

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	牧野 衣利子
論文審査 委員氏名	主査 後藤 滋巳 副査 松原 達昭 三谷 章雄 宮澤 健		
論文題名	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—		

インターネットの利用による公表用

我が国の糖尿病患者数は増加し続けている。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。糖尿病性神経障害の治療法は対症療法が主であり、新しい治療法として幹細胞移植療法が期待されている。

幹細胞の一つである歯髄幹細胞(dental pulp stem cells; 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ことから、再生医療における細胞ソースとして期待されている。これまで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機能を改善することを明らかにした。しかし、移植部位に残存する移植細胞の数はごくわずかであり、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分泌によると考えられた。

そこで本研究では、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)をラットの片側後肢骨格筋に投与し、糖尿病性神経障害の治療効果について検討している。

6週齢雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットの顎中切歯より歯髄組織を採取し、DPSCsの分離・培養を行い、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 を正常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を投与し対照群とした。投与4週後に、坐骨神経運動神経伝導速度 (motor nerve conduction velocity; MNCV)、感覚神経伝導速度 (sensory nerve conduction velocity; SNCV)、坐骨神経内血流量 (sciatic nerve blood flow; SNBF)、足底皮膚における表皮内神経線維密度 (intraepidermal nerve fiber density; IENFD) の測定、坐骨神経および後肢骨格筋における免疫組織染色、坐骨神経における遺伝子発現解析およびヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells; HUVECs) に対する DPSC-CM の効果の検討を行い、以下の結果を得ている。

1. 体重および血糖値

糖尿病ラットは有意な高血糖および体重減少を示した。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、SNBF および足底皮膚における IENFD

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、IENFD は有意に減少した。DPSC-CM 投与は、糖尿病で低下した MNCV、SNCV、SNBF および 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。

3. 坐骨神経および後肢骨格筋における免疫組織染色

坐骨神経を CD68 抗体で染色し、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投与により有意に抑制された。また後肢骨格筋をPECAM-1抗体で染色し筋束当たりの毛細血管数を計測したところ、糖尿病ラットにおいて毛細血管筋束比は有意に減少しており、DPSC-CM投与により有意に増加した。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。

4. 坐骨神経における炎症性遺伝子発現

マクロファージマーカーである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投与により低下した。

5. HUVECsに対するDPSC-CMの効果

DPSC-CMはHUVECsの増殖を有意に促進した。

これらの結果から本研究は、後肢骨格筋へのDPSC-CM単回投与が糖尿病性神経障害を改善することを明らかにした。またDPSC-CM投与は、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ることより、DPSC-CMの糖尿病性神経障害改善効果は神経保護作用、血管新生作用および抗炎症作用を介していることが示唆された。

以上より、本研究では、DPSC-CMが糖尿病性神経障害に対して治療効果を有することを示し、歯科矯正学、内科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。