

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 小山 祐平  
学位 博士 (歯学)  
学位記番号 新大院博 (歯) 第515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 Cell Extract from Adipose Tissue-derived Stem Cells Potentiates Peripheral Nerve Regeneration  
(脂肪組織由来幹細胞の細胞抽出物は末梢神経再生を強化する)

論文審査委員 主査 教授 山村 健介  
副査 教授 瀬尾 憲司  
副査 教授 前田 健康

### 博士論文の要旨

#### Introduction

智歯抜歯や口腔インプラントの埋入などの歯科治療時に下歯槽神経を損傷することがある。末梢神経は再生能力があることが知られているが、その再生過程でしばしば外傷性の神経瘤を形成することがある。これは口腔顔面領域の知覚異常や難治性の痛みを引き起こし、患者のQOLを著しく低下させる。末梢神経損傷に対しては外科的治療法が行われてきたが、手術侵襲などの欠点が多い。そこで近年、幹細胞を用いた新たな治療法の開発が進んでいる。多分化能を有する間葉系幹細胞のひとつである脂肪組織由来幹細胞 (Adipose Tissue-derived Stem Cells: ADSCs) は末梢神経を再生することが報告されている。また、ADSCs から抽出された細胞抽出物 (Cell Extract: CE) は放射線照射後の障害唾腺を再生させ、また骨髄細胞から抽出された CE も心筋梗塞後の心機能を改善したことが報告されている。これは CE に何らかの臓器再生を促進する因子が含まれていることを示唆するが、CE を末梢神経再生に応用した報告はない。われわれは ADSCs から抽出した CE (CE-ADSCs) が末梢神経の再生を促進する効果があるのではないかと仮説を立てた。本研究の目的は CE-ADSCs の損傷された末梢神経に対する再生効果を検討することである。

#### Materials and Methods

マウスの脂肪組織を採取し、ADSCs を培養した。培養した ADSCs を凍結、解凍、および遠心分離操作を行い、CE を作製した。ラットの左側下歯槽神経を 1.5 mm 幅で切断し、同部に生体吸収性ハイドロゲルと混合した生理食塩水 (Vehicle 群)、または CE (CE 群) を移植し、組織学的観察による軸索の伸長、Schwann 細胞およびマクロファージの局在を評価した。さらに、左側オトガイ部領域への機械的刺激に対する頭部逃避閾値を測定し、機能的評価を行った。

#### Results

移植後 7 日目における HE 染色では、CE を移植した動物では、生理食塩水の移植した動物と比較して、切断部近位断端から神経線維がより伸長していた。PGP 9.5 による蛍光免疫染色では、生理食塩水を移植した動物において、切断部近位断端から放射状に乱雑に神経線維が伸長した。一方で、CE を移植した動物では、神経線維が遠位方向へ乱れなく伸長した。pan neurofilament (pNf) と S100 $\beta$  による二重蛍光免疫染色では、CE を移植した動物では、Schwann 細胞が切断部遠位に認められ、近位において伸長した軸索に沿って認められた。pNf と MPZ による二重蛍光免疫染色では、生理食塩水を移植した動物では、切断部遠位にミエリンの断片が認められた。一方で、CE を移植した動物では、ミエリン断片は認められなかった。生理食塩水を移植した動物、CE を移植した動物ともに、伸長した軸索に沿ったミエリン化は認められなかった。移植後 3 日目における、Iba1 による蛍光免疫染色では、CE を移植した動物では、生理食塩水を移植した動物と比較して、より多くのマクロファージが切断部近位に浸潤していた。切断側である左側オトガイ部への機械的刺激による頭部逃避閾値は、

Vehicle 群、CE 群の両群で、移植後 1 日目で切断前と比較して、有意に閾値が上昇 ( $p < 0.05$ ) し、最大値を示した。その後、Vehicle 群では、閾値が減少し続け、7 日目で最低値となり、14 日目でも変化が認められなかった。一方、CE 群では、14 日目で Vehicle 群と比較して、有意に閾値が高く ( $p < 0.05$ )、神経切断手術前のレベルになった (有意差なし)。

#### Discussion

CE を移植すると、S100 $\beta$  陽性の Schwann 細胞が切断部遠位および伸長した軸索周囲に多数認められたことから、CE が Schwann 細胞の増殖、切断部近位への遊走、Bungner バンドの形成を促進し、また軸索の伸長を促進した可能性がある。また Iba1 陽性のマクロファージが切断部近位で多数観察され、さらに軸索の再生を阻害するミエリン断片が認められなかったことから、CE によりマクロファージが増殖し、ミエリン断片の食作用が促進された可能性がある。このように CE は Schwann 細胞やマクロファージといった非神経細胞を活性化することで、神経再生のための微小環境を整えていることが示唆された。CE を移植すると、頭部逃避閾値の低下は認められず、乱れのない軸索の伸長が認められたことから、CE は神経腫の形成を抑制したと考えられ、また mechanical allodynia の発症を抑制したことが示唆された。CE の移植と幹細胞自体の移植と比較して、細胞膜成分を除外した細胞溶解物を移植する cell-free therapy であることから、免疫反応性が低く、腫瘍を形成するリスクが低いとされており、従来の ADSCs 自体の移植と比較して、メリットがあると考えられる。

#### Conclusion

本研究によって、CE-ADSCs の移植が切断されたラット下歯槽神経の再生を促進することが明らかになった。CE の移植は、通常の神経再生の過程を強化し、末梢神経再生における有効な治療法となる可能性がある。

#### 審査結果の要旨

下顎智歯の抜歯、局所麻痺時、顎骨腫瘍や嚢胞の摘出、デンタルインプラントの埋入や顎矯正手術など様々な歯科治療の偶発症として下歯槽神経損傷がしばしば遭遇する。これら末梢神経の損傷により難治性で慢性化した疼痛を引き起こすことが知られており、大きな問題となっている。臨床的な所見として、神経損傷部での外傷性神経腫が形成されるケースが多く報告され、神経腫が神経損傷後の痛みに関与している可能性が示唆されている。申請者は多分化能を有する間葉系幹細胞のひとつである脂肪組織由来幹細胞 (Adipose Tissue-derived Stem Cells: ADSCs) に末梢神経再生効果があること、さらにその ADSCs から抽出された細胞抽出物 (CE-ADSCs) にも障害唾腺や心筋細胞を再生する効果があることに着目し、末梢神経に対しても CE-ADSCs は再生促進効果があるという仮説を立て、その検証を行った。

検証実験は下歯槽神経を切断したラットの神経切断部にマウス CE-ADSCs を適用し、神経再生の経過を組織学的および行動学的に比較することで行った。CE-ADSCs はマウス脂肪組織から培養した ADSCs をトリプシン処理、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結、 $37^{\circ}\text{C}$  で溶解を 3 度繰り返すことで抽出した。抽出した CE-ADSCs を生体吸収性ハイドロゲルと混合し、1.5 mm 幅で下歯槽神経を切断したラットの神経切断部に移植し (CE 群)、経時的に軸索の伸長、Schwann 細胞およびマクロファージの局在を生理食塩水-ハイドロゲル交合物移植群 (Vehicle 群) との間で比較した。さらに再生した軸索がどのように機能しているかをオトガイ部領域への機械的刺激に対する頭部逃避閾値を測定することで評価した。

その結果申請者は、移植後 7 日目には、CE 群では切断部近位断端からの神経線維の伸長が Vehicle 群より早く (H-E 染色による観察)、伸長方向の乱れも少ないこと (軸索マーカーである PGP9.5 を用いた観察)、Schwann 細胞が切断部遠位に認められ、近位において伸長した軸索に沿って認められ、ミエリン断片が認められないこと (軸索マーカーである pNF と Schwann 細胞マーカーである S100 $\beta$  による二重蛍光免疫染色による観察) を明らかにした。また、マクロファージのマーカーである Iba1 による蛍光免疫染色によって CE 群では、Vehicle 群と比較して、より多くのマクロファージが切断部近位に浸潤していることも明らかにした。さらにオトガイ部への機械的刺激による頭部逃避閾値は両群とも移植後 1 日目では大きく上昇し、その後減少するが、Vehicle 群では減少が 7 日目で最大になりそのレベルが 14 日目まで維持されるが、CE 群では、閾値は 7 日後以降緩やかに増大し、14 日後には Vehicle 群と比較して有意に高くなることも明らかにした。以上の結果をもとに申請者は CE-ADSCs の移植が切断された下歯槽神経の正常な再生を促進すると考察している。

本研究は多 CE-ADSCs を神経損傷部に適用することにより、神経腫を形成するリスクを低減しながら神経再

生を促進させる可能性を示し、将来的に末梢神経再生における有効な治療法となる可能性があることを示唆した貴重な研究である。一方、審査において、再生軸索の機能を検証した頭部逃避閾値を測定データの解釈に対する再検討の必要性が指摘された。申請者は、これについて検討・考察を行い、本研究が持つ臨床的意義や限界を回答するとともに、今後の研究の発展すべき方向性についても展望している。

以上のような審査の結果を踏まえ、小山祐平氏が提出した論文は歯学の発展に寄与するところがあり、同氏は歯学研究者としての資質を十分に備えていると認められたことから、博士の学位を授与するに相応しいと判断した。