

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 752 号	論文提出者 大桑 雄太
論文題目  ラット末梢神経圧挫損傷後の歯髄細胞移植における 運動機能評価と組織学的評価	

## I. 緒 言

末梢神経の損傷後に引き起こされる機能的な障害に対する根治的治療法は無いのが現状であり、顎顔面領域においては外科的処置の合併症として生じることが多い。損傷後の末梢神経系には再生能力がある程度は有することが知られているが、その再生能力は不十分であり、完全に機能回復するまでには至らないことが多いので、臨床的な問題として挙げられている 1)。顎顔面領域の手術で損傷しやすい神経は、下歯槽神経、舌神経および舌下神経であり、下顎第三大臼歯抜歯後の神経損傷は 0.4% から 8.4% の割合で生じるとの報告がある 2)。これまでの末梢神経損傷に対する治療法として、圧挫や軽度の切断症例においては薬物療法や理学療法などの対症療法があるものの、神経の欠損部の大きい症例では自家神経移植が適用されている。しかしながら、自家神経移植に必要な移植神経を採取するために新たな外科的侵襲を加えることから 3)、末梢神経損傷後の機能回復のために神経採取をする必要の無い、新規の根治的な治療法の開発が望まれている。近年、末梢神経再生の治療法として細胞移植療法が注目されている。これまでの細胞移植治療で用いられている細胞として、神経幹細胞、骨髄間葉系幹細胞および臍帯由来間葉系幹細胞が挙げられる。これらの細胞から分泌する神経栄養因子の産生やシュワン細胞へ優位に分化させる因子が、末梢神経の再生に効果があることが知られている 4-6)。成体幹細胞の一つとなる間葉系幹細胞は、骨髄、脂肪組織、骨格筋、歯根膜、歯肉および歯髄組織といったさまざまな組織から単離されることから再生医療に利用される幹細胞の中で造血幹細胞と共に最も注目されている細胞である 7-10)。これまでの間葉系幹細胞移植の効果としては骨芽細胞、脂肪細胞および軟骨細胞といった中胚葉系の細胞へ分化することを期待した医療の開発が主であった 7, 8)。近年、この間葉系幹細胞は免疫および炎症反応を調整する機能や傷害部位に移動する能力などを備えることが報告され、パラクリン機構を介した組織固有の細胞への効果を期待した医療の開発が進んでいる 9)。今回の研究で焦点をあてた末梢神経損傷における細胞治療の細胞源となる条件としては、神経栄養因子を産生するということが重要となる 11-14)。歯髄組織は血管や神経に富んだ疎性結合組織であり、歯冠ではエナメル質と象牙質に、歯根では、象牙質とセメント質に囲まれている環境下に存在する。Gronthos らが歯髄組織の間葉系幹細胞(歯髄幹細胞)を 2000 年に同定してからすでに 15 年が経過し、その特性を解析した研究報告はかなり多い。その歯髄幹細胞は生体内では歯髄の線維芽細胞と象牙芽細胞に分化するが、適切な培地を用いると骨芽細胞、脂肪細胞および軟骨細胞に分化することが報告されている 15-18)。発生学的に重要なこととして、歯髄幹細胞は神経堤から生じた外胚葉性間葉に由来し、間葉系幹細胞と神経堤幹細胞の特徴を併せもつことが、中胚葉由来の間葉系幹細胞と異なる点である。さらに、ヒトの歯髄幹細胞は中胚葉由来の間葉系幹細胞と比較すると増殖能や組織修復能が高く、免疫原性も低いことから、細胞治療における細胞源として有用であると考えられる 15)。近年では、歯髄幹細胞が神経損傷を抑制し修復するという結果も示され 21-26)、歯髄幹細胞を顔面神経の損傷部位に移植すると軸索の再生が促進することも報告されている 27, 28)。これらの研究から、ヒト歯髄幹細胞は神経疾患の治療に対して他の幹細胞と同様に有効であると考えられる。さらに、他の中胚葉由来の間葉系幹細胞と比較すると、歯髄は廃棄される抜去歯から採取でき、倫理的な問題もない点を考えると細胞治療における利点がある。坐骨神経損傷の動物モデルには、代表例として神経切断モデルと神経圧挫モデルの二つがある 29-32)。切断モデルでは、神経を縫合する際の手技上の問題あるいは炎症を惹起させ

る架橋物等の使用などにより、外的要因が その実験結果に影響を及ぼすことが考えられる 32)。一方、圧挫モデルではラット等を用いるとその運動機能は 自然回復してしまう欠点があるものの 33, 34)、圧挫 4 週 後で細胞の移植群と非移植群と比較すると、運動機能評価、電気生理学的評価および髄鞘形成において細胞移植 群が有意に高いことも報告されている 32, 35)。そこで、本研究では下顎埋伏智歯抜歯による末梢神経損傷の状態 と類似する坐骨神経圧挫モデルを選択し、ヒト歯髄細胞 の移植効果を検討することとした。

## II. 材料および方法

### II-1 細胞培養

本研究は、愛知学院大学歯学部倫理委員会の承認（承認番号：406）を得て実施した。愛知学院大学歯学部附属病院口腔外科外来を受診し、インフォームドコンセントの得られた患者（18 歳～29 歳）より第三大臼歯を抜去し、それらの歯髄組織を摘出後、以下の方法を用いて 歯髄幹細胞を含む間葉系細胞（以下歯髄細胞）を採取した。歯髄組織を 0.04 mg/ml リベラーゼ溶液（Roche, Mannheim, Germany）で 37℃、60 分間酵素処理をし、セルストレナー（40  $\mu$ m; BD Biosciences, San Jose, CA, USA）で 濾過して細胞を分離した。さらに IOtest3（Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA）を用いて赤血球を 溶解後、10%ヒト血清含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 培 地に  $3.0 \times 10^4$  個の細胞数で 35 mm 培養ディッシュ（BD Biosciences）上に播種した。コロニーを形成した歯髄細胞が培養ディッシュ内で 70%コンフルエントに達した後に、TrypLE Select (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) を 用いて細胞を分散し、100 mm 培養ディッシュへ継代培養した。なお、第 6 継代目の歯髄細胞を本研究に供した。

### II-2 坐骨神経圧挫モデルの作製

本研究は愛知学院大学歯学部動物実験委員会の承認（AGUD258 号）を得て実施し、実験動物の取り扱い は 同委員会の指針に沿っておこなった。動物は 12 時間ごとの明暗サイクルで温度を一定に保った環境下におかれ、自由に飼料や水を摂取した。実験には Fischer344 系 雄性ラット（体重 190 ～ 210g、日本エスエルシー、静岡）を用いた（n=18）。手術の前に、ラットを 導入麻醉ボックス内に入れてイソフルラン（インターベット、東京）を濃度 3.0%で導入後に、頭部マスクを装着しイソフルラン濃度を 1.7%で維持した吸入麻醉下で手術を行った。左側後肢外側面上の皮膚を剃毛および消毒し、No. 15 メスで皮膚切開を加えて坐骨神経を剖出し、周囲の結合組織を剥離して坐骨神経を明示した。その後、坐骨神経を マイクロバスキュラークリップ（ベアーメディック、茨城）を用いて 0.6N で 30 分間圧挫した（図 1a,b）。なお、圧挫部位を明示するために、圧挫部位中央部の坐骨神経 上膜に 10-0 ナイロン糸（ベアーメディック）1 糸で 縫合した。細胞懸濁液は次のように調整した。2  $\mu$ l のア テロコラーゲン（高研、東京）に 0.2  $\mu$ l のフィブロネク チン（Sigma-Aldrich）、0.1  $\mu$ l のラミニン（ThermoFisher）および 8  $\mu$ l のハンクス液（Sigma-Aldrich）にて作製した コラーゲン混合液 10  $\mu$ l にて  $3.0 \times 10^5$  個の歯髄細胞を懸濁し、酸化セルロース（SURGICEL; Johnston and Johnston, New Brunswick, NJ, USA）に播種後に圧挫部を 取り囲むように留置した（細胞移植群、n=6）（図 1c）。また、対照として坐骨神経を圧挫したのみの群（圧挫群、n=6）、および左側後肢外側面を皮膚切開後に閉創した 群（Sham 群、n=6）を設定した。なお、免疫抑制剤であるタクロリムス（アス

テラス製薬、東京) を手術前日から術後 14 日目まで毎日体重 1 kg あたり 0.05 mg を腹腔内に投与した。

図 1. 坐骨神経圧挫モデルの作製 a: マイクロバスキュラークリップを用いて、左側坐骨神経を 30 分間圧挫した。 b: 圧挫 30 分後の坐骨神経 c: コラーゲン混合液で懸濁した歯髄細胞 ( $3.0 \times 10^5$  個) を酸化セルロースに播種し、圧挫部を取り囲むように留置した

### II - 3 運動機能解析

圧挫群および細胞移植群の運動機能解析には Cat Walk XT (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA) を用いて、ラットの自然歩行を分析した。ガラス板の上でラットを自然に歩行させ、その様子を下からビデオカメラで撮影し、そのフットプリントとゲイトを数値化したデータを収集した。なお、個体差をなくすためにパラメータは同一個体内の左右の後肢を比較しておこない、左側後肢を患側、右側後肢を健側とした。そして、データから得られた解析パラメータの中で坐骨神経損傷による影響が大きいと考えられるラット後肢の第一指と第五指の間隔(以下 1 ~ 5 指間隔)、第二指と第四指の間隔(以下 2~4 指間隔)および第三指先と踵の間隔の 3 項目を圧挫群と細胞移植群で比較した。

II - 4 前脛骨筋湿重量の測定 ラットを術後 14 日目で安楽死させ、圧挫した患側および健側の前脛骨筋を摘出し、筋湿重量を秤量した。圧挫群と細胞移植群において、健側の筋湿重量を 100% とした時の患側の筋湿重量比を算出し、両群で比較した。

### II - 5 組織学的解析

術後 14 日目に左側坐骨神経を採取し、4% パラホルムアルデヒド(和光純薬工業、大阪)中に浸漬して固定した(4°C、24 時間)。その後、0.01 M リン酸緩衝液(以下 PBS, pH7.35)にて洗浄、上昇エタノール系列において脱水し、通法に従いパラフィン包埋した。パラフィン切片は、パラフィン包埋された試料をマイクロトームで厚さ  $5 \mu\text{m}$  に薄切し、スライドガラス(松浪硝子工業、大阪)に載せ作製した。キシレンにて脱パラフィン後、下降エタノール系列を通し、水洗後にヘマトキシリン・エオジン(以下 H・E)(武藤化学、東京)染色、またはルクソールファストブルー(以下 LFB)(武藤化学)染色を実施し、上昇エタノール系列で脱水、キシレンによる透徹、マリノール(武藤化学)で封入した。観察および撮影には CCD カメラ(Nikon Digital Sight DS-Fi1; ニコン、東京)を備えた光学顕微鏡(Eclipse E800M; ニコン)を用いた。圧挫群と細胞移植群における神経線維間の空隙面積率(空隙部の面積/画像全体の面積)を比較するために、はじめに坐骨神経圧挫部位を中心とした中枢側と末梢側の H・E 染色した組織像の画像サイズを統一( $0.42 \times 2.27 \text{ mm}$ )した。次に、神経線維間の空隙面積を画像解析ソフト(ImageJ, NIH)を用いて測定し、圧挫群と細胞移植群での線維間の空隙面積率を求めた。変性の割合を圧挫群と細胞移植群で比較するために、H・E 染色した組織切片を強拡大( $\times 40$ )し、その視野( $0.21 \times 0.37 \text{ mm}$ )で観察される空隙数を測定した。なお、両群のそれぞれ中枢側および末梢側の 5ヶ所ずつ、計 10ヶ所を無作為に選択して測定した。また、H・E 染色と同様に、LFB 染色でも坐骨神経圧挫部位を中心とした中枢側と末梢側の組織像の画像サイズを統一( $0.54 \text{ mm} \times 3.22 \text{ mm}$ )し、ImageJ を用いて LFB 陽性面積率(LFB 染色陽性部位の面積/画像全体の面積)を求めた。

### II - 6 免疫組織化学的解析

2 - 3 と同様の手法で厚さ  $5 \mu\text{m}$  のパラフィン切片を作製し、抗 Myelin basic protein (以

下 MBP) 抗体 (ab40390; abcam, Cambridge, UK) を用いた免疫組織化学的手法による染色をおこなった。まずパラフィン切片を脱パラフィンおよび脱水後、蒸留水で水洗した。そして、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去するために、メタノールで希釈した 3% 過酸化水素水に 10 分間反応させ、0.05% Tween20 を含むトリス緩衝液 (以下 TBST) を用いた 5 分間の洗浄を 2 回行った。次いで、HistoVT One (ナカライテスク、京都) を蒸留水で 10 倍希釈した液を用い、90°C、20 分間で抗原賦活化処理をおこなった。TBST での 5 分間の洗浄を 3 回行った後に、2.5% ウマ血清 (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) に室温で 1 時間浸漬し、非特異的反応部位のブロッキングをおこなった。そして、ブロッキング液で希釈した抗 MBP 抗体を組織切片と反応させた (4°C、12 時間)。TBST で 5 分間の洗浄を 3 回行った後に、二次抗体として ImmPRESS Reagent, anti-rabbit IgG (Vector Laboratories) を組織切片と反応 (室温、1 時間) させた。なお、陽性部位の検出のため 3,3'-diaminobenzidine (以下 DAB) を含む ImmPACTTM DAB (Vector Laboratories) にて発色させた。蒸留水で洗浄後、ヘマトキシリンによる核染色を施して封入した組織切片を、CCD カメラ (Nikon Digital Sight DS-Fi1; ニコン) を備えた光学顕微鏡 (Eclipse E800M, Nikon) で観察し、必要な部位の撮影を行った。次に、圧挫群および細胞移植群において、坐骨神経圧挫部位を中心とした中枢側と末梢側の組織像の画像サイズを統一 (0.47 mm × 3.12 mm) し、抗 MBP 抗体陽性部位の面積率 (抗 MBP 抗体陽性部位の面積 / 画像全体の面積) を ImageJ にて解析した。

#### II - 7 統計処理

データは平均値 ± 標準偏差で表し、Student's t-test にて有意差検定をおこなった。なお、有意水準は 5% とした。

### III. 結 果

#### III - 1 細胞培養

ヒト歯髄組織を酵素処理して得られた歯髄細胞は、培養 6 日目には培養ディッシュ上でコロニーを形成し、線維芽細胞様の形態を示した (図 2a)。なお、本研究では 6 継代培養した細胞を使用した (図 2b)。

図 2. 歯髄幹細胞を含む間葉系細胞 (歯髄細胞) a: 初代培養時のコロニーを形成した細胞 (培養 6 日目) b: 移植に使用した第 6 継代目の歯髄細胞

#### III - 2 坐骨神経圧挫後の肉眼的所見

坐骨神経圧挫部位への歯髄細胞移植効果を検討するために、術後 14 日目での細胞移植群および圧挫群における左側後肢 (患側) の第一指から第五指の間隔および坐骨神経圧挫部位の肉眼的所見を比較した。細胞移植群の左側後肢において、第一指から第五指の屈曲はなく、第一指から第五指の間隔は右側後肢 (健側) と比較しても顕著な差は観察されなかった (図 3a)。一方、圧挫群の左側後肢において、第一指から第五指は内反し屈曲しており、かつ細胞移植群と比較すると第一指から第五指の間隔は狭かった (図 3b)。また、剖出した坐骨神経の肉眼所見では、細胞移植群および圧挫群に形態的な差は観察されなかった。 (図 3c, d)

図 3. 圧挫処置 14 日後における後肢および坐骨神経の観察 a: 細胞移植群の患側後肢 (矢印) b: 圧挫群の患側後肢 (矢印) c: 細胞移植群の坐骨神経 (矢頭) d: 圧挫群の坐骨神経 (矢頭)

## III-3 運動機能評価

坐骨神経圧挫部位へ移植した歯髄細胞による運動機能改善効果を検討するために、術後 14 日目で Cat Walk XT を用いた指間および指踵間隔を測定および前脛骨筋湿重量、を測定した。① Cat Walk XT による運動機能評価 指間隔および指踵間隔を坐骨神経圧挫後 7、10 および 14 日目に計測した。圧挫群における健側の 1～5 指間隔から患側の 1～5 指間隔を減算した数値は 7 日目で  $1.16 \pm 0.21$  cm、10 日目で  $1.09 \pm 0.25$  cm、14 日目で  $0.72 \pm 0.34$  cm であり、細胞移植群における健側の 1～5 指間隔から患側の 1～5 指間隔を減算した数値は 7 日目で  $0.86 \pm 0.21$  cm、10 日目で  $0.83 \pm 0.18$  cm、14 日目で  $0.38 \pm 0.25$  cm であった。また圧挫群における健側の 2～4 指間隔から患側の 2～4 指間隔を減算した数値は 7 日目で  $0.58 \pm 0.16$  cm、10 日目で  $0.50 \pm 0.19$  cm、14 日目で  $0.41 \pm 0.17$  cm であり、細胞移植群における健側の 2～4 指間隔から患側の 2～4 指間隔を減算した数値は 7 日目で  $0.37 \pm 0.16$  cm、10 日目で  $0.36 \pm 0.13$  cm、14 日目で  $0.12 \pm 0.13$  cm であった。これらの結果から、指間隔はすべての測定日において、細胞移植群と圧挫群の間で有意な差 ( $P < 0.05$ ) を認めた。さらに圧挫群における健側の第三指先と踵の間隔から患側の第三指先と踵の間隔を減算した数値は 7 日目で  $-1.43 \pm 0.04$  cm、10 日目で  $-1.42 \pm 0.13$  cm、14 日目で  $-0.89 \pm 0.18$  cm であり、細胞移植群における健側の第三指先と踵の間隔から患側の第三指先と踵の間隔を減算した数値は 7 日目で  $-1.18 \pm 0.20$  cm、10 日目で  $-1.04 \pm 0.09$  cm、14 日目で  $-0.84 \pm 0.21$  cm であった。この結果から指踵間隔は 7 日目および 10 日目において細胞移植群と圧挫群の間で有意な差を認めた ( $P < 0.05$ )。(図 4, 5) ② 前脛骨筋湿重量の変化 坐骨神経麻痺により前脛骨筋が委縮することが知られているので、圧挫後の前脛骨筋を摘出し、筋湿重量および健側に対する患側の筋湿重量比 (%) を求めた 36-38) (図 6)。患側前脛骨筋の平均湿重量は、圧挫群で  $259.50 \pm 36.74$  mg、細胞移植群で  $312.17 \pm 44.19$  mg であり、圧挫群および細胞移植群の健側前脛骨筋の平均湿重量は  $391.5 \pm 46.73$  mg であった (表 1)。各実験群での健側に対する患側の筋湿重量比は、圧挫群で  $67.21 \pm 4.44\%$ 、細胞移植群で  $78.66 \pm 6.89\%$  であった。両実験群において坐骨神経麻痺による前脛骨筋の委縮を認めしたが、細胞移植群では圧挫群よりも前脛骨筋の筋重量比が有意に高かった ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

図 4. 圧挫処置後 14 日目の圧挫群、細胞移植群 および Sham 群の Cat Walk XT による運動機能解析

図 5. 圧挫処置後 7、10 および 14 日目のラット後肢足跡における指間隔と指踵間隔の測定 第一指から第五指までの間隔 (TS)、第二指から第四指の間隔 (ITS) および第三指先から踵までの間隔 (PL) を示す。なお、個体差をなくすために、健側 (N) から患側 (E) の長さを減算した値を求めた。\* $P < 0.05$

図 6. 圧挫処置後 14 日目のラット前脛骨筋 a: 圧挫群 b: 細胞移植群 c: 健側

表 1. 前脛骨筋湿重量と健側に対する筋湿重量比

## III-4 組織学的解析

坐骨神経圧挫部位への歯髄細胞移植の効果を検討するために、術後 14 日目で摘出した左側坐骨神経を組織学的に解析し、H・E 染色および LFB 染色により圧挫群および細胞移植群を比較検討した。①H・E 染色 圧挫部位を中心とし、その中枢側および末梢側に位置する坐骨神経の H・E 染色像を観察した (図 7a, b)。圧挫群では、圧挫部位より末梢側 (図 7c) および中枢側

(図 7d) の坐骨神経線維間で空隙を認めた。一方、細胞移植群では、圧挫部位より末梢側の坐骨神経線維間で空隙を認める(図 7e)ものの、中枢側では神経線維間は密であり空隙を認めなかった(図 7f)。そこで、撮影した画像全体の面積に対する神経線維間の空隙面積の割合を圧挫群および細胞移植群で比較した。その結果、圧挫群では  $17.99 \pm 1.65\%$ 、細胞移植群では  $7.04 \pm 3.34\%$  であり、細胞移植群における神経線維間の空隙は圧挫群よりも有意に少なかった ( $P < 0.05$ ) (図 7g)。また圧挫群および細胞移植群の圧挫部末梢側では空胞が観察された(図 4c-e)が、細胞移植群の圧挫部中枢側では観察されなかった(図 4f)。空胞数を測定したところ、圧挫群では  $319.33 \pm 20.24$  個、細胞移植群では  $177.0 \pm 13.06$  個であり、細胞移植群における空胞数は圧挫群よりも有意に少なかった ( $P < 0.05$ ) (図 7h)。

② LFB 染色 髄鞘の存在を明らかにするために、LFB 染色を実施した。画像全体の面積に対する LFB 陽性面積の割合を圧挫群(図 8a)および細胞移植群(図 8b)で比較したところ、圧挫群では  $0.82 \pm 1.11\%$ 、細胞移植群では  $42.29 \pm 5.48\%$  であり、細胞移植群は圧挫群よりも LFB 陽性面積の割合が有意に高かった ( $P < 0.05$ ) (図 8e)。

### III-5 抗 MBP 抗体による免疫組織化学的解析

髄鞘特異的タンパクである MBP を検出するために、免疫組織学的染色を実施した。画像全体の面積に対する抗 MBP 抗体陽性面積の割合を圧挫群(図 8c)および細胞移植群(図 8d)で比較したところ、圧挫群では  $15.73 \pm 2.08\%$  で、細胞移植群では  $37.68 \pm 1.47\%$  であり、細胞移植群は圧挫群よりも抗 MBP 抗体陽性面積の割合が有意に高かった ( $P < 0.05$ ) (図 8f)。

図 7. 圧挫処置後 14 日目の摘出した坐骨神経の H・E 染色像 a: 圧挫群の弱拡大像(4倍) b: 細胞移植群の弱拡大像(4倍) c: 圧挫群の圧挫部より末梢側の強拡大像(40倍) d: 圧挫群の圧挫部より中枢側の強拡大像(40倍) e: 細胞移植群の圧挫部より末梢側の強拡大像(40倍) f: 細胞移植群の圧挫部より中枢側の強拡大像(40倍) g: 各群の単位面積当たりにおける空隙面積の割合(\* $P < 0.05$ ) h: 各群の単位面積当たりにおける空胞の数(\* $P < 0.05$ )

図 8. 圧挫処置後 14 日目の摘出した坐骨神経の LFB 染色および免疫組織化学的解析 a: 圧挫群における LFB 染色 b: 細胞移植群における LFB 染色 c: 圧挫群における抗 MBP 抗体の染色像 d: 細胞移植群における抗 MBP 抗体の染色像 e: 各群の単位面積当たりにおける LFB 陽性面積の割合(\* $P < 0.05$ ) h: 各群の単位面積当たりにおける抗 MBP 抗体陽性面積の割合(\* $P < 0.05$ )

## IV. 考 察

顎口腔外科領域において、下顎埋伏智歯の抜歯、インプラントの埋入および顎骨嚢胞の摘出などの手術後の合併症として、神経線維の損傷および骨切削器具による神経線維の直接的損傷によって末梢神経麻痺が起きることがある(39)。特に、下顎埋伏智歯の抜歯は日常の外来診療でおこなう手術の中で末梢神経麻痺が出現する頻度が最も高いと考えられる。抜歯に伴う下歯槽神経の損傷が起きる要因として、タービンや電気エンジンによる神経の完全断裂や部分的断裂よりも、脱臼操作での歯根の圧迫や骨片の機械的に圧迫による軸索断裂または抜歯後の神経露出による一過性局在性伝導障害が知覚鈍麻症例の主要な原因であると報告されている(40)。そこで、本研究では日常の臨床で遭遇する症例に類似する末梢神経圧挫モデルを作製し歯髄幹細胞の効果を検討することを計画した。末梢神経損傷後の再生はシュワン細胞、神経栄養因子お

(学位論文の内容を要約したもの)

No. 7

愛知学院大学

よび炎症細胞が相乗的に作用し、軸索の伸長や髄鞘化 によって起きる 1, 41, 42)。これまでに、いくつかの幹細胞移植による末梢神経の再生治療への効果が報告されている (4-6, 30)、その理由として移植された幹細胞が神経栄養因子を産生する一方で、損傷により失われたシュワン細胞へ分化して生着することが示唆されている (43)。従って、末梢神経損傷後の細胞治療に用いる細胞源の候補となる条件として、入手がしやすくシュワン細胞への分化が可能であり、軸索の再生を促進させるような成長因子やサイトカインを分泌することが望ましいと考えられる。歯髄幹細胞は、胚葉を超えた多分化能 (7, 8, 14, 19, 20)、種々の成長因子やサイトカインを分泌することで損傷組織の修復能や抗炎症作用 (21-23) および免疫寛容能 (15) を有していることが報告されている。この歯髄幹細胞は抜去歯の歯髄組織から二次的侵襲や倫理的問題もなく、歯科医療の現場で比較的容易に入手できる利点もある。そこで、本研究ではラットの坐骨神経を一定の力で圧挫後にヒト歯髄幹細胞を含む歯髄細胞を圧挫部へ移植することにより、末梢神経の再生を促進することを明らかにした。最初に、移植に利用する歯髄細胞を位相差顕微鏡で観察した。ヒト歯髄組織から酵素処理により採取した細胞を  $3.0 \times 10^4$  個の細胞数で 35 mm 培養ディッシュ上に播種すると、次の日に細胞は接着し、6 日目にはコロニーを形成した。この結果から、間葉系幹細胞の特性の一つであるコロニー形成能をもつ細胞 (15) を認めたことから、歯髄から採取した細胞集団内に歯髄幹細胞が存在することが示唆された。次いで、坐骨神経圧挫部位へ移植された歯髄細胞による運動機能の改善効果を検討した。はじめに、細胞移植を伴わない圧挫群 (圧挫群) と細胞移植群における圧挫処置後 14 日での患側後肢の状態を肉眼的に観察した。圧挫群の患側後肢では第一指から第五指が内反し、各指の間隔が狭まっていた。これに対し、細胞移植群では第一指から第五指が内反することなく、各指が開いており、健側後肢の状態と類似した肉眼的所見が認められた。Cat Walk XT を用いて圧挫処置後 7 日、10 日および 14 日目における歩行した足跡による運動機能を解析した。Cat Walk XT を用いた指間間隔を計測すると、圧挫群と比較して細胞移植群は全ての測定日において有意に短くなっていた ( $P < 0.05$ )。正常ラットでは全歩行周期において踵骨隆起底面からの接地は全くないが、坐骨神経を損傷すると立脚期初期に踵骨隆起底面からの接地を認めるようになることから、指踵間距離は坐骨神経の回復とともに短くなることが報告されている (44)。本研究においても指踵間距離は 7 日目および 10 日目において、圧挫群と比較して細胞移植群は有意に短くなった ( $P < 0.05$ )。これらの結果から、圧挫群と比較して細胞移植群では再生した軸索がより早期に支配筋に到達し (29)、自発的な筋活動が再開されて運動機能が早期に回復したことが示唆された。次に坐骨神経が支配する前脛骨筋の萎縮・変性の程度を、摘出した前脛骨筋の湿重量変化を用いて評価した。圧挫 14 日後における、健側に対する圧挫側の前脛骨筋の筋湿重量の割合を算出すると、圧挫群よりも細胞移植群では有意に高い割合を示した ( $P < 0.05$ )。圧挫処置後 14 日目で圧挫群と細胞移植群の運動機能に有意な差を認めたため、同時点で圧挫した坐骨神経を含む試料を摘出して組織学的解析を行った。H・E 染色像において、圧挫群では圧挫部位より中枢側および末梢側の両側で坐骨神経の線維間に空隙および空胞の形成を認め、神経線維の変性所見が観察された。一方で、細胞移植群において圧挫部位より中枢側では、坐骨神経線維の空隙は末梢側と比較して少なく、空胞形成は観察されなかった。そこで、圧挫部位を中心として中枢側および末梢側における単位面積当たりでの空隙面積と空胞の数を比較してみると、細胞移植群は圧挫群よりも有意に少なかった ( $P < 0.05$ )。このことは、過去に報告さ

れたラット坐骨神経圧挫モデルの圧挫部位へ羊水中に含まれる間葉系幹細胞を移植した細胞移植群と圧挫群との組織学解析結果 (32, 35) と一致しており、細胞移植群の中枢側では髄鞘の形成量が多いことが示唆された。そこで、髄鞘の存在を明らかにするために LFB 染色および抗 MBP 抗体による免疫組織化学的解析を実施した。各実験群における単位面積当たりの LFB 陽性部位と抗 MBP 抗体陽性部位の面積を比較すると、それぞれにおいて細胞移植群が圧挫群よりも有意に広いことが明らかになった ( $P < 0.05$ )。この結果から、細胞移植群の圧挫部より中枢側から再生した神経線維周囲の髄鞘の形成量が多いことが明らかとなった。本研究では、坐骨神経の圧挫部へ歯髄幹細胞を含む歯髄細胞を移植すると、運動機能評価および組織学的解析評価により坐骨神経の再生を促進することが示された。歯髄幹細胞は、血管内皮細胞の遊走と増殖に関わる血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を産生し (45, 46)、脳由来神経栄養因子 (BDNF) (47, 48)、毛様体神経栄養因子 (CNTF) (46)、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) (47, 48) および神経成長因子 (NGF) (46-48) などの各種神経栄養因子を産生することが報告されている。これらの神経栄養因子はシュワン細胞の増殖、遊走、細胞死からの保護、軸索伸長や髄鞘形成を促進されることが知られている (49)。今回の実験結果も、圧挫部に移植した歯髄幹細胞が産生する各種成長因子により、血管新生が誘導されて軸索および髄鞘の再生が促進したと示唆されるが、本研究では明らかにできなかったため、今後の研究課題とする。

V. まとめ 本研究では、ヒト歯髄幹細胞を含む歯髄細胞をラットの坐骨神経を圧挫した部位に移植して坐骨神経の再生を促進する効果を検討したところ、以下の結果および結論を得た。1. ヒト歯髄組織から採取した細胞はコロニーを形成し、幹細胞の特性をもつ細胞を含んでいた。2. 健側に対する患側の前脛骨筋湿重量の割合において、細胞移植群は圧挫群よりも有意に高かった。3. Cat Walk XT による解析で、全測定日において細胞移植群は、圧挫群と比較して指間間隔が有意に広がった。また、圧挫後 7 日目および 10 日目において細胞移植群は圧挫群と比較して指踵間隔が有意に狭かった。4. 組織学的解析から、細胞移植群は圧挫群よりも神経線維間の空隙面積と空胞数が有意に少なかった。5. LFB 陽性面積および抗 MBP 抗体陽性面積において、細胞移植群は圧挫群よりも有意に広がった。以上の結果より、ヒト歯髄幹細胞を含む歯髄細胞をラット坐骨神経の圧挫部に移植すると、坐骨神経の再生を促進することが明らかになった。すなわち、歯髄細胞は末梢神経後の再生治療の細胞源として有用であることが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、懇切なるご指導およびご校閲を賜りました愛知学院大学歯学部顎口腔外科学講座栗田賢一主任教授に深い感謝の意を表します。さらに、本研究にあたり多大なるご指導を賜りました国立長寿医療研究センター研究所幹細胞再生医療研究部中島美砂子部長および口腔解剖学講座鳥海拓講師に深謝いたします。また、研究にご協力いただきました愛知学院大学歯学部顎口腔外科学講座、国立長寿医療研究センター研究所幹細胞再生医療研究部および口腔解剖学講座の皆さまに心から御礼申し上げます。なお、本研究の一部は、第 27 回日本末梢神経学会学術集会 (2016 年 8 月 26 日、大阪)、第 38 回日本炎症・再生医学会 (2017 年 7 月 19 日、大阪) および第 62 回日本口腔外科学会学術総会・学術大会 (2017 年 10 月 21 日、京都) において発表した。

文 献

1. Faroni A, Mobasser SA, Kingham PJ, Reid AJ: Peripheral nerve regeneration: Experimental strategies and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*, 82-83:160-167, 2015.
2. Meyer RA, Bagheri SC: Nerve injuries from mandibular third molar removal. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 19 (1) : 63-78, 2011.
3. Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Fasan VS: Can therapeutic ultrasound influence the regeneration of peripheral nerves? *J Neurosci Methods*, 142 (2) : 185-192, 2005.
4. Matsuse D, Kitada M, Kohama M, Nishikawa K, Makinoshima H, Wakao S, Fujiyoshi Y, Heike T, Nakahata T, Akutsu H, Umezawa A, Harigae H, Kira J, Dezawa M: Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells differentiate into functional Schwann cells that sustain peripheral nerve regeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*, 69 (9) : 973-985, 2010.
5. Cuevas P, Carceller F, Garcia-Gómez I, Yan M, Dujovny M: Bone marrow stromal cell implantation for peripheral nerve repair. *Neurol Res*, 26 (2) : 230-232, 2004.
6. Heine W, Conant K, Griffin JW, Höke A: Transplanted neural stem cells promote axonal regeneration through chronically denervated peripheral nerves. *Exp Neurol*, 189 (2) : 231-240, 2004.
7. Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ: In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun*, 282 (1) : 148-152, 2001.
8. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB: Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*, 61 (4) : 364-370, 2000.
9. Strioga M, Viswanathan S, Darinkas A, Slaby O, Michalek J: Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev*, 21 (14) : 2724-2752, 2012.
10. Shimizu S, Kitada M, Ishikawa H, Itokazu Y, Wakao S, Dezawa M: Peripheral nerve regeneration by the in vitro differentiated human bone marrow stromal cells with Schwann cell property. *Biochem Biophys Res Commun*, 359 (4) : 915-920, 2007.
11. Chen CJ, Ou YC, Liao SL, Chen WY, Chen SY, Wu CW, Wang CC, Wang WY, Huang YS, Hsu SH: Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Exp Neurol*, 204 (1) : 443-453, 2007.
12. Park BW, Kang DH, Kang EJ, Byun JH, Lee JS, Maeng GH, Rho GJ: Peripheral nerve regeneration using autologous porcine skin-derived mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*, 6 (2) : 113-124, 2012.
13. Gärtner A, Pereira T, Armada-da-Silva P, Amado S, Veloso A, Amorim I, Ribeiro J, Santos J, Bárçia R, Cruz P, Cruz H, Luís A, Santos J, Geuna S, Maurício A: Effects of umbilical cord tissue mesenchymal stem cells (UCX®) on rat sciatic nerve regeneration after neurotmesis injuries. *J Stem Cells Regen Med*, 10 (1) : 14-26, 2014.
14. Ullah I, Subbarao RB, Kim EJ, Bharti D1, Jang SJ, Park JS, Shivakumar SB, Lee SL, Kang D, Byun JH, Park BW, Rho GJ: In vitro comparative analysis of human dental stem cells from

- a single donor and its neuronal differentiation potential evaluated by electrophysiology. *Life Sci*, 154: 39-51, 2016.
15. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (25) : 13625-13630, 2000.
16. Ando Y, Honda MJ, Ohshima H, Tonomura A, Ohara T, Itaya T, Kagami H, Ueda M: The induction of dentin bridge-like structures by constructs of subcultured dental pulp-derived cells and porous HA/TCP in porcine teeth. *Nagoya J Med Sci*, 71 (1-2) : 51-62, 2009.
17. Honda MJ, Watanabe E, Mikami Y, Saito Y, Toriumi T, Shirakawa T, Shimizu N, Watanabe N, Isokawa K: Mesenchymal dental stem cells for tissue regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 28 (6) : e451-460, 2013.
18. Tonomura A, Sumita Y, Ando Y, Iejima D, Kagami H, Honda MJ, Ueda M: Differential inducibility of human and porcine dental pulp-derived cells into odontoblasts. *Connect Tissue Res*, 48 (5) : 229-238, 2007.
19. Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, Nakamura S, Naruse M, Yamagata M, Sakamoto K, Tauchi R, Wakao N, Imagama S, Hibi H, Kadomatsu K, Ishiguro N, Ueda M: Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest*, 122 (1) : 80-90, 2012.
20. de Almeida FM, Marques SA, Ramalho Bdos S, Rodrigues RF, Cadilhe DV, Furtado D, Kerkis I, Pereira LV, Rehen SK, Martinez AM: Human dental pulp cells: a new source of cell therapy in a mouse model of compressive spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 28 (9) : 1939-1949, 2011.
21. Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S: Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells*, 26 (7) : 1787-1795, 2008.
22. Király M, Porcsalmy B, Pataki A, Kádár K, Jelitai M, Molnár B, Hermann P, Gera I, Grimm WD, Ganss B, Zsembery A, Varga G: Simultaneous PKC and cAMP activation induces differentiation of human dental pulp stem cells into functionally active neurons. *Neurochem Int*, 55 (5) : 323-332, 2009.
23. Ellis KM, O'Carroll DC, Lewis MD, Rychkov GY, Koblar SA: Neurogenic potential of dental pulp stem cells isolated from murine incisors. *Stem Cell Res Ther*, 5 (1) : 30, 2014.
24. Hei WH, Kim S, Park JC, Seo YK, Kim SM, Jahng JW, Lee JH: Schwann-like cells differentiated from human dental pulp stem cells combined with a pulsed electromagnetic field can improve peripheral nerve regeneration. *Bioelectromagnetics*, [Epub ahead of print] ; doi: 10.1002/bem.21966., 2016.
25. Al-Zer H, Kalbouneh H: Dental pulp stem cells-derived schwann cells for peripheral nerve injury regeneration. *Neural Regen Res*, 10 (12) : 1945-1946, 2015.
26. Carnevale G, Pisciotto A, Riccio M, Bertoni L, De Biasi S, Gibellini L, Zordani A, Cavallini GM, La Sala GB, Bruzzesi G, Ferrari A, Cossarizza A, de Pol A: Human dental pulp

- stem cells expressing STRO-1, c-kit and CD34 markers in peripheral nerve regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*, [Epub ahead of print] ; doi:10.1002/term.2378., 2016.
27. Sasaki R, Aoki S, Yamato M, Uchiyama H, Wada K, Ogiuchi H, Okano T, Ando T: PLGA artificial nerve conduits with dental pulp cells promote facial nerve regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*, 5 (10) : 823-830, 2011.
28. Sasaki R, Aoki S, Yamato M, Uchiyama H, Wada K, Okano T, Ogiuchi H: Tubulation with dental pulp cells promotes facial nerve regeneration in rats. *Tissue Eng Part A*, 14 (7) : 1141-1147, 2008.
29. Sugimura-Wakayama Y, Katagiri W, Osugi M, Kawai T, Ogata K, Sakaguchi K, Hibi H: Peripheral nerve regeneration by secretomes of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cells Dev*, 24 (22) : 2687-2699, 2015.
30. Zarbakhsh S, Moradi F, Joghataei MT, Bahktiari M, Mansouri K, Abedinzadeh M: Evaluation of the Functional Recovery in Sciatic Nerve Injury following the Co-transplantation of Schwann and Bone Marrow Stromal Stem Cells in Rat. *Basic Clin Neurosci*, 4 (4) : 291-298, 2013.
31. Pan HC, Yang DY, Chiu YT, Lai SZ, Wang YC, Chang MH, Cheng FC: Enhanced regeneration in injured sciatic nerve by human amniotic mesenchymal stem cell. *J Clin Neurosci*, 13 (5) : 570-575, 2006.
32. Pan HC, Yang DY, Ho SP, Sheu ML, Chen CJ, Hwang SM, Chang MH, Cheng FC: Escalated regeneration in sciatic nerve crush injury by the combined therapy of human amniotic fluid mesenchymal stem cells and fermented soybean extracts, Natto. *J Biomed Sci*, 16 (1) : 75, 2009.
33. Varejão AS, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Melo-Pinto P, Raimondo S, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG: Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurotrauma*, 21 (11) : 1652-1670, 2004.
34. de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ: An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*, 77 (3) : 634-643, 1982.
35. Pan HC, Cheng FC, Chen CJ, Lai SZ, Lee CW, Yang DY, Chang MH, Ho SP: Post-injury regeneration in rat sciatic nerve facilitated by neurotrophic factors secreted by amniotic fluid mesenchymal stem cells. *J Clin Neurosci*, 14 (11) : 1089-1098, 2007.
36. Gu Y, Zhu J, Xue C, Li Z, Ding F, Yang Y, Gu X: Chitosan/silk fibroin-based, Schwann cell-derived extracellular matrix-modified scaffolds for bridging rat sciatic nerve gaps. *Biomaterials*, 35 (7) : 2253-2263, 2014.
37. Tomita K, Madura T, Mantovani C, Terenghi G: Differentiated adipose-derived stem cells promote myelination and enhance functional recovery in a rat model of chronic denervation. *J Neurosci Res*, 90 (7) : 1392-1402, 2012.
38. Pang CJ, Tong L, Ji LL, Wang ZY, Zhang X, Gao H, Jia H, Zhang LX, Tong XJ: Synergistic effects of ultrashort wave and bone marrow stromal cells on nerve regeneration with

- acellular nerve allografts. *Synapse*, 67 (10) : 637-647, 2013.
39. 山口晋一, 野間弘康, 柴原孝彦: 硬組織用超音波メスによる下歯槽神経損傷: 短時間接触による影響. *歯科学報*, 105 (6) : 589-601, 2005.
40. 松木良介, 竹之下康治, 大山順子, 清木祐介, 佐々木匡理, 堀之内康文, 白砂 兼光: 下顎智歯抜歯後に発症した下唇 知覚鈍麻についての検討. *日本口腔外科学会雑誌*, 51 (12) : 590-595, 2005.
41. Ebadi M, Bashir RM, Heidrick ML, Hamada FM, Refaey HE, Hamed A, Helal G, Baxi MD, Cerutis DR, Lassi NK: Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem Int*, 30 (4-5) : 347-374, 1997.
42. Ahmed MR, Jayakumar R: Peripheral nerve regeneration in cell adhesive peptide incorporated collagen tubes in rat sciatic nerve -- early and better functional regain. *J Peripher Nerv Syst*, 10 (4) : 390-391, 2005.
43. Murakami T1, Fujimoto Y, Yasunaga Y, Ishida O, Tanaka N, Ikuta Y, Ochi M: Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. *Brain Res*, 974 (1-2) : 17-24, 2003.
44. 長井桃子, 小形晶子, 荒川高光, 三木明德: 褥瘡様皮膚病 変を誘発する動物実験モデルの開発: 坐骨神経切断後の ラット踵部の形態学的観察. *神大院保健紀要*, 27 : 31-41, 2011.
45. Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J: Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature*, 438 (7070) : 937- 945, 2005.
46. Huang AH, Snyder BR, Cheng PH, Chan AW: Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. *Stem Cells*, 26 (10) : 2654-2663, 2008.
47. Nosrat IV, Widenfalk J, Olson L, Nosrat CA: Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Dev Biol*, 238 (1) : 120-132, 2001.
48. Nosrat IV, Smith CA, Mullally P, Olson L, Nosrat CA: Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur J Neurosci*, 19 (2) : 2388-2398, 2004.
49. Madduri S, Gander B: Schwann cell delivery of neurotrophic factors for peripheral nerve regeneration. *J Peripher Nerv Syst*, 15 (2) : 93-103, 2010.