Osaka University Knowledge Archive

Title	マウス骨髄由来間葉系幹細胞による末梢神経再生能の評価
Author(s)	山内, 裕香子
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56127
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

マウス骨髄由来間葉系幹細胞による末梢神経再生能の評価

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻（歯科保存学教室）

（指導教員：林 美加子教授）

山内　裕香子

本論文の一部は，第 62 回国際歯科研究学会日本部会（JADR）（2014 年 12 月，大阪），International Association for Dental Research (2015 年 3 月，Boston), International Society for Stem Cell Research Annual Meeting (2015 年 6 月，Stockholm），および 第 63 回国際歯科研究学会日本部会（JADR）（2015 年 10 月，福岡）において発表した.

目次

Ⅰ. 緒言 1

Ⅱ. 材料および方法
1. 間葉系幹細胞集団 HipOPs の精製 9
2. HipOPs の neurosphere 形成能の評価 10
3. Limiting dilution 法 12
4. 移植実験モデルの確立 12
5. HipOPs の神経再生能の *in vivo* における評価 14
6. 統計処理 15

Ⅲ. 結果
1. HipOPs 由来 neurosphere の形成 16
2. HipOPs の神経幹細胞集団としての評価 16
3. Limiting dilution 法による BMSCs と HipOPs の比較 17
4. 移植実験モデルの確立 18
5. 末梢神経損傷マウスに対する HipOPs 移植 19
6. BMSCs と HipOPs の末梢神経機能回復能の比較 20
7. HipOPs 由来神経幹細胞の移植 20
8. 移植細胞の同定 21

Ⅳ. 考察 22

Ⅴ. 結論 30

Ⅵ. 謝辞 31

Ⅶ. 参考文献 32

Ⅷ. 図表 42

Ⅰ．緒言

再生医療研究は，近年，様々な分野において盛んに進められており，臨床応用への成功例もみられるなど社会的な関心も高い．例えば，脂肪組織に含まれる脂肪幹細胞などを用いた乳房や顔面などの軟組織の再建が行われている［1］．また，最近では iPS 細胞が初の臨床応用として加齢黄斑変性症の治療に用いられた．こうした組織再生療法は，幹細胞を用いて損傷あるいは欠損した組織や臓器を復元し，その機能回復を目指すものである．歯科領域においては，う蝕や歯周病，そして外傷などにより失われた歯の再生を目指した研究がさまざまなグループによりなされている［2-5］．現在，失われた歯の機能を取り戻す方法としてはブリッジ，義歯，あるいはインプラントといった人工物で置換する方法がとられているが［6］，機能性や生体親和性など様々な観点においていずれも天然歯には及ばない．そのため幹細胞を用いて新たに歯を再生することが望まれている．

歯科領域からも様々な幹細胞が採取できることがこれまでに報告されているが［3］，中でも歯髄組織より採取できる歯髄幹細胞は象牙質・歯髄複合体の復元が可能であり，失われた歯を再生し得る幹細胞供給源の一つとして注目され

ている［7-9］．この歯髄組織は間葉系幹細胞と呼ばれる幹細胞を含み［10］，不要になった抜去歯から採取できるなどの利点がある．しかしながら，採取できる細胞数が少ないことから，研究の上では実験に供することができる細胞数が少なく，また臨床応用においては必要な細胞数の確保が難しいなどの問題点があり，さらには患者自身に不要な歯がない場合には自家移植による再生医療への応用は難しい．そこで歯髄細胞の代替として，骨髄細胞から得られる幹細胞を用いるのことを考えた．なぜなら，歯髄腔と骨髄腔は構造や細胞構成などにおいて多くの類似性を有し［11，12］，歯髄細胞を用いた骨組織の再生が試みられるなど［13-15］，互換性が期待できるからである．たとえば，歯髄腔内の構造は，象牙質表面に象牙芽細胞（硬組織産生細胞）が配列し，すぐ近傍には血流を維持する血管内皮細胞と血球細胞や，知覚を司る神経細胞が存在し，そしてそれらの間を埋める線維芽細胞や脂肪細胞などにより微小環境（niche）を形成している．一方で，間葉系幹細胞が多く存在する骨髄腔内の構造は，骨表面上に骨芽細胞（硬組織産生細胞）が配列し，そのすぐ近傍に血流を維持する血管内皮細胞と血球細胞（血液幹細胞を含む），知覚を司る神経細胞，そしてそれらの間を埋める線維芽細胞や脂肪細胞などにより niche が形成されている．このように歯髄腔と骨髄腔 nich を形成する細胞群は酷似しており，歯髄細胞を用いるよりも，採取可能な細胞数の多い骨髄細胞が研究対象としてふさ

わしいと考えられる.

骨髄組織中の間葉系幹細胞は，骨髄細胞から得られる付着細胞分である骨髄ストローマ細胞（BMSCs；bone marrow stromal cells）に含まれていることが，1970 年代に Friedenstein らにより提唱され［16］，その後の研究により，付着性の線維芽細胞様細胞は 1 つのクローンからさまざまな間葉系細胞に分化できるということがわかってきた［17-19］．しかしながら，間葉系幹細胞の単離には未だ成功しておらず，現状の間葉系幹細胞は依然として不均一な細胞集団であるため，分離法や培養条件によって細胞集団の構成が大きく左右され，間葉系幹細胞の正確な情報は得られていないのが実態である［20，21］．こうした背景から，現状においてヒト間葉系幹細胞は，1）CD14，CD19，CD34，CD45，HLA-DR といった血球系マーカー群の発現が陰性であること，2）CD73 や CD90 そして CD105 が陽性であること，3）付着系細胞であり，少なくとも骨芽細胞，軟骨芽細胞，そして脂肪細胞の 3 系統の細胞に分化できるという 3 要件を満たす幹細胞として，国際細胞療法学会によって定義付けられている［22］．そのため，分化誘導培地で骨芽細胞や軟骨芽細胞そして脂肪細胞に分化できる幹細胞を便宜的に間葉系幹細胞として呼んでいる．　近年では，間葉系幹細胞はこのような間葉系組織に限らず，筋・心筋細胞　［23-25］や肝細胞　［26-28］などにも誘導できる，適応性に優れた幹細胞集団であり，さらに神経へも分化

可能な細胞であることが報告されている.

例えば，BMSCs を採取して *in vitro* で培養したところ，神経幹細胞様細胞が誘導され，ニューロンやグリア細胞へ分化することがヒト，マウス，ラット等様々な動物種で確認されている［29-37］．分化したニューロンはパッチ・クランプ法によって電気生理学的に機能することも認められている［38］．*In vivo* においては，標識されたマウス BMSCs を新生マウスの脳に移植したところニューロンやグリア細胞への分化が認められた［39，40］．成体マウスにおいても，放射線照射等によって損傷した脳に BMSCs を投与したところ，細胞は脳組織内へ遊走しニューロンやグリア細胞のマーカーに陽性を示した［41-43］．また BMSCs をラットに移植し，脊髄の髄鞘再生を認めた等の例も報告されている［44］．最近では国内において，骨髄由来幹細胞の自家移植による脊髄損傷の治療が臨床試験として行われている.

先述のように，BMSCs は間葉系幹細胞以外の細胞も多く含む不均一な集団である．このため幹細胞についての詳細な分析や，より効率的な臨床応用のためには，不要な細胞を取り除いて幹細胞を精製することが望まれる．これまでにもマウス骨髄より幹細胞を精製する方法は様々試みられてきた.たとえば，間葉系幹細胞のマーカーと推察されている Sca-1，CD44，CD90（Thy1.1），SH2（CD105 もしくは endoglin），SH3，SH4（CD73）に対する抗体を用いて精製する

positive selection 法や［45-49］， マウスの骨髄に含まれる多量の血球細胞を取り除くためにいくつかの血球系の細胞に対する抗体を使用して行う negative selection 法である［46, 47］．しかしながら，これらの方法を用いた間葉系幹細胞の精製では，得られた幹細胞集団が骨芽細胞，軟骨芽細胞，および脂肪細胞の 3 系統すべての細胞への分化能を有していることを検証している報告や，どの程度間葉系幹細胞を濃縮できたかについて具体的に示している報告はあまりない［47］．

そこで，近年，Itoh らは，マグネティックマイクロビーズを用いることによりマウス骨髄ストローマから間葉系幹細胞を濃縮する簡便な方法を見出した［50］．この精製方法は，抗 CD5, CD45R, CD11b, Gr-1, 7-4, Ter-119, CD45 抗体が結合した磁気ビーズと骨髄ストローマを反応させた後，磁気カラムを通過させることによって分化した細胞を取り除き，間葉系幹細胞が濃縮された細胞集団を得るという，一種の negative selection 法を用いている．精製前の BMSCs に含まれる間葉系幹細胞の割合は 15 万個に 1 個であるのに対し，上記の精製方法により得られた新規細胞集団ではおよそ 1000 個に 1 個であることが Limiting dilution 法による解析結果から明らかとなった．つまり，この精製方法では間葉系幹細胞が約 100 倍以上濃縮されるということになる．さらに，この新規細胞集団を用いて *in vivo* 細胞移植実験を行い，移植片を回

収して組織切片を作製し組織染色を行ったところ，多量の硬組織の再生が確認され，皮質骨様硬組織によって囲まれた内部には骨梁や骨髄様組織が認められた．またマイクロ CT にて硬組織量を測定したところ，濃縮前の BMSCs と比較して，新規細胞集団では約 100 倍もの硬組織再生能を有することが明らかとなった．これらの解析結果から，この高い硬組織再生能を持つ新規幹細胞集団は ″highly purified osteoprogenitors″（HipOPs）と命名された．

これまでの研究により，HipOPs は骨組織に加えて軟骨組織や脂肪組織に対しても BMSCs に比べて高い再生能を示すことが明らかとなっている［50］．しかしながら，神経組織への分化能については未だ解析しておらず不明である．象牙質・歯髄複合体には， 知覚を司る神経細胞が含まれており，HipOPs がう蝕や外傷などにより失われた象牙質・歯髄複合体を再生しうる細胞源であることを証明するためには，神経組織への分化能について検証することが必須である．これまでに髄腔内への細胞移植などによって歯髄様の組織再生を認めた例は *in vivo* でも *in vitro* でも数多く報告されている．例えばヒト埋伏智歯から歯髄細胞を分離しマウス皮下に移植したところ，ドナー由来の象牙質・歯髄複合体様組織の形成が確認され［7，51］ 根管モデルに注入してマウス体内に移植した研究でも，根管内において象牙質・歯髄複合体様組織を認め血管新生や象牙質の添加を認めた［52］．またビーグル犬の歯髄細胞を根管内に移植し

たところ，修復象牙質や象牙質・歯髄複合体様組織の形成が認められた[53-57]．ブタにおいては，dental bud cells を培養し抜歯窩に移植したところ象牙質・歯髄複合体を含む歯様構造体の形成を認めた例や［58］， Dental pulp stem cells を顎骨に移植して象牙質様組織を認めた例などが報告されている［59］．しかしながら，これらの研究において神経の再生および神経機能の回復まで評価した報告は認められない.

また一方で，口腔外科領域においても末梢神経の再生は重要な課題である．たとえば，下顎大臼歯近傍には下歯槽神経や舌神経が走行しており，第三大臼歯の治療や抜歯，インプラント埋入，下顎枝矢状分割法等の外科処置，下顎部の腫瘍切除等に際してこれら神経を損傷することがあり，歯科・口腔外科治療時の重大な偶発症として知られている．[60-63]．特に，舌神経損傷は疼痛・異常感覚のほかに触覚のみならず味覚の鈍麻や喪失を招き，損傷後に著しい QOL の低下を来たすことがある［64-66］．その治療方法としては主に薬物療法や神経ブロックが行われるが，重症例では神経縫合や耳介神経等を用いた神経移植などが必要となる［73-75］．そこで，HipOPs によって末梢神経およびその機能が再生することが証明されれば，このような症例の治療に有用な細胞源となりうる．舌神経支配領域の感覚異常は口腔外科領域以外でも，全身麻酔を用いた外科手術後に報告されており，手術中の気道確保のために口腔内に挿

入される装置が原因と考えられている［67-72］.

以上のことから，本研究ではマウス骨髄由来新規幹細胞集団である HipOPs を用いて，*in vitro* における神経幹細胞としての HipOPs の有用性を評価するとともに，*in vivo* における損傷した末梢神経の HipOPs による再生能について解析を行い，検討することとした.

Ⅱ．材料および方法

1．間葉系幹細胞集団 HipOPs の精製

Dulbecco's Modified Eagle Medium (life technologies, CA, USA) と Ham's F12 Nutrient Mixture (life technologies) を 3 : 1 の割合にて配合し，1% penicillin-streptomycin を添加した溶液を調整した（DMEM / F12 (3:1)）.

BMSCs および HipOPs の調整は Itoh らの方法に準じて以下のように行った[50]．6-8 週齢の C57BL/6J マウス（日本チャールズ・リバー，横浜）より大腿骨および脛骨を採取した．骨頭を除去し，シリンジを用いて骨髄腔内に DMEM / F12 (3:1) を注入し骨髄を得た．40 μm セルストレーナーを用いて軟組織を除去したのち， DMEM / F12 (3:1) に 10% Fetal calf serum （FCS; ニチレイ，東京）を添加した培養液にて細胞培養皿上で培養を開始した．

3 日後に Phosphate-Buffered Saline (PBS; Sigma-Aldrich Corporation, MO, USA) を用いて 3 回洗浄することで浮遊細胞を除去し，2-3 日毎に培養液を交換して 80% セミコンフルエントになるまで 2 週間培養を続けた．その後，0.25% Trypsin-Ethylenediaminetetraacetic acid (0.25% Trypsin-EDTA

solution; life technologies）処理にて付着細胞を回収し，BMSCs として以下の実験に供した．さらに,血球系細胞のマーカー分子に対する抗体（抗 CD5, 抗 CD45, 抗 CD11b, 抗 Gr-1, 抗 7-4, 抗 Ter-119, 抗 CD45R）が結合したマグネティックビーズ（Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany）を BMSCs に反応させた後，マグネティックカラムに注入し，カラムから流出してきた細胞を回収して間葉系幹細胞集団（HipOPs: highly purified osteoprogenitors）として以下の実験に供した（図 1）.

なお，本研究におけるすべての動物実験は，大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の審査を受け，承認のもとに実施した.（受付番号：動歯-26-011-0）

2. HipOPs の neurosphere 形成能の評価

DMEM / F12 (3:1) に 40 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF; BD Bioscience, MA, USA または PEPROTECH, NJ, USA), 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF; BD Bioscience), および 2% B-27 (life technologies, CA, USA) を加えた培地を用いて，非接着性 24 well プレートにて 1×10^4 / ml の HipOPs を培養した．培養液は 3 日毎に bFGF, EGF, B-27 を 2 倍濃度添加した培養液を用いて全体の半量を交換した．成熟した neurosphere が形成され

るまで約 2 週間培養を行い，neurosphere を回収した．ピペティングによって neurosphere をシングルセル化した後，上記と同様の方法にて継代培養を行った．約 2 週間の培養の後，蛍光免疫染色を行った．一次抗体として anti-nestin（1:100; BD Bioscience）を室温にて 1 時間反応させた後，洗浄し，室温にて FITC-streptoavidine（1:50; BD Bioscience）を 15 分間反応させて発色させた．試料は VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI（Vector Laboratories, CA, USA）を用いてマウントし，Axio Vision 3.1（Carl Zeiss, Germany）にて観察した．

一方で，neurosphere から分離した細胞を poly-D-lysine（Sigma-Aldrich Corporation）および laminin（BD Bioscience）にてコーティングしたスライド上で，5% FCS 添加 DMEM / F12（3:1）にて培養した．

また，BMSCs と HipOPs の neurosphere 形成能を比較するため，BMSCs を 3×10^5，3×10^6 / ml の細胞濃度で，また HipOPs を 5×10^4，5×10^5 / ml の濃度で非接着性 24 well プレートに播種し，上記と同様の方法で 10 日間培養した．

3. Limiting dilution 法

非接着性 96 well プレートに BMSCs を 1.5×10^4, 3×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 1.5×10^5 / ml の各細胞濃度にて，また HipOPs を 1×10^3, 3×10^3, 6×10^3, 1×10^4, 1.5×10^4 / ml にてそれぞれ各 48 well ずつに播種し，40 ng/ml bFGF, 20 ng/ml EGF および 2% B-27 を加えた DMEM / F12 (3:1) を用いて neurosphere の培養を行った．培養液の交換は 3 日目に行った．1 週間の培養の後，各 well における neurosphere 形成の有無を判定した．各細胞濃度において neurosphere の形成を認めない well 数を Fo，各 well に含まれる前駆細胞数を x とすると，ポアソン分布より，Fo = 0.37 となる希釈濃度のとき 1 well 内に 1 つの前駆細胞が含まれることになることから，計算式 $Fo = e^{-x}$ により前駆細胞の数を求めた．各々独立した 4 回以上の細胞採取に対して同様の試験を行った．

4. 移植実験モデルの確立

イソフルラン吸入麻酔下で，10 週齢メス Crlj:CD1-*Foxn1*^{nu} マウス（日本チャールズ・リバー）の左側坐骨神経を露出した．腓腹神経を温存し，上流は腓

腹神経が分岐する位置，下流は脛骨神経と腓骨神経に分岐する位置として，この間で坐骨神経を切断または 1.5 mm 部分切除したのち，5-0 絹糸を用いて皮膚縫合を行った（図 2）．Sham グループは右側坐骨神経を露出したのち，神経に損傷を与えず皮膚縫合を行った．各マウスは処置内容をブラインド化するためランダムな番号の下で管理され，以下の評価試験に供した．

各マウスは手術後 2 週間毎に 8 週間後まで，von Frey 試験および運動・感覚機能のスコア化によって坐骨神経の機能を評価した．von Frey 試験では，マウスを金網上に 3 分以上静置して安静がみられた後に von Frey フィラメントにて足底中央を刺激し，細いフィラメントから順に刺激を与えて最初にマウスに反応の確認されるフィラメントを求め，感覚閾値を測定した．8.0 g フィラメントを用いると適切な刺激が与えられる前に後肢全体が挙上される場合があるため，6.0 g フィラメントにて反応がない場合は閾値を 8.0 g とした．一方の運動・感覚機能試験においては，マウスの行動観察を行いスコア化して評価した． マウスをプラスチックケージ内に入れ，1 分間静置したのちに 3 分間の行動観察を行った．その後，金網上での歩行について観察を行った．これらの行動観察から，表 1 に示す 5 項目について 0（回復を認めない），1（部分的な回復を認める），2（回復を認める）の 3 段階のスコアにて判定し，スコアの合計によって左側坐骨神経の機能を評価した．

5. HipOPs の神経再生能の *in vivo* における評価

HipOPs を 40 ng/ml bFGF, 20 ng/ml EGF および 2% B-27 を加えた DMEM / F12 (3:1)にて 10 日間培養し，得られた neurosphere から細胞を機械的に分離して HipOP 由来神経幹細胞（HipOP-NSCs）とした. 5×10^5 HipOPs, 5×10^5 BMSCs, 5×10^6 BMSCs，および 5×10^5 HipOP-NSCs を 40 µl の 10%FCS 添加 DMEM / F12 (3:1) に懸濁し，約 5 mm 立方のコラーゲンスポンジ（ファイザー，東京）に導入し，移植実験に供した．コントロールとして，細胞を含まない 10%FCS 添加 DMEM / F12 (3:1) のみをコラーゲンスポンジに導入したものを作製した.

10 週齢メス Crlj:CD1-*Foxn1*^{nu} マウス左側坐骨神経を上記と同様に 1.5 mm 切除し，切除後の間隙にコラーゲンスポンジを移植して皮膚縫合を行った．各マウスはランダムな番号の下で管理し，手術後 2 週間毎に 8 週間後まで,von Frey 試験および運動・感覚機能試験によって評価した.

HipOPs 移植 3 か月後に，神経切除および細胞移植を行った組織を摘出し，凍結切片を作製した. Anti-H-2K^k-FITC (1:100; Miltenyi Biotec) および Cy3 で標識された anti NGFR/p75NTR (1:100; Biosensis, Australia) を室温にて 1 時間反応させた後，VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI を用いてマウントし，Axio Vision 3.1 にて観察した.

6. 統計処理

結果は平均値 ± 標準偏差で表示した. 一連の実験では Dunnet test によって有意水準 5% で統計学的検定を行った.

Ⅲ. 結果

1. HipOPs 由来 neurosphere の形成

間葉系幹細胞集団 HipOPs を非接着基材上で，bFGF および EGF 存在下で培養したところ，培養 3 日目には細胞塊の形成を認め，8 日目には直径 100 μm 以上の neurosphere が観察された（図 3）．培養 14 日目の neurosphere を採取し，神経幹細胞マーカーとして用いられる nestin で蛍光免疫染色を行ったところ，これらの neurosphere は nestin 陽性であった（図 4）．

2. HipOPs の神経幹細胞集団としての評価

HipOPs 培養 16 日目に neurosphere を採取し，細胞を機械的に分離して bFGF および EGF を含む培地で継代培養を行ったところ，新たな neurosphere の形成を認めた（secondary neurosphere; 図 5A）．この neurosphere を採取し，同様の手法で細胞を分離して継代培養を行ったところ，tertiary neurosphere が形成された（図 5B）．また，HipOPs より得られ

た neurosphere を機械的に分離し，FCS 存在下で分化せたところ，シュワン細胞様の双極性の細胞像を示した（図 6).

3. Limiting dilution 法による BMSCs と HipOPs の比較

BMSCs および HipOPs をそれぞれ 3×10^5，3×10^6 / ml および 5×10^4, 5×10^5 / ml の細胞数で播種し，10 日間培養して比較したところ，HipOPs は 5×10^5 で培養すると大きな neurosphere が多数形成され（図 7C)，5×10^4 / ml の低濃度で培養しても neurosphere の形成が認められる（図 7D)のに対し，BMSCs は高濃度，低濃度いずれの培養においても小さな細胞塊が認められる程度であった （図 7A， B)．以上の結果から，HipOPs は BMSCs に比べて neurosphere 形成能が高いことが明らかとなった．また，Limiting dilution 法による解析では，BMSCs に含まれる neurosphere 形成細胞の割合はおよそ 1 / 45,000 であったのに対し，HipOPs では 1 / 410 であり，HipOPs に含まれる前駆細胞の割合は BMSCs に比べて 120 倍以上高いことが明らかとなった（表 2).

4. 移植実験モデルの確立

マウスの左側坐骨神経を腓腹神経分岐部より下流，脛骨神経および腓骨神経の分岐部より上流で切断し（図 2)，術後 2, 4, 6, 8 週間後に von Frey 試験および運動・感覚機能試験によって評価したところ，いずれの試験においても坐骨神経機能の部分的な回復が認められた（図 8,9)．そこで，同部を 1.5 mm 切除して同様に評価したところ，いずれの試験においてもほとんど回復しないか，きわめて限局的な回復を認めるのみだった（図 8,9)．

次に，細胞移植に用いる scaffold が機能回復に与える影響を検証するため，DMEM / F 12 (3:1) に 10% FCS を加えた溶液をコラーゲンスポンジに含ませて左側坐骨神経を 1.5 mm 切除した間隙に移植した．術後 2, 4, 6, 8 週後のいずれの時点においても，左側後肢の withdrawal threshold は神経を 1.5 mm 切除して移植を行っていない群との間に有意差を認めなかった（図 10A)．また，対照として健常側である右側の withdrawal threshold を測定したところ，いずれの時点においても有意差は見られなかった（図 10B)．運動･感覚機能試験のスコアにおいても同様の結果を認め（図 11)，神経機能の回復は限局的なものであった．このことから，コラーゲンスポンジおよび溶液の移植による神経機能回復への影響はないものと判断された．

そこで，本研究における *in vivo* 細胞移植実験においては左側坐骨神経を 1.5 mm 切除し，対象となる細胞を DMEM / F 12 (3:1) ＋ 10% FCS 溶液に懸濁したものをコラーゲンスポンジに含ませて，神経切除後の間隙に移植することとした．また，同様に神経を 1.5 mm 切除して，細胞を含まない DMEM / F 12 (3:1) + 10% FCS 溶液のみを含ませたコラーゲンスポンジを移植したものをコントロール群とした．

5．末梢神経損傷マウスに対する HipOPs 移植

HipOPs を移植した群は，術後 2，4，6，8 週後のいずれの時点においてもコントロール群に比べて左側後肢の withdrawal threshold が有意に低く（図 12A)，神経機能が回復していることが示唆された．一方で，右側後肢の withdrawal threshold に有意差は認められなかった（図 12B)．また，運動・感覚機能試験においても術後いずれの時点においても HipOPs 移植群はコントロール群に比べてスコアが有意に高く（図 13)，運動・感覚機能が回復していることが明らかとなった．

6. BMSCs と HipOPs の末梢神経機能回復能の比較

BMSCs を移植した群は，術後 2，4，6，8 週後のいずれの時点においても左側後肢の withdrawal threshold はコントロール群との間に有意差を認めなかった（図 14A）．右側後肢の withdrawal threshold にも有意差はみられなかった（図 14B）．また運動・感覚機能試験においては，術後 2，6，8 週後においてコントロール群に比べて高いスコアを得られたが，回復の程度は HipOPs 移植群に比べて限局的だった（図 15）．ここで，HipOPs は BMSCs を濃縮して得られる細胞集団であるため，10 倍濃度の BMSCs を移植したところ，左側後肢の withdrawal threshold はわずかに低下を認めたもののコントロール群との間に有意差はなかった（図 14A）．運動･感覚機能試験においては低濃度の BMSCs 移植群同様の結果となった（図 15）．

７．HipOPs 由来神経幹細胞の移植

HipOPs により形成された neurosphere をシングルセル化した HipOP-NSCs を左側坐骨神経損傷マウスに移植した．左側後肢の withdrawal threshold は術後いずれの時点においてもコントロール群に比べて有意に低く，神経機

能の回復効果は HipOPs より高かった（図 16）．特に，2 週間後の短期間から高い回復を示すことが確認された．運動・感覚機能試験においても，HipOP-NSCs は術後短期間から高いスコアを示し，神経機能の回復が認められた（図 17）．

８．移植細胞の同定

HipOPs 移植 3 ヶ月後の組織切片に対して蛍光免疫染色を行ったところ，移植細胞を示す H-2K^{k} と神経栄養因子受容体 p75NTR は同じ部位において発現していることが確認された（図 18）．

Ⅳ．考察

神経幹細胞は，EGF 等を添加した無血清培地上で球状の浮遊細胞塊（neurosphere）として分離・増殖させられることが知られているが［76］，神経幹細胞の分化経路の詳細については未だ不明な点が多い．近年，神経幹細胞分化の初期に関与している因子が報告されたが，神経幹細胞を誘導する特定の因子は明らかとなっておらず［77，78］，このような現状においては neurosphere の形成が神経幹細胞同定法の一つとして多用されている．この神経幹細胞同定法は neurosphere assay とよばれ，具体的には，無血清培地に加える因子として EGF の他に bFGF, LIF (leukemia inhibitory factor), BDNF (brain derived neurotrophic factor) など様々な因子を用いた培養法が工夫され，ES 細胞や iPS 細胞など，種々の幹細胞の神経細胞誘導能を検証するために用いられている［32，79-81］．

そこで，マウス骨髄由来幹細胞集団 HipOPs の神経細胞への分化能を検証するにあたり，まずはこの細胞を bFGF および EGF を含む培養液を用いて非接着性基材上で培養した［82］．その結果 neurosphere の形成を認め，さらにその neurosphere から得られた細胞は神経幹細胞マーカーとして用いられる

nestin に陽性を示した（図 3,4）．これらのことから HipOPs は神経幹細胞を含む細胞集団であることが推察されるが，このことを証明するためには幹細胞の重要な特徴である自己複製能と分化能を有することを示す必要性があった．そこでまず自己複製能を検証するために，HipOPs により形成された neurosphere に含まれる細胞をシングルセル化して継代培養したところ，各細胞から新たな neurosphere が形成された（図 5）．従って，neuroshere を形成している細胞は自己複製能を持つことが明らかとなった．次に，neuroshere を形成している細胞を血清培地にて培養し分化誘導をかけたところ，シュワン細胞様細胞への分化が確認された（図 6）．これらの結果から，HipOPs は自己複製能を持ち神経系細胞に分化し得る神経幹細胞を含む細胞集団であることが確認された．

ところで，HipOPs は BMSCs から幹細胞を濃縮した細胞集団であるため，BMSCs と HipOPs それぞれに含まれる神経幹細胞の割合について検証する必要性がある．そこで，まずは neurosphere assay によってそれぞれの細胞から形成される neurosphere を比較したところ，HipOPs は neurosphere 形成能に優れ，より多数の，またより大きな neurosphere の形成を認めた（図 7C,D）．その一方で BMSCs は細胞を低濃度で播種して培養すると neurosphere はほとんど確認されず，また HipOPs よりも高濃度で播種しても小さな neurosphere が

少数みられる程度であった（図 7A,B）．これらの結果から，HipOPs の精製によって幹細胞が濃縮されたばかりでなく，不要な幹細胞が除かれて神経幹細胞の分化や増殖がより行われやすい環境が形成されたことが推測される．

BMSCs とHipOPsの神経幹細胞誘導能をさらに詳細に検討するため，limiting dilution 法による検証を行った．これは，ある細胞集団を種々の濃度に希釈して特定の細胞へ誘導し，各細胞濃度において反応のみられた割合からその細胞集団における前駆細胞の含有率を推定するものである．そこで HipOPs と BMSCs をそれぞれ 5 段階に希釈して bFGF および EGF 存在下で neurosphere（神経幹細胞を含む細胞集団）に誘導した．ただし神経幹細胞は容易に凝集する細胞であるため［83］，neurosphere の形成の有無をより正確に判定するために培養期間を短くし，培養液の交換回数を少なくすることで細胞の移動を可及的に抑えることとした．Neurosphere の誘導において，細胞濃度が高い場合に培養 3 日目頃までにみられる細胞塊は自己複製ではなく細胞が凝集したものである可能性があるとされているが，予備実験において各細胞を注意深く培養し 7 日目と 15 日目に neurosphere の形成の有無を判定したところ，すべての well において判定結果が同一であることを確認した．そのため neurosphere 形成の有無を判定するには 7 日間の培養で十分であると考え，この実験においては培養期間を 7 日間としその間の培養液の交換は 1 回のみ

とした．この limiting dilution 法による解析により，BMSCs と HipOPs に含まれる神経幹細胞の割合が計測される．そして解析の結果，HipOPs は BMSCs に比べて約 120 倍も高い割合で神経幹細胞を含んでいることが明らかとなった（表 2）．以上の結果から，*in vitro* において HipOPs は BMSCs に比べて高い神経幹細胞誘導能を示すことがわかった．

次に，臨床応用への可能性を探るため，HipOPs の *in vivo* での神経回復能を細胞移植によって評価することとした．末梢神経損傷後の感覚および運動機能回復の評価を目的とした *in vivo* 実験には様々な動物モデルが考案されてきたが，その中でも一般的によく用いられるのはラットの坐骨神経損傷モデルである［84-88］．しかしながら HipOPs の精製に際して，BMSCs から分化した細胞を negative selection するためにターゲットとした表面マーカーはマウスに特有のものであり，ヒトやラットなど他の動物種では分化した細胞はこれらとは異なる表面マーカーを示す．そこで本研究では移植実験の対象としてマウスを用いることとした．神経損傷の部位としては大腿神経，脛骨神経，腓骨神経［89-92］などを対象とした例もあるが，神経の太さやアクセスの良さ等から末梢神経損傷としては坐骨神経を用いることが多い．神経損傷後の機能回復の評価には，筋重量の測定や電気生理学的な評価，また walking track analysis など様々な方法が用いられているが［86, 87, 93-95］， その中でも

オープン・フィールドで行動を観察する方法は，特別な装置等を必要とせず容易に実施できるという利点があり，様々な研究で用いられている．その評価方法として広く用いられるものの 1 つに Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) スコアがあるが［96］， このシステムはラットの運動機能評価として開発されたものであり，マウスの評価方法としては適さない部分もある．そこでマウスの運動機能評価として適合するように新たに開発されたのが Basso Mouse Scale (BMS) スコアである［97］．BMS はマウス脊髄損傷後の運動機能評価として一般的に用いられているが，評価項目の内容が重複しているなどの問題もあり Body Support Scale (BSS) や Toyama Mouse Score (TMS) などの評価方法が開発されてきた ［98, 99］．しかしながら，これらは脊髄損傷モデルの機能回復評価を想定したものであり，これより下位にあたる末梢神経損傷の評価としては適合しない部分もある．また，動物サイズの違いなどから坐骨神経損傷モデルとして用いられる第一選択はラットであり［100］，マウスを対象とした研究には脊髄損傷を扱ったものが多いのが現状である［101-104］．そこで簡便な方法でマウス坐骨神経損傷後の神経機能を評価するため，本研究では新たな評価方法を策定した．マウスをプラスチックケージに入れ，オープン・フィールドでの行動観察をもとにして， BMS スコアや BMS サブスコアを参考に［97］，主に運動機能に関連した 5 つの項目を設定し（表 1)，それぞれ 3 段

階でスコア化し評価することとした．また感覚機能の評価として臨床でもよく用いられる von Frey 試験を併せて行うこととした.

これらの動物モデルおよび評価方法を用いて細胞移植実験を行ったところ，HipOPs の移植によって，損傷した末梢神経の機能が感覚機能および運動機能ともに回復することが確認され（図 12,13），その回復能はBMSCs の移植に比べて有意に高いということが明らかとなった（図 14,15）．HipOPs は BMSCs を濃縮して得られる細胞集団であるため，この回復能の違いは間葉系幹細胞が濃縮されたことのみによるものであるか否かを判断するためには，より多くの BMSCs を移植して比較検討する必要があった．BMSCs から HipOPs を精製すると細胞数は数十分の一程度に減少するため，HipOPs の数十倍量の BMSCs を移植して，もし HipOPs 移植時と同程度の回復が確認されれば回復能の違いは幹細胞の濃縮によるもののみであると示される．ただし細胞の量が多くなりすぎると scaffold に担持させることが難しくなるため，ここでは 10 倍量の BMSCs を移植して比較することとした．その結果，10 倍量の BMSCs を移植しても HipOPs の移植に匹敵する回復は見られず，低濃度の BMSCs を移植した時と比べてもほとんど差異は見られなかった（図 14,15）．従って，HipOPs の移植が高い回復能を示したのは間葉系幹細胞が濃縮されたことのみによるものではなく，HipOPs の精製によってより神経組織の分化を誘導しやすい細胞集

団が形成されたことが推察される．さらに，HipOPs を neurosphere に誘導したのちに細胞移植すると，術後短期間で有意に回復を認め（図 16,17），行動観察において患側の後肢が十分に機能していることが見て取れた．

最後に，移植された細胞が生体内でどのような経過を辿るかを探るため，移植 3 ヶ月後の組織切片に対して蛍光免疫染色を行った．HipOPs 由来の細胞を識別する目的で，移植のドナーである C57BL/6J マウス では発現するがレシピエントである Crlj:CD1-*Foxn1*^{nu} マウス には発現しない，マウス主要組織適合遺伝子複合体（major histocompatibility complex ; MHC）クラスⅠ抗原 H-2K^{k} を用いた．従って組織切片において HipOPs 由来細胞のみが H-2K^{k} を発現することになる．神経栄養因子受容体 p75NTR と共に蛍光免疫染色を行って発現部位を観察したところ，神経切断および細胞移植処置を行った部位の組織切片において，H-2K^{k} と p75NTR は同じ部位での発現が確認されたため（図 18），移植された HipOPs は生体内に生着し幹細胞として組織再生に寄与していると考えられる．但しその詳細についてはいまだ不明であり，移植された細胞がどのようなメカニズムを介して損傷した神経組織の再生，およびその機能回復に関与しているのかについては今後さらに検討していく必要があると考えられる．

以上より，末梢神経損傷モデルにおける HipOPs の細胞移植実験で観察され

た短期間での神経機能の回復は，神経損傷に対する神経再生療法や歯科領域における歯髄再生療法において HipOPs は有用な細胞集団であると言える．将来的には，マウスからヒト細胞へと検証を進めて行くことで，臨床応用へと繋がっていくと考えている．

V．結論

本研究により，　間葉系幹細胞集団として骨，軟骨，脂肪に対して高い分化能を示す HipOPs は，間葉系組織のみならず神経組織にも分化可能であることが明らかとなり，多様な組織に分化し得る幹細胞として再生医療に有用な細胞源であることが示された.

Ⅵ. 謝辞

稿を終えるにあたり，本研究を行う機会を与えて頂き，貴重なる御指導と御高閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）林　美加子教授に謹んで感謝の意を表します．また，本研究の遂行に際し，終始変わらぬ御指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）伊藤祥作博士，口腔解剖学第一教室　阿部真土博士，ならびに大阪大学大学院医学研究科分子神経学　藤谷昌司博士に深く感謝致します．最後に本研究に対して御理解，御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）の諸先生方に心から感謝致します.

Ⅶ. 参考文献

1. Yoshimura K, Suga H, Eto H: **Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation**. *Regen Med* 2009, **4**(2):265-273.
2. Zhang YD, Chen Z, Song YQ, Liu C, Chen YP: **Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells**. *Cell Res* 2005, **15**(5):301-316.
3. Mantesso A, Sharpe P: **Dental stem cells for tooth regeneration and repair**. *Expert Opin Biol Ther* 2009, **9**(9):1143-1154.
4. Hung CN, Mar K, Chang HC, Chiang YL, Hu HY, Lai CC, Chu RM, Ma CM: **A comparison between adipose tissue and dental pulp as sources of MSCs for tooth regeneration**. *Biomaterials* 2011, **32**(29):6995-7005.
5. Krasner P, Verlander P: **Stem cells in dentistry and medicine: the dentist's role**. *Dent Today* 2011, **30**(1):128, 130-124; quiz 135.
6. Modino SA, Sharpe PT: **Tissue engineering of teeth using adult stem cells**. *Arch Oral Biol* 2005, **50**(2):255-258.
7. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S: **Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(25):13625-13630.
8. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM: **Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action**. *J Endod* 2007, **33**(4):377-390.
9. Kim S, Shin SJ, Song Y, Kim E: **In Vivo Experiments with Dental Pulp Stem Cells for Pulp-Dentin Complex Regeneration**. *Mediators Inflamm* 2015, **2015**:409347.
10. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S: **Stem cell properties of human dental pulp stem cells**. *J Dent Res* 2002, **81**(8):531-535.
11. Karaoz E, Demircan PC, Saglam O, Aksoy A, Kaymaz F, Duruksu G: **Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and**

epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol* 2011, **136**(4):455-473.

12. Isobe Y, Koyama N, Nakao K, Osawa K, Ikeno M, Yamanaka S, Okubo Y, Fujimura K, Bessho K: **Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp**. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2015.
13. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G: **Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration**. *Stem Cell Rev* 2008, **4**(1):21-26.
14. Morad G, Kheiri L, Khojasteh A: **Dental pulp stem cells for in vivo bone regeneration: a systematic review of literature**. *Arch Oral Biol* 2013, **58**(12):1818-1827.
15. Yasui T, Mabuchi Y, Toriumi H, Ebine T, Niibe K, Houlihan DD, Morikawa S, Onizawa K, Kawana H, Akazawa C *et al*: **Purified Human Dental Pulp Stem Cells Promote Osteogenic Regeneration**. *J Dent Res* 2015.
16. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN: **Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs**. *Exp Hematol* 1976, **4**(5):267-274.
17. Prockop DJ: **Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues**. *Science* 1997, **276**(5309):71-74.
18. Bianco P, Kuznetsov SA, Riminucci M, Gehron Robey P: **Postnatal skeletal stem cells**. *Methods Enzymol* 2006, **419**:117-148.
19. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ: **Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation**. *J Cell Biochem* 1999, **72**(4):570-585.
20. Garcia-Gomez I, Elvira G, Zapata AG, Lamana ML, Ramirez M, Castro JG, Arranz MG, Vicente A, Bueren J, Garcia-Olmo D: **Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications**. *Expert Opin Biol Ther* 2010, **10**(10):1453-1468.
21. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW: **Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging**. *Exp Hematol* 2004, **32**(5):414-425.
22. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E: **Minimal**

criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006, **8**(4):315-317.

23. Wakitani S, Saito T, Caplan AI: **Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine**. *Muscle Nerve* 1995, **18**(12):1417-1426.
24. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F: **Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors**. *Science* 1998, **279**(5356):1528-1530.
25. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM *et al*: **Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium**. *Nature* 2001, **410**(6829):701-705.
26. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP: **Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells**. *Science* 1999, **284**(5417):1168-1170.
27. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M *et al*: **Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow**. *Nature* 2002, **418**(6893):41-49.
28. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM: **Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells**. *J Clin Invest* 2002, **109**(10):1291-1302.
29. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N *et al*: **Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro**. *Exp Neurol* 2000, **164**(2):247-256.
30. Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, Brenner R *et al*: **Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells**. *J Cell Sci* 2004, **117**(Pt 19):4411-4422.
31. Long X, Olszewski M, Huang W, Kletzel M: **Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells**. *Stem Cells Dev* 2005, **14**(1):65-69.

32. Magaki T, Kurisu K, Okazaki T: **Generation of bone marrow-derived neural cells in serum-free monolayer culture**. *Neurosci Lett* 2005, **384**(3):282-287.
33. Wang Y, Deng Z, Lai X, Tu W: **Differentiation of human bone marrow stromal cells into neural-like cells induced by sodium ferulate in vitro**. *Cell Mol Immunol* 2005, **2**(3):225-229.
34. Scintu F, Reali C, Pillai R, Badiali M, Sanna MA, Argiolu F, Ristaldi MS, Sogos V: **Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments**. *BMC Neurosci* 2006, **7**:14.
35. Lei Z, Yongda L, Jun M, Yingyu S, Shaoju Z, Xinwen Z, Mingxue Z: **Culture and neural differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro**. *Cell Biol Int* 2007, **31**(9):916-923.
36. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB: **Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons**. *J Neurosci Res* 2000, **61**(4):364-370.
37. Ma K, Fox L, Shi G, Shen J, Liu Q, Pappas JD, Cheng J, Qu T: **Generation of neural stem cell-like cells from bone marrow-derived human mesenchymal stem cells**. *Neurol Res* 2011, **33**(10):1083-1093.
38. Xu R, Jiang X, Guo Z, Chen J, Zou Y, Ke Y, Zhang S, Li Z, Cai Y, Du M *et al*: **Functional analysis of neuron-like cells differentiated from neural stem cells derived from bone marrow stroma cells in vitro**. *Cell Mol Neurobiol* 2008, **28**(4):545-558.
39. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG: **Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(19):10711-10716.
40. Bonilla S, Silva A, Valdes L, Geijo E, Garcia-Verdugo JM, Martinez S: **Functional neural stem cells derived from adult bone marrow**. *Neuroscience* 2005, **133**(1):85-95.
41. Eglitis MA, Mezey E: **Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(8):4080-4085.
42. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR: **Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow**. *Science* 2000, **290**(5497):1779-1782.

43. Anbari F, Khalili MA, Bahrami AR, Khoradmehr A, Sadeghian F, Fesahat F, Nabi A: **Intravenous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells promotes neural regeneration after traumatic brain injury**. *Neural Regen Res* 2014, **9**(9):919-923.
44. Akiyama Y, Radtke C, Kocsis JD: **Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells**. *J Neurosci* 2002, **22**(15):6623-6630.
45. Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ: **Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential**. *Blood* 2004, **103**(5):1662-1668.
46. Van Vlasselaer P, Falla N, Snoeck H, Mathieu E: **Characterization and purification of osteogenic cells from murine bone marrow by two-color cell sorting using anti-Sca-1 monoclonal antibody and wheat germ agglutinin**. *Blood* 1994, **84**(3):753-763.
47. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J: **Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing**. *Stem Cells* 2007, **25**(11):2739-2749.
48. Houlihan DD, Mabuchi Y, Morikawa S, Niibe K, Araki D, Suzuki S, Okano H, Matsuzaki Y: **Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR-alpha**. *Nat Protoc* 2012, **7**(12):2103-2111.
49. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, Phinney DG: **Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection**. *J Cell Biochem* 2003, **89**(6):1235-1249.
50. Itoh S, Aubin JE: **A novel purification method for multipotential skeletal stem cells**. *J Cell Biochem* 2009, **108**(2):368-377.
51. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S: **The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures**. *Orthod Craniofac Res* 2005, **8**(3):191-199.
52. Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, Shi S: **Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model**. *Tissue Eng Part A* 2010, **16**(2):605-615.

53. Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A: **Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2**. *J Dent Res* 2004, **83**(8):590-595.
54. Iohara K, Zheng L, Ito M, Ishizaka R, Nakamura H, Into T, Matsushita K, Nakashima M: **Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31(-)/CD146(-) side population cells from a canine tooth**. *Regen Med* 2009, **4**(3):377-385.
55. Iohara K, Imabayashi K, Ishizaka R, Watanabe A, Nabekura J, Ito M, Matsushita K, Nakamura H, Nakashima M: **Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105+ stem cells with stromal cell-derived factor-1**. *Tissue Eng Part A* 2011, **17**(15-16):1911-1920.
56. Nakashima M, Iohara K: **Regeneration of dental pulp by stem cells**. *Adv Dent Res* 2011, **23**(3):313-319.
57. Wang Y, Zhao Y, Jia W, Yang J, Ge L: **Preliminary study on dental pulp stem cell-mediated pulp regeneration in canine immature permanent teeth**. *J Endod* 2013, **39**(2):195-201.
58. Kuo TF, Huang AT, Chang HH, Lin FH, Chen ST, Chen RS, Chou CH, Lin HC, Chiang H, Chen MH: **Regeneration of dentin-pulp complex with cementum and periodontal ligament formation using dental bud cells in gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold in swine**. *J Biomed Mater Res A* 2008, **86**(4):1062-1068.
59. Kodonas K, Gogos C, Papadimitriou S, Kouzi-Koliakou K, Tziafas D: **Experimental formation of dentin-like structure in the root canal implant model using cryopreserved swine dental pulp progenitor cells**. *J Endod* 2012, **38**(7):913-919.
60. Hillerup S, Stoltze K: **Lingual nerve injury in third molar surgery I. Observations on recovery of sensation with spontaneous healing**. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007, **36**(10):884-889.
61. Martos-Fernandez M, de-Pablo-Garcia-Cuenca A, Bescos-Atin MS: **Lingual nerve injury after third molar removal: Unilateral atrophy of fungiform papillae**. *J Clin Exp Dent* 2014, **6**(2):e193-196.
62. Mommaerts M, Jacobs W: **[Lingual nerve injury during extraction of lower wisdom teeth]**. *Rev Belge Med Dent (1984)* 1991, **46**(3):27-46.
63. Shad S, Shah SM, Alamgir, Abbasi MM: **Frequency of Lingual Nerve**

Injury in Mandibular Third Molar Extraction: A Comparison of Two Surgical Techniques. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2015, **27**(3):580-583.

64. Lopes V, Mumenya R, Feinmann C, Harris M: **Third molar surgery: an audit of the indications for surgery, post-operative complaints and patient satisfaction**. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1995, **33**(1):33-35.
65. Fielding AF, Rachiele DP, Frazier G: **Lingual nerve paresthesia following third molar surgery: a retrospective clinical study**. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997, **84**(4):345-348.
66. Shafer DM, Frank ME, Gent JF, Fischer ME: **Gustatory function after third molar extraction**. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999, **87**(4):419-428.
67. Brain AI, Howard D: **Lingual nerve injury associated with laryngeal mask use**. *Anaesthesia* 1998, **53**(7):713-714.
68. Majumder S, Hopkins PM: **Bilateral lingual nerve injury following the use of the laryngeal mask airway**. *Anaesthesia* 1998, **53**(2):184-186.
69. Gaylard D: **Lingual nerve injury following the use of the laryngeal mask airway**. *Anaesth Intensive Care* 1999, **27**(6):668.
70. Wang KC, Chan WS, Tsai CT, Wu GJ, Chang Y, Tseng HC: **Lingual nerve injury following the use of an oropharyngeal airway under endotracheal general anesthesia**. *Acta Anaesthesiol Taiwan* 2006, **44**(2):119-122.
71. Renes SH, Zwart R, Scheffer GJ, Renes S: **Lingual nerve injury following the use of an i-gel laryngeal mask**. *Anaesthesia* 2011, **66**(3):226-227.
72. Jenkinson A, Crosher R, Mohammed-Ali R, Parsons K: **Lingual nerve injury following use of a supraglottic airway device**. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2014, **52**(3):279-280.
73. Smith KG, Yates JM, Robinson PP: **The effect of nerve growth factor on functional recovery after injury to the chorda tympani and lingual nerves**. *Brain Res* 2004, **1020**(1-2):62-72.
74. Graff-Radford SB, Evans RW: **Lingual nerve injury**. *Headache* 2003, **43**(9):975-983.
75. Kushnerev E, Yates JM: **Evidence-based outcomes following inferior alveolar and lingual nerve injury and repair: a systematic review**. *J*

Oral Rehabil 2015, **42**(10):786-802.

76. Reynolds BA, Weiss S: **Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system**. *Science* 1992, **255**(5052):1707-1710.
77. Kamiya D, Banno S, Sasai N, Ohgushi M, Inomata H, Watanabe K, Kawada M, Yakura R, Kiyonari H, Nakao K *et al*: **Intrinsic transition of embryonic stem-cell differentiation into neural progenitors**. *Nature* 2011, **470**(7335):503-509.
78. Gage FH: **Mammalian neural stem cells**. *Science* 2000, **287**(5457):1433-1438.
79. Azari H, Sharififar S, Rahman M, Ansari S, Reynolds BA: **Establishing embryonic mouse neural stem cell culture using the neurosphere assay**. *J Vis Exp* 2011(47).
80. Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, van der Kooy D: **Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism**. *Neuron* 2001, **30**(1):65-78.
81. Matsui T, Takano M, Yoshida K, Ono S, Fujisaki C, Matsuzaki Y, Toyama Y, Nakamura M, Okano H, Akamatsu W: **Neural stem cells directly differentiated from partially reprogrammed fibroblasts rapidly acquire gliogenic competency**. *Stem Cells* 2012, **30**(6):1109-1119.
82. Biernaskie JA, McKenzie IA, Toma JG, Miller FD: **Isolation of skin-derived precursors (SKPs) and differentiation and enrichment of their Schwann cell progeny**. *Nat Protoc* 2006, **1**(6):2803-2812.
83. Coles-Takabe BL, Brain I, Purpura KA, Karpowicz P, Zandstra PW, Morshead CM, van der Kooy D: **Don't look: growing clonal versus nonclonal neural stem cell colonies**. *Stem Cells* 2008, **26**(11):2938-2944.
84. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA: **Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat**. *Plast Reconstr Surg* 1989, **83**(1):129-138.
85. Shen N, Zhu J: **Application of sciatic functional index in nerve functional assessment**. *Microsurgery* 1995, **16**(8):552-555.
86. Bervar M: **Video analysis of standing--an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic**

nerve. *J Neurosci Methods* 2000, **102**(2):109-116.

87. Varejao AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patricio JA, Cabrita AM: **Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis**. *J Neurosci Methods* 2001, **108**(1):1-9.
88. Gan L, Qian M, Shi K, Chen G, Gu Y, Du W, Zhu G: **Restorative effect and mechanism of mecobalamin on sciatic nerve crush injury in mice**. *Neural Regen Res* 2014, **9**(22):1979-1984.
89. Moradzadeh A, Borschel GH, Luciano JP, Whitlock EL, Hayashi A, Hunter DA, Mackinnon SE: **The impact of motor and sensory nerve architecture on nerve regeneration**. *Exp Neurol* 2008, **212**(2):370-376.
90. Alluin O, Wittmann C, Marqueste T, Chabas JF, Garcia S, Lavaut MN, Guinard D, Feron F, Decherchi P: **Functional recovery after peripheral nerve injury and implantation of a collagen guide**. *Biomaterials* 2009, **30**(3):363-373.
91. Apel PJ, Alton T, Northam C, Ma J, Callahan M, Sonntag WE, Li Z: **How age impairs the response of the neuromuscular junction to nerve transection and repair: An experimental study in rats**. *J Orthop Res* 2009, **27**(3):385-393.
92. Huang J, Hu X, Lu L, Ye Z, Wang Y, Luo Z: **Electrical stimulation accelerates motor functional recovery in autograft-repaired 10 mm femoral nerve gap in rats**. *J Neurotrauma* 2009, **26**(10):1805-1813.
93. Campbell WW: **Evaluation and management of peripheral nerve injury**. *Clin Neurophysiol* 2008, **119**(9):1951-1965.
94. Zarbakhsh S, Bakhtiyari M, Faghihi A, Joghataei MT, Mehdizadeh M, Khoei S, Mansouri K, Yousefi B, Pirhajati V, Moradi F *et al*: **The effects of schwann and bone marrow stromal stem cells on sciatic nerve injury in rat: a comparison of functional recovery**. *Cell J* 2012, **14**(1):39-46.
95. Navarro X: **Functional evaluation of peripheral nerve regeneration and target reinnervation in animal models: a critical overview**. *Eur J Neurosci* 2015.
96. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC: **A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats**. *J Neurotrauma* 1995, **12**(1):1-21.
97. Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG: **Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in**

recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma* 2006, **23**(5):635-659.

98. Teshigawara K, Kuboyama T, Shigyo M, Nagata A, Sugimoto K, Matsuya Y, Tohda C: **A novel compound, denosomin, ameliorates spinal cord injury via axonal growth associated with astrocyte-secreted vimentin**. *Br J Pharmacol* 2013, **168**(4):903-919.
99. Shigyo M, Tanabe N, Kuboyama T, Choi SH, Tohda C: **New reliable scoring system, Toyama mouse score, to evaluate locomotor function following spinal cord injury in mice**. *BMC Res Notes* 2014, **7**:332.
100. Tos P, Ronchi G, Nicolino S, Audisio C, Raimondo S, Fornaro M, Battiston B, Graziani A, Perroteau I, Geuna S: **Employment of the mouse median nerve model for the experimental assessment of peripheral nerve regeneration**. *J Neurosci Methods* 2008, **169**(1):119-127.
101. Fujimoto Y, Abematsu M, Falk A, Tsujimura K, Sanosaka T, Juliandi B, Semi K, Namihira M, Komiya S, Smith A *et al*: **Treatment of a mouse model of spinal cord injury by transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells**. *Stem Cells* 2012, **30**(6):1163-1173.
102. Marques SA, de Almeida FM, Mostacada K, Martinez AM: **A highly reproducible mouse model of compression spinal cord injury**. *Methods Mol Biol* 2014, **1162**:149-156.
103. Liu R, Zhang S, Yang H, Ju P, Xia Y, Shi Y, Lim TH, Lim AS, Liang F, Feng Z: **Characterization and therapeutic evaluation of a Nestin(+) CNP(+) NG2(+) cell population on mouse spinal cord injury**. *Exp Neurol* 2015, **269**:28-42.
104. Neirinckx V, Agirman G, Coste C, Marquet A, Dion V, Rogister B, Franzen R, Wislet S: **Adult bone marrow mesenchymal and neural crest stem cells are chemoattractive and accelerate motor recovery in a mouse model of spinal cord injury**. *Stem Cell Res Ther* 2015, **6**:211.

表1　運動・感覚機能試験の評価項目

1	後肢を引き摺る
2	足指が丸くなる
3	歩行時に後肢が外旋する
4	起立時に後肢が接地しない
5	金網上で後肢が網目に嵌る

各項目について, 該当する場合を 0, 部分的に該当する場合を 1, 該当しない場合を 2 として 3 段階で評価し, 5 項目の合計をスコアとした.

表2　Limiting dilution 法によって求められた神経前駆細胞の割合

	BMSCs	HipOPs
#1	1/39255	1/397
#2	1/45392	1/412
#3	1/45043	1/455
#4	1/48283	1/391

BMSCs および HipOPs に含まれる神経前駆細胞の割合. 各細胞につき, 4 回の独立した細胞採取について試験を行った.

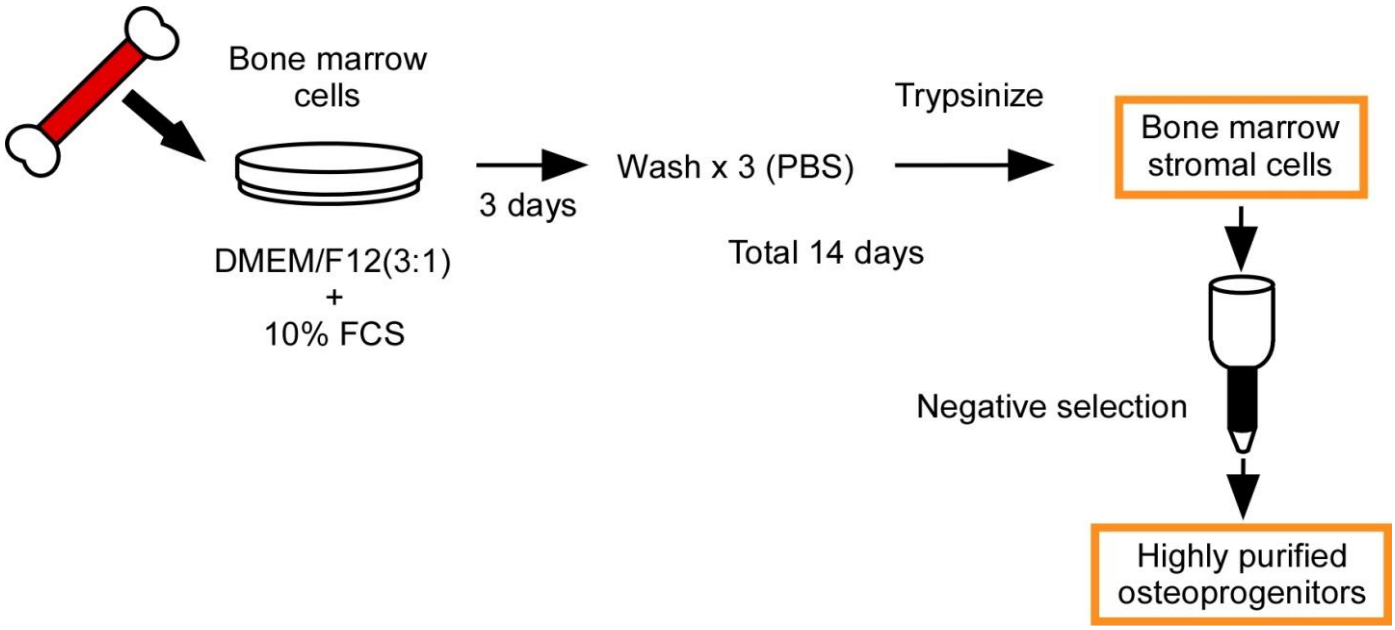
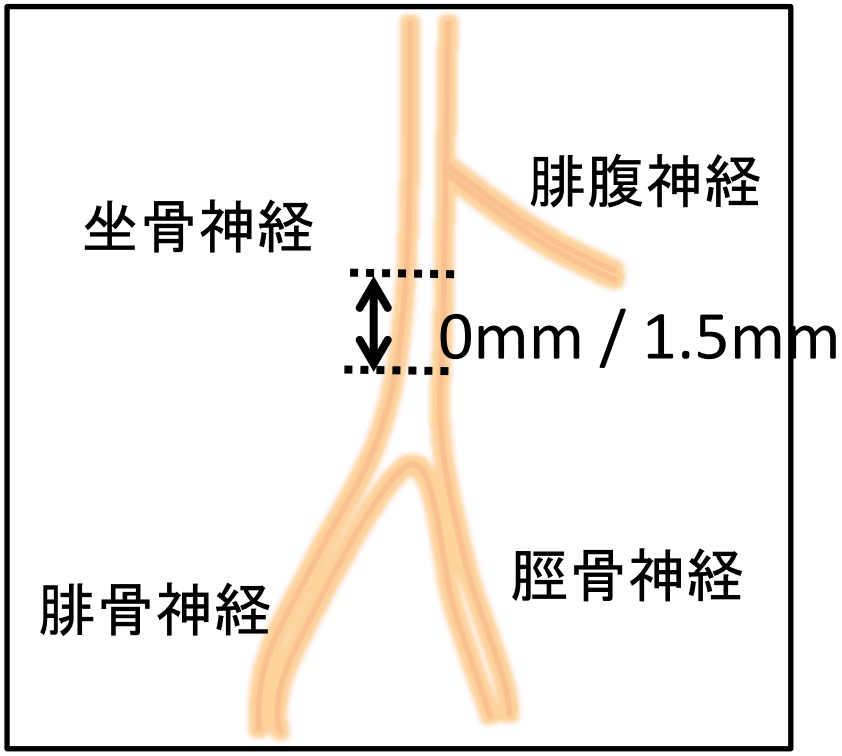


図1　BMSCs および HipOPs 調整の概略図

A



B

図2　細胞移植実験の術式

(A) Spared nerve injury の概略図.腓腹神経を温存し, 坐骨神経を切除する.
(B) 坐骨神経切除後の写真.

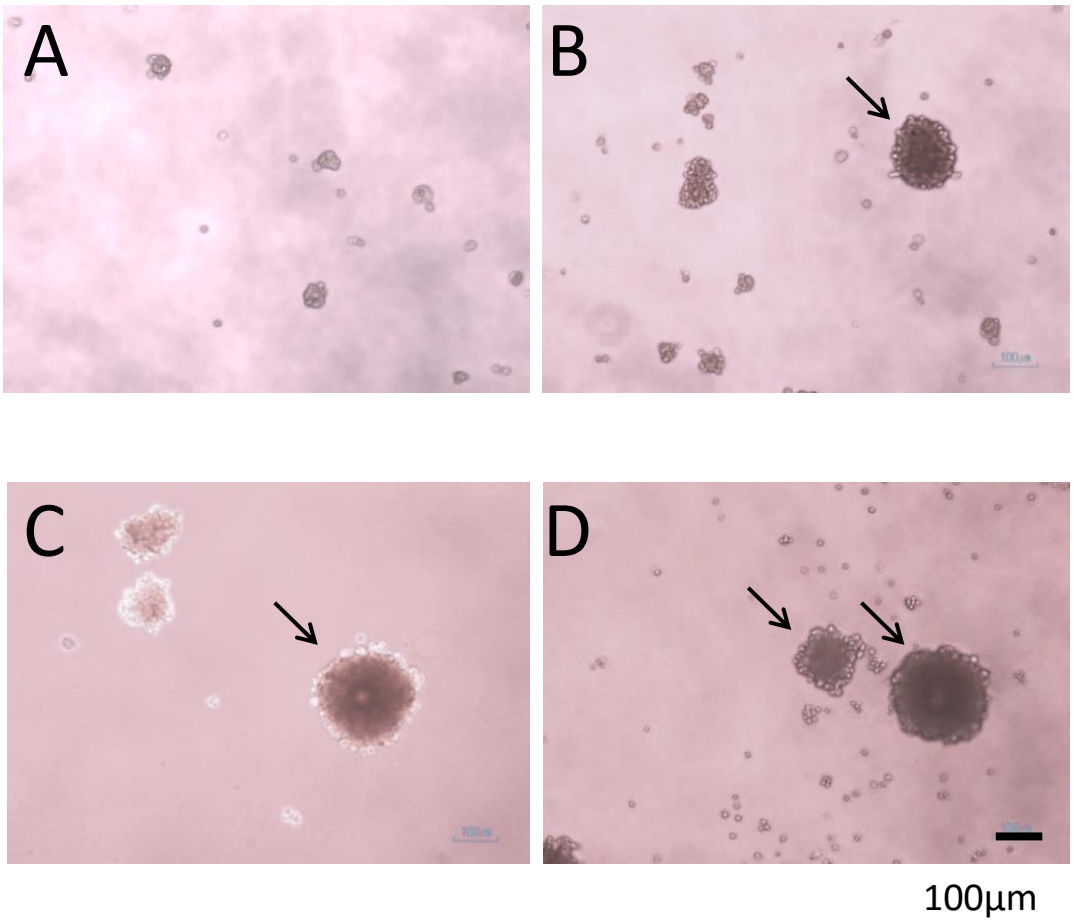


図3　HipOPs の neurosphere 形成能の評価

HipOPs を bFGF および EFG 存在下で培養した, 培養 3日目 (A), 8日目(B), 17日目(C), 21日目(D) の顕微鏡像. 培養 8 日目頃より neurosphere の形成を認める (矢印).

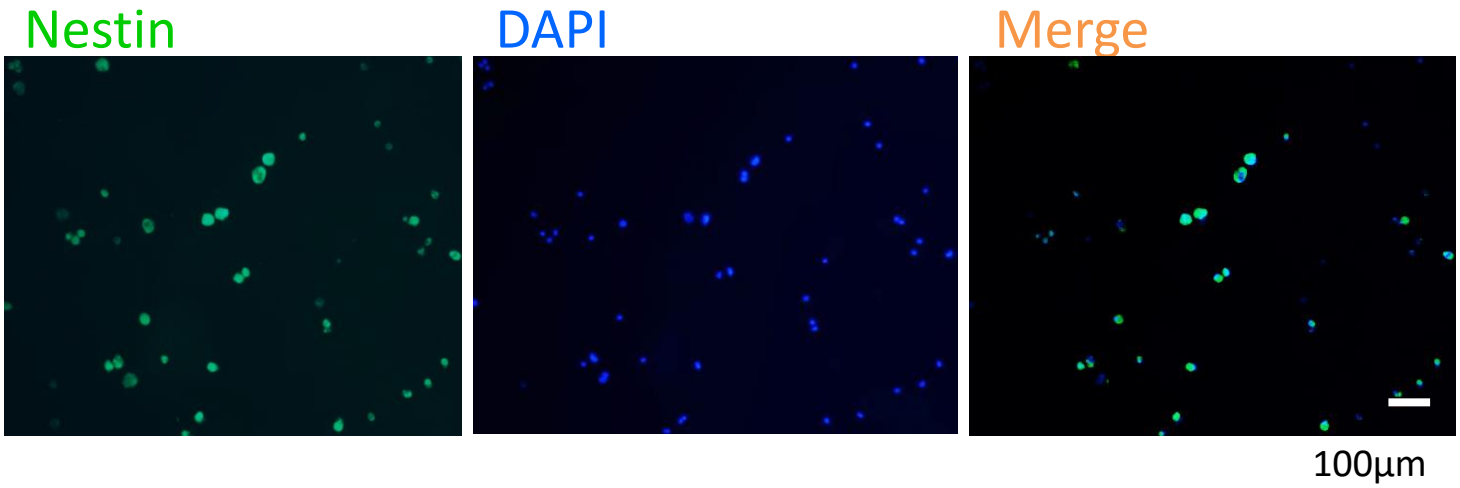
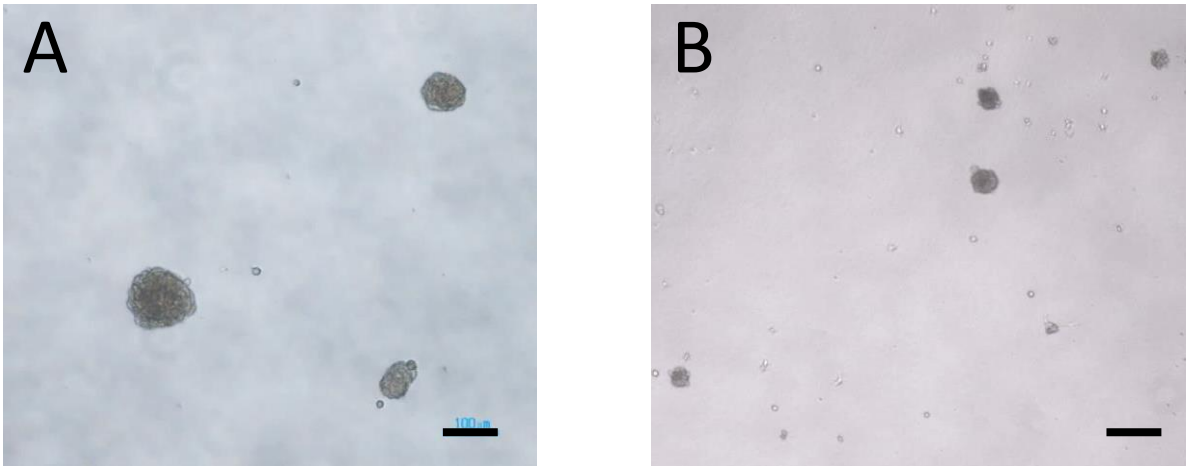


図4　HipOPs 由来 neurosphere の
蛍光免疫染色

Neurosphere 形成細胞の nestin に対する蛍光免疫染色像.



100μm

図5　HipOPs 由来 neurosphere の継代培養実験

HipOPs　由来 neurosphere の継代培養によって形成された secondary neurospheres (A) および tertiary neurospheres (B).

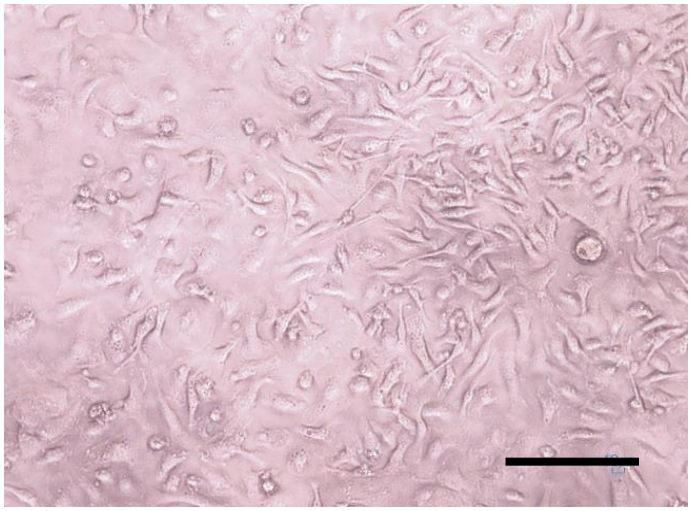


図6　HipOPs 由来 neurosphere の分化能解析

HipOPs　由来 neurosphere を 10% FCS 存在下で分化させた, 培養 10日目の光学顕微鏡像.

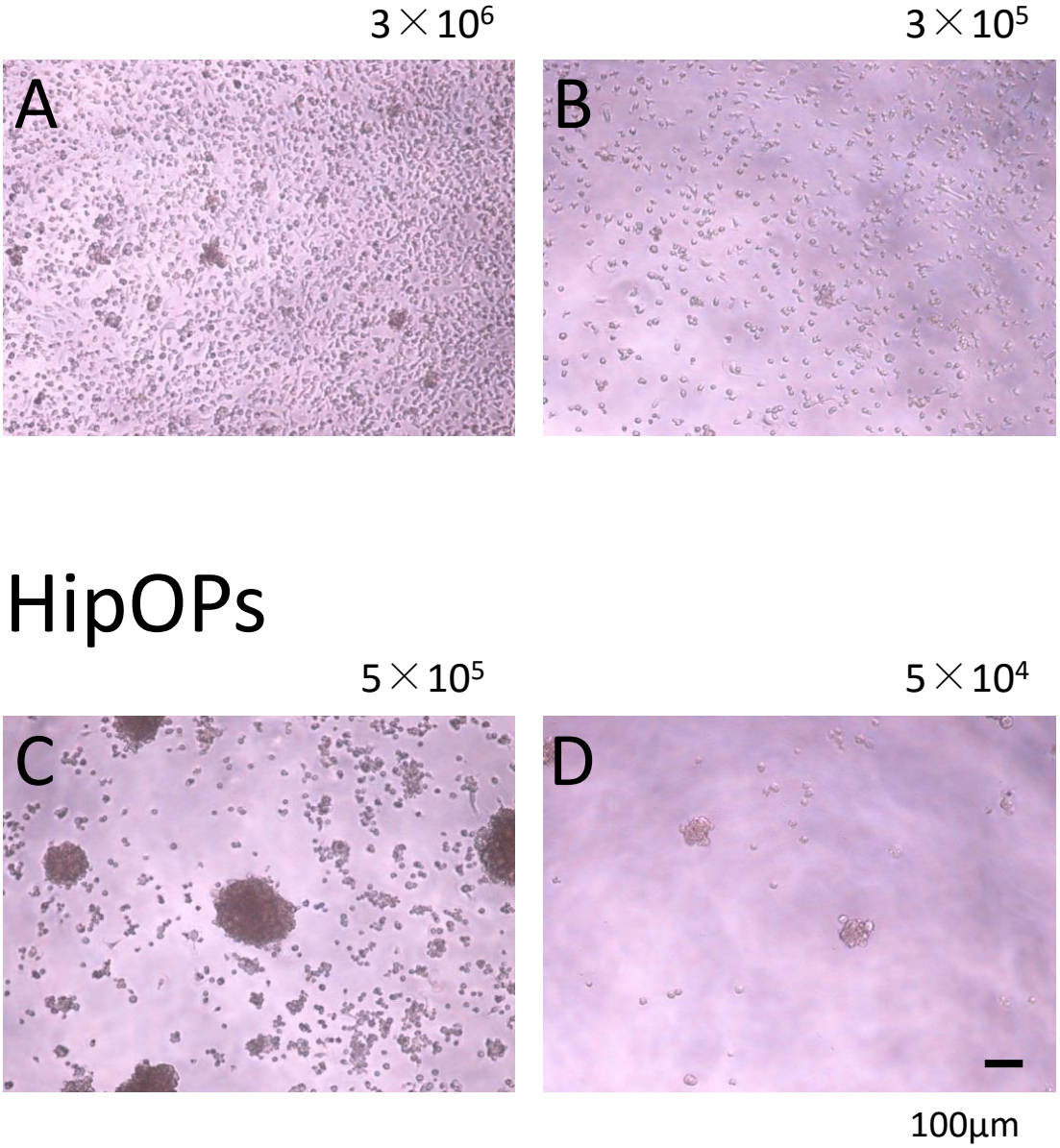


図7　BMSCs と HipOPs の neurosphere 形成能の比較

BMSCs (A,B) および HipOPs (C,D) を異なる細胞数にて播種し, bFGF および EGF を含む培地で培養 10 日目の光学顕微鏡像.

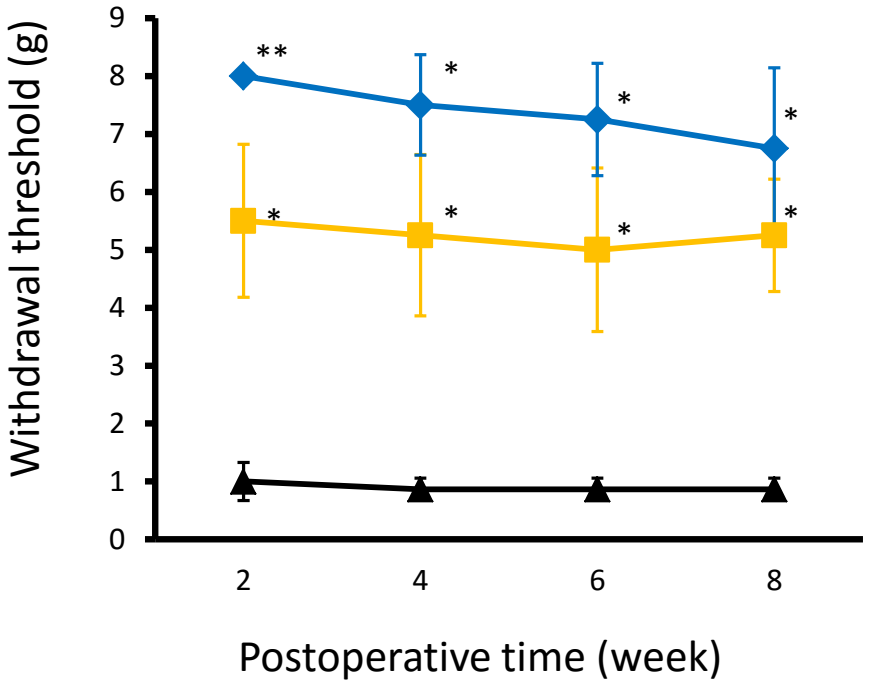


図8　坐骨神経切除量による比較 (von Frey 試験)

左側坐骨神経を切断した群 (黄) と 1.5 mm 切除した群 (青) および sham 群 (黒) の左側後肢の von Frey 試験の結果. 横軸は術後の経過週数, 縦軸はwithdrawal threshold. n=8.

* ： $p < 0.05$, ** ： $p < 0.005$　(Dunnett test)

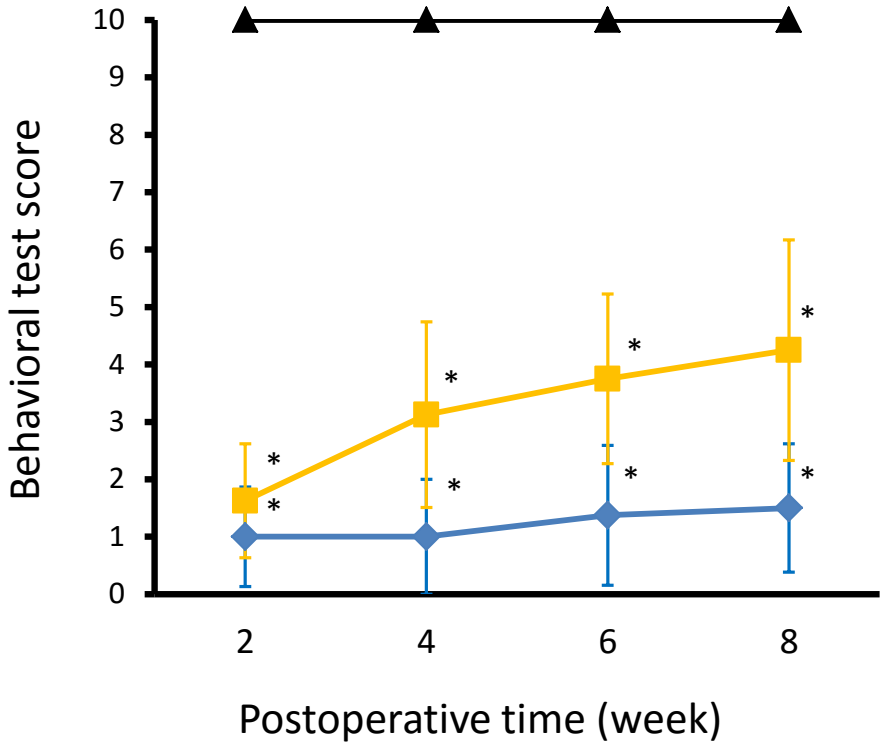
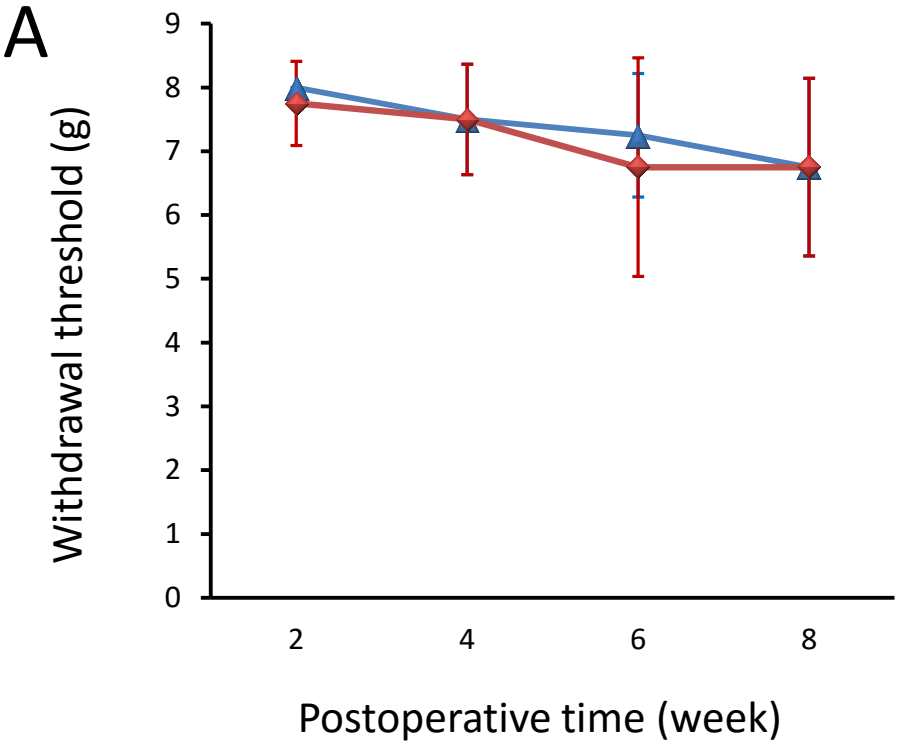


図9　坐骨神経切除量による比較
(運動･感覚機能試験)

左側坐骨神経を切断した群 (黄) と 1.5 mm 切除した群 (青) および sham 群 (黒) の左側後肢の行動試験の結果. 横軸は術後の経過週数, 縦軸はスコア. n=8.
*　: $p < 0.05$　(Dunnett test)



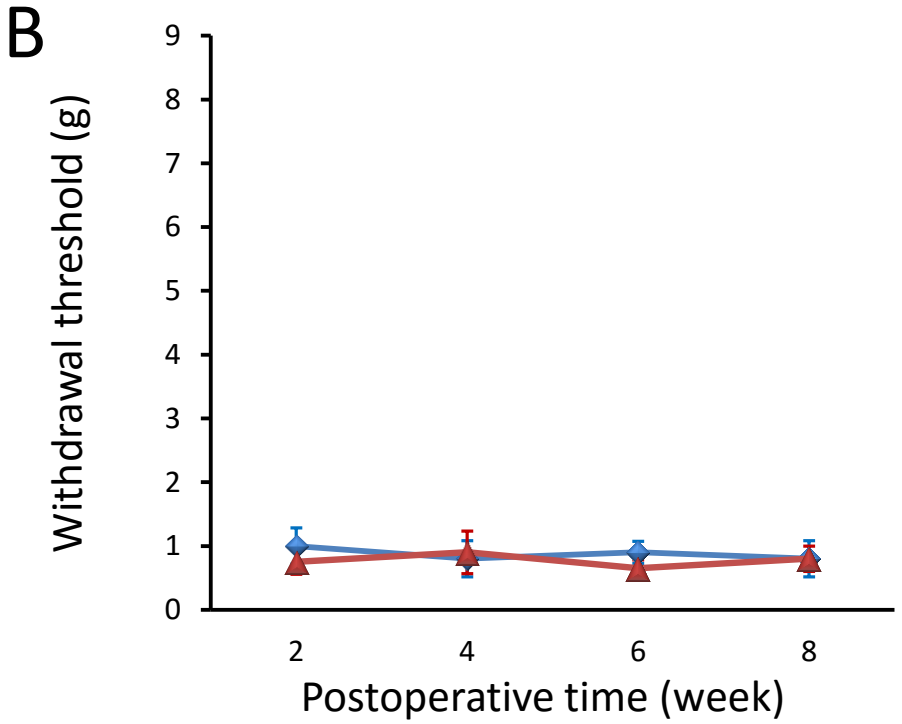


図10　scaffold 移植群の von Frey試験

坐骨神経を切除した群 (青) と切除後 scaffold を移植した群 (赤) の左側後肢 (A) および右側後肢 (B) の von Frey 試験. 横軸は術後の経過週数, 縦軸は withdrawal threshold. n=8. いずれも有意差を認めない. (Dunnett test)

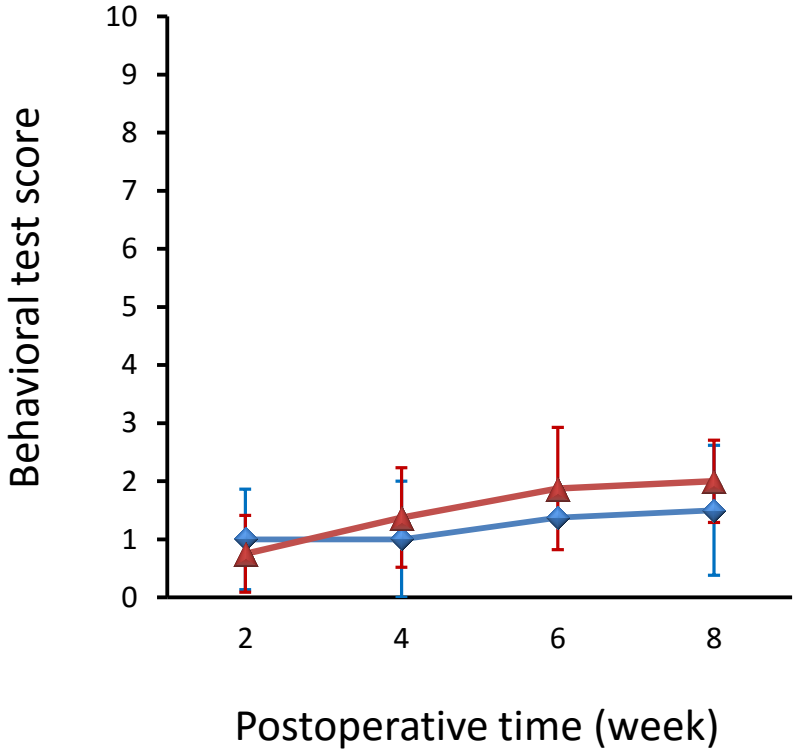


図11　scaffold 移植群の 運動・感覚機能試験

坐骨神経を切除した群 (青) と切除後 scaffold を移植した群 (赤) の行動試験の結果. 横軸は術後の経過週数, 縦軸はスコア. n=8.
いずれも有意差を認めない. (Dunnett test)

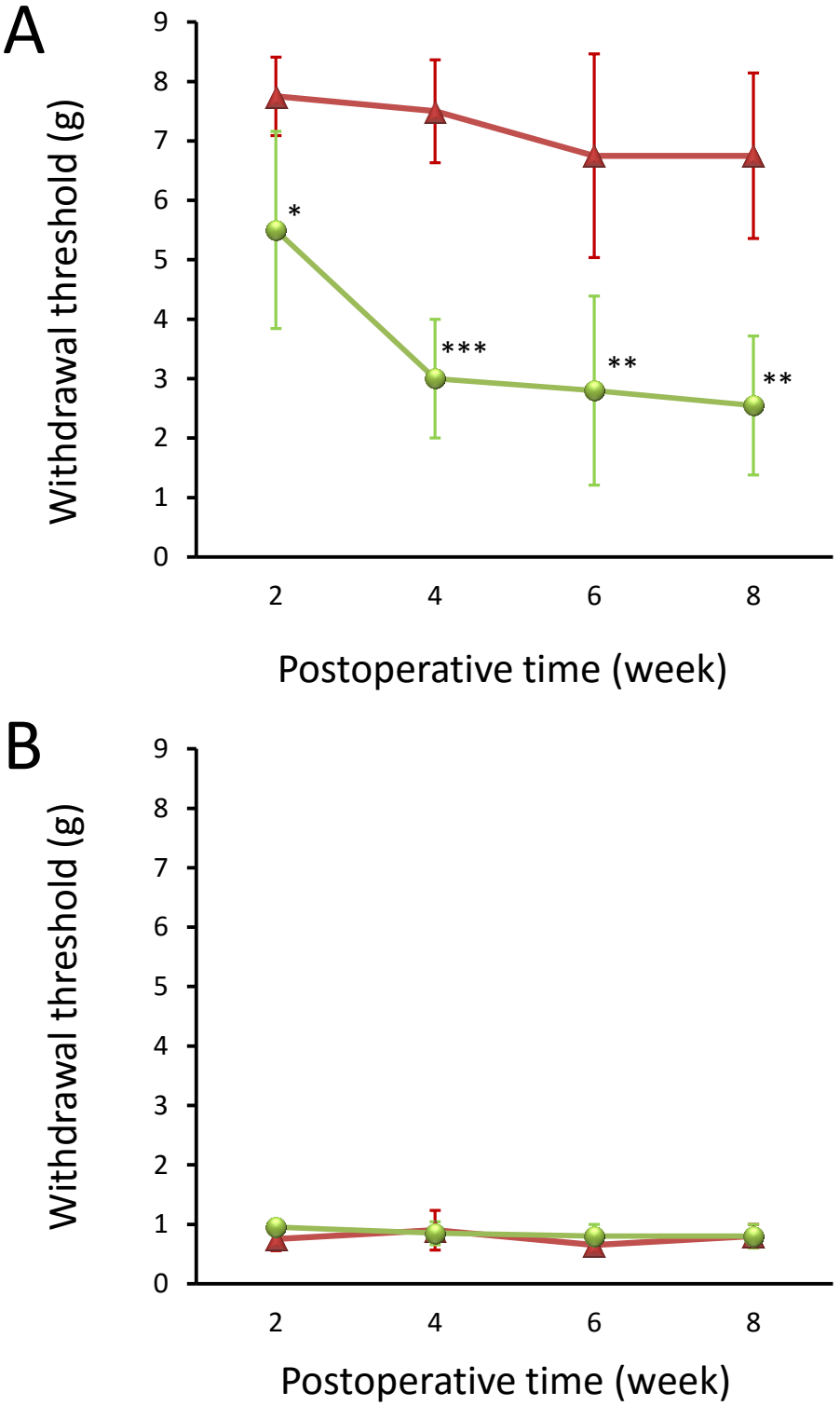


図12　HipOPs 移植群の von Frey 試験

HipOPs 移植群 (緑) とコントロール群 (赤) の左側後肢 (A) および右側後肢 (B) の von Frey 試験の結果. 横軸は術後の経過週数, 縦軸はwithdrawal threshold. n=8.
* ： $p < 0.05$, ** ： $p < 0.005$, ***: $p < 0.001$ (Dunnett test)

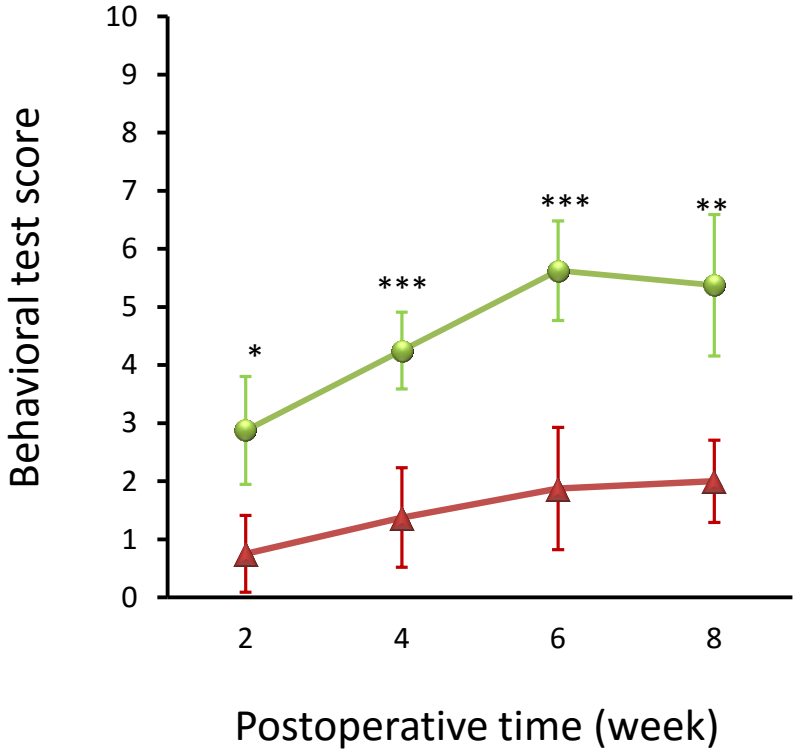


図13　HipOPs 移植群の スコア試験

HipOPs 移植群 (緑) とコントロール群 (赤) の行動試験の結果. 横軸は術後の経過週数, 縦軸はスコア. n=8.
*　: $p < 0.05$, ** : $p < 0.005$, ***: $p < 0.001$ (Dunnett test)

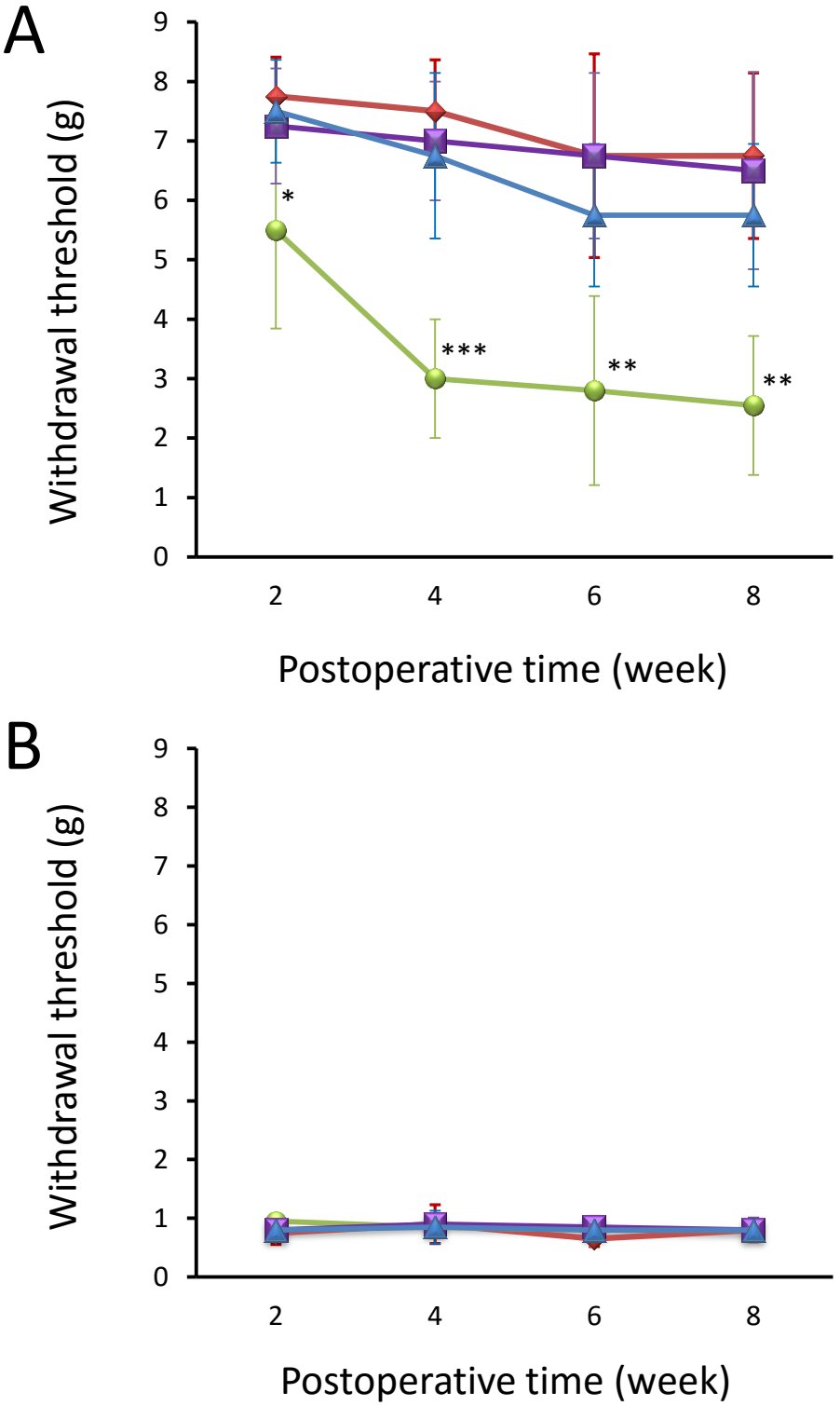


図14　BMSCs 移植群の von Frey 試験

BMSCs 移植群 (紫) および 10 倍量 BMSCs 移植群 (青) の左側後肢 (A) および右側後肢 (B) の von Frey 試験の結果. 赤はコントロール群, 緑は HipOPs 移植群. 横軸は術後の経過週数, 縦軸はwithdrawal threshold. n=8.

* ： $p < 0.05$, ** ： $p < 0.005$, ***: $p < 0.001$ (Dunnett test)

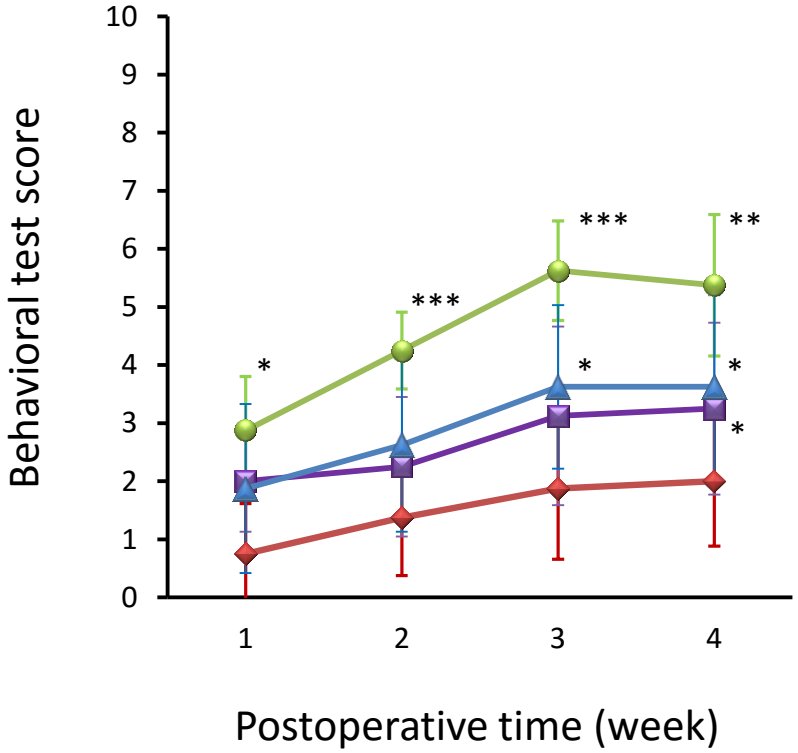


図15　BMSCs 移植群の 運動・感覚機能試験

BMSCs 移植群 (紫) および 10 倍量 BMSCs 移植群 (青) の行動試験の結果. 赤はコントロール群, 緑は HipOPs 移植群. 横軸は術後の経過週数, 縦軸はスコア. n=8.
*　: $p < 0.05$, ** : $p < 0.005$, ***: $p < 0.001$ (Dunnett test)

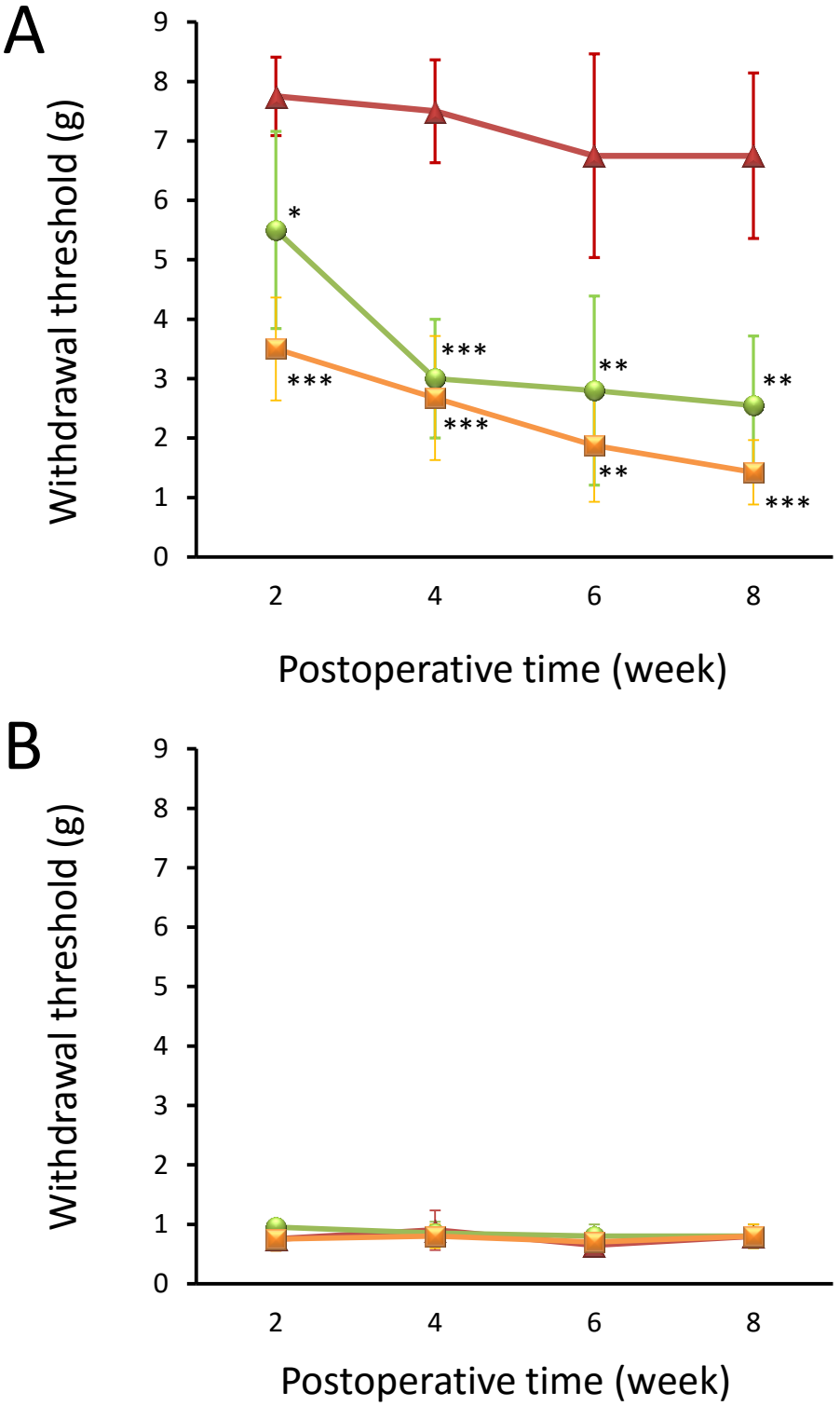


図16　HipOP-NSCs 移植群の von Frey 試験

HipOP-NSCs 移植群 (黄) の左側後肢 (A) および右側後肢 (B) の von Frey 試験の結果. 赤はコントロール群, 緑は HipOPs 移植群.　横軸は術後の経過週数, 縦軸は withdrawal threshold. n=8.
*　: $p < 0.05$, **　: $p < 0.005$, ***: $p < 0.001$ (Dunnett test)

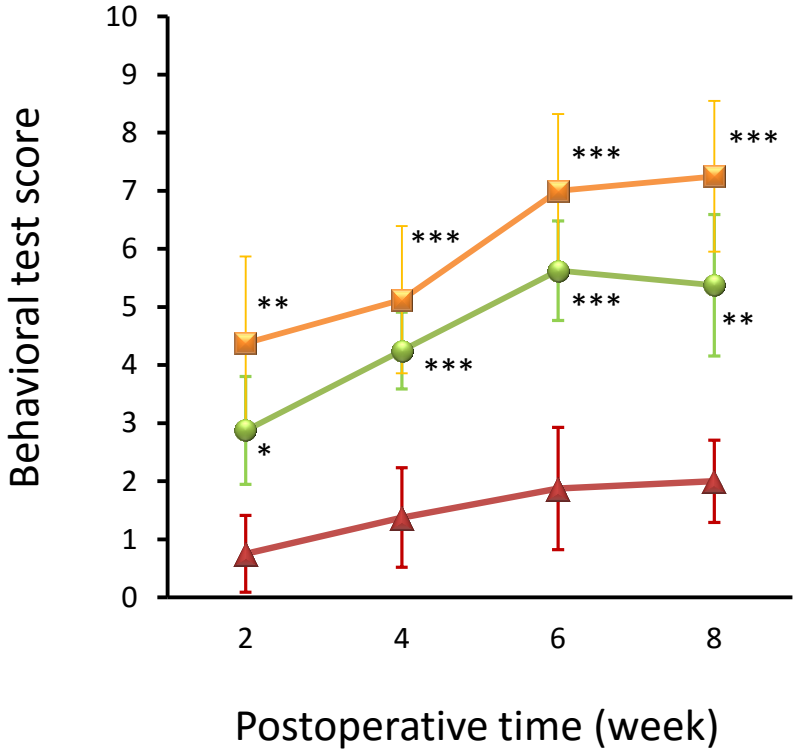


図17　HipOP-NSCs 移植群の 運動・感覚機能試験

HipOPs-NSCs 移植群 (黄) の行動試験の結果. 赤はコントロール群, 緑は HipOP 移植群. 横軸は術後の経過週数, 縦軸はスコア. n=8.

*　: $p < 0.05$, **　: $p < 0.005$, ***: $p < 0.001$ (Dunnett test)

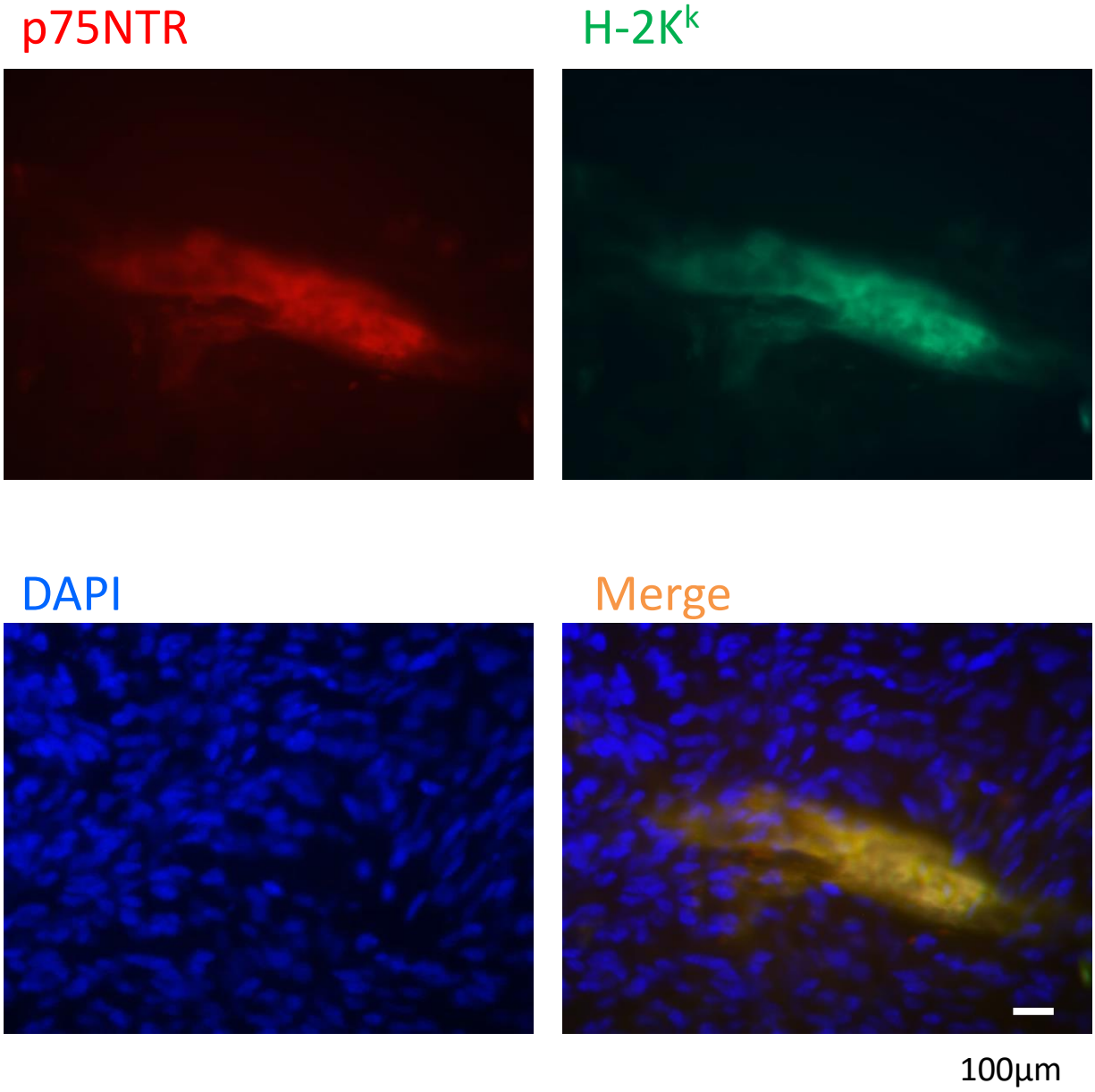


図18　組織切片の蛍光免疫染色

HipOP-NSCs 移植3ヶ月後の組織切片の p75NTR および H-2K^k に対する蛍光免疫染色像.