

主論文の要旨

**Dopaminergic differentiation of stem cells from
human deciduous teeth and their therapeutic
benefits for Parkinsonian rats**

ヒト乳歯由来幹細胞のドーパミン神経分化誘導と
そのパーキンソン病ラットに対する治療効果

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

(指導：大野 欽司 教授)

藤井 裕美

【緒言】

パーキンソン病はドーパミン神経細胞の変性脱落により発症する神経変性疾患である。過去にヒト胎児中脳細胞の移植治療が行われたが、倫理面や細胞供給源の確保に問題を抱えている。今回我々はヒト乳歯由来幹細胞 (SHED) に注目し、ドーパミン神経様細胞に効率的に分化誘導し、パーキンソン病ラットに対する移植治療効果を検討した。

【対象及び方法】

ヒト乳歯歯髄から採取した SHED をドーパミン神経分化誘導し、4 種類の誘導因子を添加して分化効率を TH 陽性細胞の割合で評価した。PCR で遺伝子発現を、ELISA でドーパミン分泌量を評価した。ラットの右側線条体に神経毒 (6-OHDA) を注入してパーキンソン病モデルを作製し、未分化な SHED 及びドーパミン神経分化誘導 SHED (dSHED) を移植した。メタンフェタミン誘発回転数の測定により神経症状を評価し、ELISA で線条体のドーパミン量を測定し、免疫染色で組織学的評価を行った。SHED 及び dSHED の培養上清をラット小脳顆粒細胞に添加し、6-OHDA による細胞死と神経突起伸長を免疫染色で評価した。

【結果】

SHED をドーパミン神経分化誘導し、その分化能を評価した。分化誘導初期段階の SHED は紡錘形だが、誘導後は神経細胞様形態となった (Fig1.A-B)。4 種類の誘導因子を添加し分化効率を比較したところ、BDNF を添加する方法が最も効率的で、7 割以上の SHED が TH (チロシン水酸化酵素) 陽性細胞に分化した (Fig1.C)。ドーパミン神経分化誘導 SHED (dSHED) は、TH 及び成熟神経細胞マーカー (NeuN) の発現とドーパミンの分泌を認めた (Fig1.D-M/Fig2.B-F)。PCR による遺伝子発現解析では、発生過程でドーパミン神経細胞が発現する各種遺伝子を認めた (Fig2.A)。低酸素下で培養することにより dSHED の生存率は向上し、神経栄養因子の発現増加を認めた (Fig3)。SHED 及び dSHED を移植したパーキンソン病ラットは行動実験で神経症状が改善し、線条体のドーパミン量がコントロールと比較し高かった (Fig4.B/I)。線条体に移植細胞の生着を認めたが、SHED の生着率は 1% 未満と低く、dSHED は 3-4% であった。dSHED は SHED とは異なり、生着後 TH、BDNF 及び GDNF の発現を認めた (Fig4.C-H)。SHED 及び dSHED 移植群は、黒質及び腹側被蓋野の TH 陽性ドーパミン神経細胞数がコントロール群と比較し多く、投射先の線条体の TH 陽性領域が多く認められた (Fig5-6)。SHED 及び dSHED の培養上清を加えた神経細胞は、6-OHDA 添加時の TUNEL 陽性細胞の割合が低く、神経突起の伸長を認めた (Fig7)。

【考察】

本研究では SHED をドーパミン神経分化誘導し、その分化能を評価した。未分化な SHED は未成熟及び成熟ドーパミン神経細胞が発現する転写因子

(En1,Lmx1b,Nurr1,Pitx3) の発現を認めたが、神経新生に關与する転写因子 (Ngn2,Mash1) の発現を認めなかった。分化誘導初期段階で神経新生に關与する遺伝子が発現し、分化誘導の第 2 段階では 4 種類の誘導因子を試し、BDNF を添加する方法が最も分化効率に優れていた。これは、BDNF がドーパミン神経細胞の成熟晩期に作用する因子であるためと考えられる。効率が劣っていた他の誘導因子は、いずれもドーパミン神経発生 of 早期段階で作用する因子であった (SHH,FGF8,TGF- β)。SHED のドーパミン神経分化誘導は、神経新生の誘導後、晩期の神経成熟を促すことが重要であると考えられる。また、低酸素下での培養は分化誘導細胞の細胞生存率の向上と神経栄養因子の発現増加を促し、多面的な治療効果の向上を認めた。

パーキンソンモデル動物への未分化及び分化誘導幹細胞の移植実験は種々の幹細胞で行われている。間葉系幹細胞では骨髓由来幹細胞や臍帯由来幹細胞の治療効果が報告されているが、移植細胞の生着率は 1%前後と低い。幹細胞移植の治療メカニズムは、細胞補給効果だけでなく、移植細胞のパラクライン作用による内在神経細胞の保護や神経経路の修復等の多面的治療効果の可能性が報告されている。本実験でも移植後の dSHED の生着率は低かったが、線条体のドーパミン量の回復と行動実験で神経症状の改善を認め、移植細胞のドーパミン産生や神経栄養因子の発現によるパラクライン作用が治療効果に關与したと考えられる。

6-OHDA の注入により作製するパーキンソン病モデルは、短期間で線条体のドーパミン量及び TH 陽性領域が 90%以上減少するが、黒質のドーパミン神経細胞の変性は長期間にわたって徐々に進行する。本実験では治療介入の時点で、患側の黒質及び腹側被蓋野の TH 陽性ドーパミン神経細胞数が健常側の約 60%、線条体の TH 陽性領域が 10%未満に減少していた。SHED 及び dSHED の移植により、一旦喪失した線条体の TH 陽性領域が 20-30%まで回復した。また、進行していたドーパミン神経細胞の喪失が抑制され、コントロール群の TH 陽性細胞が数%まで減少したのに対し、SHED 及び dSHED 移植群は約 40%の神経細胞が維持された。SHED 及び dSHED の治療効果は、内在ドーパミン神経細胞の保護作用と黒質線条体経路の修復機構の賦活化が要因と考えられる。

SHED 及び dSHED のパラクライン作用を検証するため、SHED 及び dSHED の培養上清を用いて in vitro で実験を行った。SHED 及び dSHED の培養上清は、6-OHDA により誘発される細胞死から神経細胞を保護する効果と神経突起伸長効果を認めた。神経突起伸長作用は SHED よりも dSHED の培養上清が優れており、低酸素下での分化誘導により発現が増加した神経栄養因子 (BDNF,GDNF,NT-3,HGF) の關与が考えられる。dSHED の培養上清は dSHED 移植と同様の治療効果が期待され、培養上清中に分泌される因子がパーキンソン病治療の鍵になると考えられる。

【結論】

SHED は低酸素下で培養し BDNF を添加することにより高率でドーパミン神経様細胞に分化する。SHED 及び dSHED の移植はパーキンソンモデルラットの治療効果を

認め、その要因は神経保護効果と神経経路の修復効果によるものと考えられる。SHED 及び dSHED は、神経保護作用と神経突起伸長作用を有する因子を分泌する。歯髄由来幹細胞はパーキンソン病治療に有用な幹細胞であると考えられる。