

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 今井 有蔵
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第514号
学位授与の日付 令和4年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 脂肪組織由来幹細胞から抽出した Cell Extract の in vitro における末梢神経再生効果の検討

論文審査委員 主査 教授 照沼 美穂
副査 教授 瀬尾 憲司
副査 教授 田沼 順一

博士論文の要旨

【緒言】

下顎埋伏智歯抜歯術やインプラント埋入術などは、下歯槽神経や舌神経などの末梢神経を損傷することは少なくない。これを原因とする慢性疼痛に対しては、薬物療法や星状神経節ブロック、自家神経移植といった外科的治療が行われているが、薬物療法では副作用や薬物依存を助長するリスク、星状神経節ブロックでは合併症の発生、自家神経移植術は正常な神経組織の一部を犠牲にする必要がある。そういった現状から、近年は脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived stem cells : ADSCs) などの幹細胞を用いた再生治療の開発が行われている。ADSCs は脂肪組織から獲得することができ、脂肪細胞や神経細胞、心筋細胞などに分化できる多分化能を有しているが、幹細胞を用いた治療を臨床に応用するためには、細胞の移植による拒絶反応の可能性や、幹細胞の保管や輸送の管理といった課題がある。しかし、細胞構造を破壊することによって作製される細胞抽出物 (Cell Extract : CE) は腫瘍原性や免疫原性のリスクが低く、1年以上の長期保存も可能である。さらに放射線照射後の唾液腺機能の回復や、心筋梗塞後の心機能を回復させるといった様々な臓器再生における CE の有用性が報告されている。しかし、CE を末梢神経再生へ応用した研究はない。そこで本研究では、ADSCs 由来 CE (CE-ADSCs) は末梢神経細胞を活性化させ末梢神経の再生を促進できるのではないかと仮説を立てた。本研究では、CE-ADSCs に含まれる各種因子を解析し、CE-ADSCs の末梢神経細胞への効果を検討した。

【方法】

9週齢の C57BL/6J マウス鼠径部の脂肪組織より ADSCs を樹立した。ADSCs を生理食塩水に懸濁し、懸濁液に対して凍結・解凍操作を3回繰り返すことにより細胞構造を破壊した。その後、遠心分離操作により上清を回収し、CE-ADSCs として実験に使用した。まず、CE-ADSCs の成分を解析したのち、CE-ADSCs を添加した培地を用いて培養することで、CE-ADSCs のシュワン細胞、後根神経節 (Dorsal root ganglion : DRG) ニューロン、PC12D 細胞に対する効果を解析した。シュワン細胞はコスモ・バイオ株式会社より購入し、MTT 法を用いて生細胞数を、ELISA 法を用いて glial fibrillary acidic protein (GFAP) 量を測定した。DRG ニューロンは、10-12週齢 SD ラットにより樹立し、位相差顕微鏡を用いて Neurite-bearing cells (細胞体よりも長い突起を有する細胞) の割合の測定を、蛍光免疫染色 (betaIII-Tubulin) および Image J ソフトウェアを用いて突起の長さを測定した。また PC12D 細胞は愛知医科大学医学部細胞生物学教室より提供されたものを用いて、Image J ソフトウェアにて突起の長さを測定した。

【結果】

- ・ CE-ADSCs 中には vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF), basic-fibroblast growth factor (basic-FGF) などの血管新生関連因子, および stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) などのサイトカインが含まれていた
- ・ タンパク濃度 12.5 µg/ml の CE-ADSCs を培地に添加した群 (CM+CE-ADSCs (12.5 µg/ml)) では, 基本培地 (コントロール培地) で培養した群と比較して, シュワン細胞数 ($p < 0.05$, Dunnett' s test) や GFAP 量 ($p < 0.01$, Unpaired Student' s T-test) が有意に増加した
- ・ CM+CE-ADSCs (12.5 µg/ml) 群ではコントロール培地群と比較して, Neurite-bearing cells の割合 ($p < 0.01$, Dunnett' s test) や DRG ニューロンの突起長さ ($p < 0.01$, Unpaired Student' s T-test), PC12D 細胞の突起長さ ($p < 0.01$, Dunnett' s test) が有意に増加した

【考察】

末梢神経が損傷すると, マクロファージやシュワン細胞の貪食作用により損傷神経が除去されたのち, シュワン細胞が神経内膜や基底膜に沿って配列し再生の足場として機能する. さらにその配列に沿ってニューロンは軸索を伸長し, 標的細胞とのネットワークを再構築させる. また実験に使用した PC12D 細胞はラット褐色細胞腫から株化された細胞であり, 神経成長因子添加により増殖を停止し, 神経線維の伸長および神経細胞様に分化する特徴を有することから, 特定の物質に対する分化誘導作用を調べるモデルとして使用されている. 本研究より, CE-ADSCs の培地添加が, これら細胞の細胞数や突起長さを増加させたことから, CE-ADSCs が神経細胞への分化誘導や, 損傷神経の再生を担うシュワン細胞やニューロンを活性化させることによって末梢神経再生の促進に関与する可能性を示唆することができた.

本研究で作製した CE-ADSCs の総タンパク濃度は 4.1 ± 0.1 mg/ml であり, 過去の報告 (4.2 mg/ml) と同程度であった. 過去には, タンパク濃度 4.24 mg/ml の CE-ADSCs やタンパク濃度 1.3 mg/ml の骨髄細胞由来の CE をマウス尾静脈から投与すると, 唾液腺機能が回復するとの報告がある. 本研究ではタンパク濃度 0.0125 mg/ml の CE-ADSCs を用いることで末梢神経細胞の増殖や突起伸長が増加したが, CE-ADSCs を培地に添加することで細胞に直接作用させたため, 過去の報告と比較して 1/340 から 1/100 の低濃度でも効果を示したものと思われる.

CE-ADSCs 中の成分を解析すると, VEGF や HGF, basic-FGF, SDF-1 などが含有していたが, 本研究ではすべての因子を調べたものではない. したがって, CE-ADSCs の中に含まれるどの因子が有効であったかを示すことはできず, 今後のさらなる研究が必要である.

【結論】

CE-ADSCs 中の何らかの因子が, 末梢神経細胞に有効に作用する可能性があり, 新たな末梢神経再生の治療法となり得ることが明らかになった.

審査結果の要旨

末梢神経損傷を起因とする慢性疼痛には薬物療法や星状神経節ブロック、外科的治療が用いられているが、いずれの場合にも副作用や薬物依存、合併症を助長するリスクや適応症例が限られる点など、問題点も多い。本研究では、近年再生治療技術の開発において盛んに用いられている幹細胞の一つである脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived stem cells : ADSCs) に着目している。ADSCs は脂肪組織から獲得することができ、採取時の侵襲性が他の細胞に比べて少ない。加えて、この細胞は増殖能が高く、脂肪細胞や骨芽細胞、軟骨細胞、神経細胞、心筋細胞、肝細胞などへの分化能も報告されている。このような細胞の獲得し易さと細胞の多分化能にも注目して材料を選択している点は高く評価できる。さらに、細胞の移植によって生まれる拒絶反応の可能性や、幹細胞の保管や輸送を含む管理などの問題点を排除するために、ADSCs そのものではなく、腫瘍原性や免疫原性のリスクが低く且つ長期保存も可能な ADSCs の細胞抽出物 (Cell Extract : CE) を使用していることが、本研究の科学的価値をさらに高めている。ADSCs から作製した細胞抽出物 (CE-ADSCs) を、末梢神経の再生への応用を目指して検討した研究はこれまでにな

い。このことから、本研究は学術的意義が高く、新規性のある研究だと言える。

研究をデザインする上で、臨床への応用を見据えての下記のような工夫も見られており、本研究のユニークさを際立たせている。

(1) CE-ADSCsの由来種（マウス）とシュワン細胞・DRGニューロン・PC12D細胞の由来種（ラット）とで異なる動物を使用している：実臨床においてはドナーとレシピエント間の免疫反応を考慮する必要があるため、より臨床を意識した研究となるように、ドナーとレシピエントの動物を別にして研究を行った。

(2) 先行研究では骨髄由来間葉系幹細胞から抽出したCEを使用していたが、本研究ではCE-ADSCsを使用している：骨髄由来幹細胞を獲得するためには全身麻酔下で骨髄液から採取する必要がある。一方、脂肪は局所麻酔下での脂肪吸引により採取できるため、より低侵襲かつ安全である。さらに脂肪組織は体内に多く存在しており、骨髄と比べてより多くの幹細胞を獲得することができる。このことから、脂肪から獲得するADSCs、そしてADSCsから作製されるCE-ADSCsは、より臨床に応用し易い。

本研究では、シュワン細胞、DRGニューロン、さらには神経細胞様に変化するPC12D細胞を用いて神経再生効果の有無をそれぞれ検討している。つまり本研究は、*in vitro*でのCE-ADSCsの効果を検討するために適切な細胞を選択して使用しており、実験手法や解析手法についても、現時点での可能な限り最善のものが選択されている。再現性の点では、まだ実験回数が少ないところもあるが、CE-ADSCsを複数回抽出して検討しており、また手技をしっかりと確立していることから、今後さらなるデータの蓄積と共に、応用への取り組みへと発展していくと考える。

本研究によってCE-ADSCsには神経再生の効果を有することが示唆されたが、CE-ADSCsは細胞構造を破壊して細胞内に含まれる成分を抽出したものである。そのため、細胞の分泌物質、細胞内物質のいずれが再生効果を有するのかわかっていない。今後はCEとADSCsを培養した培地上清それぞれでの末梢神経細胞への効果の違いの検討や、プロテオミクス解析による分子の同定も予定しているとのことから、今後の研究成果が楽しみである。

現在、損傷した神経に対する治療は、ギャップを埋めるために神経再生誘導チューブが使用されている。本研究成果は、例えばチューブ内にCEを充填することでCEが再生の足場として機能する可能性を示すものであり、損傷神経線維の再生を誘導できる可能性がある。また、本研究では明らかにはされていないが、今後解析が進むことでCE内の末梢神経再生に関与する因子が同定されることが期待され、神経損傷症例に対しての新たな治療法の提供に結びつく可能性がある。こうした点を考えても、本研究が神経損傷の研究にもたらした貢献は大きいと考える。

今後の研究の進展により、分子レベルでのCEの機能が明らかになり、*in vivo*での研究、さらには臨床への応用へと進むことを期待する。