

ヒト脱落乳歯や親知らずから採取した歯髄幹細胞^{*1}による新しい脊髄損傷^{*2}治療の可能性

ポイント

- 完全に切断したラット脊髄に歯髄幹細胞を移植すると下肢運動機能が回復することを明らかにしました。骨髄幹細胞や線維芽細胞を移植しても下肢運動機能は回復しません。
- 歯髄幹細胞の治療効果を担う3つの神経再生メカニズムを解明しました（下記参照）。このうち2つは歯髄幹細胞に特異的であり、他の幹細胞では観察されていない新しい治療効果でした。歯髄幹細胞は他の成体幹細胞にない神経再生効果を発揮することを見いだしました。
- 移植した歯髄幹細胞による腫瘍形成は観察されませんでした。ヒト歯髄幹細胞は移植安全性が高く、卓越した神経再生能力を発揮する成体幹細胞であることが明らかとなりました。

背景

脊髄損傷の病態は複雑です。外傷などによる一次損傷は、神経伝達物質や炎症性サイトカインの異常放出を引き起こします。これらがより広範囲な脊髄細胞のアポトーシスやネクローシス死(二次損傷)を誘発します。損傷部位に集積したアストロサイトは細胞外基質を産生し、損傷部位を囲い込むようにグリア瘢痕^{*3}を形成します。グリア瘢痕は炎症性因子や神経伝達物質の拡散を防ぐ「生体防御システム」として機能しますが他方、再生しようとする脊髄神経細胞の神経軸索伸張を阻害し中枢神経の再生を妨げてしまうのです。急性期の脊髄損傷では、これら多様なファクターが複雑に絡み合うことによって不可逆的な機能不全が引き起こされてしまいます。この多面的な病態の改善に有効な治療法は未だ開発されていません（図1参照）。

近年、脊髄損傷の多面的病態に有効な新しい治療法として、幹細胞移植による治療が注目を集めています。これまでの研究でヒトES細胞、iPS細胞、骨髄間葉系幹細胞などの治療効果が脊髄損傷の動物モデルをもちいて解析されてきました。これらの細胞は、失われた細胞を補給する効果と、細胞から分泌される再生因子によって治療効果を発揮すると考えられています。しかし分泌因子は多様であり、その再生メカニズムの実態は多くが不明のままです。また、実用化に関しては倫理面や移植安全性、移植細胞の低い生着効率、治療効果の曖昧性、幹細胞採取における激しい生体侵襲など多くの問題を抱えているのが現状です。これらの問題点をクリアーしうる新しい幹細胞ソースの開発が期待されているのです。

ヒトの歯髄組織は歯の内部空洞（歯髄腔）を満たす軟組織であり、神経・血管・結合組織、象牙質の栄養や修復をになう象牙芽細胞などで構成されています。歯髄組織は胎生期の頭部神経外胚葉から分化した神経堤細胞に由来すると考えられています。もともと神経系の細胞であったため神経再生治療に有用である可能性が高いと考えられていました。しかしながら、特定の神経疾患に対する歯髄幹細胞の治療効果は多くが不明のままです。今回、研究グループは脊髄損傷などの中枢神経損傷疾患に対する歯髄幹細胞治療効果を検証しました。

研究の内容

〔要旨〕

脊髄損傷は重篤な機能障害をもたらします。その病態は複雑であり有効な治療法が開発されていません。名古屋大学医学系研究科（研究科長・祖父江元）の顎顔面外科学・大学院生・酒井陽、山本朗仁准教授、上田実教授らの研究グループは、医療廃棄物であるヒト脱落乳歯や抜去した親知らずから採取した歯髄幹細胞による新しい脊髄損傷治療の可能性を見いだしました。さらに歯髄幹細胞が3つの再生メカニズムを発揮することで中枢神経を再生することを明らかにしました。本研究

成果は米国臨床研究学会誌 The Journal of Clinical Investigation の電子版に 12 月 1 日（米国東部時間）発表されます。

研究グループは、完全に切断したラット脊髄に歯髄幹細胞を移植すると下肢運動機能が回復することを見いだしました。移植した歯髄幹細胞は、（１）神経保護効果：神経損傷に伴う脊髄細胞の死を効率に抑制します。（２）抗-軸索伸張抑制因子効果：中枢神経の損傷部位にはグリア瘢痕が形成されます。グリア瘢痕は、神経軸索の伸張や再生を抑制する様々な分子を産生し神経再生を抑制します。歯髄幹細胞から分泌される因子は、グリア瘢痕由来の軸索伸張抑制分子の効果を抑制し脊髄神経の再生を促します。（３）細胞補給効果：中枢神経では軸索を覆う髄鞘によって神経伝達速度が維持されていますが、神経損傷によってこの髄鞘^{*4}を形成する細胞（オリゴデンドロサイト）^{*5}が消失します。脊髄損傷部位に移植した歯髄幹細胞は、オリゴデンドロサイトに特異的に分化し髄鞘の再生に貢献します。特筆すべき点は、治療効果（２）および（３）は他の成体幹細胞では報告のない、歯髄幹細胞に特異的な神経再生能力であったことです。実際、歯髄幹細胞移植による下肢運動機能の回復効果は、骨髓由来の幹細胞より強力であることが明らかとなっています。さらに、歯髄幹細胞は不要となった組織から採取可能であるため幹細胞採取による生体侵襲は無視できるほどです。またラット脊髄に移植した歯髄幹細胞の腫瘍形成能は検出されませんでした。本研究成果は有効な治療法のない脊髄損傷の治療に新しい可能性を提供するだけでなく、医療廃棄物の有効利用に道を開く画期的な研究成果です。

[研究成果]

（１）ヒト歯髄幹細胞

名古屋大学大学院医学系研究科及び医学部附属病院生命倫理審査委員会の承認を得たのち、同附属病院口腔外科や関連病院の外来に受診した患者さんの同意を得て、脱落乳歯や親知らず永久歯を提供していただきました。提供を受けた複数の歯から歯髄幹細胞を採取しました。どの歯髄幹細胞も骨髓由来の間葉系幹細胞に較べて 3 倍程度高い細胞増殖能を示しました。さらにマーカー発現や分化能の解析によって、歯髄幹細胞が神経外胚葉と中胚葉の性格を兼ね備えた幹細胞であることを見いだしました。

（２）ラット完全切断型脊髄損傷モデルへの移植と、脊髄損傷環境での細胞生着・分化能の検証

ラット（生後 12 週）の胸部脊髄を完全切断・離断することで重度の脊髄損傷モデルを製作しました。当然、ラットは下肢運動機能を完全に喪失します。切断部周囲と切断面にヒト歯髄幹細胞を移植すると、移植後 8 週間で下肢 3 関節を回転させて歩行できるまでに回復しました。骨髓由来の間葉系幹細胞や皮膚線維芽細胞を移植したラットは歩行できませんでした。移植した歯髄幹細胞の 30%以上が生着し、その 90%程度が成熟型オリゴデンドロサイトに分化し髄鞘の再生に寄与することを見いだしました（図 2、3 参照）。

（３）歯髄幹細胞由来のパラクライン因子による神経再生

歯髄幹細胞は、以下の二つの特筆すべきパラクライン効果を発揮することが明らかになりました。

[アポトーシス抑制効果] 神経損傷では受傷後 24 時間で多くの神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトがアポトーシスで消失します。これが損傷後の神経線維や髄鞘の広範な破壊を引き起こす主たる原因です。歯髄幹細胞はこれら全てのアポトーシスを強力に抑制します。アポトーシス細胞の総数は歯髄幹細胞移植によって 10 分の 1 以下に減ることを見いだしました（図 4 参

照)。

〔抗-神経軸索伸長抑制因子効果〕ラットの大脳皮質運動野に順行性トレーサーを注入した後、2週間後に屠殺、トレーサーでラベルされた大脳皮質脊髄路の神経軸索を組織化学的に検出しました。歯髄幹細胞を移植した脊髄では、切断された軸索が切断面を越えて尾側脊髄に再生・伸長していました(図5参照)。さらに注目すべき点は、損傷部周囲の頭側グリア瘢痕内に大量の神経線維が侵入していることです(▼)。コントロール群では、頭側グリア瘢痕内に神経軸索が侵入できません。軸索が切断面を越えることもありません。歯髄幹細胞は損傷した脊髄の再生を促す組織環境を作り出すことがわかりました。

グリア瘢痕の主成分であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)は、軸索伸長抑制因子として機能することが知られています。歯髄幹細胞から分泌される未知の神経再生因子と CSPG との直接的な関わり合いを試験管の中で検証しました。ラット小脳から採取した神経細胞を培養すると神経突起をのびします。CSPG をコーティングした培養皿の上では突起を伸ばすことができません。驚くべきことに歯髄幹細胞の無血清培養上清を加えると神経細胞の突起伸張が回復することを見いだしました。重要な点は、骨髄間葉系幹細胞や皮膚線維芽細胞の培養上清にはこの効果が検出できないことです(図6参照)。

成果の意義

本研究の解析結果は、脊髄損傷環境下に移植した歯髄幹細胞が多面的な治療効果を発揮して機能回復を促したことを裏付けています。重要なことに、移植した歯髄幹細胞の腫瘍形成は観察されませんでした。移植安全性の高い歯髄幹細胞は医療廃棄物から採取可能であり、医療応用における倫理的ハードルも低いものと考えられます。本研究によって、歯髄幹細胞が他の幹細胞と異なった強力な神経再生能力を持つ、優れた神経再生治療用の成体幹細胞であることが明らかとなりました。今後、前臨床研究として霊長類であるサルの脊髄損傷モデルへの移植実験を準備しています。これらの解析で治療効果と移植安全性が明らかとなれば、現在有効な治療法がない脊髄損傷治療における新たな戦略の樹立へとつながると期待されます。

用語説明

- * 1、歯髄幹細胞：歯の内部空洞（歯髄腔）を満たす歯髄組織を採取し、コラゲナーゼ等の酵素処理にて細胞成分を分離する。これを細胞培養皿に播種すると細胞コロニーを形成する。高い増殖能が特徴であり、細胞採取から半月程度の培養で、ラット脊髄損傷の治療に要する細胞数が確保できる。一ヶ月もあれば10匹以上の脊髄損傷ラットを治療できる細胞数が確保可能。また、高い分化能を示すことでも注目されている。試験管内で骨、軟骨、脂肪、血管内皮、神経、神経膠細胞にも分化誘導できる。
- * 2、脊髄損傷：脊柱に対する強い外力によって、内部神経組織である脊髄が損傷をうける。また、脊髄内の神経腫瘍やヘルニアなどによる局所的な外圧の亢進によっても同様な病態が観察される。中枢神経系は末梢神経と異なり、一度損傷すると修復・再生されることは無く、決定的治療法は未だ存在しない。
- * 3、グリア瘢痕：損傷した中枢神経組織に集積した反応性アストロサイトによって損傷部位の周囲に高密度の瘢痕組織が形成される。グリア瘢痕は脊髄損傷によって引き起こされた神経炎

症の拡大を封じ込める生体防御機構として重要な役割を果たす。しかしその主成分であるプロテオグリカンには神経軸索の伸張を抑制する神経再生阻害因子としても機能する。

- * 4、髄鞘：脊椎動物の多くのニューロンの軸索の周りに存在する絶縁性のリン脂質の層を指す。ミエリン鞘とも言う。絶縁性の髄鞘で軸索が覆われることにより神経パルスの電導を高速にする機能がある。
- * 5、オリゴデンドロサイト：希突起膠細胞・乏突起膠細胞・稀突起膠細胞とも呼ばれる。中枢神経系に存在するグリア細胞で、軸索に巻きついて髄鞘を形成および巻きついた神経細胞の維持と栄養補給の機能を持つ。ひとつのオリゴデンドロサイトは数本の突起を伸ばし、それぞれの突起が異なる神経細胞の髄鞘となることが知られている。

論文名

Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms.

Kiyoshi Sakai, Akihito Yamamoto*, Kohki Matsubara, Shoko Nakamura, Mami Naruse, Mari Yamagata, Kazuma Sakamoto, Ryoji Tauchi, Norimitsu Wakao, Shiro Imagama, Hideharu Hibi, Kenji Kadomatsu, Naoki Ishiguro, Minoru Ueda. (*Corresponding author)

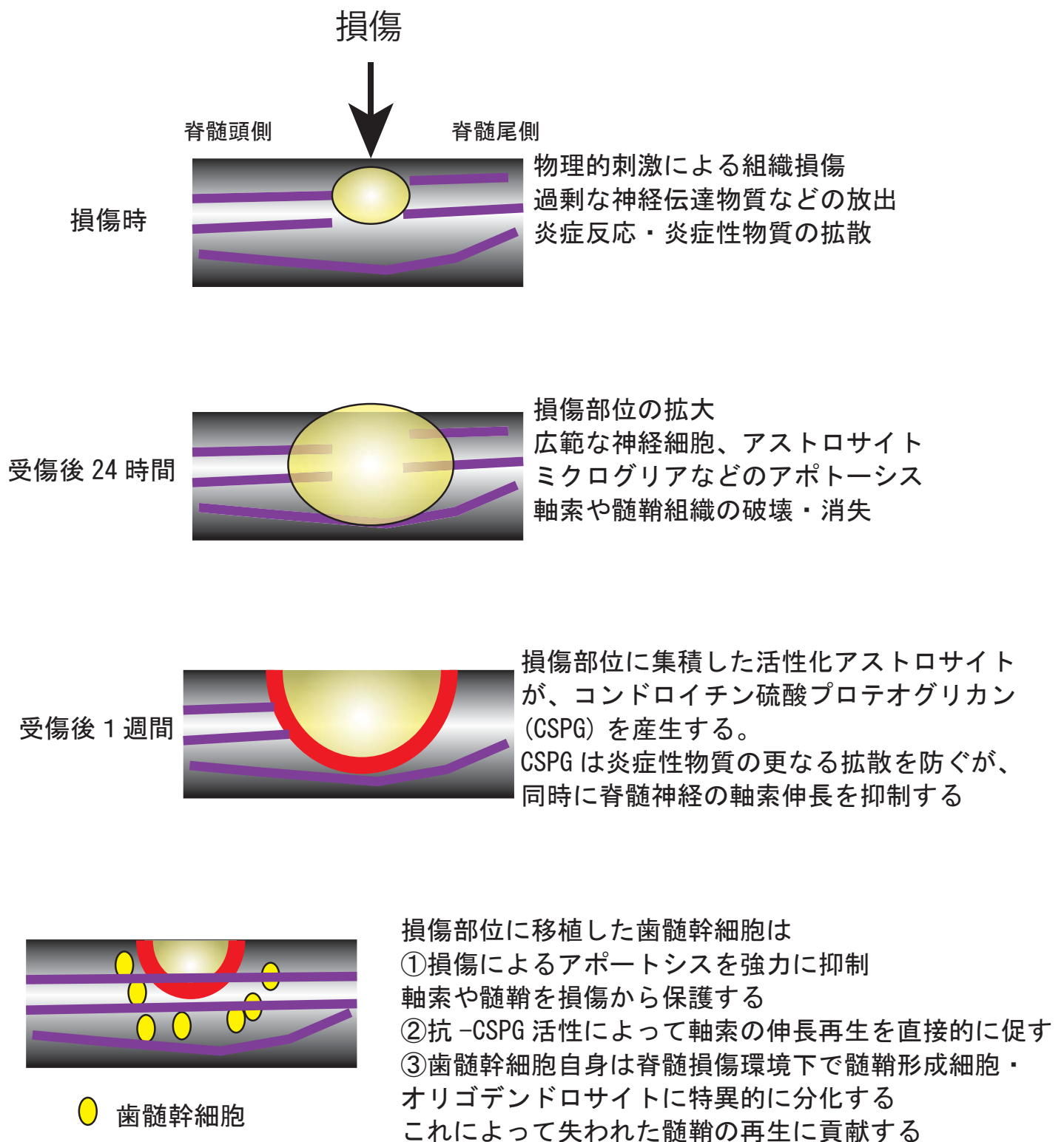
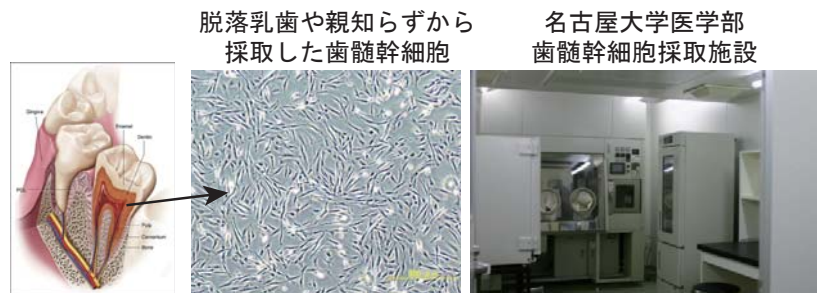
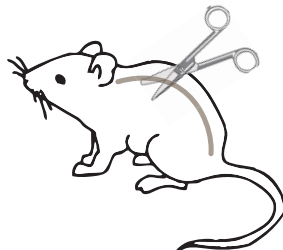


図 1 脊髓損傷の複雑な病態と歯髄幹細胞の治療効果



ラット脊髄完全切断

歯髄幹細胞、骨髄幹細胞、線維芽細胞を移植



骨髄幹細胞移植群や
線維芽細胞移植群は歩行できない

脱落乳歯や親知らずから採取した
歯髄幹細胞移植群は歩行機能が回復する

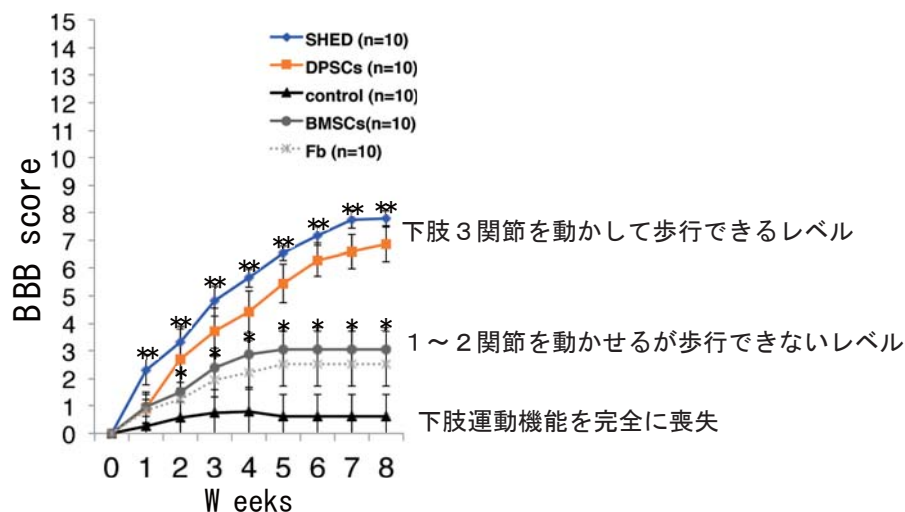
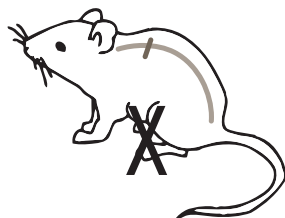


図2 完全に切断したラット脊髄に歯髄幹細胞を移植すると下肢運動機能が回復する
成体ラット（生後12週）の胸部脊髄を完全切断・離断することで重度の脊髄損傷モデルを製作した。
ラットは下肢運動機能を完全に喪失する。切断部周囲と切断面に100万個のヒト歯髄幹細胞を移植すると、
移植後8週間で下肢3関節を回転させて歩行できるまでに回復する。骨髄由来の間葉系幹細胞や皮膚線維
芽細胞を移植したラットは歩行できない。

髄鞘染色

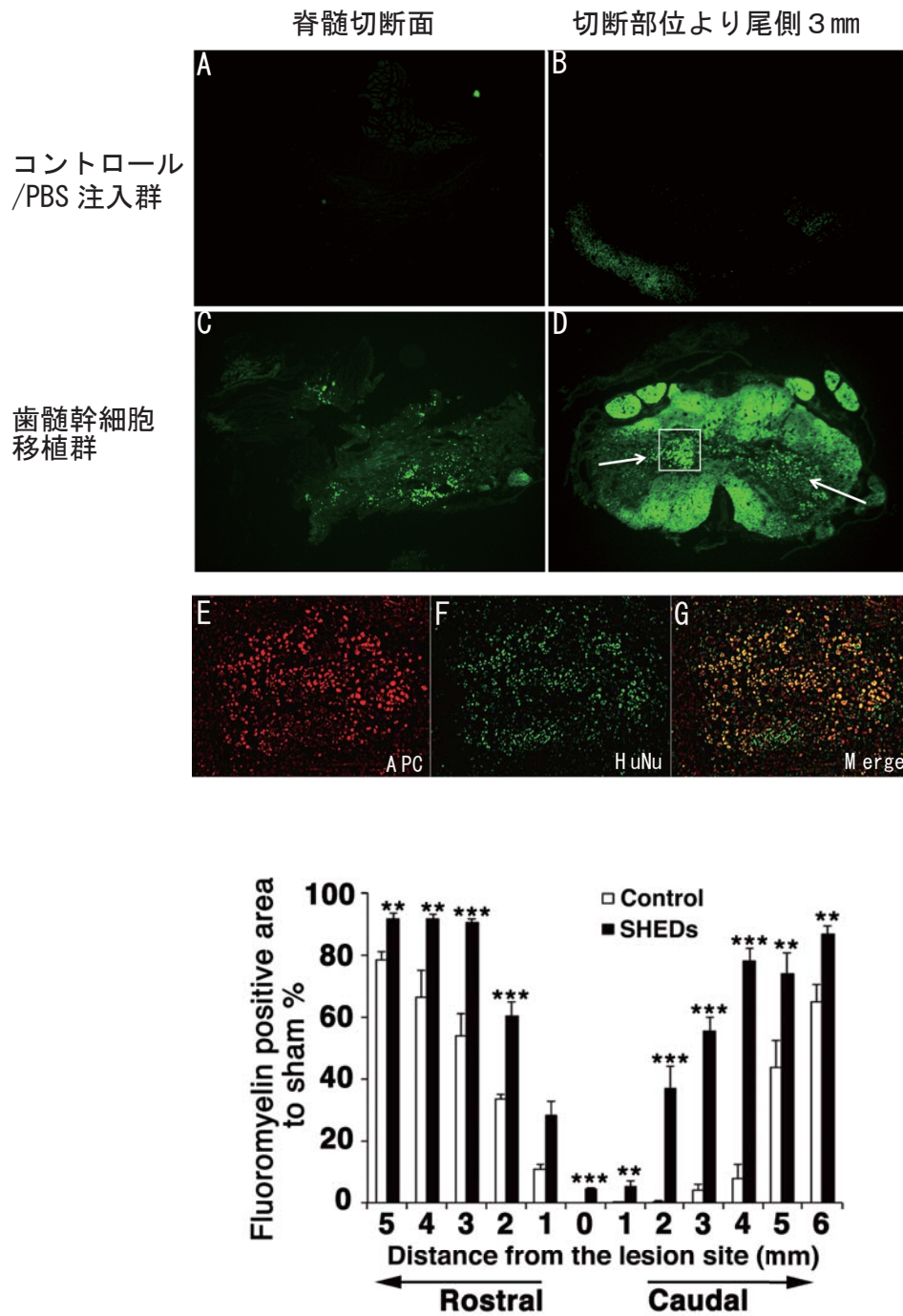


図3 歯髄幹細胞移植は脊髄切断による髄鞘の消失を防ぐ。脊髄損傷環境下に移植した歯髄幹細胞は髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトに分化する。

(A, B) 脊髄を完全切断した損傷部のミエリン染色。(C, D) 乳歯歯髄幹細胞 (SHED) の移植による髄鞘維持効果。髄質内のミエリンシグナル強陽性細胞群 (白四角内) は、成熟型オリゴデンドロサイトマーカーAPC (E) と抗ヒト細胞核抗体 (F) 共陽性な、オリゴデンドロサイトに分化したSHEDである。

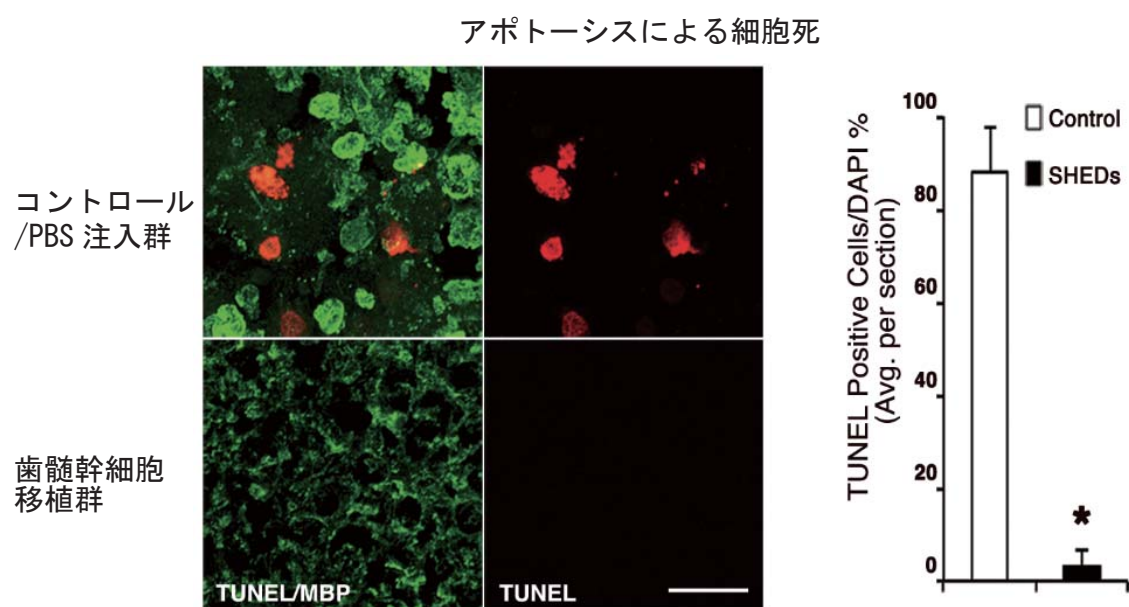
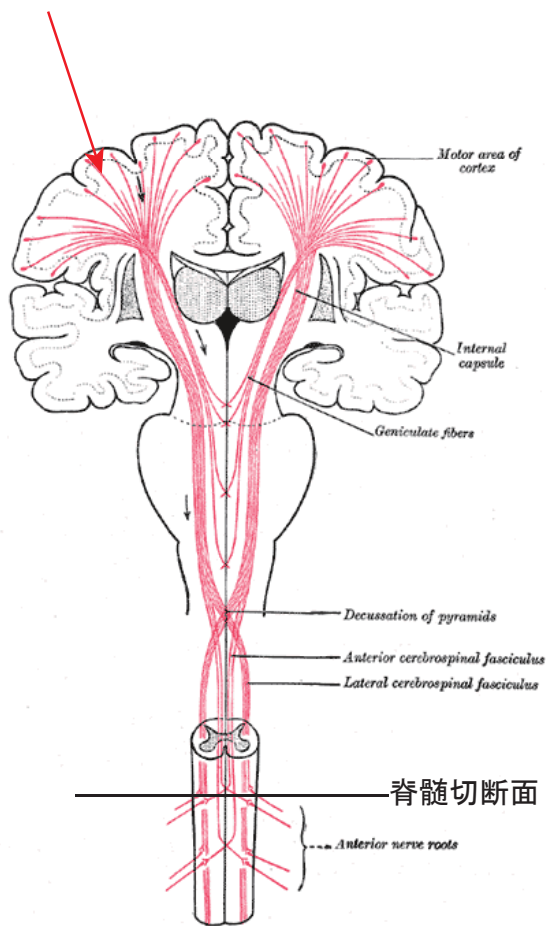


図4 歯髄幹細胞による脊髄損傷のアポトーシス制御
神経損傷では受傷後24時間で多くの神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトがアポトーシスで消失する。歯髄幹細胞はこれら全てのアポトーシスを強力に抑制する。アポトーシス細胞の総数は歯髄幹細胞移植によって10分の1以下に減少する。

順行性 BDA トレーサーを大脳運動野に注入



中枢神経損傷によるグリア瘢痕領域

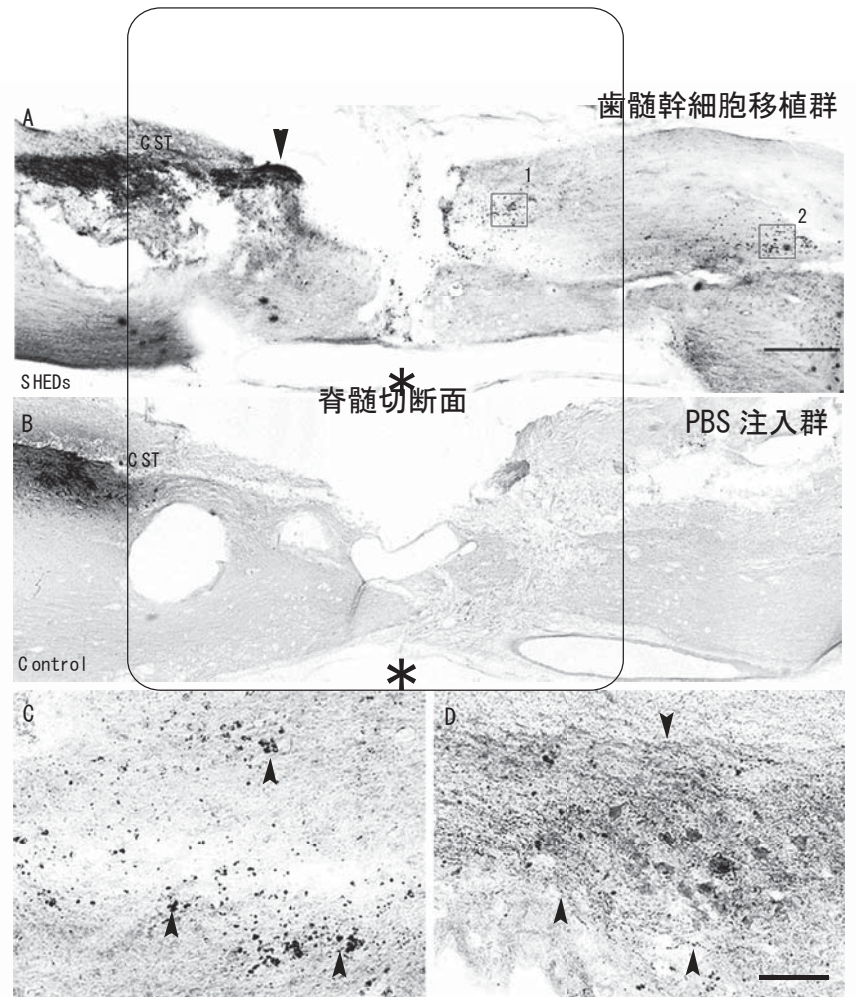
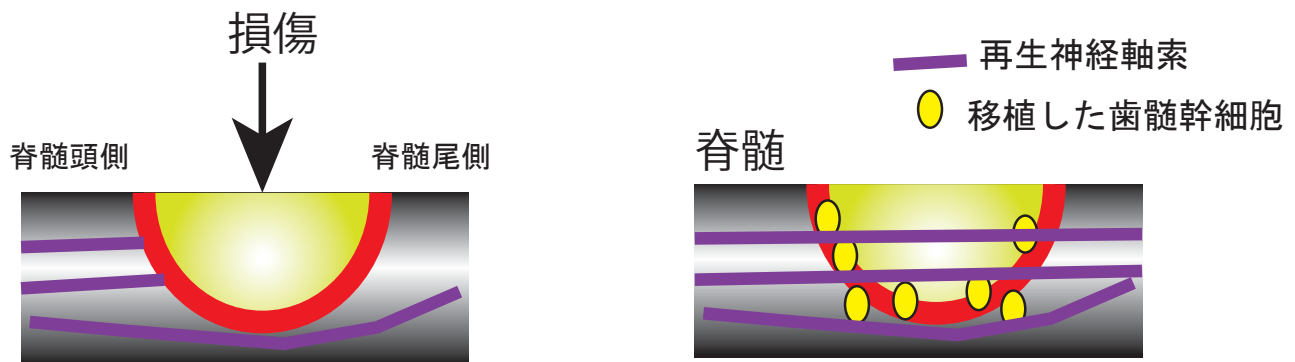


図5 大脳皮質脊髄路の組織化学的検出

歯髄幹細胞を移植した脊髄では、切断された軸索が切断面を越えて尾側脊髄に伸長していた。特に、グリア瘢痕内で激しい軸索の再生が検出された。(▼)



損傷部位に集積した活性化アストロサイトが産生する
コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) が脊髄神経の軸索伸長を抑制する

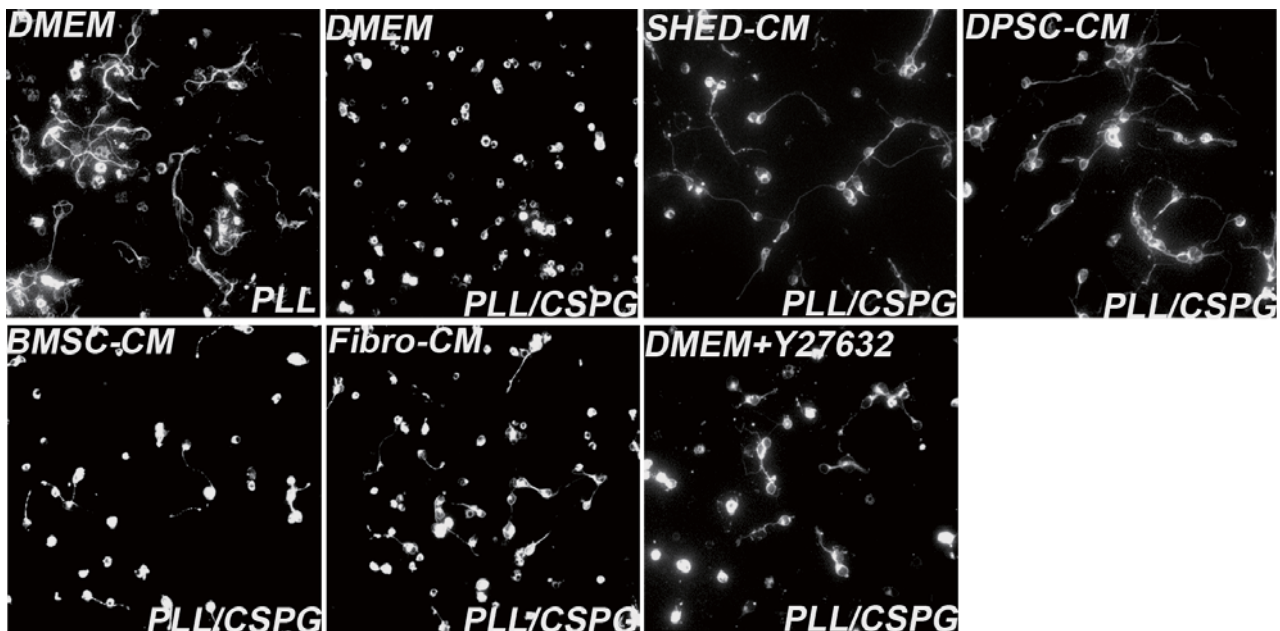


図6 歯髄幹細胞の抗-神経軸索伸長阻害因子効果

神経細胞はプロテオグリカン（グリア瘢痕の主成分）の上で培養すると神経突起をのばすことができない。しかしながら歯髄幹細胞の無血清培養上清を加えると突起伸張が回復する。骨髄間葉系幹細胞や皮膚線維芽細胞の培養上清にはこの効果がない。