

主論文の要旨

**A novel treatment with stem cells from human exfoliated
deciduous teeth for hypoxic-ischemic encephalopathy
in neonatal rats**

脱落乳歯歯髄幹細胞による新生児低酸素性虚血脳症モデルラット
に対する新規治療法の開発

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：高橋 義行 教授)

北瀬 悠磨

【緒言】

周産期低酸素性虚血性脳症 (HIE) は、出生 1,000 人あたり約 1.5 人の割合で発生し、死亡率は約 15% であり、生涯を通じて重度神経障害を含む複数の臓器に影響を及ぼす。その治療法として低体温療法による神経保護の有効性が報告されているが重度の HIE には効果的ではなく、HIE の新しい治療法の開発は急務の課題である。ヒトの脱落乳歯歯髄幹細胞 (SHED) は、外胚葉由来であり、神経細胞を含む様々な細胞型に分化することが可能であり、炎症状態を抗炎症状態に変化させ、アポトーシスを抑制し、組織損傷を抑制することが報告されている。また医療廃棄物として脱落乳歯から採取されるため倫理的な問題が少ない。今回我々は、SHED の静脈内投与による機能的な改善とそのメカニズムの解明することを主な目的として研究を行った。

【方法】

本実験は名古屋大学倫理委員会より承認を得た上で実験を行った。生後 7 日目の Wister/ST ラットを麻酔し、左頸動脈を露出させ、迷走神経から分離し、二重結紮し、結紮糸の間を切断した。その後低酸素負荷をかけた後頭部 MRI を撮像し、重症度分類を行った。歯髄幹細胞の採取については親からインフォームドコンセントを得た 6-12 歳までの子供から、自然に脱落した乳歯を収集し培養した上で本実験に使用した。低酸素性虚血負荷後 24 時間後に、全身麻酔下で、SHED 投与群には右外頸静脈から SHED を 1×10^5 個投与し、vehicle 群にはリン酸緩衝食塩水を投与した。また SHED の細胞動態を解析するため、量子ドット QD655 を導入した SHED 細胞を使用し評価を行った。組織評価は生後 9 日目に行った。アポトーシスの評価として Active caspase 3 (AC-3)、酸化ストレスの評価として 4 hydroxynonenal antiserum (4HNE)、ミクログリアの評価として Iba-1 抗体を使用して免疫染色による海馬と皮質の評価を行った。またミクログリアの極性を評価するために Iba-1, ED-1 そして CD206 を用いて陽性細胞の割合を海馬、皮質ともに評価した。またサイトカインの評価として、SHED 投与後 24 時間後、生後 9 日目に大脳皮質を収集し各種サイトカインの比較検討を行った。また運動機能、学習機能の評価のためのロータロッドトレッドミル試験、左右の運動機能の評価するためのシリンダーテスト、左右の歩行機能の評価のための cat walk を用いた歩行解析、学習・記憶の評価として能動的回避試験を行った。行動実験後に MRI で脳の体積を測定し、SHED の治療効果について比較検討を行った。また *in vitro* で SHED の馴化培地を用いて神経細胞に対する神経保護効果を検討した。

【結果】

量子ドットにより細胞動態を評価した結果、投与後 1 時間後に SHED 投与群の大脳において強い蛍光反応を検出し、sham 群、vehicle 群ではほとんど検出されなかった。また投与 24 時間後では大脳皮質において SHED は 10 個未満しか検出できなかった (図 1)。低酸素負荷後の急性期マーカーの結果、AC-3 は SHED 投与群で海馬、皮質とも有意に抑制され、また 4HNE については皮質にて有意な抑制を認めた。Iba-1 によ

る評価では皮質にて SHED 投与群の細胞数が有意に多い結果となった (図 2)。そこで蛍光免疫染色にてミクログリアの極性に対する評価を行った。Iba-1+/ED-1+の割合は SHED 投与群で海馬、皮質共に有意に減少し、炎症作用を有するマクロファージの有意な減少を認めた。CD206+/ED-1+については有意な差に達しなかったが SHED 投与群で増加する傾向を認め、抗炎症作用、神経保護作用を有する M2 ミクログリアの増加が示唆された (図 3)。

サイトカインによる評価では SHED 投与群において、IL-1 α , IL-18, IP-10 そして MIP-1 α が有意に上昇した。

行動実験についてはロータロッドトレッドミル試験の評価 2 日目で SHED 投与群が vehicle 群と比較して有意に改善を認め、シリンドertestでは sham 群と SHED 投与群に有意な差は認めなかったものの sham 群と vehicle 群間には有意な差を認め、SHED 投与群での治療効果を認めた。また cat walk を用いた歩行解析では、左右前肢の設置面積比の評価において SHED 投与群が vehicle 投与群よりも有意に低い値を呈し改善を認め、そして能動的回避試験では 1 日目において sham 群と SHED 投与群間では有意差は認められなかったものの、sham 群と vehicle 群間で有意な差を認めた (図 4)。その後 MR I による大脳体積の比較検討を行ったが sham 群に比べ SHED 投与群、vehicle 群は有意に体積の減少を認め、SHED 投与群と vehicle 群間には有意な差は認められなかった。最後に SHED の馴化培地による神経細胞への保護効果を評価した。SHED 馴化培地を添加した細胞群からの LDH の放出が有意に抑制され、SHED による神経保護作用が確認された (図 5)。

【結語】

本研究では、SHED の HIE モデルラットへの静脈内投与がアポトーシスを強く抑制し、酸化ストレスを軽減し、有害な M1 ミクログリアの活性化を低下させる可能性があることを示した。量子ドットを使用して観察された細胞動態は、HI 治療の 24 時間後に脳内のわずかな細胞のみを明らかにし、またニューロンを用いた *in vitro* 実験から SHED 馴化培地の治療効果を示され、パラクライン効果による作用が主体であることが示唆された。さらに、それらの結果として様々な行動実験の改善が観察された。以上のことから HIE に対する SHED の静脈投与は新たな治療戦略のひとつになりうると思われる。