

主論文の要旨

Conditioned medium from the stem cells of human dental pulp improves cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease

ヒト歯髄幹細胞由来培養上清はアルツハイマー型認知症
モデルマウスの認知機能を改善する

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)

見田 常幸

【緒言】

アルツハイマー型認知症（AD）は、認知症の中でも最も患者数が多い疾患であり、記憶障害、理解・判断力・実行機能低下を認める神経変性疾患である。病態については、未だ不明な点が多いが、アミロイド仮説が有力であるとされている。同仮説では、脳内に沈着したアミロイド β タンパク（A β ）により活性化したミクログリア（Mic）が炎症性サイトカイン（TNF- α および IL-1 β ）や誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）を産生し、ROS や NO の合成を促す。これらフリーラジカルの化学反応によって生成されるパーオキシナイトライトは、神経伝達物質の原料となるチロシンをニトロ化する事によりニトロチロシン（3-NT）を合成し、神経伝達障害を起こすとされている。我々は、これまでに、ヒト乳歯歯髄幹細胞（SHED）の無血清培養上清（CM）が脳梗塞、新生児低酸素脳症、脊髄損傷に対し治療効果を示すことを明らかにしてきた。SHED-CM の効果は、アポトーシス抑制による神経保護と強力な神経炎症制御であった。本研究では、AD モデルマウスに SHED-CM を鼻腔内投与し、治療効果を行動学、遺伝学、生化学的に検証した。

【材料と方法】

本学倫理委員会承認のもと本学附属病院で患者の同意を得て提供されたヒト乳歯歯髄より SHED を分離・培養した。比較対照群として、DMEM、Lonza 社から購入したヒト骨髄間葉系幹細胞（BMSC）、ヒト線維芽細胞（Fibro）を使用した。80%コンフルエント状態で無血清培地へ交換した。48 時間無血清培養した後、細胞残骸を除去した上清を CM として使用した。各 CM 中に含まれるタンパク質は、3 μ g/ml である事を確認している。

AD の原因タンパクの一つである A β_{1-40} とコントロール群として逆位タンパクである A β_{40-1} を 37 $^{\circ}$ C、4 日間インキュベートしオリゴマーを形成させた。9 週齢 ICR マウスを麻酔し、海馬へ A β (5 μ g) を注入し AD モデルマウスを作成した。

モデル作成 24 時間後より、ハミルトンシリンジを用い SHED-CM、BMSC-CM、Fibro-CM、DMEM を 4 日間、1 日 2 回、各 50 μ l 鼻腔内投与した。モデル作成 3 日後より、新奇物体認知試験、ウェスタンブロッティング法（WB 法）による生化学的解析、免疫組織学的解析および Real time RT-PCR 法による遺伝子発現解析を行い、CM の治療効果を検討した。さらに各 CM のタンパク発現を、ヒト 274 種類サイトカインアレイ解析を用いて解析した。過去の文献を参考にして CM 中のタンパクの機能分類を行った。また、SHED-CM を大脳由来初代培養マウス神経細胞へ作用させ、細胞死抑制効果を評価した。

【結果】

AD モデルマウスに CM を投与した結果、SHED-CM 投与群で著明な認知機能改善効果が得られた（図 1）。SHED-CM、BMSC-CM、Fibro-CM は同様に iNOS や 3-NT の産生、および炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑制した（図 2 および図 3）。抗炎症

性 M2 型ミクログリアマーカー (Ym-1、Arginase1、Fizz1) の遺伝子発現は SHED-CM 群のみ有意に増加した (図 3)。神経栄養因子 BDNF、NGF および IGF-1 の遺伝子発現は、DMEM 群に比べ SHED-CM 群で有意に増加していた (図 5)。免疫組織学的解析にて、SHED-CM 投与 3 時間後の損傷部周囲に集積した Mic は、DMEM 群のそれと比べ Iba1 (汎 Mic マーカー) /Ym-1 共陽性細胞数が有意に増加していた (図 4)。神経毒性の持つグルタミン酸にて初代培養マウス神経細胞を刺激したところ、SHED-CM は誘導される神経細胞死を有意に抑制した (図 6)。

サイトカインアレイ解析により、SHED-CM 中に 48 種類のタンパクを同定した。これらの内 14 種類タンパクは、抗炎症、神経保護/抗アポトーシス、軸索伸長促進、血管新生、Mic 性状制御因子などに機能分類された (表 1)。

【考察】

近年、AD モデルマウスの脳室腔内に幹細胞を移植すると認知機能を改善するという報告を散見するが、幹細胞が分泌するパラクライン因子の投与のみで、認知機能が改善するかは不明であった。本研究は世界に先駆けて、幹細胞由来のパラクライン因子の投与のみで、AD モデルマウスの認知機能が改善する事を明らかにした。さらに SHED-CM 中に多く含まれる複数の治療効果因子が協調的に作用することで多面的な効果を発揮し、BMSC-CM や Fibro-CM と比較し優位に認知機能を改善することを見出した。

SHED-CM は、Mic の形質転換を起こし炎症性サイトカインや細胞障害性因子を放出する M1 型 Mic が優位な炎症性環境から、抗炎症性サイトカインや神経保護因子を放出する M2 型 Mic が優位な抗炎症性環境へと転換する事を明らかにした。また、SHED-CM は直接的に神経細胞死を抑制することが明らかとなった。

今回 SHED-CM の鼻腔内投与が AD モデルマウスの認知機能改善に有用であることが明らかとなった。鼻腔内投与は低侵襲で複数回投与可能であるため神経変性疾患の治療戦略として有用である。これまでの研究で鼻腔内投与した薬剤が、鼻腔内粘膜支配神経である三叉神経を経て脳幹へ至る経路、嗅球を経て脳髄液・脳実質に行く経路、鼻腔粘膜上皮の毛細血管から吸収される経路などが報告されている。今後、SHED-CM が含有する、AD 治療の有効因子を明らかにするとともに、鼻腔から脳内への輸送経路を明らかにすることが SHED-CM による AD 治療開発に重要であると考えられる。

【結語】

本研究結果から、未だ有効な根本的な治療法のない AD に対して、SHED-CM の鼻腔内投与はこれまでにない多面的な効果を持ち合わせた新規治療法となりうる可能性が示唆された。