

主論文の要旨

**Conditioned Medium from the Stem Cells of
Human Exfoliated Deciduous Teeth Ameliorates
Experimental Autoimmune Encephalomyelitis**

〔 ヒト脱落乳歯歯髄幹細胞培養上清は
実験的自己免疫性脳脊髄炎を改善する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
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)

下島 千明

【緒言】

多発性硬化症(MS)は中枢神経系(脳や脊髄)の様々な部位に病巣ができ、多彩で重篤な機能障害をもたらす自己免疫性の神経難病であり、厚生労働省が指定する特定疾患の一つである。国内の罹患患者数は約2万人と言われており、年々増加している。その病態には炎症促進性マクロファージと自己反応性リンパ球が大きく関与していると考えられている。現在のMS治療は主に対症療法であり、完全寛解を達成していない。

近年、再生医学(幹細胞移植療法)による多発性硬化症の治療が期待されている。しかし、移植細胞の低生着率、腫瘍形成や免疫拒絶の危険性など、臨床応用には諸問題が山積している。そこで我々は、幹細胞移植を伴わない、幹細胞培養上清に含有される治療効果因子群のみを使用する、新しいMS治療法の開発を目指してきた。

我々はこれまで幹細胞源としてヒト脱落乳歯歯髄由来幹細胞(SHED)に着目し、研究を行ってきた。SHEDは優れた増殖能と多分化能を示す幹細胞である。SHEDは神経堤由来の細胞と考えられ、間葉系幹細胞と神経幹細胞の両方のマーカーを発現する。脊髄損傷、虚血性脳傷害などの動物モデルに対してSHEDを移植すると、パラクライン効果により著しい機能回復が得られる。さらにSHED移植の治療効果因子の多くが、SHED由来無血清培養上清(SHED-CM)として回収できることを見出した。SHED-CMの治療メカニズムの主体は抗炎症性M2マクロファージの誘導であった。近年、活性化マクロファージが様々な難治性疾患の病因に関係していると報告されている。活性化マクロファージには炎症性M1と抗炎症性M2という2つの表現型が存在する。M1は各種炎症性メディエーターの放出により、炎症を惹起し、組織破壊をもたらす。一方で、M2は抗炎症性サイトカインの放出によって炎症性M1に対抗する。一般的な創傷治癒では、M1とM2がそれぞれ炎症の惹起と消退に関わると報告されている。したがって、MSにおいてもマクロファージの極性を調節することで、治療効果が期待できる可能性がある。しかしながら、MSに対するSHED-CMの治療効果の検証はなされていなかった。

今回、MSの動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)に対して、SHED-CMを投与し、その治療効果を検証した。

【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脱落乳歯よりSHEDを分離、培養した。SHEDを培養し、80%の細胞密度になったところで無血清培地(DMEM)に交換、さらに48時間培養した後に上清を回収した。上清を遠心し細胞残骸などを除去したものをCMとして使用した。

In vivo 実験では、国際的に汎用されている多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)マウスを用いた。8週齢雌性C57BL/6Jマウスに対して、Operon Biotechnologies社より購入したミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白ペプチド(MOG₃₅₋₅₅)200 μ gを完全フロイントアジュバントとともにマウス腰背部に免疫した。0,2日目に百日咳毒素200ngを腹腔内投与しEAEを作製した。炎症がピークに達する

14 日目に SHED-CM、DMEM(対照群)それぞれ 500 μ l を尾静脈より 1 回投与した。16 日目および 28 日目に屠殺し試料を採取した。0 日目から 28 日目まで EAE 臨床スコアに準じてマウスの麻痺状態を評価した。16 日目には、免疫組織化学染色、Real time RT-PCR で炎症性、抗炎症性因子の発現を解析した。28 日目には、LFB 染色、H-E 染色、Sudan Black 染色、Toluidine blue 染色、MBP 染色、CD3 染色および SMI31 染色で組織学的解析を行った。さらに、組織再生に有効とされている HGF、SHED-CM が含有する M2 の誘導因子である ED-Siglec-9 を免疫沈降法により特異的に除去したもの (CM-depleted HGF, CM-depleted-ED-Siglec-9) を作製し、同様に解析した。HGF と ED-Siglec-9 除去後の含有量は ELISA 法にて確認した。

In vitro では、EAE マウス脾臓より MOG 特異的 CD4⁺T 細胞を採取し、SHED-CM を作用させたときの T 細胞増殖と炎症性サイトカインの産生を BrdU、ELISA にて評価した。

【結果】

DMEM または SHED-CM を EAE 症状極期に単回尾静脈から投与した結果、DMEM 群と比較し、SHED-CM 群では EAE 臨床スコアが有意に低下した(図 1)。

28 日目の組織学的解析において、DMEM 群では脊髄における脱髄および炎症細胞の浸潤を認めた。一方、SHED-CM 群では、脊髄における脱髄範囲、炎症性細胞浸潤が明らかに減少していた(図 2A)。また、脱髄範囲、CD3 陽性細胞数を定量的に評価した結果も同様に、SHED-CM 群で有意に低下していた(図 2B,C)。また、軸索損傷の評価では、DMEM 群では脱髄部位において軸索損傷やビーズ状変性を認めたが、SHED-CM 投与群では有意に改善していた(図 2D,E)。

16 日目の EAE 脊髄組織における遺伝子発現解析では、SHED-CM 群で炎症性サイトカインの発現が有意に低下していた。一方、M2 マーカー(*CD206*、*Arginase-1*)の発現は、SHED-CM 群で有意に上昇していた(図 3A)。蛍光免疫染色でも同様の傾向が認められた。(図 3B)

MOG 特異的 CD4⁺T 細胞の増殖に関する解析において、DMEM 群と比較して SHED-CM 群では MOG 特異的 CD4⁺T 細胞の増殖が有意に減少していた(図 4A)。また、T 細胞の培養上清を ELISA 法にて測定したところ、SHED-CM 群では炎症性サイトカインの産生が有意に抑制されていた(図 4B)。

SHED-CM の治療効果が CM 中に含まれる HGF に依存するものであるのかを調べるために、HGF のみを特異的に除去した CM-depleted-HGF を作製し、同様に解析した。CM-depleted-HGF 群は DMEM と比較し EAE 臨床スコアの有意な低下を認めた (図 5)。

SHED-CM の治療効果が ED-Siglec-9 によるものか調べるため、ED-Siglec-9 のみを特異的に除去した CM-depleted-ED-Siglec-9、あるいは ED-Siglec-9 単独投与を行った。EAE 臨床スコアにおいて、CM-depleted-ED-Siglec-9 群では CM の神経機能改善効果は減弱された。一方、ED-Siglec-9 単独投与群で麻痺症状の改善を認めた。(図 6)

【考察】

SHED-CM は、EAE 症状極期に単回静脈内投与することにより、EAE の神経麻痺症状を改善した。炎症性 M1 関連サイトカインの発現抑制および、抗炎症性 M2 関連遺伝子の上昇によって中枢神経系の炎症環境を抗炎症環境へ変換し、その結果として脊髄における炎症性細胞浸潤を抑制、脊髄の脱髄を改善したと考えられる。さらに *in vitro* の結果より、SHED-CM は活性化 T 細胞の増殖を抑制し、炎症性サイトカインの産生を減少させることが分かった。

SHED-CM による EAE の治療効果は抗炎症 M2 環境の誘導と関連していた。これらの結果は、過去に報告された様々な疾患に対する SHED-CM の治療メカニズムと矛盾しない。本研究と合わせて、炎症性 M1 環境から抗炎症性 M2 環境へ変換することは EAE を含めた様々な難治性疾患に対する有効な治療戦略になる可能性が示唆された。

さらに、SHED-CM 中に特異的に含まれる分泌型シアル酸認識レクチンである ED-Siglec-9 も SHED-CM と同様に EAE の神経麻痺症状を改善した。しかしながら、SHED-CM の方が ED-Siglec-9 単独投与と比較して治療効果が高かった。サイトカインアレイ解析の結果から、SHED-CM には EAE に対して治療効果があることが報告されている因子が複数含まれていることが確認されており、CM 中のこれら治療効果因子が協調的に作用して治療効果を発揮しているためと考えられた。

【結論】

SHED-CM には複数の治療効果因子が含まれており、M2 誘導や T 細胞の活性化抑制によって抗炎症性環境を誘導することで、EAE を改善した。したがって、SHED-CM 投与は MS に対して有効な治療戦略となりうることが示唆された。