

論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	① 乙 第 号	論文提出者名	大見 真衣子
論文審査 委員氏名	主査	武部 純	
	副査	松原 達昭	
		河合 達志	
論文題名	糖尿病性神経障害に対する歯髄幹細胞移植療法 の抗炎症作用ーストレプトゾトシン誘発糖尿病 ラットにおける検討ー		

インターネットの利用による公表用

糖尿病性神経障害は糖尿病合併症の中で最も早期に発症し、罹患率も高い。糖尿病性神経障害の治療法は、厳格な血糖コントロールあるいは高血糖により惹起される代謝異常の是正が原則であるが、進行した神経障害に対しては現在のところ対症療法により自覚症状を改善させるのみである。そこで、新しい治療法として、前駆細胞や幹細胞を用いた細胞移植療法が注目されている。しかしながら、これらの細胞においては糖尿病や加齢による細胞機能障害が生じており、細胞移植療法の効果が減弱する可能性が懸念されている。智歯や矯正治療により便宜抜歯した歯より分離・培養可能な歯髄幹細胞は、糖尿病発症前の若年時の間葉系幹細胞の供給源として期待される。細胞移植療法における治療効果のメカニズムは、幹細胞から分泌される血管新生因子や神経栄養因子による効果であると考えられている。また、肥満や糖尿病においてはその病態に炎症が重要視されており、炎症の抑制が糖尿病性神経障害の治療として効果的である可能性が示唆されている。そこで、本研究においては、streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病モデルラットを用いて、糖尿病性神経障害に対する歯髄幹細胞移植の治療効果および末梢神経における抗炎症作用の検討を行った。

実験動物には6週齢雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットおよび GFP ラットを用い、抜歯した上下顎中切歯より歯髄組織を採取し、歯髄幹細胞の分離、培養を行った。3継代目の歯髄幹細胞を用いて、幹細胞の同定および分化誘導培地による分化能の検討を行った。In vivo での検討において、6週齢雄

性SDラットにSTZを投与して糖尿病を誘導し、8週後に6週齢雄性GFPラットから採取した歯髄幹細胞をラット片側後肢骨格筋に10か所に分けて移植し、移植4週後に以下の測定を行った。(1)神経生理学的評価：坐骨神経における運動神経伝導速度、感覚神経伝導速度および坐骨神経内血流量を測定した。(2)坐骨神経におけるマクロファージ数についてCD68抗体を用いた蛍光免疫染色により評価した。(3)坐骨神経における遺伝子発現をreal-time PCR法により解析した。(4)RAW264.7細胞を用いて歯髄幹細胞培養上清の抗炎症効果について、炎症性サイトカインの遺伝子発現解析を行った。(5)培養歯髄幹細胞の発現するサイトカインについて遺伝子発現解析を行った。

培養歯髄幹細胞は、間葉系幹細胞マーカーを高く発現し、分化誘導培地にて脂肪細胞、骨芽細胞および軟骨細胞への分化が確認された。STZ誘発糖尿病ラット後肢骨格筋への歯髄幹細胞移植実験において、以下の結果が得られた。(1)糖尿病ラットで低下した坐骨神経における運動神経伝導速度、感覚神経伝導速度および坐骨神経内血流量は、歯髄幹細胞移植により有意に改善した。(2)歯髄幹細胞移植は、糖尿病ラット坐骨神経で増加したマクロファージ数を有意に減少させた。(3)糖尿病ラット坐骨神経において、M1マクロファージマーカーであるTNF- α 、IL-1 β およびCD11cの発現が有意に増加した。歯髄幹細胞移植は糖尿病ラットで増加したTNF- α 遺伝子発現を低下させ、逆にM2マクロファージマーカーであるIL-10およびCD206

の発現を増加させた。(4) 歯髄幹細胞培養上清は LPS 刺激した RAW264.7 細胞において、IL-10 および CD206 遺伝子発現を有意に増加させた。(5) 培養歯髄幹細胞は血管新生因子および神経栄養因子を高く発現し、特に、M1 マクロファージ誘導因子である GM-CSF と比較して、M2 マクロファージ誘導因子である M-CSF を高く発現していた。

本研究では、移植歯髄幹細胞は M-CSF および IL-10 などの M2 マクロファージ誘導因子を分泌し、末梢神経における M2 マクロファージを増加させる可能性が示唆され、M2 マクロファージを介した抗炎症作用が、糖尿病性神経障害改善に寄与している可能性が示唆された。

歯髄幹細胞は、智歯や矯正治療により便宜抜歯した歯から容易に採取可能であり、糖尿病発症前の若年時における細胞源として注目されている。若年時に抜歯した歯から歯髄を採取し、歯髄幹細胞を分離培養した後、凍結保存し、必要時に融解して再培養し、細胞移植に用いることは、高齢者に自らの若年時の細胞を移植することが可能となり、侵襲なくより大きな効果が期待できると考える。歯髄幹細胞移植療法は、糖尿病性神経障害のみならず、他の難治性疾患への応用も期待され、また顎口腔領域においては、歯髄再生、歯周病、口腔インプラント治療のための骨増生に有効である可能性が高いと考えられる。再生医療実現に向けて、歯髄幹細胞がマクロファージの表現型を変えることによって抗炎症作用を示す能力を見出した点は、今後の応用研究に重要な知見である。

(論文審査の要旨)

No.4.....

(2000字以内のこと)

愛知学院大学

本研究は、今後の歯髄幹細胞を利用した再生医療研究の発展に大いに貢献するものであり、歯科補綴学、および関連諸学科に寄与するところが大きい。よって本論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと判定した。

平成28年 1 月27日