

《様式B》

研究テーマ 「ヒト歯髄細胞を用いた急性脊髄損傷治療に関する研究」

研究責任者 所属機関名 岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 分子生物学研究室

官職又は役職 教授

氏名 福光 秀文 メールアドレス hfukumi@gifu-pu.ac.jp

共同研究者 所属機関名 日本バイオリサーチセンター

官職又は役職 検査部・主任

氏名 安藤 次郎

(令和2年度募集) 第33回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1,000字程度)

※産業技術として実用化の可能性や特許出願 (予定も含む) の有無についてもご記載ください。

わが国の脊髄損傷の罹患数は 10-15 万人と見積もられている。現状、抜本的治療法は開発されていないが、間葉系幹細胞 (特に骨髄間葉系幹細胞) の移植療法が臨床研究で進んでおり、期待されている。間葉系幹細胞のソースとして、抜去歯由来であり、採取および樹立が容易な歯髄細胞 (dental pulp cells: DPC) が注目を集めている。我々は、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: FGF2) を処理した DPC を脊髄損傷 SCI モデルへ移植すると、顕著な治療効果を誘導できるが、治療効果には DPC のクローン差があることを明らかにしている (Nagashima et al., 2017; Sugiyama et al., 2019)。本研究では、複数のドナー細胞を用いて、SCI モデルへの移植治療効果および細胞の性状の関係をつぶさに検討し、値用効果のクローン差の要因に抗酸化能の違いが関与している可能性を明らかにし、関連する抗酸化因子 B を同定した。また、抗酸化能に関与する別のカスケード制御分子 (転写因子 X) の活性化剤 ActX の併用により、DPC における抗酸化因子 C-E の発現が誘導されること、DPC の抗酸化能が亢進すること、を明らかにした。この ActX の作用にはクローン差は認められなかった。一方で、そのままでは治療効果のない DPC を ActX/FGF2 を処理して SCI モデルに移植したところ、群間の有意差は認められなかったが、顕著な運動機能回復効果を示す個体が複数生じた。今後、アプリケーション法などの工夫により、クローンによらない安定した DPC 移植療法を確立させたい。特許出願を経て、医療 (産業) 技術などの実用化へと展開したい。

## 2. 実施内容および成果の説明（A4で、5ページ以内）

### 研究背景

脊髄は脳と末梢の情報伝導路であり、損傷すると感覚・運動麻痺が生涯続く。我が国の脊髄損傷の患者数は総計 10-15 万人、毎年 5 千人が新たに受傷している。治療法は確立されておらず、開発を渴望されている。

近年、幹細胞移植療法の臨床研究が盛んになり、様々な疾患に対する骨髄間葉系幹細胞の移植療法が期待されている。歯髄細胞は入手の容易さから、骨髄間葉系幹細胞に代わる移植源として注目を集めている。

脊髄損傷に対する細胞療法を考えると、移植される環境は細胞にやさしくない。すなわち、損傷中心部の脊髄組織では物理的組織損傷に続く、炎症反応により活性酸素の組織含量が増加し、ホスト側の神経組織細胞の生存だけでなく、移植細胞の生着も妨げられる。我々は FGF2 処理して移植すると、歯髄細胞の抗酸化能が亢進し、SCI モデル動物の運動機能回復効果を顕著に増強すること、だが一方で歯髄細胞の移植治療効果には歯髄細胞（ドナー）クローンの性状差に基づく顕著な違いがあること、を見出している。

そこで、本研究では、（ドナー）クローンの性状差の要因を調べるべく、各ドナーにおける抗酸化因子の発現をウエスタンブロット法により定量し、抗酸化活性との相関を調べた。また、化合物 ActX の処理が抗酸化因子の発現および抗酸化能、引いては移植後の SCI モデル動物の後肢運動機能に及ぼす影響を検討した。

なお、本研究は岐阜大学医学研究等倫理審査委員会、岐阜薬科大学倫理審査委員会の審査、承認を経て、岐阜大学医学部にて保持されているヒト歯髄細胞ストックから 7 クローン（DPa~g：実際には歯髄細胞の樹立の順に通し番号を付与されているが、論文投稿前であるため詳細は示さず）を提供され、これらのヒト歯髄細胞を用いた実験はすべて岐阜薬科大学の施設内で行った。共同研究者である日本バイオリサーチセンターでは、市販のヒト腫瘍細胞を用いて投与経路に関する検討を行った。また、脊髄挫滅モデルの脳脊髄液中のサイトカイン含量などの測定を試みた。

### 実施内容

1. 損傷局所へのヒト歯髄細胞移植がラット完全切断 SCI モデルの後肢の運動機能に及ぼす影響

以前の報告 (Sugiyama et al., 2017) と同様に、2 クローンのヒト歯髄細胞を FGF2 添加培養し、rat 脊髄完全切断 (全切断 spinal cord injury: 全切断 SCI) モデルの損傷中心に移植し、移植後の後肢の運動機能を経時的 (各週測定 6 週間にわたり) に評価した (BBB スコア)。BBB スコアは後肢の運動機能の回復を 1-21 点でスコアリングする評価法である。7 クローンのうち、4 クローン (DPa-d) に治療効果があり、3 クローン (DPe-g) には治療効果が認められなかった (図 1. 概念図)。

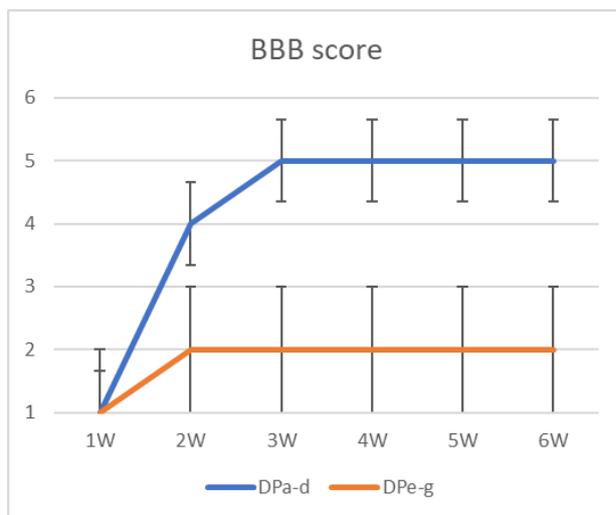


図 1 DPC 移植後のラット後肢の運動機能の回復効果

## 2. ドナーの異なる歯髄細胞クローンの性状差

FGF2 添加の有無により培養した DPC の増殖能を播種 0、3、7 日後に計数し、各クローンの増殖曲線を作製した。得られた結果より、各クローンの倍加時間を求めた。

次に、創傷治癒アッセイを用いて、各 DPC クローンの migration 速度を測定した。多くのクローンで FGF2 添加培養により倍加時間が短縮、migration 速度の促進がみられたが、治療効果との相関性はみられなかった。MTT アッセイにより、活性酸素細胞毒性に対する抵抗性を検討した。治療効果を示した 4 ク

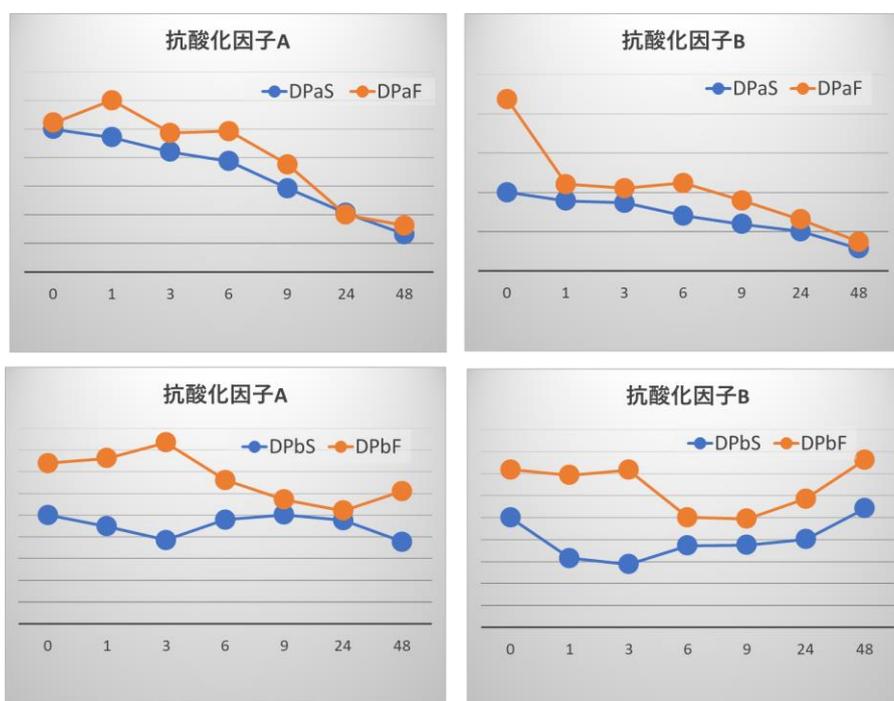


図 2 活性酸素処理後の抗酸化因子 A、B の経時的変化 (DPa, b) X 軸は時間経過 (h)、Y 軸は任意の測定値を示す。

ローンにおいて、活性酸素細胞毒性に対する抵抗性が高いことが明らかになった（データは示さず）。

次に、活性酸素毒性に対する抵抗性に違いがみられた DPa および DPb を用いて、活性酸素処理後の代表的な抗酸化因子の発現をウエスタンブロット法により検討した。その結果、抗酸化因子 A および B でドナー間および FGF2 の処理による変化が認められた（DPXXXS、DPXXXF はそれぞれ、FGF2 不含培地にて培養、FGF2 含有培地にて培養した DPC を示す）。すなわち、FGF2 処理の有無にかかわらず、抗酸化能の低い DPa は抗酸化能の高い DPb と比較して、活性酸素処理直後数時間以内の抗酸化因子 A、B の発現が低く、時間とともに減少する傾向が認められた（図 2）。そこで、7 クローンの DPC を用いて、抗酸化因子 A、B の発現と活性酸素毒性に対する抵抗性の相関性を検討したところ、抗酸化因子 B の発現と抗酸化活性に相関性があることが明らかとなった（抗酸化因子 A:  $R^2 < 0.005$ 、抗酸化因子 B:  $R^2 \approx 0.7$ ）。

### 3. 転写因子 X 活性化剤 (ActX) 処理が DPC の抗酸化能に及ぼす影響

上記の結果から、FGF2 処理の有無にかかわらず抗酸化因子 B の発現が高い DPC が高い抗酸化活性を示すことを明らかにしたが、一方で、抗酸化活性と相関する代表的な転写因子 X 経路の活性化やそのシグナル下流に存在する抗酸化因子の発現は FGF2 処理による変化を受けなかった（データは示さず）。

そこで、転写因子 X の活性化剤である化合物 ActX の処理が DPC の抗酸化能に及ぼす影響を調べた。化合物 ActX の処理はクローンの違いや FGF2 添加の有無にかかわらず、DPC の抗酸化因子 C-E の発現を有意に上昇させ（図 3 参照）、また、活性

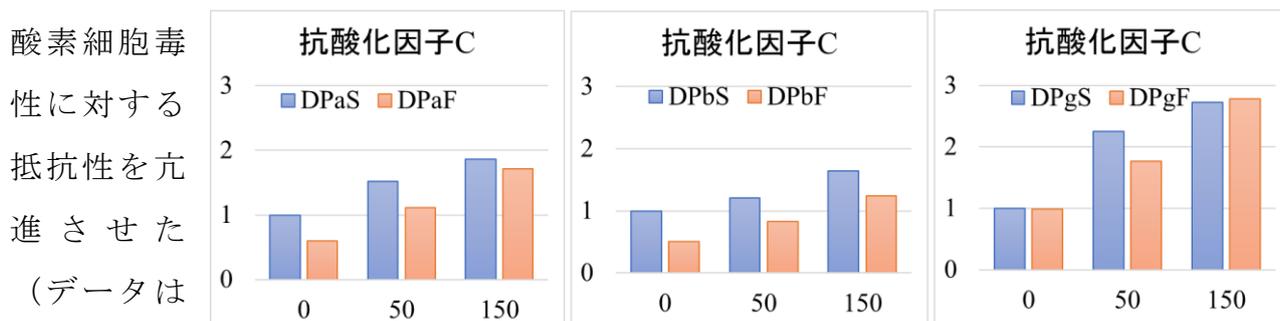


図 3 転写因子 X 活性化剤の処理が抗酸化因子 C の発現に及ぼす影響

X 軸：化合物 ActX の添加濃度 (nM)、Y 軸：任意の測定値

一方、細胞の migration

に關与するシグナル分子 F, G の発現は FGF2 処理によって上昇したが、化合物 ActX 処理の影響は受けなかった（データは示さず）。

#### 4. ActX および FGF2 処理が DPC の抗酸化能に及ぼす影響

次に 化合物 ActX および FGF2 の併用処理が DPC の移植による SCI モデルマウスの運動機能改善に及ぼす影響を検討した。ここでは、臨床応用を志向して、クリップによる脊髄挫滅損傷（挫滅 SCI）マウスモデルを用い、DPC を尾静脈より投与して、挫滅 SCI マウスの後肢の運動機能の回復効果を調べた。移植により全切断 SCI rat の運動機能回復が誘導される DPbF を用いた検討では、細胞の尾静脈投与により、挫滅 SCI mouse でも麻痺した後肢の運動機能の有意な回復効果が観察された（データは示さず）。一方で、全切断 SCI モデルで運動機能回復効果の認められなかった DPgF では、ActX で併用処理した時のみ、顕著な運動機能回復を示す個体が複数出現したが、対照群との群間比較における有意な回復効果は認められなかった（データは示さず）。

#### 5. 細胞移植の投与経路に関する検討

本研究では、全切断 SCI には損傷中心への直接投与、挫滅 SCI には尾静脈投与で細胞供給を行った。しかし、これらの投与経路が最適であるかは不明である。そこで、将来的に投与経路の最適化を評価することを目指して、ヒト腫瘍細胞を用いて、投与経路ごとに移植可能な細胞数を検討した（脊髄くも膜下、大槽内、尾静脈、を検討）。その結果、くも膜下を選択した場合、他の投与経路に比較して投与できる細胞がかなり限定された（データは示さず）。

また、細胞移植が炎症反応に及ぼす影響を調べることを目的として、SCI モデル作製に伴う血中のサイトカイン濃度の変動を調べた。その結果、一部のサイトカイン血中濃度は SCI なしの sham operation（背部皮膚の切開縫合のみ）でも SCI と同様に変動しうることが明らかになった（図 4）。したがって、血中のサイトカインについては、sham

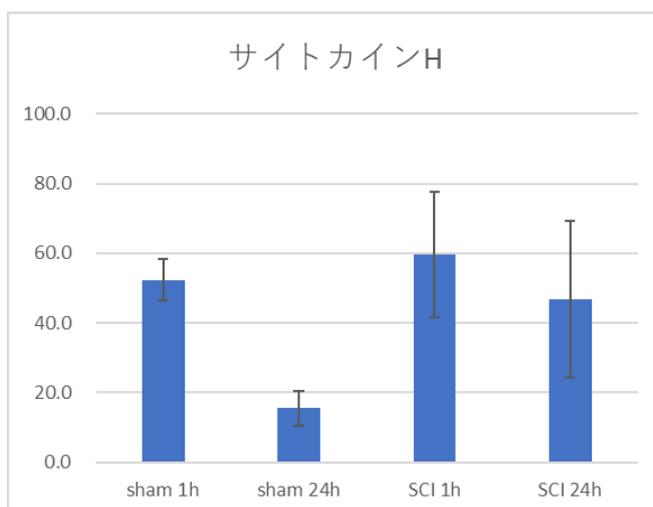


図 4 モデル作製に伴う血中サイトカイン C の濃度の経時的変化

operation に対する影響も併せて評価して考察する必要がある。

### 【考察】

本研究では、化合物 ActX 処理により抗酸化因子の発現誘導を介して DPC の抗酸化能が亢進することを明らかにした。この ActX の作用にはクローン差や FGF2 処理の有無の影響を受けなかった。また、ActX 処理 DPgF を移植した際、挫滅 SCI モデルの有意な運動機能回復は認められなかったものの、顕著な改善効果が示される個体も出現した。損傷中心への DPC の送達が十分でないのかもしれない。ここで、ActX は別疾患において臨床試験が展開されており、SCI の細胞移植療法の併用薬としてのドラッグリポジショニングも考えうるため、アプリケーションなどの工夫でクローン差の影響の少ない細胞療法のシーズとして提供できる可能性がある。

### 【今後の展望】

実地内容 5 で述べたように、歯髄細胞の供給方法などを含めた最適化が重要になる可能性がある。あるいは免疫拒絶の少ない HLA 抗原ハプロタイプホモのドナー由来 DPC の中から、治療効果の高い DPC を選別して、利用する方法もある。その際 first screening 法として、抗酸化因子 B が指標になる可能性がある。これらを整理した段階で、成果の特許出願や学会発表を行い、（臨床研究へと展開して）産業化へ成果を展開していきたい。

### 【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、多大なる研究助成を賜りました一般財団法人東海産業技術振興財団並びに関係各位にこの場を借りて、深謝申し上げます。また、共同研究者の日本バイオリサーチセンターの 安藤次郎 主任、岐阜薬科大学 宗宮仁美 講師、大学院生の 中村海斗、小林洋之、にも感謝申し上げます。