml fungizone (Cytiva, USA)を用いて、37°C 4.7% CO<sub>2</sub>で行った。Outgrowthした細胞が80%コンフルエントになった所で、0.1% trypsin-0.02%EDTA/PBS(-)液で細胞を解離し、430  $\times$  gで5分間遠心後、 $1 \times 10^3$ 個の細胞を100-mm dishに播種し、7から14日間培養してコロニーを形成させた。最も増殖能の高い細胞が形成するコロニー(最も大きなコロニー)を歯髄幹細胞のコロニーとして本実験に使用した。歯髄幹細胞は1:3 splitで継代した。

### 3-2-2. 歯髄幹細胞の脂肪・軟骨・骨・神経誘導

歯髄幹細胞の多分化能を評価するために、歯髄幹細胞に脂肪誘導、骨誘導、軟骨誘導、そして神経誘導を行った。脂肪誘導は  $1 \times 10^6$  個の歯髄幹細胞を 60-mm dish に播種し、MSC go Adipogenic XF™ medium (Biological Industries Ltd., Beit Haemek, Israel) supplemented with MSC go® Adipogenic – SF, XF Supplement Mix-1 (Biological Industries Ltd.), MSC go® Adipogenic – SF, XF Supplement Mix-2 (Biological Industries Ltd.) にて 37°C で 28 日間静置培養した。その後、Oil Red O (Sigma-Aldrich) で染色した。軟骨誘導は  $1 \times 10^5$  個の歯髄幹細胞を、 $430 \times g$  で遠心することでペレットを形成させ、3%の低酸素条件下にて DMEM/F12 supplemented with 15% FBS, 1 ng/mL of transforming growth factor b1 (TGFb1; Pepro Tech, Inc., Rocky Hill, NJ, USA), 5 ng/mL of TGF-2 (Pepro Tech), 0.1 mM of ascorbic acid 2-phosphate を用いて 37°C で 2 週間培養した。4% paraformaldehyde で固定した後作製した 4 $\mu$ m 厚のパラフィン切片を Alcian Blue (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) で染色した。骨誘導は  $1 \times 10^6$  個の歯髄幹細胞を 60-mm dish に播種し、 $\alpha$ -minimum essential medium (Wako Pure Chemical Industries) supplemented with 10% FBS, 10 mM b-glycerophosphate (Wako Pure Chemical Industries), 10 nM dexamethasone (Sigma-Aldrich), 100 mM ascorbic acid 2-phosphate (Wako Pure Chemical Industries) にて 37°C で 2 週間培養し、1% Alizarin Red で染色した。

神経誘導は Takahashi ら(25)の報告に従っておこなった。 $1 \times 10^4$  個の歯髄幹細胞を 60-mm dish に播種し、神経誘導培地で 2 週間培養した。神経誘導には DMEM/F12 supplemented with 5% FBS (Sigma-Aldrich), 10 mM MEM-NEAAs, 10 nM all-trans retinoic acid (Sigma-Aldrich), 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich), 50 mM



ascorbic acid (Sigma-Aldrich), 5 mM insulin (Sigma-Aldrich), 10 nM dexamethasone (Sigma-Aldrich), 20 nM progesterone (Sigma-Aldrich), 20 nM estradiol (Sigma-Aldrich), 10 nM neural growth factor-1 (Sigma-Aldrich), 10 ng/mL thyroxine (T4) (Sigma-Aldrich), 50 U/mL penicillin, 50 mg/mL streptomycin, 0.25 mg/mL fungizone を用いた。位相差顕微鏡下に形態的に明らかな神経突起を持つ細胞のコロニーを、0.1% trypsin-0.02%EDTA/PBS(-)液を浸した濾紙で採取した。採取した細胞を神経系細胞とした。神経系細胞は神経維持培地で培養され、神経維持培地には B27 (Thermo Fisher Scientific) supplemented with FGF2 (PeproTech), epidermal growth factor (PeproTech)を用いた。培養に使用する dish は BD Matrigel® Basement Membrane (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)でコーティングしたものを使用した。神経系細胞は passages 3 から 5, 培養日数は 4 から 6 日間(day in vitro: DIV)のものを実験に使用した。

### 3-2-3. Flow Cytometry

細胞表面抗原には fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse IgGk isotype control antibody (dilution, 1:100, MOPC-21; BioLegend, San Diego, CA, USA), FITC-labeled antibodies against CD14 (1:100, HCD14; BioLegend), CD34 (1:100, 561; BioLegend), CD44 (1:100, BJ18; BioLegend), CD45 (1:100, 2D1; BioLegend), CD73 (1:100, AD2; BioLegend), CD90 (1:100, 5E10; BioLegend)を使用した。細胞内抗原についてはメタノールによる膜透過処理の後, Alexa Fluor 488-labeled mouse IgG1 kappa isotype control antibody (1:100, P3.6.2.8.1, Thermo Fisher Scientific), Alexa Fluor 488-labeled anti-GFAP (1:100, GA5; Thermo Fisher Scientific), Alexa Fluor 647-labeled mouse IgM kappa isotype control antibody (1:100, MM-30; BioLegend), Alexa Fluor 647-labeled anti-A2B5 (1:100, 105; BioLegend)を使用した。

FACSVerse Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いて得られたデータを, FACSuite software version 1.0.5.3841 (BD Biosciences) を用いて解析した.

#### 3-2-4. 蛍光免疫染色

12DIV までの短期間の培養における神経系細胞と歯髄幹細胞は  $5 \times 10^4$  個の細胞を four-well chamber slides (Iwaki, Tokyo, Japan) に播種し, 50DIV の長期培養の神経系細胞は 60-mm dish で培養した. 培養細胞は  $-30^{\circ}\text{C}$  メタノールで 15 分間固定, Blocking One Histo blocking buffer で 10 分処理した. 一次抗体を  $4^{\circ}\text{C}$  で overnight 作用させた後, 二次抗体として Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (all diluted to 1:1000; Thermo Fisher Scientific), goat anti-chicken IgY H&L (Alexa Fluor® 647, 1:1000; Abcam, Cambridge, UK), donkey anti-goat IgG H&L (Alexa Fluor® 647, 1:1000; Abcam) を 60 分間作用させた. 細胞核は 4',6-diamidino-2-phenylindole (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で染色した. 画像は蛍光顕微鏡 (BZ-X810; Keyence, Osaka, Japan) にて撮影し, 培養細胞の定量化は 10 倍の対物レンズで撮影された画像で行った. 用いた一次抗体を表 1 に示す.

#### 3-2-5. RT-PCR

Total RNA は培養細胞から TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) を使って抽出し, cDNA は  $1\mu\text{g}$  の total RNA から High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて作製した. RT-PCR は Quick Taq® HS DyeMix (Toyobo, Osaka, Japan), Veriti® 96-well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) を用いた. 熱変性を  $94^{\circ}\text{C}$  で 15 秒間, アニーリングを 15 秒間, 伸長を  $72^{\circ}\text{C}$  で

60 秒間という条件で 35 サイクルおこなった. 各遺伝子のプライマーを表 2 に示す.

### 3-2-6. 神経系細胞によるスフェロイド形成

神経系細胞を 0.1% trypsin-0.02%EDTA/PBS(-)液で解離後, 430 x g で 5 分間遠沈し, 神経維持培地で再浮遊させた. 35mm-dish に  $1 \times 10^6$  個の細胞を播種, rotary shaker (Multi Bio 3D, Biosan, Riga, Latvia) を用いて 30 回転/分で 5 日間旋回培養した.

### 3-2-7. 透過型電子顕微鏡

Dish 上で単層培養された神経系細胞と神経系細胞で形成されたスフェロイドは 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer にて前固定し, 1% osmium tetroxide にて後固定した. 脱水後細胞はエポキシ樹脂に包埋し, 酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色した. Dish 上で培養された細胞は透過型電子顕微鏡(HU-12A; Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan)で, スフェロイドは透過型電子顕微鏡(JEM-1400; JEOL Ltd., Tokyo, Japan)で観察した.

### 3-2-8. マイクロアレイ解析

3 つの別個体から得た歯髄幹細胞とそれらから分化誘導した神経系細胞をマイクロアレイで解析した. 歯髄幹細胞と神経系細胞の Total RNA は TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて抽出した. その濃度は BioSpectrometer<sup>®</sup> basic instrument (Eppendorf, Hamburg, Germany) にて測定した. Total RNA は agarose gel electrophoresis (Agarose S; Nippon Gene, Tokyo, Japan) で, 核酸は Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)で評価し

た. マイクロアレイは Human Clariom S Assay (Thermo Fisher Scientific) にて行  
った. 6 つの HTA 2.0 マイクロアレイデータは Expression Console 1.3.1 software  
(Thermo Fisher Scientific) にて処理され, データセットの品質評価は  
Transcriptome Analysis Console software (version 3.1.0.5; Applied Biosystems) にて  
行った. データは GEO Accession No. GSE168399 にて公開されている. Scatter plot  
は歯髄幹細胞と神経系細胞との遺伝子発現の違いを評価するために示した. 神  
経系細胞で上方制御された遺伝子を  $p$ -value  $< 0.05$  かつ a fold change  $> 5$  で抽出し,  
gene ontology (GO) analysis using DAVID で解析することで, biological processes と  
cellular components において上位 5 つの重要な GO terms を示した. さらに, 神経  
系細胞の遺伝子発現を評価するために, *in vivo* GFAP 陽性細胞の成熟と関連した  
*in vitro* GFAP 陽性細胞に関する過去のデータセット(26)を利用した. Cluster 1:  
early pseudo-time; cluster 2: middle pseudo-time; cluster 3: late pseudo-time における  
各上位 50 の遺伝子でクラスターの階層を構築した.

### 3-2-9. Calcium imaging

神経系細胞内カル

シウム動態を評価するために, 50DIV の神経系細胞を用いた. 60-mm dish にて培  
養した神経系細胞に, 40 分間 4 mM Fluo8 AM (AAT Bioquest, Sunnyvale, CA, USA)  
を取り込ませた. 蛍光顕微鏡(BZ-810)で蛍光強度をモニターした. 得られた動画  
を ImageJ Software によって解析した. 茶枠, 青枠で覆われた 2 つの細胞の細胞内  
カルシウム動態について, 縦軸は蛍光強度, 横軸は撮影時間で表した.

### 3-2-10. 統計学的処理

データは mean  $\pm$  standard error で示した. 統計解析は IBM SPSS Statistics for

Windows, version 26.0. (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) にて行った.

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. 歯髄幹細胞の評価

本実験における歯髄幹細胞は、位相差顕微鏡写真において線維芽細胞様の紡錘形であった (図 1A).

歯髄幹細胞を Flow Cytometry にて免疫表現型で評価した結果、単球マーカーである CD14, 造血系細胞マーカーである CD34 と CD45 に対して陰性であり、CD44, CD73, CD90 の間葉系幹細胞マーカーには陽性であった. これは本実験の歯髄幹細胞が間葉系幹細胞としての免疫表面型を持つことを示している. 歯髄幹細胞は神経堤由来の幹細胞であるが、神経堤細胞マーカーである CD56 (HNK1)や CD271 (p75 neurotrophin receptor:p75NTR) に陰性であった.

歯髄幹細胞の各種神経関連マーカーの細胞免疫染色において(図 1B), doublecortin (DCX) (神経前駆細胞),  $\beta$ III tubulin (神経細胞), A2B5 (オリゴデンドロサイト前駆細胞: oligodendrocyte progenitor cells; OPCs), glial fibrillary acidic protein (GFAP) (神経幹細胞, アストロサイト), Nestin (神経幹細胞)に陽性であった. さらに多能性マーカー(Nanog, Sox2, Oct4) の発現を確認した (図 1C). 神経堤細胞である HNK1+/p75NTR+細胞は確認できなかった.

さらに、歯髄幹細胞の多分化能を確認するために、adipocytes, osteocytes, chondrocytes への分化誘導を行った (図 1D). その結果歯髄幹細胞の多能性を証明した.

#### 3-3-2. 歯髄幹細胞から分化誘導した神経系細胞の評価

歯髄幹細胞から分化誘導された神経系細胞の形態的な評価において、位相差

顕微鏡写真で複数の突起構造を持つ細胞をみとめた(図 2A). さらに透過型電子顕微鏡評価では, 単層培養された神経系細胞において軸索特有の軸索の長軸に沿った microtubules と長細いミトコンドリアを確認した(図 2B). また, 旋回培養で作製された神経系細胞スフェロイド内部においてシナプス小胞とシナプス後肥厚を確認することができた(図 2C).

5DIV 神経系細胞の各種神経関連マーカーによる細胞免疫染色において(図 2D), 神経幹細胞で発現が認められる Sox2, Pax6, Olig2, Sox10, Nestin や, 神経幹細胞からアストロサイトで発現が確認される GFAP が, 神経系細胞のほとんどの細胞で発現していた. オリゴデンドロサイト前駆細胞マーカーである platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR $\alpha$ ) が発現している細胞も確認できたが, 成熟オリゴデンドロサイトマーカーである O4 陽性の細胞はみとめなかった. 成熟神経細胞マーカーである NeuN と共陽性となる DCX 陽性細胞も多く確認することができた. また, HNK1+/p75NTR+である神経堤細胞も存在していた(図 2E). さらに DCX と GFAP に共陽性である細胞もみとめた(図 2F). 12DIV 神経系細胞において, synaptophysin 陽性のシナプス小胞は MAP2 陽性神経細胞に沿って確認された(図 2G). 神経系細胞は Nestin (95.0 $\pm$ 4.3%), GFAP (90.3 $\pm$ 5.7%), DCX (14.0 $\pm$ 1.6%), PDGFR $\alpha$  (6.5 $\pm$ 5.9%), NeuN (4.7 $\pm$ 3.9%), p75NTR (2.9 $\pm$ 3.6%) 陽性細胞で構成されていた (n = 3; 図 2H).

さらに 50DIV の神経系細胞は細胞内カルシウム動態を評価するため, Fluo-8 AM based calcium imaging をモニターした(図 2I). その結果, 間欠的な神経系細胞の細胞内カルシウム濃度の上昇を捉えた.

### 3-3-3. 神経系細胞の成熟と分化

神経系細胞の経時的な成熟と分化を評価するために, 5DIV と 50DIV の神経系

細胞を用いた。まず CD44, GFAP, A2B5 を用いて Flow cytometry を行った。5DIV と 50DIV において、それぞれ 87.3%, 53.1%の CD44 陽性細胞をみとめた (図 3A)。GFAP と A2B5 の 2 カラー解析において、5DIV においては 1 つの細胞集団であったが、50DIV では神経細胞とグリア細胞の 2 つの細胞集団にわかれていた(図 3B)。

また、細胞増殖マーカーである Ki67 による細胞免疫染色において、50DIV の Ki67 陽性細胞率は 5DIV で比較して有意に低かった( $p < 0.01$ ;  $n = 3$ ; 図 3C)。

#### 3-3-4. 歯髄幹細胞と神経系細胞の発現遺伝子比較

RT-PCR にて遺伝子発現の比較を行った。歯髄幹細胞と分化誘導神経系細胞において Nestin, Sox2, GFAP, S100 $\beta$ (アストロサイトマーカー), Olig2 は両方で発現していたが、NeuN と MAP2 といった神経細胞マーカーは歯髄幹細胞では発現せず、神経系細胞でのみ発現していた(図 4)。

#### 3-3-5. 歯髄幹細胞と神経系細胞の網羅的遺伝子解析

遺伝子発現についてさらに詳細に評価するために、歯髄幹細胞 ( $n=3$ )と神経系細胞 ( $n=3$ )の網羅的遺伝子解析を行った。発生学的に初期の神経マーカー (Pax6, Nestin, Sox2, FoxG1, and OTX1/2) (24) が神経系細胞において上方制御されていることがわかった(図 5A)。

次に、biological processes と cellular components の Gene Ontology (GO) 解析を行った。神経系細胞で上方制御されたそれぞれより重要な上位 5 個の GO term は、神経発達や神経細胞のシナプス形成に関連するものであった(図 5B)。

神経系細胞のほとんどは GFAP を発現しており、GFAP は神経幹細胞から成熟アストロサイトまで発現を続けるものであるため、GFAP 陽性細胞の分化段階についてさらなる評価を行った。*In vivo* のヒト GFAP 陽性細胞の分化に相関がある

とされるヒト iPS 細胞由来 GFAP 陽性細胞の, *in vitro* における分化を報告した過去の data set (26)を利用した. ここではGFAP 陽性細胞を成熟度の若い順に cluster 1, cluster 2, cluster 3 の 3 つの cluster に分類しており, 我々の神経系細胞では cluster 2 と cluster 3 で発現する遺伝子について強い発現をみとめた. また, cluster 2 は外側放射状グリアの遺伝子プロファイルと近似しており(26), 我々の神経系細胞においても放射状グリアマーカーである FABP7 の強い発現がみられた. また cluster 3 において, よく知られている成熟アストロサイトマーカーである AQP4 は神経系細胞では弱い発現であった (図 5C).

#### 3-4. 考察

20 世紀の終わりから, 様々な方法で万能細胞の神経幹/前駆細胞誘導が試みられてきた. 主に間質細胞の利用や胚葉体様構造から, 神経管様構造である神経ロゼットを形成させる手法がとられてきた(27). 本実験の神経系細胞は, 神経幹細胞マーカーを発現する GFAP 陽性のグリア細胞と神経細胞とが混在している. その中において, GFAP+/DCX+細胞(図 2F)は神経細胞とグリア細胞のどちらにも分化しうる前駆細胞であると考えられる. この細胞の存在から *retrospective* に考えると, 本実験の神経誘導プロトコルは, 神経ロゼットの形成なしに神経幹/前駆細胞の分化誘導に成功している可能性が高い.

神経系細胞は GFAP 陽性細胞がその多くの割合を占めることがわかった. Flow Cytometry やマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現による評価から, これらの GFAP 陽性細胞は, 放射状グリア以降のアストロサイト系統細胞であると考えられたが, 成熟アストロサイトマーカーの発現は弱く, アストロサイトの前駆段階の細胞である可能性が示された.

本実験の歯髄幹細胞から得た神経系細胞は, ES 細胞や iPS 細胞などの万能細胞



から得ることのできる神経系細胞とその細胞構成において同様の性質を持つ。しかしながら、過去の報告にある、間葉系幹細胞から得た神経誘導の結果とは性質を異にしている。万能細胞から分化誘導した神経幹/前駆細胞は、持続的な拡大と分化を特徴とし、様々な分化段階の様々な細胞で構成される細胞集団となる(19)。しかし、過去の間葉系幹細胞由来の神経幹/前駆細胞様細胞の報告は持続的な拡大や分化が示されていなかった(28,29)。また、万能細胞由来神経細胞は遺伝子プロファイル、神経マーカーの発現、形態的評価、シナプス形成、電気生理学的評価で十分に特徴付けられている(30)。本実験の神経系細胞を構成する神経細胞の存在は、複数の神経マーカーの発現、形態的特徴、シナプス形成、細胞内カルシウム動態で評価した。さらに、マイクロアレイの結果による GO enrichment 解析も神経細胞の存在とシナプス形成を示唆している。過去の間葉系幹細胞の神経誘導の結果は主に神経関連マーカーの発現、もしくは上方制御に基づいており(31, 32)、間葉系幹細胞由来神経様細胞は形態的に神経細胞とは異なっており、シナプスの形成も評価されていなかった(31, 3)。近年の報告では間葉系幹細胞由来神経様細胞の電気生理学的評価も行われているが(34)、電位依存的 Na チャネルは、形態的な変化前の初期神経細胞から発生するとする報告もある(35)。従って、幹細胞の神経誘導の結果については多角的に評価する必要がある。過去の報告にある間葉系幹細胞の神経誘導の結果は、正常な神経幹/前駆細胞や神経細胞ではなく、何らかの神経系の細胞のいずれかの分化段階であったものと考えられる。

### 3-5. 小括

歯髄幹細胞から分化誘導した神経系細胞は、アストロサイト系統、オリゴデンドロサイト系統、神経系統、神経堤細胞系統細胞から構成されていた。神経

系細胞は持続的に分化・成熟し、5DIVにおいてその大部分は未成熟なアストロサイト系統細胞であることが示唆された。

## 第4章 神経系細胞を用いた末梢神経再生に関する研究

### 4-1. 目的

歯髄幹細胞から分化誘導した神経系細胞の、血管内皮細胞、シュワン細胞、神経細胞に対する paracrine 効果を評価する。さらに神経系細胞をヌードラット坐骨神経切断モデルに神経誘導管とともに移植し、細胞分化と末梢神経再生能を評価する。

### 4-2. 材料と方法

#### 4-2-1. 神経系細胞培養上清の回収

神経系細胞の培養上清を回収するために、神経系細胞を神経維持培地で培養し、70% confluency となった後に新しい神経維持培地に変更した。その24時間後に培養上清を回収した。Negative control 培養液として、incubator 内に24時間おいた神経維持培地を使用した。

#### 4-2-2. WST8 cell proliferation assay

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) と immortalized adult rat Schwann (IFRS1) cells は、それぞれ Complete Medium Kit with Serum and CultureBoost-R™ (Cell Systems, Kirkland, WA, USA) と IFRS1-dedicated medium (Nacalai Tesque, Inc.) を用いて培養した。細胞は 0.1% trypsin-0.02% EDTA/PBS(-) 液で解離後、遠心し、10% FBS/DMEM で再浮遊させた。次に 96-well plates を用いて  $2 \times 10^4$  cells/well をそれぞれの培養液 135  $\mu$ L で播種した。さらに 15  $\mu$ L の神経系細胞培養上清、または negative control 培養液をそれぞれ加えた。48 時間の培養後、10  $\mu$ L の Cell Count Reagent SF (Nacalai Tesque) をそれぞれの well に加えた。1 時間の呈色反応後に Varioskan™ LUX multimode microplate reader (Thermo Fisher

Scientific)を用いて 450nm の吸光度で測定した. 細胞を培養していない well の培養液を negative control とし, それぞれの吸光度を negative control との比で表した.

#### 4-2-3. Migration assay

HUVECs と IFRS1 を 12-well culture dish に播種し, それぞれ Complete Medium Kit with Serum and CultureBoost-R™ with Attachment factor® (Cell Systems) と IFRS1-dedicated medium (Nacalai Tesque, Inc.)を用いて confluence 状態になるまで培養した. セルスクレーパーを用いて scratch を形成し, 100μL の神経系細胞培養上清, または 100μL の negative control に 900μL のそれぞれの培養液を加えて 24 時間培養した. HUVEC の位相差画像は顕微鏡(BZ-X710; Keyence, Osaka, Japan)を, IFRS1 は(IX71; Olympus Corporation, Tokyo, Japan)を用いて撮影した. Wound closure (%)は以下の式を用いて計算した. 
$$\text{Wound closure (\%)} = \{1 - (\text{area of 24h}) / (\text{area of the primary wounds})\} \times 100.$$

#### 4-2-4. Tube formation assay

HUVECs は Complete Medium Kit with Serum and CultureBoost-R™ with Attachment factor® (Cell Systems)で培養維持した後, 0.1% trypsin-0.02%EDTA/PBS(-)液で細胞を解離し, 10% FBS/DMEM で再懸濁した. 次に Matrigel® (Corning Incorporated, Corning, NY, USA)-coated 96-well plates に  $2 \times 10^4$  cells/well を 135μL の維持培地で播種した. さらに, 15μL の神経系細胞培養上清, または negative control 培養液を各 well に加え, 9 時間後に倒立顕微鏡(IX71)を用いて倍率 100 倍で撮影した. Tube formation Angiogenesis Analyzer for the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) (36)を用いて評価した.

#### 4-2-5. Neurite regeneration assay

Neurite regeneration assay は過去の報告を参考に行った(37, 38).  $5 \times 10^4$  個の神経系細胞を  $450\mu\text{L}$  ずつ 4-well chamber slide (Iwaki) に播種し, さらに  $50\mu\text{L}$  の神経系細胞培養上清, または  $50\mu\text{L}$  の negative control 培養液を加え培養した. 48 時間後, 神経系細胞は anti-MAP2 抗体で免疫染色され, BZ-X810 顕微鏡の 40 倍の対物レンズで観察した. 個々の最も長い神経突起を NeuronJ with ImageJ software で測定した. ランダムに 10 視野を撮影し, 各神経細胞の神経突起の長さを測定することでその平均値を求め  $n=1$  とした. 3 つの独立した実験を行い, 培養上清は違う個体の神経系細胞から得たものを使用した.

#### 4-2-6. 実験動物と細胞移植

動物実験は筑波大学動物実験委員会にて承認された(Approval No. 20-232)方法に従って行われた.  $180\text{-}220\text{g}$  のオスの免疫不全ラット(F344/N Jcl rnu/rnu; CLEA Japan, Osaka, Japan)を用いた. Medetomidine ( $0.15\text{ mg/Kg}$ ), midazolam ( $2\text{ mg/Kg}$ ), butorphanol ( $2.5\text{ mg/Kg}$ ), and saline solution ( $1.45\text{ mL/Kg}$ )で麻酔し, 左側の坐骨神経を  $10\text{mm}$  切離・除去した. ラットを 2 群に分け, 中腔の神経誘導管 (composite seamless tube; Atree, Tokyo, Japan)に Matrigel<sup>®</sup>を填入し再建した群をコントロール群 ( $n=6$ )とし, 人工導管に  $1 \times 10^5$  個の神経系細胞と Matrigel<sup>®</sup>を填入し再建した群を細胞移植群 ( $n=9$ ) とした. 細胞移植群の一部 ( $n=3$ ) は 2 週間後に sacrifice され生存細胞の評価を行った. 両群ともに同様の条件で飼育した.

#### 4-2-7. 蛍光免疫染色

組織サンプルは 4% paraformaldehyde で固定し, パラフィン包埋後,  $4\mu\text{m}$  の切

片とした。抗原の賦活化は HistoVT One antigen retrieval solution (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan)を用いて 98°C 40 分で行った。さらに Blocking One Histo blocking buffer (Nacalai Tesque, Inc.) で 10 分処理した。一次抗体を 4°C で overnight 作用させた後、二次抗体として Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (all diluted to 1:1000; Thermo Fisher Scientific), goat anti-chicken IgY H&L (Alexa Fluor® 647, 1:1000; Abcam, Cambridge, UK), donkey anti-goat IgG H&L (Alexa Fluor® 647, 1:1000; Abcam)を 60 分間作用させた。細胞核は 4',6-diamidino-2-phenylindole (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)で染色した。画像は蛍光顕微鏡 (BZ-X810; Keyence, Osaka, Japan)にて撮影され、細胞数の定量化は組織切片において 40 倍の対物レンズで撮影された画像で行った。用いた一次抗体を表 1 に示す。

#### **4-2-8. Walking track analysis**

Sciatic Functional Index は, Inserra ら(39)の報告に従って術後 4, 8, 12 週で評価した。

#### **4-2-9. Electrophysiological evaluation**

術後 12 週において、坐骨神経を剖出し電気生理学的評価を行った。その評価は(0.1 ms duration, 1 Hz)の刺激強度で PowerLab (PowerLab4/25, SEN-34, SS-203 J, MEG-5200; Nihon Kohden, Tokyo, Japan)を用いて行った。腓腹筋の Compound muscle action potentials (CMAP)の測定を行った。さらに、Motor nerve conduction velocity (MCV) は異なる 2 点間の距離から計算した。その結果はラットの個体差を考慮し、健側との比較で評価した。

#### 4-2-10. 再生軸索評価

電気生理学的評価後に、再生神経部の中央部で評価するために再生神経を半分に分けて採取した。前述された方法で固定・脱水・エポキシ樹脂で包埋した後、横断面中央部をトルイジンブルー染色し評価した。BZ-X810 顕微鏡にて 40×の対物レンズで撮影し、再生軸索数を ImageJ software を使用して測定した。さらに透過型電子顕微鏡を用いて G ratio (ratio of axon diameter to fiber diameter) を計算した。各サンプルにおいて 30 個の髄鞘をランダムに抽出し ImageJ software を使用して計算した。その平均値を n=1 としてカウントした。

#### 4-2-11. 透過型電子顕微鏡

再生部神経組織は 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer にて前固定し、1% osmium tetroxide にて後固定した。脱水後細胞はエポキシ樹脂に包埋し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色した。透過型電子顕微鏡(JEM-1400; JEOL Ltd., Tokyo, Japan)で観察した。

#### 4-2-12. 腓腹筋筋湿重量評価

健側と実験側の腓腹筋を採取し質量を測定し下記の計算式を用いて評価した。  
$$\text{Muscle mass ratio} = (\text{muscle mass of the affected side}) / (\text{muscle mass of the unaffected side}) \times 100\%.$$

#### 4-2-13. 統計学的処理

データは mean ± standard error で示した。統計解析は IBM SPSS Statistics for Windows, version 26.0. (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) にて Student's *t*-test を用いて行った。本研究では、両側検定において p 値が 0.05 未満を統計的に有意で

あるとした。

### 4-3. 結果

#### 4-3-1. 神経系細胞が産生する生理活性物質の血管内皮細胞(HUVEC), シュワン細胞(IFRS1), 神経細胞への影響

末梢神経再生に重要な役割を持つ細胞に対する神経系細胞の paracrine 効果を評価するために、神経系細胞の培養上清を用いて各細胞の培養を行った。HUVEC と IFRS1 の増殖能は、WST8 cell proliferation assay を用いて評価した。IFRS1 において、神経系細胞培養上清を用いた培養では negative control 培養液での培養と比較し有意に増殖能は高まっていた( $p < 0.01$ ,  $n = 3$ ; 図 6A)。しかしながら、HUVEC においては有意な差はみとめなかった。

次に HUVEC と IFRS1 の遊走能について migration assay にて評価した。HUVEC は神経系細胞培養上清を用いた培養において、negative control 培養液を用いた培養と比較し有意に遊走能を増強したが、IFRS1 では有意差がなかった ( $p < 0.01$ ,  $n = 3$ ; 図 6B)。

さらに、HUVEC の血管新生を tube formation assay 法で評価した。神経系細胞培養上清を用いた培養は negative control 培養液を用いた培養より、number of junctions ( $p < 0.01$ ,  $n = 3$ ) と total tube length ( $p < 0.05$ ;  $n = 3$ ; 図 6C) において有意な差をみとめた。

神経細胞についての評価は neurite regeneration assay を行った。神経系細胞を構成する神経細胞は、神経系細胞培養上清を利用した培養で、negative control 培養液を用いた培養よりも有意な神経突起の伸長をみとめた ( $p < 0.05$ ;  $n = 3$ ; 図 6D)。



#### 4-3-2. ラット末梢神経再生部位におけるヒト神経系細胞の分化

長さ 10-mm の左側坐骨神経欠損部に、神経誘導管とともに神経系細胞を免疫不全ラットに移植し、移植後 2 週と 12 週における生存細胞の分化を免疫組織学的に評価した(図 7A,E). 移植後 2 週では、再生神経の横断面においてほとんどの STEM123(ヒト GFAP)細胞は Nestin も発現していた。また、多くの細胞は Ki67 に陽性であり、細胞分裂を行っていることを示した。さらに、多くの細胞で PDGFR $\alpha$  に陽性であった。一方で DCX 陽性細胞は少数であった。成熟オリゴデンドロサイト(O4 陽性細胞)と成熟神経細胞(MAP2 陽性細胞) はみられなかった。さらに、Nestin, GFAP, PDGFR $\alpha$ , DCX の定量評価を行った(図 7B). 再生神経部横断面にて形態的に未成熟な human PDGFR $\alpha$ +p75NTR+細胞を確認した(図 7C). 縦断面においても、ラット p75NTR 陽性細胞に囲まれた human PDGFR $\alpha$ +p75NTR+細胞をみとめた(図 7D).

次に移植後 12 週において生存ヒト細胞が評価され、極少数の 2 種類の STEM121(ヒト細胞質)陽性細胞を確認することができた。p75+/myelin protein zero (MPZ) - 細胞 と MPZ 陽性細胞のシュワン細胞系統細胞であった。生存していたヒト細胞はラット軸索近傍に存在し、ラット軸索に対して髄鞘形成をしていなかった (図 4E).

#### 4-3-4. 神経系細胞の末梢神経再生能と再生坐骨神経機能評価

神経系細胞移植による末梢神経再生促進の評価では、移植後 12 週における再生坐骨神経の画像において、control 群においても坐骨神経の連続性が確認できたが、神経系細胞移植群の方がより太い再生神経であった (図 8A).

機能評価として坐骨神経機能指数 (SFI)を使用した。-100 が完全断裂な状態であり、0 は正常な状態を表す。移植後 4, 8, 12 週において神経系細胞移植群は

control 群より有意に高い数値であった ( $p < 0.01$ ,  $n = 6$ ; 図 8B).

移植後 12 週の電気生理学的評価において, CMAP と MCV の結果は control 群と比較し神経系細胞移植群で有意に良好な結果であった ( $p < 0.01$ ,  $n = 6$ ; 図 8C).

移植後 12 週の再生神経部軸索を評価した結果, 横断面のトルイジンブルー染色では, control 群より神経系細胞移植群のほうが, 中枢からの再生軸索数が有意に多かった ( $p < 0.01$ ,  $n = 6$ ; 図 8D).

さらに, 透過型電子顕微鏡を用いて髄鞘の成熟を評価した. 神経系細胞移植群の髄鞘の G ratio は control 群の G ratio より有意に低く, より成熟した髄鞘であることを示した ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ; 図 8E).

腓腹筋湿重量では, 神経系細胞移植群は control 群より有意に高い値を示し ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ; 図 8F), 筋の萎縮を改善させていた.

#### 4-4. 考察

驚くべきことに, ラット坐骨神経欠損部に移植された分化誘導神経系細胞において, 移植前は 5%程度であった PDGFR $\alpha$ + OPCs が, 移植後 2 週において約 75%のヒト細胞が PDGFR $\alpha$ + OPCs となっていた. 我々の神経系細胞は, ある程度成熟した神経細胞を除いてはそのほとんどが GFAP を発現しており, 神経マーカーでの評価だけでは GFAP 陽性細胞が神経幹細胞から成熟アストロサイトまでのどの分化段階であるのかを示すことは困難であった. Flow cytometry とマイクロアレイの結果から, GFAP 陽性細胞は未成熟アストロサイトの細胞集団であろうと考えられた. Lepore らは中枢神経の脱髄病変にグリア制限前駆細胞を移植し, その動態を評価した(40). 移植部から近い部位では移植細胞の多くがアストロサイト系統細胞に, 遠い部位においてオリゴデンドロサイト系統細胞に分化した. これはグリア制限前駆細胞がその niche においていずれかのグリア

細胞に分化することを示唆している。また, Guo らは硬化症の複数のモデルにおいて, Nestin 陽性アストロサイトが脱髄部で OPCs に分化していることを示した(41)。これらの報告は, グリア細胞はその niche において分化や脱分化を起こし得ることを示しており, 本実験による GFAP 陽性細胞の多くは, 末梢神経切断部位に移植された後にアストロサイト系統ではなくオリゴデンドロサイト系統へ分化したものと考えられた。

さらに, PDGFR $\alpha$ + OPCs のさらなる評価では, PDGFR $\alpha$ + OPCs は, シュワン細胞の表現型である p75NTR を得ることがわかった。OPCs は中枢神経においてグリア制限前駆細胞から分化し, 髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトとなる。しかしながら昨今 genetic fate mapping を利用して, 中枢神経の脱髄部において OPCs がシュワン細胞に分化し, その OPCs 由来シュワン細胞が再髄鞘化に寄与することで髄鞘化を促進するという報告が増えている(42, 43)。p75NTR はシュワン細胞のプロトタイプマーカーであり, OPCs のシュワン細胞分化において PDGFR $\alpha$ との共発現が予測されていたが確認されていなかった(44)。犬ジステンバーモデルにおいて, OPCs からシュワン細胞への分化後に PDGFR $\alpha$ +の発現はなくなり, 一方で p75NTR の発現が続くことがわかった(45)。さらに, 近年の報告では, OPCs をげっ歯類の末梢神経に同種移植し, その4週間後に OPCs はシュワン細胞マーカーを発現し, 宿主軸索周囲で髄鞘を形成していた(18)。しかしながら, OPCs のシュワン細胞への分化は, 末梢神経髄鞘マーカーである periaxin の発現によるものであり, p75NTR 発現での評価はなかった。本実験における移植後2週間での PDGFR $\alpha$ +p75NTR+細胞は, OPCs のシュワン細胞様細胞への分化を示すものであり, 我々が渉猟し得た限り初めての報告である。

歯髄幹細胞は, 他の間葉系幹細胞より高いレベルの神経栄養因子を分泌することが知られている(46)。人工導管とともに末梢神経に移植された歯髄幹細胞は,

抗炎症, 抗アポトーシス, 血管新生制御, シュワン細胞のガイドによって, 軸索伸長, 髄鞘化, 機能回復を促進することが報告されている(47). 種々の神経マーカーが発現している神経誘導された歯髄幹細胞の移植は, 誘導前の歯髄幹細胞の移植より末梢神経再生を促進することも報告されている(48). Martens らは, ヒト歯髄幹細胞から誘導されたシュワン細胞様細胞が, ラット神経細胞を *in vitro* で髄鞘化することを示した(49). さらに, ヒト歯髄幹細胞から誘導されたシュワン細胞様細胞が *in vivo* で末梢神経再生を促すことも報告された(50-52). しかしながら, これらヒトシュワン細胞様細胞の髄鞘化の報告は *in vitro* に限られており, *in vivo* においては報告されていない. *In vivo* において, 移植細胞が宿主軸索を髄鞘化しない理由については, 異種移植が原因であることや, シュワン細胞の分化度に問題があること, さらに免疫抑制動物であってもナチュラルキラー細胞やマクロファージが存在するから(53)など, 多くの可能性が考えられる. さらにヒト iPS 細胞由来神経堤細胞は, げっ歯類末梢神経損傷部位に移植された後シュワン細胞マーカーを発現したが, その髄鞘化は確認できず宿主軸索の周囲に存在しているだけであった(54). 我々の実験においても移植後 12 週では宿主軸索の周囲に存在していることが確認されており, 過去の報告と同様であった. しかしながら移植後 12 週においても神経堤系統細胞が生存していたことと機能回復の結果から, ヒト細胞は持続的に末梢神経再生を促進していたと考えられる.

#### 4-5. 小括

歯髄幹細胞から分化誘導した神経系細胞は, 神経再生に重要な細胞である血管内皮細胞, シュワン細胞, 神経細胞の活性をその *paracrine* 効果で増強することが明らかになった. さらに, ニードラット坐骨神経切断モデルに移植された

神経系細胞は、移植後 2 週で PDGFR $\alpha$ 陽性細胞の割合が増加し、その一部で PDGFR $\alpha$ /p75NTR 陽性細胞が確認された。また、移植後 12 週において生存していたヒト細胞はシュワン細胞系統細胞のみであり、ラット軸索の髄鞘化はみとめなかった。移植された神経系細胞は坐骨神経再生を促進した。

## 第5章 総括

### 5-1. 総括

本実験は、ヒト歯髄幹細胞を遺伝子導入やフィーダー細胞の使用なしで、神経系細胞に分化誘導できたことを示した。分化誘導された神経系細胞は神経系統、アストロサイト系統、オリゴデンドロサイト系統、神経堤系統細胞によって構成されていた。この神経系細胞は *in vitro* において *paracrine* 依存的に内皮細胞、シュワン細胞、神経細胞の活性を増強した。また、神経系細胞はヌードラット坐骨神経切断モデルに移植された後にオリゴデンドロサイト前駆細胞由来シュワン細胞様細胞を生じさせ、一部のヒト細胞の長期生存を達成した。さらに、移植された神経系細胞は軸索伸長と再髄鞘化を促し、電気生理学的活性と腓腹筋萎縮を改善することで機能回復を導いた。

万能細胞を使用しない本実験の神経誘導のプロトコルは、その安全性と簡便さからさらに広く応用されるべきである。また、歯髄幹細胞から分化誘導された神経系細胞の移植は、末梢神経再生治療の有望な戦略となる。

### 5-2. 今後の展望と課題

ヒトシュワン細胞とラット軸索における髄鞘形成には不明な点が多く、本実験においても移植後12週に生存していたヒトシュワン細胞系統細胞は宿主軸索を髄鞘化していなかった。神経系細胞の髄鞘形成能を正確に評価するために、ラット歯髄より歯髄幹細胞を単離し、ラット神経系細胞を同種坐骨神経切断モデルへ移植することを予定している。さらに、現在当研究室において神経系細胞の PDGFR $\alpha$ 陽性細胞を約9割にまで増やすことに成功している。この PDGFR $\alpha$ 陽性の割合が高い細胞集団を坐骨神経切断モデルに移植することで、PDGFR $\alpha$ /p75NTP陽性細胞などへの細胞分化を詳細に評価する予定である。

万能細胞を神経幹/前駆細胞に分化誘導した結果得られた細胞群には、中枢神経系の細胞だけでなく神経堤系統の細胞が混在することが知られているが、その理由はあきらかになっていない(55)。また、Bung らはラット放射状グリアを遺伝子導入で神経上皮細胞に脱分化させて培養した結果、その一部に神経堤系統細胞が出現したと報告している(56)。発生学的に、中枢神経系細胞の由来となる神経管は神経外胚葉である神経上皮がくぼむことで形成される。その際、神経堤細胞は上皮間葉転換を起こし神経上皮から分離することで神経堤を形成する。すなわち神経堤細胞の起源は神経上皮細胞にあると考えられる。*In vitro*における中枢神経系細胞の細胞集団に出現する神経堤細胞の過去の報告は、発生学的に非常に初期の神経幹細胞である神経上皮細胞から神経堤細胞が分化することを示唆しており、本実験においても同様の現象が起こっている可能性がある。したがって、神経系細胞において上皮マーカー(E-cadherin)を発現している神経上皮細胞や、シュワン細胞、末梢神経、平滑筋などの神経堤細胞由来の細胞を探索する予定である。また、神経系細胞から特定の細胞を単離して増殖させることができれば、多くの神経疾患に対して、万能細胞に頼らない安全性の高い移植細胞として臨床試験にも応用が広がると考える。

### 5-3. 結語

歯髄幹細胞から分化誘導された神経系細胞は様々な種類の細胞からなる細胞集団であり、末梢神経切断部位に移植された神経系細胞は、産生する生理活性物質によって間接的に末梢神経再生を促進させた。歯髄幹細胞から分化誘導された神経系細胞は、細胞治療のさらなる発展に有用な細胞源である。

## 表と図

### 表 1

Antibody	Company	Catalog No.	Dilution (ICC)	Dilution (IHC)
Doublecortin	abcam	ab18723	1:500	1:200
$\beta$ III tubulin	abcam	ab7751	1:500	
A2B5	abcam	ab53521	1:200	
GFAP	abcam	ab7260	1:1000	1:500
Nestin	abcam	ab105389	1:200	1:300
Nanog	Proteintech	14295-1-AP	1:200	
Sox2	MERCK	AB5603	1:100	1:200
Oct4	abcam	ab19857	1:200	
Pax6	abcam	ab5790	1:400	
Olig2	MERCK	SAB1404798	1:500	
Sox10	Atlas Antibodies	HPA068898	1:200	
PDGFRa	Cell Signaling	3174	1:500	1:500
PDGFRa	R & D SYSTEMS	AF-307		1:100
NeuN	MERCK	MAB377	1:500	
HNK1	MERCK	C6680	1:200	
p75NTR	abcam	ab52987	1:100	1:200
MAP2	MERCK	M4403	1:1000	
synaptophysin	Cell Signaling	36406	1:100	
Ki67	abcam	ab15580	1:200	1:500
STEM121	Takara	Y40410		1:1000
STEM123	Takara	Y40420		1:1000
MPZ	NOVUS BIOLOGICALS	NB100-1607		1:100

S S Z

### 表 1. 一次抗体

Abbreviations: GFAP, glial fibrillary acidic protein; ICC, immunocytochemistry; IHC, immunohistochemistry; HNK1, human natural killer-1; Olig2, oligodendrocyte lineage transcription factor 2; MAP2, microtubule-associated protein 2; MPZ, myelin protein zero; NeuN, neuronal nuclei; Oct4, octamer-binding transcription factor 4; Pax6, paired box 6; PDGFRa, platelet-derived growth factor receptor a; Sox2, sex-determining region Y-box 2; Sox10, sex-determining region Y-box 10; p75NTR, p75 neurotrophin receptor;



表 2

Gene	Primer sequences, 5' to 3'	Product size (bp)	Annealing temp (°C)	GenBank accession number
GAPDH	S: GTCAAGGCTGAGAACGGGAA	613	55	NM_001256799.1
	A: GCTTCACCACCTTCTTGAIG			
Nestin	S: AACAGCGACGGAGGTCTCTA	220	55	NM_006617
	A: TTCCTCTGTCCCGCAGACTT			
GFAP	S: GGAAGATTGAGTCGCTGGAG	164	60	XM_145728.2
	A: ATACTGCGTGC GGATCTCTT			
Sox2	S: AACCCCAAGATGCACAACTC	152	55	NM_003106
	A: CGGGGCCGGTATTATAATC			
Olig2	S: AGGACAAGAAGCAAATGACAG	100	58	NM_005806
	A: TCCATGGCGATGTTGAGG			
S100 $\beta$	S: GGAAATCAAAGAGCAGGAGGT	254	60	NM_006272
	A: ATTAGCTACAACACGGCTGGA			
MAP2	S: AGTTCAGGCCACCTCCTCCCTCC	127	55	XM_011511198.1
	A: GGGAGCCAGAGCTGATCCCCA			
NeuN	S: GCGGCTACACGTCCTCCAACATC	189	60	NM_001350453
	A: ATCGTCCCATTTCAGCTTCTCCC			

表 2. プライマー

Abbreviations: GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Sox2, sex-determining region Y-box 2; GFAP, glial fibrillary acidic protein; MAP2, microtubule-associated protein 2; NeuN, neuronal nuclei; Olig2, oligodendrocyte lineage transcription factor 2; S100 $\beta$ , S100 calcium binding protein B

図 1

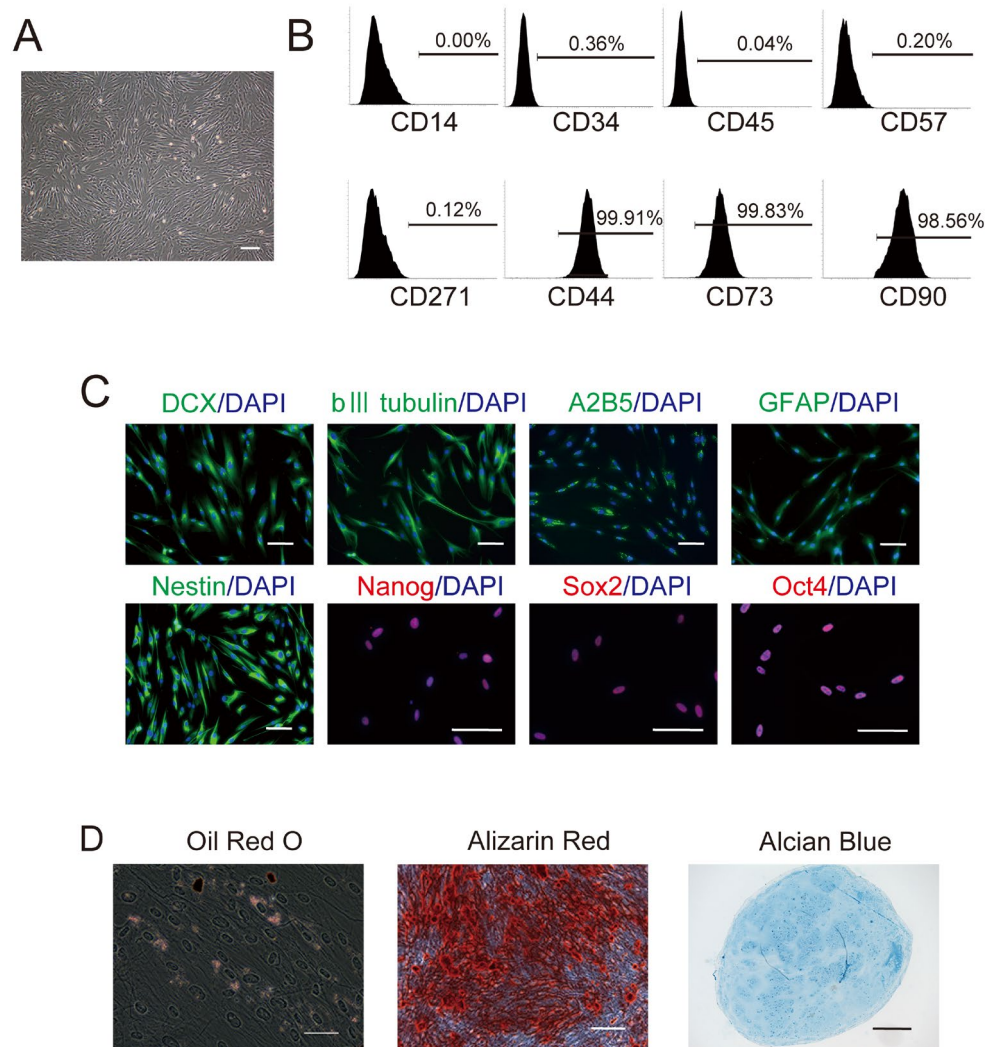


図 1. 歯髄幹細胞の特徴

(A) 歯髄幹細胞の位相差顕微鏡画像. Scale bar = 200 μm.

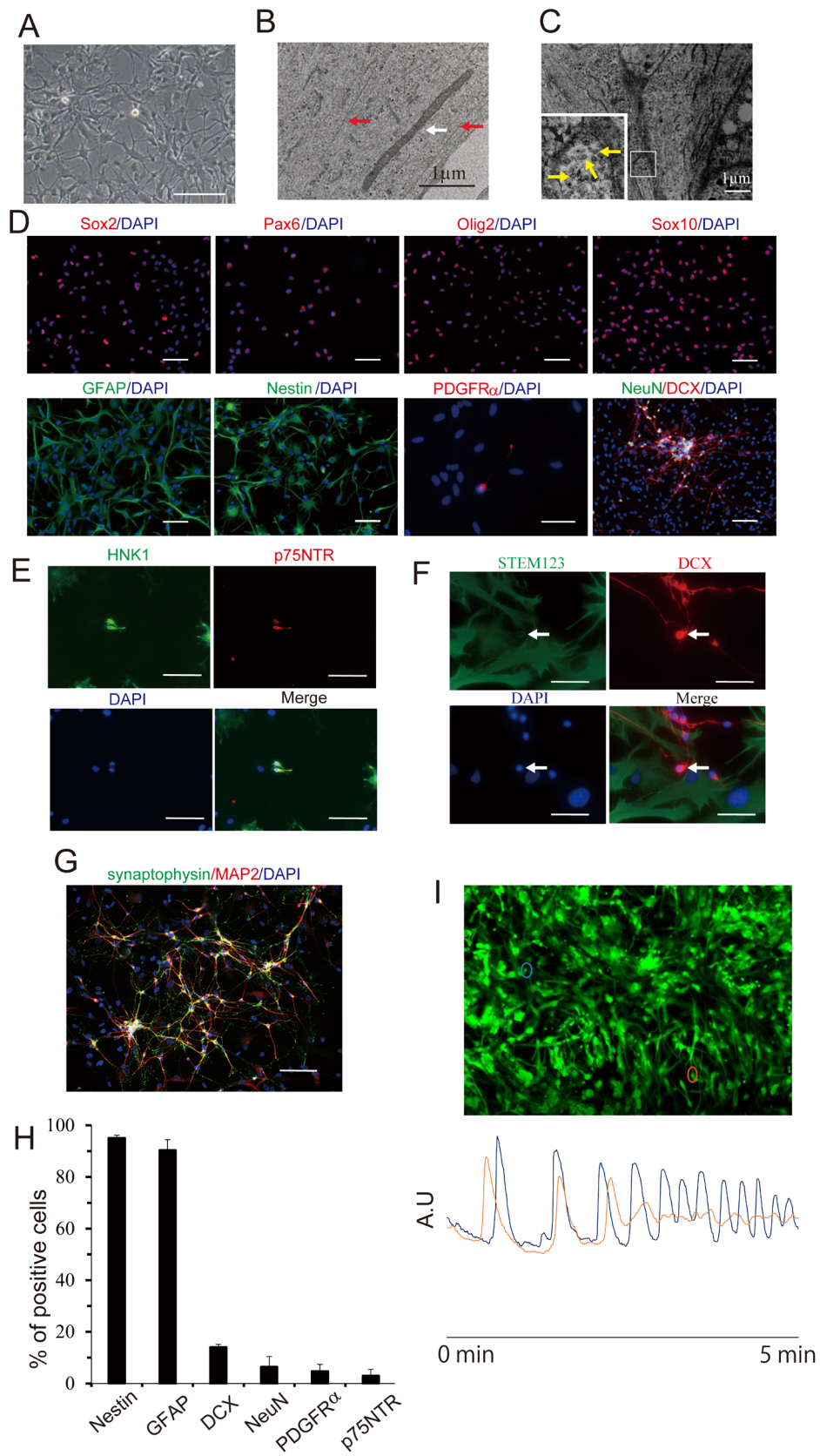
(B) 歯髄幹細胞の細胞表面マーカー. 単球マーカー(CD14), 造血系細胞マーカー(CD34, CD45), 神経堤細胞マーカー(CD57, CD271), 間葉系幹細胞マーカー(CD44, CD73, CD90) が評価された.

(C) 歯髄幹細胞の神経系マーカーによる細胞免疫染色(DCX, βIII tubulin, A2B5,

GFAP)と幹細胞関連マーカー(Nanog, Sox2, Oct4). Scale bar = 100 $\mu$ m

(D) 歯髄幹細胞は脂肪誘導(Oil Red O; scale bar = 50 $\mu$ m), 骨誘導(Alizarin Red; scale bar = 200 $\mu$ m), 軟骨誘導(Alcian Blue; scale bar = 500 $\mu$ m) に分化された.

图 2



## 図 2. 歯髄幹細胞から分化誘導された神経系細胞の特徴

(A) 5DIV における神経系細胞の位相差顕微鏡画像. Scale bar = 200 $\mu$ m

(B) dish 上で培養された神経系細胞の 5DIV における透過型電子顕微鏡画像. 赤矢印; 微小管, 白矢印; ミトコンドリアを示す.

(C) スフェロイド内部神経系細胞の 5DIV における透過型電子顕微鏡画像. 黒矢印; シナプス後肥厚, 黄色矢印; シナプス小胞を示す.

(D) 5DIV における神経系細胞の抗 Sox2, Pax6, Olig2, Sox10, GFAP, Nestin, DCX, NeuN 抗体における免疫染色. Scale bar = 100 $\mu$ m. 抗 PDGFR $\alpha$ 抗体による免疫染色. Scale bar = 50 $\mu$ m.

(E) 5DIV における神経系細胞の神経堤細胞マーカーによる免疫染色. Scale bar = 100 $\mu$ m.

(F) 5DIV における神経系細胞の抗 GFAP, DCX 抗体による免疫染色. Scale bar = 50  $\mu$ m.

(G) 12DIV における神経系細胞の抗 synaptophysin, MAP2 抗体による免疫染色. Scale bar = 100 $\mu$ m.

(H) 5DIV における神経系細胞の Nestin, GFAP, DCX, NeuN, PDGFR $\alpha$ , p75NTR 陽性細胞の定量評価.

(I) 50DIV における神経系細胞内カルシウム動態. 上図における茶枠, 青枠で覆われた細胞の細胞内カルシウム動態は, 下図における茶線, 青線に対応している. 縦軸; 任意単位(A.U), 横軸; 時間.

図 3

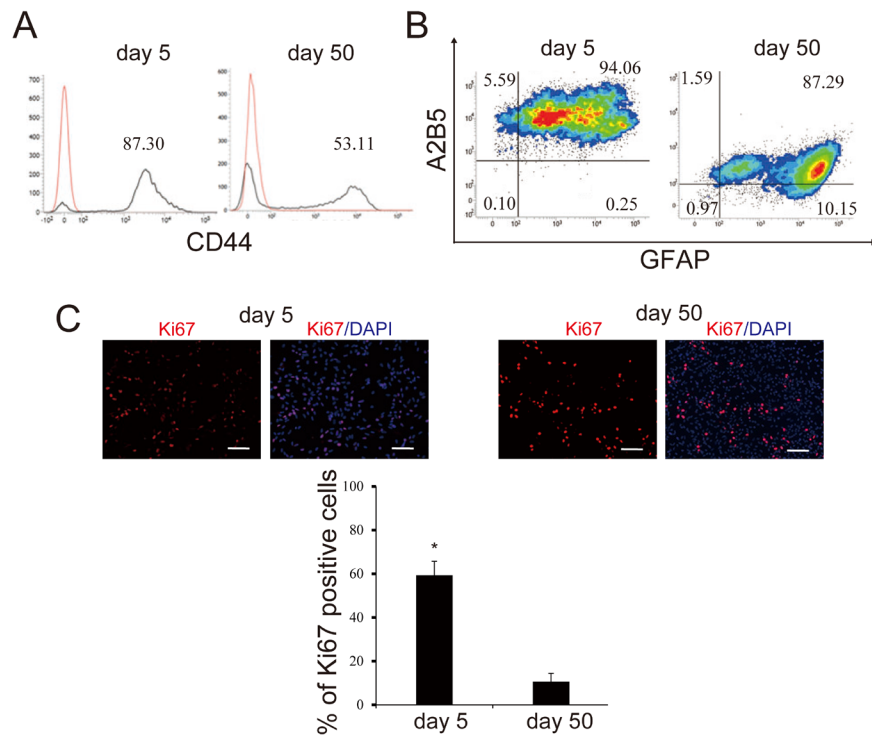


図 3. 神経系細胞の成熟, 分化

- (A) 5DIV と 50DIV における神経系細胞の CD44+細胞の Flow cytometric 解析
- (B) 5DIV と 50DIV における神経系細胞の GFAP, A2B5 を用いた 2-color Flow cytometric 解析
- (C) 5DIV と 50DIV における神経系細胞の Ki67+細胞と DAPI+細胞割合の比較.(n=3; scale bar = 100 $\mu$ m)

図 4

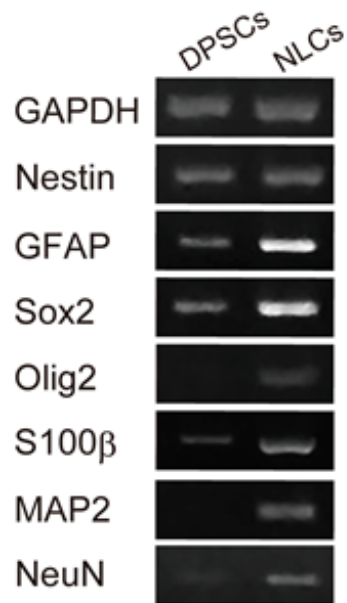


図 4. 歯髄幹細胞と分化誘導した神経系細胞の比較

5DIV における歯髄幹細胞(DPSCs)と神経系細胞(NLCs)の神経関連マーカー (Nestin, GFAP, Sox2, Olig2, S100β, MAP2, NeuN)の RT-PCR 解析.

図 5

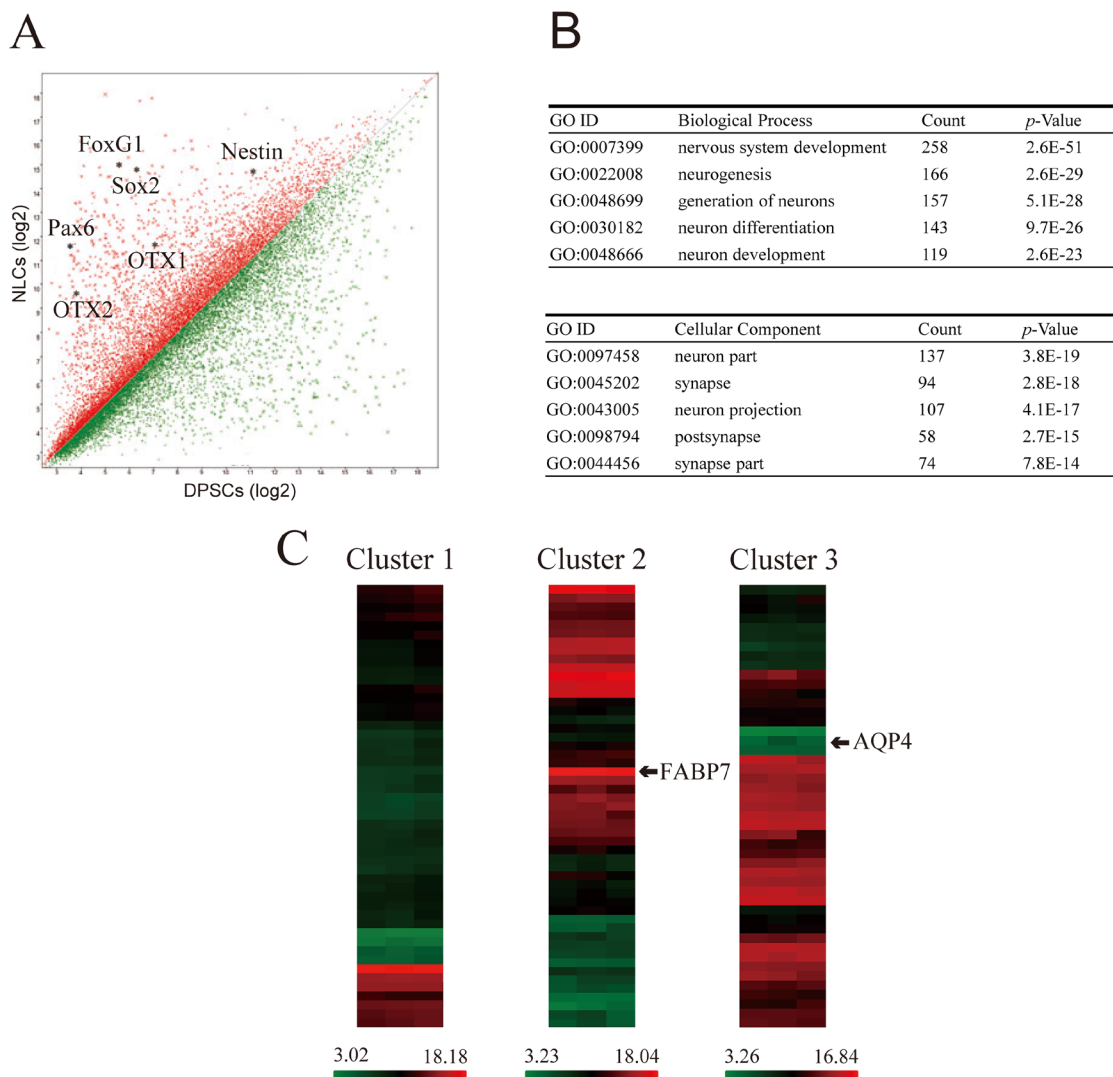


図 5. マイクロアレイ解析

(A) Scatter plot 解析を用いた歯髄幹細胞(DPSCs)と神経系細胞(NLCs)の発現遺伝子の比較. 発生学的初期神経関連マーカー(Pax6, Nestin, Sox2, FoxG1, OTX1/2)を示す.

(B) GO functional 解析. 上位 5 個の神経系細胞で上方制御された GO biological process と cellular component を示す.



(C) GFAP 陽性細胞成熟に関連する 3 つの cluster に、神経系細胞の遺伝子発現を当てはめた. Cluster 1, early pseudo-time; cluster 2, middle pseudo-time; cluster 3, late pseudo-time.

図 6

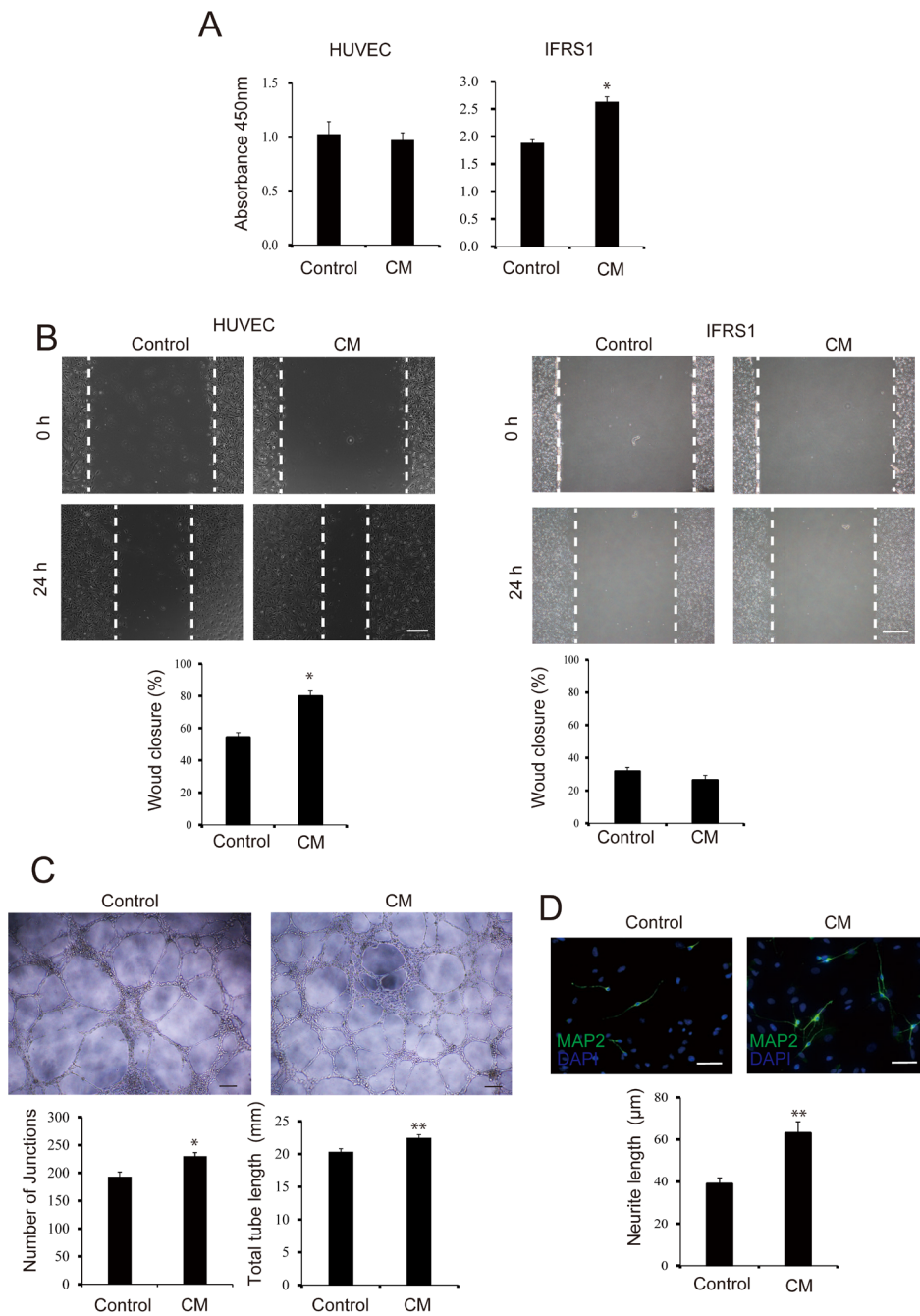


図 6. 神経系細胞培養上清の paracrine 効果

HUVEC, IFRS1, 神経系細胞中の神経細胞を, 10%神経系細胞培養上清を含んだ培養液と negative control 培養液を利用して培養した.

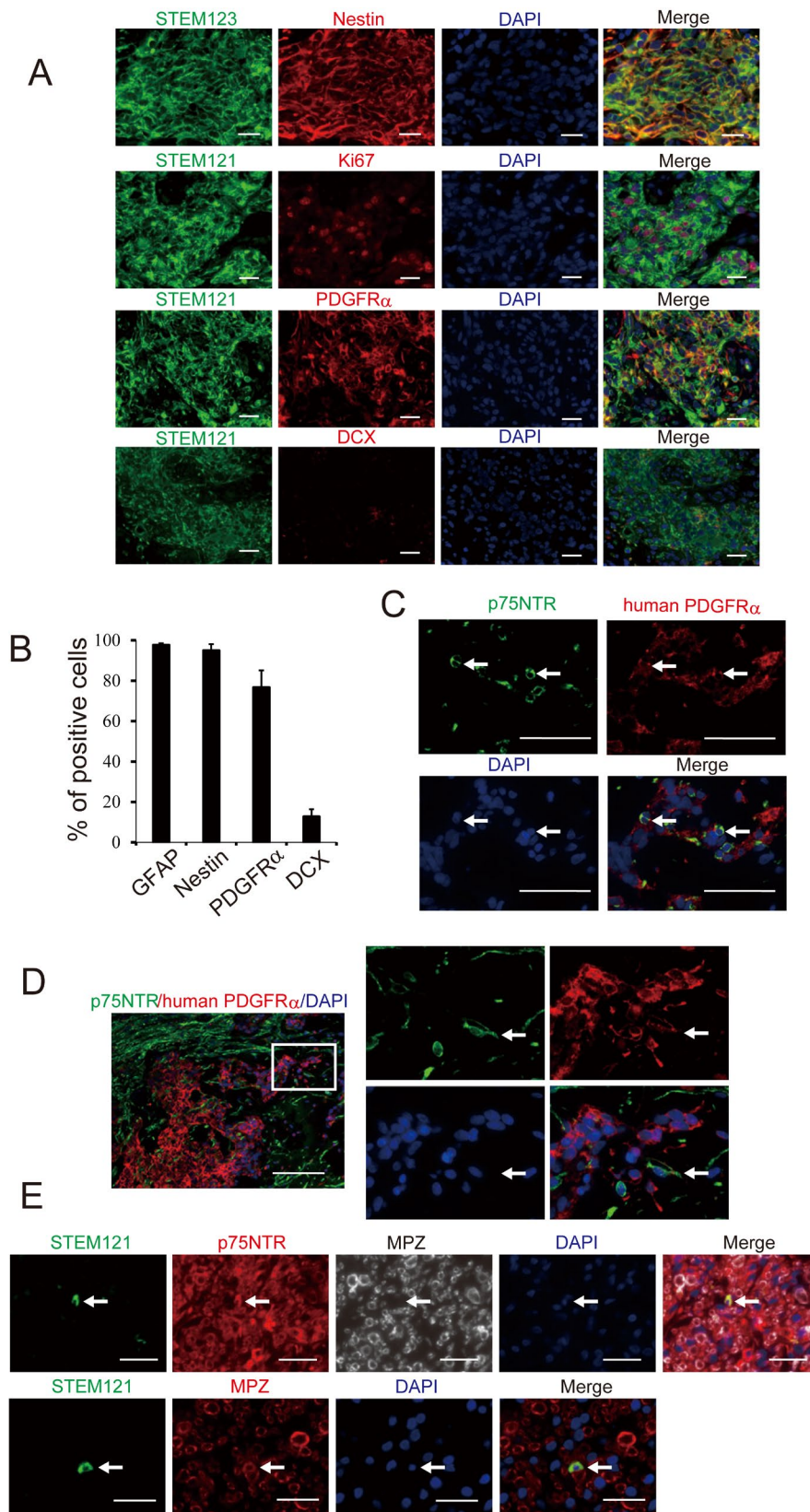
(A) 細胞増殖 assay (OD 450; negative control との比). HUVEC と IFRS1 を 10%培養上清と negative control 培養液で 48 時間培養した(n=3/group).

(B) HUVEC と IFRS1 における 24 時間の 10% 培養上清と negative control 培養液で培養することによって細胞遊走 assay を行った. Scale bar = 400 $\mu$ m. (n=3/group).

(C) HUVEC は 10% 培養上清と negative control 培養液で 9 時間培養された. Scale bar = 100 $\mu$ m (n=3/group).

(D) 神経系細胞を構成する神経細胞で neurite regeneration assay を行った. 10% 培養上清もしくは negative control 培養液で 48 時間培養された. 最も長い神経突起が計測された. (n=3/group). Scale bar = 50 $\mu$ m.

\* $p$ <0.01, \*\* $p$ <0.05.



## 図 7. 神経系細胞の移植後評価

(A) 移植後 2 週, 再生神経部の横断面; 抗 STEM123(ヒト GFAP), 抗 nestin, 抗 STEM121(ヒト細胞質), 抗 Ki67, 抗 PDGFR $\alpha$ 抗体による免疫染色. Scale bar = 20 $\mu$ m.

(B) 移植後 2 週における, 各陽性細胞の定量評価.

(C) 移植後 2 週における, 横断面の抗 p75NTR, 抗 human PDGFR $\alpha$ 抗体による免疫染色. Scale bar = 50 $\mu$ m.

(D) 移植後 2 週における, 縦断面の抗 p75NTR, 抗 human PDGFR $\alpha$ 抗体による免疫染色. 右図は左図の白線内の拡大. Scale bar = 100 $\mu$ m.

(E) 移植後 12 週における, 再生神経部横断面の抗 STEM121, 抗 p75NTR, 抗 MPZ 抗体による免疫染色. ヒト細胞を白矢印で示す. Scale bar = 20 $\mu$ m.

図 8

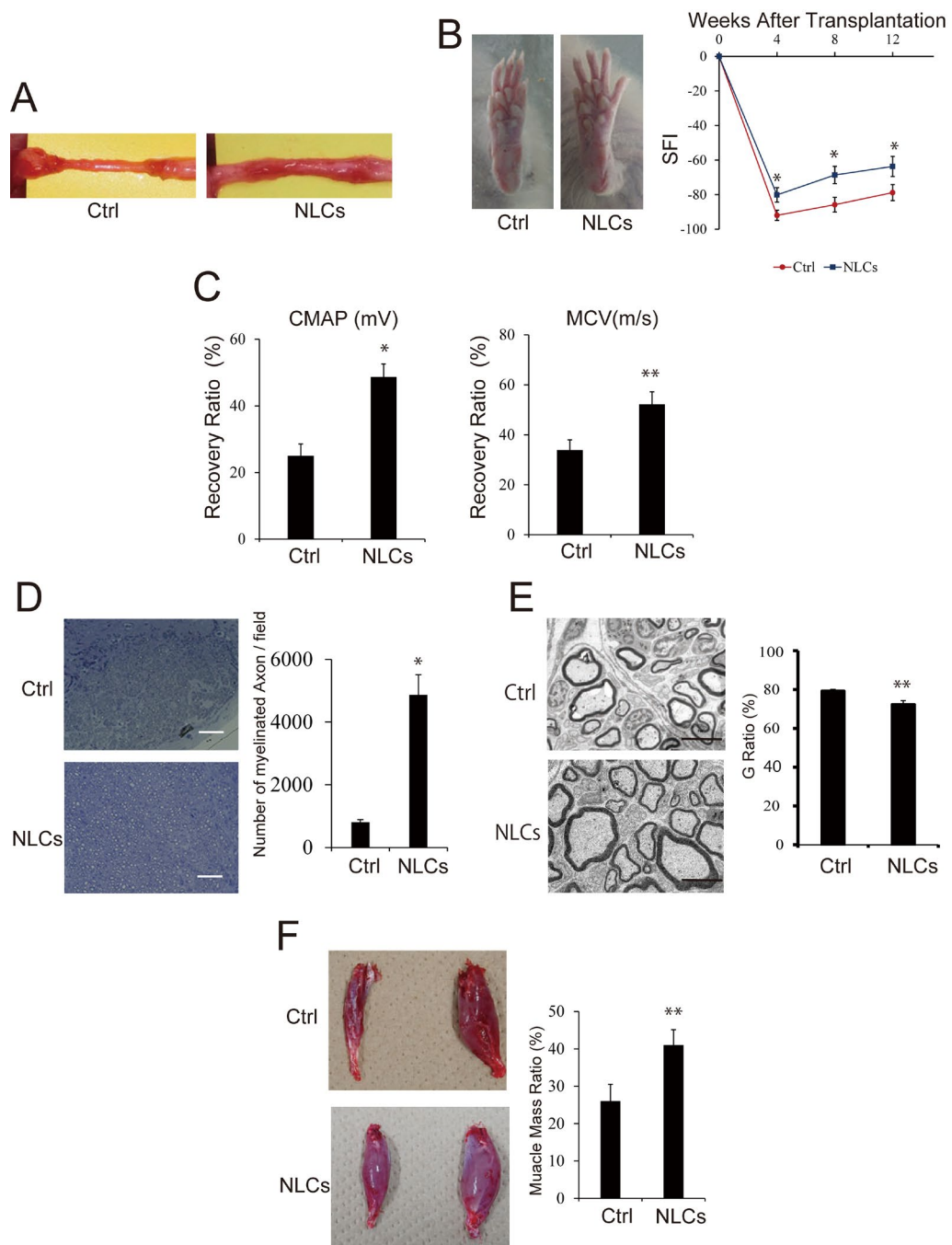


図 8. 神経切断からの回復

(A) 移植後 12 週の再生神経.

(B) 移植後 4, 8, 12 週における坐骨神経機能評価(SFI) (n=6/group).

(C) 移植後 12 週の CMAP, MCV を健側との比較で示す(n=6/group).

(D) 移植後 12 週の神経再生部横断面中央部のトルイジンブルー染色. Scale bar = 50 $\mu$ m (n=6/group).

(E) 移植後 12 週の再生神経部横断面の透過型電子顕微鏡画像. 髄鞘成熟の G ratio 解析. (n=6/group). Scale bar = 5 $\mu$ m.

(F) 移植後 12 週における, 実験側と細胞移植側の腓腹筋画像. 健側と細胞移植側との比較. (n=6/group).

\* $p$ <0.01, \*\* $p$ <0.05

## 7. 謝辞

指導教官である顎口腔外科学 武川寛樹教授には、博士課程の進学から論文執筆に至るまで懇切丁寧なご指導を賜りましたこと心より厚く感謝申し上げます。脳神経外科 臨床再生医療研究室の石川博先生、大山晃弘先生、豊村順子先生、渡邊美穂先生には基礎知識から手技にわたる研究全般の多大なるご指導を賜り心より感謝申し上げます。特に石川博先生には、日々の研究のみならず常に暖かいご助言を賜り心より御礼申し上げます。顎口腔外科学 内田文彦講師には研究だけでなく様々な相談に乗っていただき、多くのありがたいご助言を賜りました。深く感謝申し上げます。当時脳神経外科学の教授で、現在茨城県立医療大学に在籍しておられる松村明学長、また、脳神経外科学 松丸祐司教授、丸島愛樹講師には、研究室に迎え入れてくださり、数々のご指導、ご助力を賜ったこと厚く御礼申し上げます。顎口腔外科学 柳川徹教授、山縣憲司准教授、菅野直美講師には、常に進捗状況を気にしていただき、本研究遂行にあたり多くのご教示、ご助言を頂きました。心より感謝申し上げます。博士課程の同期として様々な実験や考察を共に行った脳神経外科学 松村英明先生には深甚の謝意を表します。電子顕微鏡画像の撮影についてご支援を賜りました東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 基盤研究施設 立花利公教授に深く感謝申し上げます。審査委員として本学位論文作製に多くのご助言を頂きました人見重美教授、佐々木薫講師、鎌田浩史講師、梶和子講師に厚く御礼申し上げます。同意書の取得や抜去歯の採取に関して、歯科口腔外科スタッフの方々に感謝申し上げます。

妻、両親の支えなしには本研究の遂行は成しえませんでした。感謝申し上げます。特に、家族で過ごす時間がない中でも、いつも研究室へ快く送り出してくれた妻・麻里と子供達に心より感謝の意を表して謝辞といたします。



## 出典

本学位論文では *Human Cell*. (doi: 10.1007/s13577-021-00634-9) に掲載された論文の内容を、Springer Nature 社の規定にしたがって再利用している。

## 学会発表

1.

Shohei Takaoka, Hideaki Matsumura, Yosuke Shibao

「Potential of DPSC-derived stem cell therapy;

Peripheral nerve regenerative using DPSC-derived neural bundle」

『Tsukuba Conference 2019』

Tsukuba, 2019.10.2 ~ 10.3

2.

高岡昇平, 内田文彦, 千原佳菜子, 福澤智, 菅野直美, 山縣憲司, 柳川徹,  
石川博, 武川寛樹

「歯髄幹細胞の神経系細胞への分化誘導」

『一般社団法人 日本外傷歯学会 第20回日本外傷歯学会総会・学術大会』

誌上開催, 2020.09.26 ~ 09.27

3.

高岡昇平, 内田文彦, 千原佳菜子, 福澤智, 菅野直美, 山縣憲司, 柳川徹,  
武川寛樹

「歯髄幹細胞由来神経幹/前駆細胞の誘導と末梢神経再生」

『NPO 法人 日本口腔科学会 第75回日本口腔科学会学術集会』

大阪, 2021.05.12 ~ 05.14

優秀ポスター賞受賞

## 引用文献

1. Barati M, Akhondi M, Mousavi NS, et al. Pluripotent Stem Cells: Cancer Study, Therapy, and Vaccination. *Stem Cell Rev Rep*. 2021 Jun 11:1–18.
2. Kern S, Eichler H, Stoeve J, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006 May;24(5):1294-301.
3. Chai Y, Jiang XJ, Ito Y, et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*. 2000;127(8):1671–1679.
4. Al Madhoun A, Sindhu S, Haddad D, et al. Dental Pulp Stem Cells Derived From Adult Human Third Molar Tooth: A Brief Review. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Oct 12;9:717624.
5. Yoshida S, Tomokiyo A, Hasegawa D, Hamano S, Sugii H, Maeda H. Insight into the Role of Dental Pulp Stem Cells in Regenerative Therapy. *Biology (Basel)*. 2020 Jul 9;9(7):160.
6. Alge DL, Zhou D, Adams LL, 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*. 2010 Jan;4(1):73-81.
7. Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, et al., Human Dental Pulp-Derived Stem Cells Promote Locomotor Recovery After Complete Transection of Rat Spinal Cord by Multiple Neuro-Regenerative Mechanisms. *J Clin Invest*. 2011;122(1):80–90.
8. Nieto MA. The early steps of neural crest development. *Mech Dev*. 2001;105(1-2):27-35.
9. Woodhoo A, Sommer L. Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve. *Glia*. 2008 Nov 1;56(14):1481-90.

10. Liu CY, Yang Y, Ju WN, et al. Emerging Roles of Astrocytes in Neuro-Vascular Unit and the Tripartite Synapse With Emphasis on Reactive Gliosis in the Context of Alzheimer's Disease. *Front Cell Neurosci.* 2018;10:193.
11. Zahr SK, Kaplan DR, Miller FD. Translating neural stem cells to neurons in the mammalian brain. *Cell Death Differ.* 2019 Dec;26(12):2495-2512.
12. Min Q, Parkinson DB, Dun XP. Migrating Schwann cells direct axon regeneration within the peripheral nerve bridge. *Glia.* 2021 Feb;69(2):235-254.
13. de Ruitter GC, Malessy MJ, Yaszemski MJ, et al. Designing ideal conduits for peripheral nerve repair. *Neurosurg Focus.* 2009 Feb;26(2):E5.
14. Wang C, Lu CF, Peng J, et al. Roles of neural stem cells in repair of peripheral nerve injury. *Neural Regen Res.* 2017;12(12):2106-2112.
15. Kim S, Lee J, Lee DY, et al. Schwann cell precursors from human pluripotent stem cells as a potential therapeutic target for myelin repair. *Stem Cell Rep.* 2017;8(6):1714–26.
16. Murakami T, Fujimoto Y, Yasunaga Y, et al. Transplanted Neuronal Progenitor Cells in a Peripheral Nerve Gap Promote Nerve Repair. *Brain Res.* 2003;974(1-2):17–24.
17. Askari N, Yaghoobi MM, Shamsara M, et al. Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate into Oligodendrocyte Progenitors Using the Expression of Olig2 Transcription Factor. *Cells Tissues Organs.* 2014;200(2):93-103.
18. Mi R, Shinn D, Li Y, et al. Oligodendrocyte Precursors Gain Schwann Cell-Like Phenotype and Remyelinate Axons upon Engraftment into Peripheral Nerves. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;13(10):1854–60.
19. Mothe AJ, Tator CH. Review of transplantation of neural stem/progenitor cells for

- spinal cord injury. *Int J Dev Neurosci*. 2013;31(7):701–713.
20. Lee ST, Chu K, Park HK, et al. New concept of neural stem cell transplantation: anti-inflammatory role. *Int J Stem Cells*. 2008;1(1):36–42.
  21. Yang H, Wang C, Chen H, et al. Neural stem cell-conditioned medium ameliorated cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Stem Cells Int*. 2018;4659159.
  22. Sareen D, Gowing G, Sahabian A, et al. Human induced pluripotent stem cells are a novel source of neural progenitor cells (iNPCs) that migrate and integrate in the rodent spinal cord. *J Comp Neurol*. 2014;522(12):2707–2728.
  23. Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, et al. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2001;19(12):1134–1140.
  24. Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, et al. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2001;19(12):1129–1133.
  25. Takahashi H, Ishikawa H, Tanaka A. Regenerative Medicine for Parkinson's Disease Using Differentiated Nerve Cells Derived from Human Buccal Fat Stem Cells'. *Hum Cell*. 2017;30(2):60–71.
  26. Sloan SA, Darmanis S, Huber N, et al. Human astrocyte maturation captured in 3D cerebral cortical spheroids derived from pluripotent stem cell. *Neuron*. 2017;95(4):779–790.e6.
  27. Galiakberova AA, Dashinimaev EB. Neural stem cells and methods for their generation from induced pluripotent stem cells in vitro. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:815.

28. Fu L, Zhu L, Huang Y, et al. Derivation of neural stem cells from mesenchymal stem cells: evidence for a bipotential stem cell population. *Stem Cells Dev.* 2008;17(6):1109–1121.
29. Peng C, Lu L, Li Y, et al. ‘Neurospheres Induced from Human Adipo-Derived Stem Cells as a New Source of Neural Progenitor Cells’. *Cell Transplant.* 2019;28(1):66S–75S.
30. Meijer M, Rehbach K, Brunner JW, et al. A Single-Cell Model for Synaptic Transmission and Plasticity in Human iPSC-Derived Neurons. *Cell Rep.* 2019;27(7):2199–2211.e6.
31. Kogo Y, Seto C, Totani Y, et al. Rapid Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells to Neuron-Like Cells by High K<sup>+</sup> Stimulation. *Biophys Physicobiol.* 2020;17:132–139.
32. Marrelli M, Paduano F, Tatullo M. Human periapical cyst-mesenchymal stem cells differentiate into neuronal cells. *J Dent Res.* 2015;94(6):843–852.
33. Chang CC, Chang KC, Tsai SJ, et al. Neurogenic differentiation of dental pulp stem cells to neuron-like cells in dopaminergic and motor neuronal inductive media. *J Formos Med Assoc.* 2014;113(12):956–965.
34. Gao S, Guo X, Zhao S, et al. Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into Neuron/Motoneuron-Like Cells for Cell Replacement Therapy of Spinal Cord Injury. *Cell Death Dis.* 2019;10(8):597.
35. Jelítai M, Anderová M, Chvátal A, et al. Electrophysiological characterization of neural stem/progenitor cells during in vitro differentiation: study with an immortalized neuroectodermal cell line. *J Neurosci Res.* 2007;85(8):1606–1617.

36. Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, et al. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: State of the science at the art. *Angiogenesis*. 2009;12(3):267–274.
37. Martens W, Sanen K, Georgiou M, et al. Human dental pulp stem cells can differentiate into Schwann cells and promote and guide neurite outgrowth in an aligned tissue-engineered collagen construct *in vitro*. *FASEB J*. 2014;28(4):1634–1643.
38. Lange J, Haslett LJ, Lloyd-Evans E, et al. Compromised astrocyte function and survival negatively impact neurons in infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Acta Neuropathol Commun*. 2018;6(1):74.
39. Inserra MM, Bloch DA, Terris DJ. Functional indices for sciatic, peroneal, and posteriotibial nerve lesions in the mouse. *Microsurgery*. 1998;18(2):119–124.
40. Lepore AC, O'Donnell J, Kim AS, et al. Human glial-restricted progenitor transplantation into cervical spinal cord of the SOD1 mouse model of ALS. *PLOS ONE*. 2011;6(10):e25968.
41. Guo AC, Chu T, Liu XQ, et al. Reactivated astrocytes as a possible source of oligodendrocyte precursors for remyelination in remitting phase of experimental autoimmune encephalomyelitis rats. *Am J Transl Res*. 2016; 8(12):5637-5645.
42. Assinck P, Duncan GJ, Plemel JR, et al. Myelinogenic plasticity of oligodendrocyte precursor cells following spinal cord contusion injury. *J Neurosci*. 2017;37(36):8635–8654.
43. Bartus K, Burnside ER, Galino J, et al. ErbB Receptor Signaling Directly Controls Oligodendrocyte Progenitor Cell Transformation and Spontaneous Remyelination After Spinal Cord Injury. *Glia*. 2019; 67(6):1036–1046.
44. Kegler K, Spitzbarth I, Imbschweiler I, et al. Contribution of Schwann Cells to Remyelination in a Naturally Occurring Canine Model of CNS Neuroinflammation. *PLOS ONE*. 2015;10(7):e0133916.

45. Imbschweiler I, Seehusen F, Peck CT, et al. Increased p75 Neurotrophin Receptor Expression in the Canine Distemper Virus Model of Multiple Sclerosis Identifies Aldynoglia Schwann Cells That Emerge in Response to Axonal Damage. *Glia*. 2012;60(3):358–371.
46. Maed B, Logan A, Berry M, et al. Paracrine-mediated neuroprotection and neuritogenesis of axotomised retinal ganglion cells by human dental pulp stem cells: comparison with human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *PLOS ONE*. 2014;9(10):e109305.
47. Sultan N, Amin LE, Zaher AR, et al. Dental Pulp Stem Cells: Novel Cell-Based and Cell-Free Therapy for Peripheral Nerve Repair. *World J Stomatol*, 2019;7(1):1–19.
48. Wang DR, Wang YH, Pan J, et al. Neurotrophic effects of dental pulp stem cells in repair of peripheral nerve after crush injury. *World J Stem Cells*. 2020;12(10):1196-1213.
49. Martens W, Sanen K, Georgiou M, et al. Human Dental Pulp Stem Cells Can Differentiate into Schwann Cells and Promote and Guide Neurite Outgrowth in an Aligned Tissue-Engineered Collagen Construct *In Vitro*. *FASEB J*. 2014;28(4):1634–1643.
50. Hei WH, Kim S, Park JC, et al. Schwann-Like Cells Differentiated from Human Dental Pulp Stem Cells Combined with a Pulsed Electromagnetic Field Can Improve Peripheral Nerve Regeneration?. *Bioelectromagnetics*, 2016;37(3):163-174.
51. Sanen K, Martens W, Georgiou M, et al. Engineered neural tissue with Schwann cell differentiated human dental pulp stem cells: potential for peripheral nerve repair? *J Tissue Eng Regen Med*. 2017;11(12):3362–3372.



52. Carnevale G, Pisciotta A, Riccio M, et al. Human dental pulp stem cells expressing STRO-1, c-kit and CD34 markers in peripheral nerve regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12(2):e774–e785.
53. Xia G, Ji P, Rutgeerts O, Waer M. Natural killer cell- and macrophage mediated discordant guinea pig-->rat xenograft rejection in the absence of complement, xenoantibody and T cell immunity. *Transplantation.* 2000;70(1):86–93.
54. Wang A, Tang Z, Park IH, et al. Induced Pluripotent Stem Cells for Neural Tissue Engineering, *Biomaterials.* 2011;32(22):5023–5032.
55. Pruszek J, Ludwig W, Blak A, et al. CD15, CD24, and CD29 define a surface biomarker code for neural lineage differentiation of stem cells. *Stem Cells* 27:2928-40,2009.
56. Bung R, Wörsdörfer P, Thier MC, et al. Partial Dedifferentiation of Murine Radial Glia-Type Neural Stem Cells by Brn2 and c-Myc Yields Early Neuroepithelial Progenitors. *J Mol Biol* 428:1476-83,2016.