

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—

牧 野 衣 利 子

愛知学院大学大学院歯学研究科 歯科臨床系（歯科矯正学）

指導：後藤 滋巳 教授

愛知学院大学大学院歯学研究科博士（歯学）学位申請論文

Pluripotency of Dental Pulp Stem Cells in Regenerative Medicine
– Mechanisms of Therapeutic Effects of Conditioned Media from Cultured Dental
Pulp Stem Cells on Diabetic Polyneuropathy –

ERIKO MAKINO

Graduate School of Dentistry, Aichi Gakuin University

Clinical Dentistry (Orthodontics)

Supervisor : Prof. Shigemi Goto

The thesis submitted to the Graduate School of Dentistry,
Aichi Gakuin University for Ph.D. degree

本論文の基盤論文は、次のような論文です。

タイトル：Conditioned Media from Dental Pulp Stem Cells Improved Diabetic Polyneuropathy through Anti-inflammatory, Neuroprotective and Angiogenic Actions: Cell-free Regenerative Medicine for Diabetic Polyneuropathy

掲載誌名：Journal of Diabetes Investigation 2019;10:1199-1208

著者：ERIKO MAKINO¹⁾, NOBUHISA NAKAMURA²⁾, MEGUMI MIYABE²⁾,
MIZUHO ITO²⁾, SAKI KANADA¹⁾, MASAKI HATA³⁾, TOMOKAZU SAIKI⁴⁾,
KAZUNORI SANGO⁵⁾, HIDEKI KAMIYA⁶⁾, JIRO NAKAMURA⁶⁾,
KEN MIYAZAWA¹⁾, SHIGEMI GOTO¹⁾, TATSUAKI MATSUBARA²⁾
and KEIKO NARUSE²⁾

所属：¹⁾ Department of Orthodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University, 2-11 Suemori-dori, Chikusa-ku, Nagoya 464-8650, Japan
²⁾ Department of Internal Medicine, School of Dentistry, Aichi Gakuin University, 2-11 Suemori-dori, Chikusa-ku, Nagoya 464-8650, Japan
³⁾ Department of Removable Prosthodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University, 2-11 Suemori-dori, Chikusa-ku, Nagoya 464-8650, Japan
⁴⁾ Department of Pharmacy, Dental Hospital, Aichi Gakuin University, 2-11 Suemori-dori, Chikusa-ku, Nagoya 464-8650, Japan
⁵⁾ Laboratory of Peripheral Nerve Pathophysiology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan
⁶⁾ Division of Diabetes, Department of Internal Medicine, Aichi Medical University School of Medicine, 1-1 Yazakokarimata, Nagakute 480-1195, Japan

目 次

I. 緒 言	1
II. 実験材料および方法	1
1. 動物	1
2. 歯髄幹細胞の分離・培養および歯髄幹細胞培養上清の作製	1
3. 歯髄幹細胞培養上清の投与	2
4. 坐骨神経における神経伝導速度の評価	2
5. 坐骨神経内血流量の評価	2
6. 足底皮膚における表皮内神経線維密度の評価	2
7. 坐骨神経および後肢骨格筋における免疫組織染色	2
8. 坐骨神経における遺伝子発現解析	2
9. ヒト臍帯静脈内皮細胞に対する歯髄幹細胞培養上清の効果の検討	2
10. 統計処理	2
III. 結 果	3
1. 体重および血糖値	3
2. 坐骨運動／感覚神経伝導速度および坐骨神経内血流量	3
3. 足底皮膚における表皮内神経線維密度	3
4. 坐骨神経における CD68 陽性細胞数	4
5. 坐骨神経における炎症性遺伝子発現	4
6. 坐骨神経神経内膜内における毛細血管数	5
7. 後肢骨格筋における毛細血管筋束比	5
8. ヒト臍帯静脈内皮細胞に対する歯髄幹細胞培養上清の効果	6
IV. 考 察	6
V. ま と め	7
謝 辞	7
文 献	7

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、罹患率の高い合併症である。しびれ、痛みなど多彩な自覚症状が患者の生活の質を低下させるのみでなく、寿命とも関連する重大な合併症である。糖尿病性神経障害は、慢性高血糖に起因する代謝異常と血流障害を中心に、さらに加齢や免疫機能低下が加わって、発症・進展する¹⁾。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、糖尿病性神経障害の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。これまでの動物実験より間葉系幹細胞、embryonic stem(ES)細胞、induced pluripotent stem(iPS)由来細胞などさまざまな種類の幹細胞を用いた糖尿病性神経障害に対する細胞移植療法の効果が、報告されている²⁻⁷⁾。これらの幹細胞移植は、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した。一方で、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⁸⁻¹¹⁾。細胞移植の効果は移植細胞機能に依存しており、正常動物より分離培養した幹細胞移植と比較して、加齢または糖尿病動物から分離培養した幹細胞移植では治療効果が損なわれていた^{12,13)}。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 cell; 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、使用までに凍結保存が可能である¹⁴⁾。必要時に解凍・再培養することにより、自己の若年時のDPSCsを用いて幹細胞移植を実施することが可能となる。すでに我々は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、DPSCsの後肢骨格筋への移植が低下した坐骨神経伝導速度、坐骨神経内血流量、および表皮内神経線維密度を改善し、また長期間の糖尿病状態による末梢神経形態異常も改善することを明らかにした^{14,15)}。

幹細胞移植療法の糖尿病性神経障害治療メカニズムとして、局所的な生着と血管や神経への細胞分化によって血管新生や神経再生が起こると予想されていたが、その後の研究により、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¹⁴⁾、この現象は、虚血性心疾患や脳梗塞など他の疾患に対する細胞療法と同様であった^{16,17)}。現在は、血管新生因子や神経栄養因子また

は免疫抑制因子を含む移植細胞から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り、移植部位で血管新生効果や保護効果を示す可能性が考えられる^{18,19)}。

本研究では、DPSCsより分泌されたセクレトームの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、一定期間後の糖尿病性神経障害治療効果について検討した。

II. 実験材料および方法

1. 動物

実験動物は、中部科学資材株式会社(Nagoya, Japan)より6週齢雄Sprague-Dawley(SD)ラットを購入し、一晩絶食後STZ(Sigma Chemical Co., MO, USA)を腹腔内投与した(60mg/kg)。STZ投与1週間後に血糖値を測定し、14mmol/L以上の血糖値を有するラットを糖尿病モデルとした。動物は、12時間の明暗サイクルの人工照明下、室温(23±1.0℃)および湿度(45±10%)で飼育し、自由飲水で固形飼料を与えた。なお、本研究は愛知学院大学歯学部動物実験委員会の承認を受けて行われた(承認番号:AGUD318号)。

2. 歯髄幹細胞の分離・培養および歯髄幹細胞培養上清の作製

6週齢雄性SDラットに三種混合麻酔薬:塩酸メドミジン(Meiji Seika Pharma Co., Ltd., Tokyo, Japan)、ミダゾラム(Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan)、酒石酸ブトルフェノール(Meiji Seika Pharma Co., Ltd.)を腹腔内投与し屠殺後、下顎中切歯の抜歯を行った。短針を用いて歯髄組織を採取し、0.1%コラゲナーゼ(Sigma)および0.25%トリプシン/EDTA溶液(GIBCO Lab Inc., Grand Island, NY)を用いて酵素処理を行った後、10cmシャーレ(BD Falcon)上に播種し、alpha modification of Eagle's medium(α -MEM)(GIBCO)に20%ES細胞用ウシ胎児血清(GIBCO)および1%penicillin-streptomycin(GIBCO)を添加した培養液を用いて、DPSCsの分離・培養を行った。フローサイトメトリーを使用した表面抗原解析におけるCD29/CD90陽性、CD34/CD45陰性、および各分化誘導による脂肪分化能および骨分化能によりDPSCを同定した。培養歯髄幹細胞を無血清Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)培地(Sigma)に交換し、37℃、5%

CO₂ 気相下で培養した。その 24 時間後培養上清を回収し、3-kDa centrifugal filters (Amicon Ultra-15, Nihon Millipore, Japan) を用いて 10 倍濃縮したものを DPSC-CM として実験に用いた。

3. 歯髄幹細胞培養上清の投与

STZ 糖尿病誘導 8 週後に 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ヶ所にわけて投与した。反対側には同量の DMEM 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。

4. 坐骨神経における神経伝導速度の評価

イソフルランによる吸入麻酔下にて、Neuropack MEB-9400 (Nihon-Koden, Osaka, Japan) を用いて神経伝導速度を測定した。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。坐骨神経周囲を 37°C に維持するため、加温パット上で記録を行った。

5. 坐骨神経内血流量 (sciatic nerve blood flow: SNBF) の評価

イソフルランによる吸入麻酔下にて、大腿皮膚を切開し坐骨神経を露出させ、坐骨結節より 1cm 遠心部にセンサーをあて計測を実施した。計測には Laser Doppler Blood Flow Meter (FLO-N1:Omega Wave Inc., Tokyo, Japan) を用い、坐骨神経周囲を 37°C に維持するため、加温パット上で行った。

6. 足底皮膚における表皮内神経線維密度の評価

足底より 0.5cm 角で皮膚を採取し、4% パラホルムアルデヒド溶液 (Sigma) で固定をした後、ドライアイスを用いて OCT コンパウンド (Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan) に包埋し、クリオスタットを用いて厚さ 25 μ m の組織切片を作製した。一次抗体に PGP9.5 抗体 (Millipore, Tokyo, Japan)、二次抗体に Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて蛍光免疫染色を行い、神経線維は FV10i 共焦点システム (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて計測した。

7. 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、4% パラホルムアルデヒド溶液 (Sigma) で固定をした後、パラフィン包埋し 5 μ m の厚さの組織切片を作製した。坐骨神経の切片には CD68 抗体 (Abcam, Cambridge, UK) と PECAM-1 抗体 (Dianova Hmburg, Germany) を用いて Simplestain rat system (Nichirei, Tokyo, Japan) にて染色を行った。腓腹筋の切片には一次抗体に PECAM-1 抗体 (Dianova Hmburg)、二次抗体に Alexa Fluor 594 (Invitrogen) 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。

8. 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を RNA 安定化試薬の RNA later (Qiagen, Valencia, CA, USA) に浸潤後、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出した。cDNA は ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて合成した。Real-time PCR は 95°C 1分、52°C 1分、72°C 30秒、50 サイクルの反応を ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) を用いて解析した。CD68 (*CD68*), TNF- α (*tnf*) に対する、TaqMan Gene Expression Assay プライマーとプローブは Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) から購入した。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。

9. ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に対する歯髄幹細胞培養上清の効果と検討

DPSC-CM の HUVEC に対する細胞増殖促進効果を検討した。HUVEC は American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) から入手し、EGM-2 MV 培地 (LONZA, Walkersville, MDLONZA) で培養した。HUVEC は 24well ディッシュ中で 50% コンフルエントに達したときに、細胞を無血清 EGM-2 培地中でインキュベーションし、24 時間後、DPSC-CM と MTT (Sigma) を添加した。4 時間インキュベート後、HUVEC を溶解し、分光光度計 (Spark, TECAN, Männedorf, Switzerland) を用いて 550nm の吸光度を計測した。また同様に、CCK-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて 4 時間インキュベート後、分光光度計を用いて 450nm の吸光度を計測した。

10. 統計処理

全ての群の値は平均値 \pm 標準誤差 (S.E.) 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 (表 1)。

表 1 体重および血糖値

	Body weight (g)	Blood glucose (mM)
Normal-vehicle	435.0 ± 17.3	4.8 ± 0.7
Normal-DPSC-CM	445.0 ± 34.2	4.7 ± 0.5
Diabetes-vehicle	245.0 ± 56.9*	23.2 ± 7.2*
Diabetes-DPSC-CM	214.0 ± 25.1*	20.3 ± 4.8*

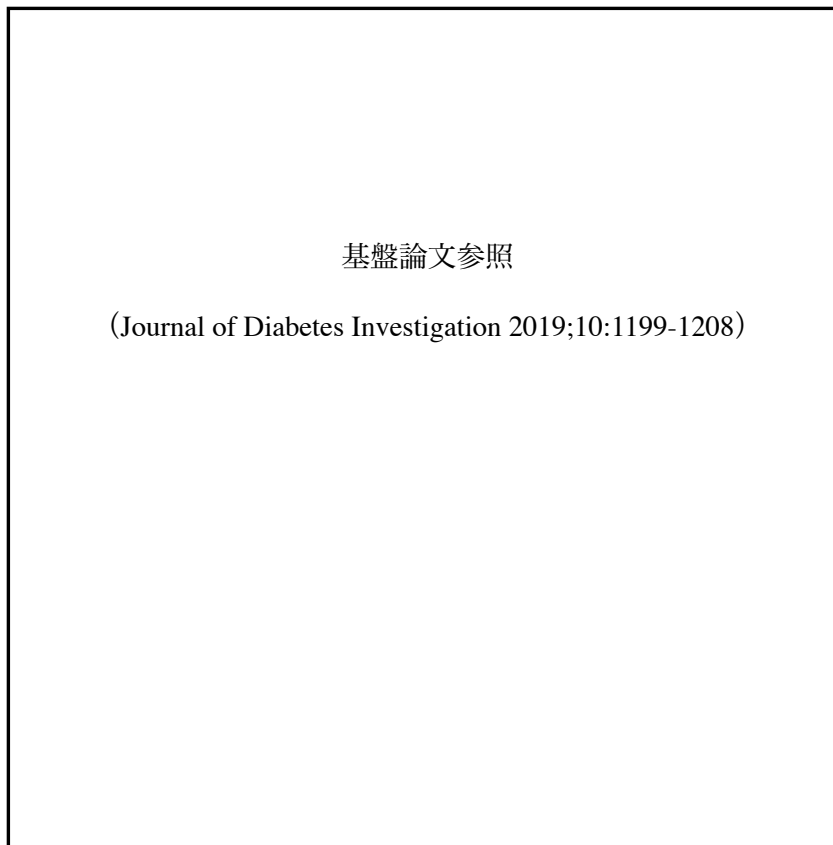
* $p < 0.05$ vs Normal-vehicle n=4-5

2. 坐骨運動 / 感覚神経伝導速度 (MNCV/SNCV) および坐骨神経内血流量 (SNBF)

DPSC-CM 投与 4 週後に MNCV、SNCV、SNBF を測定した。対照群正常ラットと比較して、対照群糖尿病ラットは MNCV、SNCV が有意に遅延し、SNBF は有意に減少した (図 1A、B、C)。糖尿病ラットにおける 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。対照的に、正常ラットにおける DPSC-CM 投与は MNCV、SNCV、SNBF に影響を及ぼさなかった。

3. 足底皮膚における表皮内神経線維密度 (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。対照群糖尿病ラットにおける IENFD は対照群正常ラットと比較して有意に低い値を示した (図 1D)。DPSC-CM 投与は糖尿病ラット投与側における IENFD



基盤論文参照

(Journal of Diabetes Investigation 2019;10:1199-1208)

図 1 坐骨神経伝導速度、坐骨神経内血流量および足底皮膚における表皮内神経線維密度の評価

A : 運動神経伝導速度 (足首～坐骨切痕間で測定 n=5-7)

B : 感覚神経伝導速度 (足首～膝間で測定 n=5-7)

C : 坐骨神経内血流量 (n=5-7)

D : 表皮内神経線維密度 (n=4)

DPSC-CM 投与 4 週間後に測定を実施し、データは平均値 ± S.E. で表した。** $p < 0.01$

を有意に増加させた。正常ラットにおいては IENFD における DPSC-CM の効果は認められなかった。

4. 坐骨神経における CD68 陽性細胞数

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可視化した (図 2A)。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た (図 2B)。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、対照群正常ラットと DPSC-CM 投与群正常ラットの間には有意差を認めなかった。

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 (図 3)。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

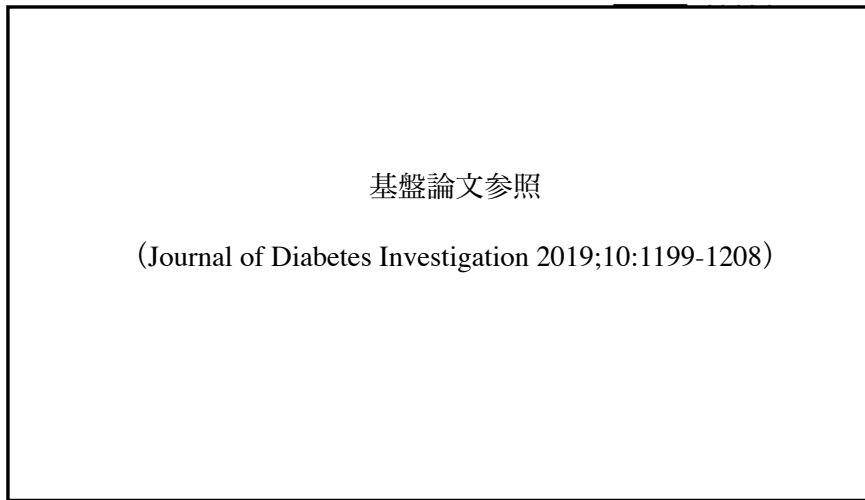


図 2 坐骨神経における CD68 免疫組織学的染色

A: 正常ラットおよび糖尿病ラットの坐骨神経における代表的な CD68 陽性細胞染色写真 (scale bar = 10 μ m)

B: CD68 陽性細胞 /mm² の計測 (n=4)

DPSC-CM 投与 4 週間後に坐骨神経を免疫染色し、データは平均値 \pm S.E. で表した。** $p < 0.01$

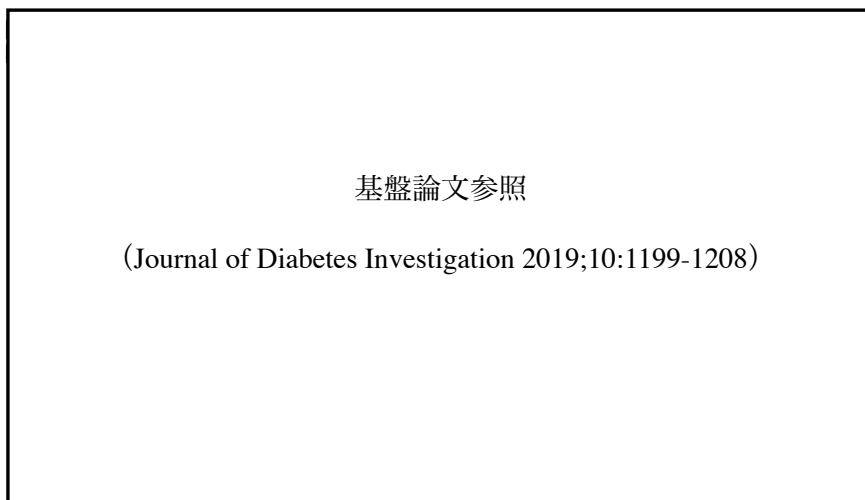


図 3 坐骨神経における炎症性遺伝子発現

DPSC-CM 投与 4 週間後に坐骨神経の CD68 (*CD68*)、TNF- α (*tnf*) 遺伝子をリアルタイム PCR 法で評価し、データは平均値 \pm S.E. で表した。n=4-6 * $p < 0.05$

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。DPSC-CM 投与は正常ラットにおける CD68 (*CD68*) および TNF- α (*tnf*) 遺伝子発現に影響を与えなかった。

6. 坐骨神経神経内膜内における毛細血管数

血管内皮細胞を PECAM-1 抗体で染色し、毛細血管を可視化し、単位面積あたりの神経内膜内毛細血管数を計測した(図 4A)。坐骨神経における毛細血管数は正常ラッ

トおよび糖尿病ラットで同程度であった(図 4B)。後肢骨格筋への DPSC-CM 投与は、正常ラット糖尿病ラットともに、坐骨神経神経内膜内における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ていた(図 5A, B)。DPSC-CM 投与は

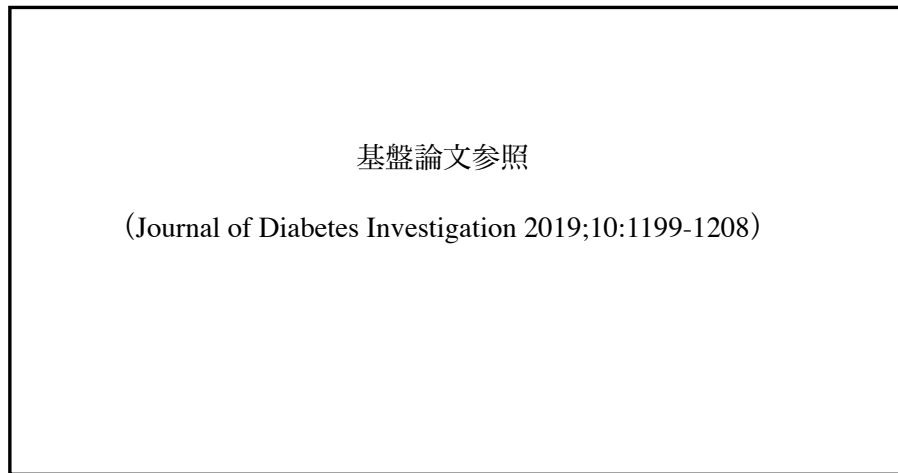


図 4 坐骨神経における毛細血管の免疫組織学的染色

A: 正常ラットおよび糖尿病ラットの坐骨神経における代表的な毛細血管染色写真 (scale bar = 10 μ m)
 B: 毛細血管数の計測 (n=4)
 DPSC-CM 投与 4 週間後に坐骨神経を免疫染色し、データは平均値 \pm S.E. で表した。

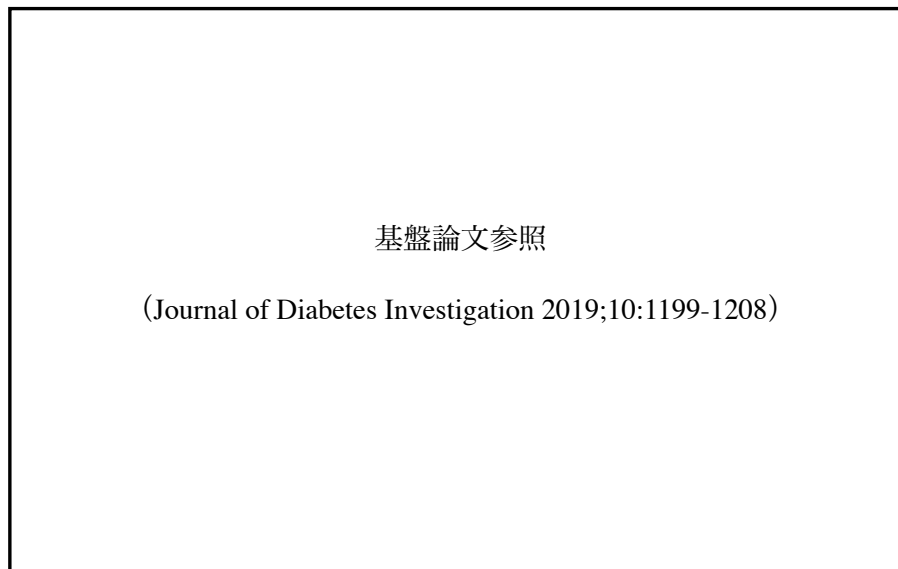


図 5 後肢骨格筋における毛細血管の免疫組織学的染色

A: 正常ラットおよび糖尿病ラットの後肢骨格筋における代表的な毛細血管染色写真 (scale bar = 50 μ m)
 B: 毛細血管筋束比 (n=4)
 DPSC-CM 投与 4 週間後に坐骨神経を免疫染色し、データは平均値 \pm S.E. で表した。** $p < 0.01$

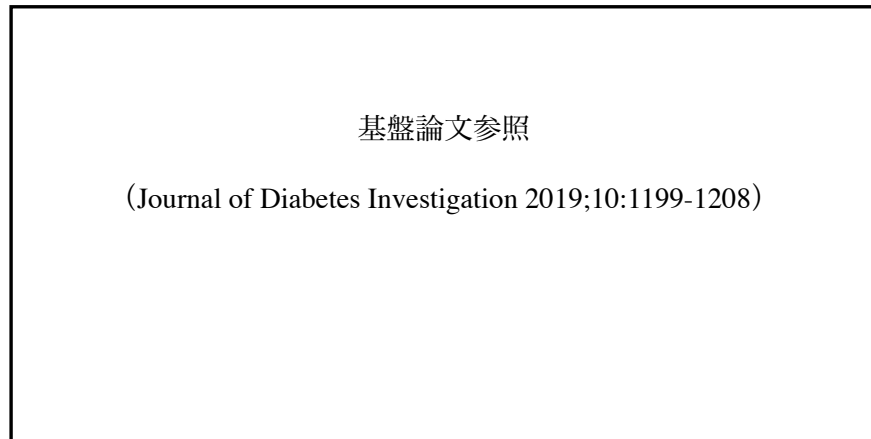


図6 ヒト臍帯静脈内皮細胞に対する 歯髄幹細胞培養上清の効果

A: 細胞増殖を CCK-8 アッセイで評価
 B: 細胞増殖を MTT アッセイで評価
 データは平均値 ± S.E. で表した。n=8 * $p < 0.05$

糖尿病ラットの毛細血管筋束比を有意に増加させた。一方で正常ラットにおける毛細血管筋束比は DPSC-CM 投与による影響を受けなかった。

8. ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に対する 歯髄幹細胞培養上清の効果

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 HUVECs の増殖を有意に促進し、CCK-8 アッセイで 1.2 倍の増加 (図 6A) と MTT アッセイで 1.3 倍の増加 (図 6B) を示した ($p < 0.05$)。

IV. 考 察

本研究では、糖尿病性神経障害における DPSC-CM の治療効果について明らかにした。糖尿病ラット後肢骨格筋への DPSC-CM 投与は、坐骨神経における運動神経伝導速度、感覚神経伝導速度、坐骨神経内血流量および足底皮膚における表皮内神経線維密度を増加させた。さらに、DPSC-CM 投与が糖尿病ラットの坐骨神経において抗炎症効果を示すことを明らかにした。

糖尿病性神経障害に対し DPSCs 移植が有効であるが^{14, 15, 20}、移植された DPSCs の多くは移植後一定期間で移植部位から消失する。この現象は虚血性心疾患や脳梗塞など他の細胞移植療法においても同様であった^{17, 21}。こうした事実より、幹細胞移植の治療メカニズムは、移植の初期段階での幹細胞からの豊富なセクレトームが主に関連していると考えられている。そこで本研究では DPSCs より分泌されるセクレトームの直接投与による

糖尿病性神経障害の効果を検討した。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) および足底表皮内神経線維密度を有意に増加させ、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。

これまでの検討より、培養 DPSCs において血管新生因子、神経成長因子、免疫調節因子の遺伝子発現を確認している²⁰。DPSC-CM は、ラット後根神経節細胞の神経突起伸長を伸展させ、またシュワン細胞の増殖とミエリン蛋白形成を増加させた。さらにマクロファージ細胞株である Raw264.7 細胞を用いた検討では、Lipopolysaccharide (LPS) 刺激下で、DPSC-CM は抗炎症マーカーである CD206 と IL10 遺伝子を増加させ、M2 分極を誘導し抗炎症性に働いた。

糖尿病患者の骨格筋における毛細血管密度は減少していることが証明されているが²²、本研究において DPSC-CM 投与は糖尿病ラットで低下した後肢骨格筋における毛細血管筋束比を改善した。DPSC-CM は VEGF を中心に血管新生因子が豊富に発現しており、DPSC-CM 投与は血管内皮細胞の増殖を誘導することより、この現象は DPSC-CM の直接的な血管新生作用による可能性がある。しかし、骨格筋における毛細血管密度と糖尿病性神経障害の直接的な関係性を調べた研究はほとんどなく、未だ不明である。Andreassen らは、神経障害の程度と毛細血管密度に関係がないことを示した²³ が、この研究では十分なサンプルサイズではなかった。今後

の検討が必要である。

本研究において糖尿病ラットにおける神経内血流量が、DPSC-CM投与によって改善することを明らかにしたが、坐骨神経の毛細血管数は正常ラットと糖尿病ラットで類似し、DPSC-CM投与による影響は認められなかった。糖尿病患者の末梢神経における毛細血管の主な病理学的変化が、基底膜肥厚、血管内皮細胞の過形成そして神経内腔領域の減少であり、毛細血管数の減少ではないことがすでに報告されている^{24,25)}。DPSC-CMは末梢神経の毛細血管形態に影響を及ぼしている可能性があるが、さらなる研究が必要である。

間葉系幹細胞培養上清の治療効果は、虚血性心疾患²⁶⁾や脳損傷²⁷⁾、脊髄損傷²⁸⁾、骨欠損²⁹⁾のような他の疾患においても検討されており、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と考えられる。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³⁰⁾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、若くて高品質のDPSCsを継続的に得ることができる点であると考える。

顎口腔領域における歯髄幹細胞を用いた研究は、歯髄再生や骨増生に有効であると報告されており^{31,32)}、歯髄幹細胞培養上清の多面的作用は、糖尿病性神経障害のみならず、他の疾患においても有効であると考えられる。一方で、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。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました歯科矯正学講座、恩師後藤滋巳教授ならびに宮澤健特殊診療科教授に深く感謝の意を表すと共に、日頃から格別な御指導と御校閲を賜りました内科学講座、松原達昭教授に深謝いたします。また、本研究に際し、懇親なる御指導、御助言を頂きました内科学講座、成瀬桂子准教授に謹んで感謝の意を表します。加えて、本研究にあたりご協力を頂きました内科学講座の皆様、ならびに歯科矯正学講座の皆様にご挨拶を申し上げます。

文 献

- 1) Yagihashi S, Mizukami H and Sugimoto K. Mechanism of diabetic neuropathy: Where are we now and where to go? *J Diabetes Investig*, **2**: 18-32, 2011.
- 2) Shibata T, Naruse K, Kamiya H, et al. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves diabetic polyneuropathy in rats. *Diabetes*, **57**: 3099-3107, 2008.
- 3) Okawa T, Kamiya H, Himeno T, et al. Transplantation of neural crest-like cells derived from induced pluripotent stem cells improves diabetic polyneuropathy in mice. *Cell Transplant*, **22**: 1767-1783, 2013.
- 4) Himeno T, Kamiya H, Naruse K, et al. Angioblast derived from ES cells construct blood vessels and ameliorate diabetic polyneuropathy in mice. *J Diabetes Res*, **2015**: 257230, 2015.
- 5) Han JW, Choi D, Lee MY, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve diabetic neuropathy by direct modulation of both angiogenesis and myelination in peripheral nerves. *Cell Transplant*, **25**: 313-326, 2016.
- 6) Monfrini M, Donzelli E, Rodriguez-Menendez V, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of diabetic peripheral neuropathy. *Exp Neurol*, **288**: 75-84, 2017.
- 7) Datta I, Bhadri N, Shahani P, et al. Functional recovery upon human dental pulp stem cell transplantation in a diabetic neuropathy rat

- model. *Cytherapy*, **19**: 1208-1224, 2017.
- 8) Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*, **106**: 2781-2786, 2002.
- 9) Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, et al. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes*, **53**: 195-199, 2004.
- 10) Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell*, **7**: 335-343, 2008.
- 11) Baker N, Boyette LB and Tuan RS. Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. *Bone*, **70**: 37-47, 2015.
- 12) Kondo M, Kamiya H, Himeno T, et al. Therapeutic efficacy of bone marrow-derived mononuclear cells in diabetic polyneuropathy is impaired with aging or diabetes. *J Diabetes Investig*, **6**: 140-149, 2015.
- 13) Kim H, Han JW, Lee JY, et al. Diabetic mesenchymal stem cells are ineffective for improving limb ischemia due to their impaired angiogenic capability. *Cell Transplant*, **8**: 8, 2014.
- 14) Hata M, Omi M, Kobayashi Y, et al. Transplantation of cultured dental pulp stem cells into the skeletal muscles ameliorated diabetic polyneuropathy: therapeutic plausibility of freshly isolated and cryopreserved dental pulp stem cells. *Stem Cell Res Ther*, **6**: 162, 2015.
- 15) Omi M, Hata M, Nakamura N, et al. Transplantation of dental pulp stem cells improves long-term diabetic polyneuropathy together with improvement of nerve morphometrical evaluation. *Stem Cell Res Ther*, **8**: 279, 2017.
- 16) Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, **105**: 93-98, 2002.
- 17) Hu X, Xu Y, Zhong Z, et al. A Large-scale investigation of hypoxia-preconditioned allogeneic mesenchymal stem cells for myocardial repair in nonhuman primates: Paracrine activity without remuscularization. *Circ Res*, **118**: 970-983, 2016.
- 18) Gnecci M, Zhang Z, Ni A, et al. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*, **103**: 1204-1219, 2008.
- 19) Chimenti I, Smith RR, Li TS, et al. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res*, **106**: 971-980, 2010.
- 20) Omi M, Hata M, Nakamura N, et al. Transplantation of dental pulp stem cells suppressed inflammation in sciatic nerves by promoting macrophage polarization towards anti-inflammation phenotypes and ameliorated diabetic polyneuropathy. *J Diabetes Investig*, **7**: 485-496, 2016.
- 21) Garbuzova-Davis S, Haller E, Lin R, et al. Intravenously transplanted human bone marrow endothelial progenitor cells engraft within brain capillaries, preserve mitochondrial morphology, and display pinocytotic activity toward blood-brain barrier repair in ischemic stroke rats. *Stem Cells*, **35**: 1246-1258, 2017.
- 22) Groen BB, Hamer HM, Snijders T, et al. Skeletal muscle capillary density and microvascular function are compromised with aging and type 2 diabetes. *J Appl Physiol*, **116**: 998-1005, 2014.
- 23) Andreassen CS, Jensen JM, Jakobsen J, et al. Striated muscle fiber size, composition, and capillary density in diabetes in relation to neuropathy and muscle strength. *J Diabetes*, **6**: 462-471, 2014.
- 24) Malik R, Newrick P, Sharma A, et al. Microangiopathy in human diabetic neuropathy: relationship between capillary abnormalities and the severity of neuropathy. *Diabetologia*, **32**: 92-102, 1989.
- 25) Yasuda H and Dyck PJ. Abnormalities of endoneurial microvessels and sural nerve pathology in diabetic neuropathy. *Neurology*, **37**:

- 20-28, 1987.
- 26) Timmers L, Lim SK, Hofer IE, et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res*, **6**: 206-214, 2011.
- 27) Chang CP, Chio CC, Cheong CU, et al. Hypoxic preconditioning enhances the therapeutic potential of the secretome from cultured human mesenchymal stem cells in experimental traumatic brain injury. *Clin Sci (Lond)*, **124**: 165-176, 2013.
- 28) Cantinieaux D, Quertainmont R, Blacher S, et al. Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: an original strategy to avoid cell transplantation. *PLoS One*, **8**: e69515, 2013.
- 29) Katagiri W, Osugi M, Kinoshita K, et al. Conditioned medium from mesenchymal stem cells enhances early bone regeneration after maxillary sinus floor elevation in rabbits. *Implant Dent*, **24**: 657-663, 2015.
- 30) Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, et al. Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci*, **18**: 1852, 2017.
- 31) Nakashima M, Iohara K. Mobilized dental pulp stem cells for pulp regeneration: initiation of clinical trial. *J Endod*, **40**: S26-32, 2014.
- 32) Laino G, d'Aquino R, Graziano A, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res*, **20**: 1394-1402, 2005.

論文提出先：愛知学院大学大学院歯学研究科委員会
(名古屋市千種区楠元町 1-100)