

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学フォーラム (2014.02) 14巻1号:45～46.

平成23.24年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題
2) 歯髄幹細胞を用いた網膜移植治療法の確立(新しい幹細胞移植の開発)

研究代表者 高宮 央

2) 歯髄幹細胞を用いた網膜移植治療法の確立 (新しい幹細胞移植の開発)

研究代表者 高宮 央

[目的]

哺乳類において、成熟した網膜細胞は自己再生能を殆んど有さない。近年、増加している糖尿病網膜症や加齢黄斑変性、遺伝性疾患の網膜色素変性症は網膜を傷害し永久的な視力障害を引き起こすが、現在のところ網膜傷害に対する有効な治療法は無い。この傷害部位を正常網膜に置き換えて視力回復を図る網膜移植治療は、重篤な視力障害を抱える人々にとって希望の光と成り得る治療法である。しかし、これまでに多くの網膜移植に関する研究が行われて来たが、未だ有用には至っていない。その最大の理由は有用なドナー細胞が存在しないことである。今回我々は、幹細胞を高率に含み再生医療分野で話題となっている歯髄細胞を使用し、その有用性と可能性について検討した。

[方法]

1 動物と歯髄細胞の抽出

GFP (green fluorescein protein) 陽性マウス (バックグラウンド: C57BL/6 マウス (Okabe, 1997)、生後 2-4 ヶ月) から歯髄細胞を取り出し、野生型 C57BL/6 マウス (生後 2-4 ヶ月) に網膜移植をした。ペントバルビタールの過剰投与による安楽死の後、GFP 陽性マウスの下歯から歯髄組織を出しコラゲナーゼ I 酵素 (3 mg/ml Worthington Biochemical, Lakewood, NJ) およびデスパーゼ酵素 (4 mg/ml エーディア、東京) によって分離して歯髄細胞を得た。

2 網膜移植前グリオトキシン治療

野生型マウスにグリオトキシン (Sigma, St. Louis, MO) を前投与してグリオーシスを抑制することでドナー細胞の生着率向上を図った。この方法は米国ハーバード大学 - スケプンス眼研究所、Chen 博士の下で我々が開発した方法である。

3 歯髄細胞の網膜移植

グリオトキシン治療後 2 日目に GFP 陽性歯髄細胞 ($1 \times 10^4 \sim 10^5 / \mu l$ を $2 \mu l$) をマイクロピペットニードルを用いて野生型マウスの網膜下に移植した。

4 網膜移植の評価

移植後の 2 週および 3 週目の網膜凍結切片 ($12 \mu m$) を作製し、GFP 陽性歯髄細胞の形態学的変化を組織学

的に検討した。また同じ切片を用いて視細胞マーカーである抗リカバリン抗体 (Millipore Temecula, CA) を用いた IHC を行った。

[結果]

網膜移植後 2 週および 3 週目の網膜切片において移植した GFP 陽性細胞を認めた。その多くは網膜下腔に存在し、網膜内まで侵入した細胞は少数であった (図 1)。(GCL: 神経節細胞層、INL: 内顆粒層、ONL: 視細胞層、RPE: 網膜色素上皮層、矢印の green 細胞: 移植した歯髄細胞、White Bar= $30 \mu m$)

網膜移植の際に硝子体腔に出た GFP 陽性歯髄細胞は索状構造 (図 2 矢印) を形成し生存していた。以前に我々が行った脂肪細胞移植とは異なり、網膜表層に接着し突起を伸展させた GFP 陽性細胞は観察されなかった (図 2)。(green の索状: 移植した歯髄細胞、White Bar= $30 \mu m$)

一部の GFP 陽性細胞は網膜外層に観察された。視細胞層には突起を伸展させ、視細胞様の形態を有する細胞が認められた (図 3)。

(GCL: 神経節細胞層、INL: 内顆粒層、ONL: 視細胞層、White Bar= $30 \mu m$)

抗リカバリン抗体を用いた免疫組織化学法視細胞層において一部の GFP 陽性細胞はリカバリン (視細胞マーカー) を発現していた (図 4)。(INL: 内顆粒層、ONL: 視細胞層、Red: リカバリン陽性細胞、White Bar= $30 \mu m$)

[考察]

歯髄は神経堤由来の細胞¹⁾ であるため、他の間葉系幹細胞に比べて神経系細胞への分化が優れていると考えられる。近年、歯髄細胞を用いた神経再生に関する研究報告が散見され、歯髄幹細胞はこの分野で注目されつつある幹細胞であるが、これまでに歯髄細胞を用いた網膜再生の研究報告はない。

今回我々が初めて網膜移植のドナー細胞として歯髄細胞を用いその有用性を検討した。本研究では GFP 陽性マウスの歯髄細胞を野生型マウスの網膜下に移植し、移植後の形態学的変化を観察した。移植後、網膜下に多数の GFP 陽性歯髄細胞が観察されたが、その多くは形態学的変化に乏しかった (図 1)。一方、硝子体腔では GFP 陽性歯髄細胞が集合し索状構造を形

成し GFP を強発現していた (図 2)。これらの結果より、硝子体腔は歯髄細胞が生存し易い環境にあり長期生存が可能な空間であると考えられた。しかし、移植後の形態学的変化に関しては網膜下腔および硝子体腔のどちらにおいても、その変化は乏しかった。近年、マウスの脳に移植した歯髄幹細胞において、その細胞自体には形態学的変化を認めなかったという報告がなされた²⁾。今回の我々の研究においても、網膜移植した歯髄細胞の形態学的な変化は乏しかったことから、歯髄細胞自体の網膜細胞へ分化能は高くないことが示唆された。一方、移植した歯髄細胞によって既存の脳細胞の潜在的な増殖能および分化能が活性化され脳細胞

の再生を促すことが可能であったとする報告がなされた²⁾。従って、脳細胞と同様に、網膜においても歯髄細胞移植によって既存網膜の増殖能や分化能が活性化することで網膜の再生が誘導される可能性が考えられる。更に近年、脊髄損傷モデルや脳梗塞モデルにおいて歯髄幹細胞移によって機能回復に成功したという報告³⁻⁴⁾もあり、今後は歯髄細胞移植後に生じる網膜細胞の分化、増殖そして再生に関する検討を行う必要があると考える。

現在 iPS 細胞を使用した再生医療の研究は盛んに行われ、今まさに臨床応用が行われようとしているところではあるが、現実には未だ多くの解決すべき課題を抱えている。iPS 細胞に比べて歯髄幹細胞を含めた内在性幹細胞は安全面において秀でており、その取り扱いも容易であるため、今後の再生医療において大きな可能性を秘めている細胞といえる。中でも歯髄細胞はこれからの神経系再生医療の有用なアイテムの一つなり得る細胞である。更なる研究を進めその有用性について検討していく必要ことが、今後の再生医療の発展にとって重要であると考えられる。

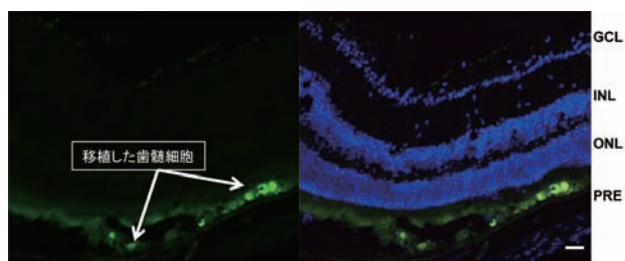


図 1 網膜移植をした歯髄細胞 (右図は DAPI 染色)

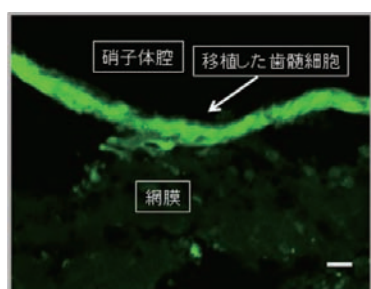


図 2 硝子体腔における歯髄細胞

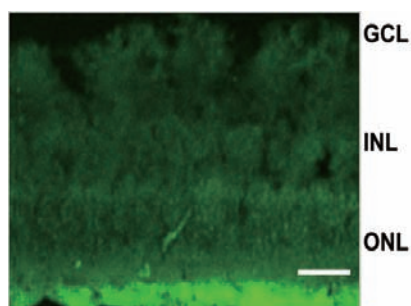


図 3 網膜内に進展した歯髄細胞

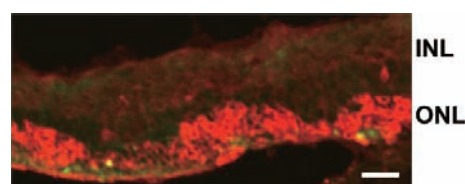
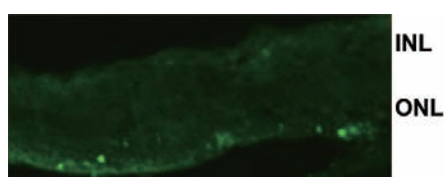


図 4 網膜移植した歯髄細胞 (右) と抗リカバリン抗体を用いた免疫組織化学法 (左)

[文 献]

- 1) Gronthos, S et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97:13625-13630.
- 2) Huang, AH et al. Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. Stem Cells. 2008;26:2654-63.
- 3) Sakai, K et al. 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. 2008;122: 80-90.
- 4) Yamagata, M et al. Human Dental Pulp-Derived Stem Cells Protect Against Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Mice. Stroke. 2013;44:551-4.