

主論文の要旨

**Peripheral Nerve Regeneration by Secretomes
of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth**

〔ヒト乳歯歯髄幹細胞由来液性因子による末梢神経再生〕

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：日比 英晴 教授)

梶村 有紀子

【緒言】

末梢神経損傷は、外傷や手術の合併症として生じる。現在、比較的長い神経欠損においては自家神経移植がゴールドスタンダードとして行われているが、ドナー部位の知覚異常や神経腫形成等の様々な問題がある。そこで、末梢神経損傷に対して新しいアプローチが期待されており、幹細胞移植による神経再生療法の研究が行われている。近年、移植細胞の生着率や分化効率の低さが指摘されており、その治療効果は移植した幹細胞が分泌する液性因子等のパラクライン作用によるものが主体であるとの報告がある。このような背景から本研究では幹細胞が分泌するパラクライン因子を多く含む培養上清に着目し、ヒト乳歯歯髄幹細胞の培養上清をラット坐骨神経損傷モデルへ投与しその治療効果を検討することを目的とした。

【材料と方法】

ヒト乳歯歯髄幹細胞 (SHED) は、本学生命倫理委員会承認のもとインフォームド・コンセントを得て提供されたヒト乳歯より分離・培養した。SHED を 80%コンフルエントになるまで培養し、その後無血清培地 (DMEM(-)) に交換、48 時間培養し上清を回収した。上清を遠心し死細胞などを除去したものを SHED-CM として使用した。

これまで報告されている神経再生に関与する因子を選定し、SHED-CM に含まれるサイトカインを ELISA 法にて定量化した。シュワン細胞株である RT4-D6P2T を SHED-CM にて 48 時間培養し、Transwell migration assay により遊走能、MTT assay により増殖能、Real time RT-PCR 法により神経再生に関与する遺伝子発現を評価した。3 日齢の Wistar/ST ラットより脊髄後根神経節 (DRG) を採取し分散培養後、さらに SHED-CM にて 48 時間培養し、神経突起伸長と生存率を評価した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて、Tube formation assay を行い管腔の長さと同数分岐数を算出し、SHED-CM を作用させたときの血管新生に対する効果を評価した。

7-8 週齢オス Wistar/ST ラットを麻酔し、外科的に作成した左側坐骨神経の 12mm 欠損をシリコンチューブにて架橋した。実験群は、Sham 手術した群 (Sham 群)、切断したのみの群 (Transection 群)、シリコンチューブに SHED-CM を充填した群 (SHED-CM 群)、シリコンチューブに DMEM(-) を充填した群 (DMEM(-) 群)、坐骨神経を採取し 180 度反転させ再移植した群 (Autograft 群) の 5 群とした。移植後 3,6,9,12 週に運動機能評価として sciatic function index (SFI) を算出した。移植後 12 週に電気生理学的評価としてシリコンチューブより中枢の坐骨神経を電気刺激し腓腹筋での複合活動電位 compound muscle action potentials (CMAPs) を測定した。坐骨神経の組織学的評価としてトルイジンブルー染色と透過型顕微鏡を用いて検討した。また、腓腹筋の重量測定、マッソントリクローム染色を行った。

【結果】

ELISA 法により SHED-CM 中の成長因子含有量を定量した結果、NGF、BDNF、NT-3、GDNF、CNTF、VEGF、HGF はそれぞれ 58.7 ± 28 、 46.4 ± 5.3 、 24.9 ± 2.1 、 115 ± 50 、 131

±71、556±65、3350±560pg/mlであった (Table2)。Migration assay と MTT assay の結果、SHED-CM はシュワン細胞の遊走能と増殖能を上昇させることが明らかになった (Fig.1)。Real time RT-PCR 法による神経栄養因子、血管新生、細胞外マトリックスの遺伝子発現解析では、無血清培地で培養したシュワン細胞と比較し SHED-CM を作用させたシュワン細胞は、*NGF*、*BDNF*、*NT-3*、*CNTF*、*GDNF*、*VEGF*、*Laminin*、*Fibronectin*、*Collagen IV* の発現が有意に上昇していた (Fig.2)。DRG の分散培養の結果、SHED-CM を DRG に作用させると神経突起が伸長し、生存率も上昇させた (Fig.3)。Tube formation assay の結果、SHED-CM を HUVEC に作用させると管腔の長さと同数が増加した (Fig.4)。

ラットの坐骨神経を切断、12mm の欠損を作り末梢神経損傷モデルを製作した。12週後において Transection 群は神経の連続性を認めず、神経腫を形成していた。SHED-CM 群、DMEM(-)群の両群においては連続性を認めたが、SHED-CM 群の方がより多く再生した神経を認めた (Fig.5)。トルイジンブルー染色像では、SHED-CM 群は DMEM(-)群と比較し明らかに再生軸索数が増加していた。また、透過型顕微鏡像より髄鞘化の指標である G-ratio を算出した。その結果、SHED-CM 群は DMEM(-)群と比較し髄鞘化が促進していたことがわかった (Fig.6)。SFI の最終評価の 12 週後では SHED-CM 群と Autograft 群は DMEM(-)群と比較し有意に運動機能が改善していた。電気生理学的評価では、潜時、振幅、神経伝導速度全ての項目において SHED-CM 群と Autograft 群は DMEM(-)群と比較し有意に回復していた (Fig.7)。腓腹筋の筋湿重量に関しても SHED-CM 群と Autograft 群は DMEM(-)群と比較し有意に増加していた。また、マッソントリクローム染色像においても SHED-CM 群と Autograft 群は DMEM(-)群と比較しコラーゲン線維の割合が少ないことがわかった (Fig.8)。

【考察】

本研究では、坐骨神経切断モデルを用いて SHED-CM の局所投与により末梢神経再生を促進することを示した。近年、幹細胞移植による末梢神経再生治療の報告が数多くある。しかし、移植した細胞の生存率や分化程度は低いとされている。幹細胞移植による治療効果は細胞補給効果だけでなく、移植した幹細胞のパラクライン因子の持つ軸索伸長効果、神経細胞保護効果、抗炎症効果等による可能性も報告されている。本実験においても CM の局所投与により末梢神経再生促進効果があり、移植細胞が分泌したサイトカインや成長因子といったパラクライン因子が治療効果に関与したと考えられる。

末梢神経再生において血管新生、足場の構築、そしてシュワン細胞の動員が重要である。SHED-CM に含まれる因子により、シュワン細胞の遊走能、増殖能が上昇し、遺伝子レベルで神経栄養因子のマーカ、血管新生のマーカ、神経再生の足場となる基底膜のマーカの発現も上昇した。また、SHED-CM はシュワン細胞に作用するだけでなく軸索や血管にも作用することがわかった。このように SHED-CM に含まれる液性因子が多面的に働くことにより末梢神経再生を促進させたと考えられる。

SHED-CM に含まれる栄養因子のそれぞれの濃度は高くないが、それらの相加相乗効果によって作用していると考えられる。過去の文献では血管新生において HGF は VEGF の効果を増強するとの報告や末梢神経再生において BDNF と CNTF の組み合わせは単体で投与するよりも効果があったとの報告がある。

【結語】

本研究により、SHED は様々な液性因子を分泌し、それらが末梢神経再生を促進させたことが裏付けられた。SHED-CM の局所投与は細胞移植を必要としない新しい治療となりうることが示唆された。