

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

牧野衣利子

論文題目

再生医療における歯髄幹細胞の多能性 — 糖尿病性
神経障害に対する歯髄幹細胞培養上清の治療効果 —

I. 緒言

我が国の糖尿病患者数は1000万人を超え、増加し続けている。糖尿病性神経障害は糖尿病合併症の中で最も早く発症し、慢性高血糖に起因する代謝異常と血流障害に、加齢や慢性炎症が加わって進展する。糖尿病性神経障害に対する治療法はいまだ痛みに対する対症療法が主であり、病因に則した根治的治療法の開発が望まれている。

幹細胞移植療法は糖尿病性神経障害の新しい治療法として期待されている。幹細胞移植は、糖尿病で障害された神経伝導速度、神経内血流量、表皮内神経線維密度、感覚障害および神経形態を改善させる。一方で、細胞移植の効果は移植細胞機能に依存しており、糖尿病または加齢により前駆細胞や幹細胞の機能不全が生じることが明らかとなっている。こうした移植幹細胞機能障害の問題を解決する一つの方法として、歯髄幹細胞 (dental pulp stem cells; DPSCs) が期待されている。DPSCsは若年時または糖尿病発症前の矯正治療により抜去された歯から容易に採取可能であり、使用直前まで凍結保存が可能である。以前にストレプトゾトシン (streptozotocin; STZ) 誘導1型糖尿病モデルラットを用い、後肢骨格筋へのDPSCsの移植が、低下した神経生理的機能を改善することを明らかにした。しかし、移植部位に生存する移植細胞の数がごくわずかであることが判明し、糖尿病性神経障害への治療効果は、移植細胞の豊富なセクレトームが幹細胞移植初期に多量に分泌されることによると考えられる。

本研究では、DPSCs より分泌されたセクレトームの直接投与が糖尿病性神経障害の治療に有効であることを検証する目的で、歯髄幹細胞培養上清 (dental pulp stem cell culture media; DPSC-CM) を STZ 誘導 1 型糖尿病モデルラットの片側後肢骨格筋に投与し、一定期間後における糖尿病性神経障害の治療効果について検討した。

II. 実験材料および方法

1. DPSC-CM の調整

6 週齢雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットに三種混合麻酔薬 (塩酸メドミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルファノール) を腹腔内投与し屠殺後、下顎中切歯より歯髄組織を採取し、DPSCs の分離・培養を行った。その後培養上清を回収し 10 倍濃縮したものを DPSC-CM として実験に用いた。6 週齢雄性 SD ラットに STZ を投与して糖尿病を誘発し、8 週間後に DPSC-CM (1.0mL/rat) を正常ラットおよび糖尿病ラットの片側後肢骨格筋に 10 ヶ所において投与した。反対側には同量の培養液 (Dulbecco's modified Eagle medium) を投与し対照群とした。投与 4 週後に以下の測定を行った。

2. 坐骨神経における神経伝導速度と坐骨神経内血流量の評価

イソフルランによる吸入麻酔下にて、神経伝導速度と坐骨神経内血流量を測定した。坐骨神経運動神経伝導速度 (motor nerve conduction velocity: MNCV) は、坐骨神経走行部位である足首と坐骨切痕部に刺激を与え活動電位を記録し、感覚神経伝導速度 (sensory nerve conduction

velocity; SNCV) は、腓腹神経走行部位である足首と膝裏に電気刺激を与え、活動電位を記録した。坐骨神経内血流量 (sciatic nerve blood flow; SNBF) は、大腿皮膚を切開し坐骨神経を露出させ、レーザーを用いて計測を実施した。

3. 足底皮膚における表皮内神経線維密度 (intraepidermal nerve fiber density; IENFD) の評価

足底より 0.5cm 角で皮膚を採取し、厚さ 25 μ m の組織切片を作製した。PGP9.5 抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、足底表皮内に入る神経繊維数を計測した。

4. 坐骨神経および後肢骨格筋における免疫組織染色

坐骨神経と腓腹筋を採取し、組織切片を作製した。坐骨神経は CD68 抗体と PECAM-1 抗体を用いて染色を行い、腓腹筋は PECAM-1 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。スライドは蛍光顕微鏡下で観察した。

5. 坐骨神経における遺伝子発現解析

坐骨神経および腓腹筋における TNF- α (*tnf*), CD68 (*CD68*) の mRNA の発現レベルを評価した。内在性コントロールとして β 2 microglobulin を用いて $\Delta\Delta$ Ct 法で計算した。

6. ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells; HUVEC) に対する DPSC-CM の効果の検討

HUVECを無血清培地でプレインキュベーション後、DPSC-CMとMTTまたはCCK-8を添加し一定時間後に分光光度計を用いて450nmの吸光度を読み取った。

7. 統計処理

全ての群の値は平均値±標準誤差 (SEM) で表した。統計分析は多重比較のために一元配置分散分析のBonferroni検定を用いて行った。差は $p < 0.05$ を有意とした。

III. 結果

1. 体重および血糖値

糖尿病ラットは高血糖および体重減少を示した。正常ラットと糖尿病ラットともにDPSC-CM投与による血糖値および体重の有意な変動は認められなかった。

2. MNCV、SNCVおよびSNBF

DPSC-CM投与4週後にMNCV、SNCV、SNBFを測定した。正常ラットと比較して、糖尿病ラットはMNCV、SNCVが有意に遅延し、SNBFは有意に減少した。DPSC-CM投与は、糖尿病で低下したMNCV、SNCV、SNBFを有意に増加させたが、正常ラットでは影響を及ぼさなかった。

3. 足底皮膚におけるIENFD

足底表皮内に入る単位距離あたりの末梢神経c線維数を計測した。糖尿病ラットにおけるIENFDは正常ラットと比較して有意に低い値を示した。

DPSC-CM投与は、糖尿病ラットにおけるIENFDを有意に増加させたが、正常ラットでは影響を及ぼさなかった。

4. 坐骨神経におけるCD68陽性細胞数

坐骨神経をCD68抗体で染色し、坐骨神経神経内膜内のマクロファージ数を計測した。糖尿病ラットにおいてマクロファージ数は有意に増加し、DPSC-CM投与は糖尿病ラットの坐骨神経内マクロファージ数を有意に抑制した。しかし、正常ラットでは影響を及ぼさなかった。

5. 坐骨神経における炎症性遺伝子発現

マクロファージのマーカーであるCD68 (*CD68*) 遺伝子発現は糖尿病ラットの坐骨神経で有意に増加し、DPSC-CM投与によって改善することを確認した。炎症誘発性遺伝子であるTNF- α (*tnf*) 遺伝子発現は糖尿病ラットの坐骨神経で増加傾向を示したが、有意差は認めなかった。

6. 坐骨神経神経内膜内における毛細血管数

坐骨神経における血管内皮細胞をPECAM-1抗体で染色し、単位面積あたりの神経内膜内毛細血管数を計測した。正常ラットおよび糖尿病ラットの毛細血管数は同程度であり、DPSC-CM投与は、毛細血管数に影響を与えなかった。

7. 後肢骨格筋における毛細血管筋束比

糖尿病ラットの後肢骨格筋の筋束当たりの毛細血管数は有意に減少し、DPSC-CM投与は糖尿病ラットの毛細血管筋束比を有意に増加させた。一方で正常ラットではDPSC-CM投与による影響を受けなかった。

8. HUVECに対するDPSC-CMの効果

血管内皮細胞増殖に対するDPSC-CMの効果について、CCK-8とMTTアッセイを用いて評価した。DPSC-CMはCCK-8とMTTアッセイで共にHUVECsの増殖を有意に促進した。

IV. 考察

本研究では、DPSC-CMの糖尿病性神経障害に対する治療効果について明らかにした。後肢骨格筋へのDPSC-CM単回投与は、糖尿病で低下した神経機能（神経伝導速度および神経内血流量）およびIENFDを有意に増加させ、糖尿病性神経障害を改善した。さらに、DPSC-CM投与は糖尿病ラットの後肢骨格筋の毛細血管筋束比を増加させるとともに、坐骨神経内のマクロファージ数を減少させた。

間葉系幹細胞培養上清の治療効果は、幹細胞移植療法に比較して次のような利点を有している。第一に、培養上清は移植片対宿主病や腫瘍原性、塞栓形成がないこと、第二に、培養上清の大量生産はコストを削減し、良質な培養上清の維持が可能であること、第三に、虚血性心疾患や脳梗塞のような急性疾患の治療で直ちに利用可能であることである。DPSC-CMのさらなる利点としては、矯正歯科治療による抜去歯から採取することにより、疾患が発症する前の若年時に採取可能であり、高品質のDPSCsを継続的に得ることができる点であると考えられる。

本研究のDPSC-CM投与とこれまでに実施されたDPSCs移植との糖尿病性神経障害治療効果を比較したところ、SNCVとSNBFにおけるDPSC-CM投与の効果はDPSCs移植と同程度であった。しかし、MNCVにおけるDPSC-CM投与の効果はDPSCs移植よりやや劣っていた。今後、DPSC-CM投与を臨床応用するためには、さらなる効果の改善のために、投与量または投与回数を検討していく必要があることが示唆された。

V. まとめ

本研究により、後肢骨格筋への歯髄幹細胞培養上清投与が、神経保護作用、血管新生作用および抗炎症作用を介して糖尿病性神経障害に対して治療効果を有することが解明された。糖尿病性神経障害に対し、歯髄幹細胞より分泌される多様なセクレトームの投与が糖尿病性神経障害の根治的治療法として有用であることを示唆しており、今後の臨床応用が期待できる。