

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（要約）

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 今井 有蔵

【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 $\mu\text{g/ml}$ の CE-ADSCs を培地に添加した群 (CM + CE-ADSCs (12.5 $\mu\text{g/ml}$)) 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 $\mu\text{g/ml}$) 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 $4.1 \pm 0.1 \text{ mg/ml}$ 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 の骨髓細胞由来の 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.