

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

大見真衣子

論文題目

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—ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおける検討—

## I. 緒言

糖尿病性神経障害は糖尿病三大合併症（神経障害、網膜症、腎症）の中で最も早期に発症し、罹患率も高い。その症状は多彩で、患者の QOL (Quality of life) を低下させる重大な疾患である。糖尿病性神経障害の治療法は、他の合併症と同じく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。これまでに血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞、胚性幹細胞 (ES 細胞) および人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の移植が糖尿病モデル動物における糖尿病性神経障害に有効であることが報告されている。細胞移植療法における治療効果のメカニズムは、前駆細胞や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血管新生および神経伸長/保護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いる。神経組織においては、神経と免疫システムの密接な関わりが神経内の免疫調節機構を活性化し、神経疾患の病態を進行させる。糖尿病性神経障害においても炎症が大きな役割を果たしていることが報告されており、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) などの炎症性サイトカインの分泌を抑制することで、神経伝導速度や神経病理学的変化を改善できることが糖尿病モデル動物で証明されている。また、前駆細胞や幹細胞においては、強

い免疫調整作用を持つことが報告されており、その治療効果は同種移植において証明されている。しかしながら、高齢者や糖尿病患者から得られた前駆細胞や間葉系幹細胞においては、細胞の機能低下が認められるため、移植細胞の機能改善が重要な課題となっている。間葉系幹細胞の一種である歯髄幹細胞 (dental pulp stem cells: DPSCs) は、矯正治療により便宜抜歯した歯や智歯から容易に採取可能であり、細胞の増殖能や分化能に優れ、凍結保存後も多分化能や増殖能を維持することが報告されており、再生医療において理想的な細胞ソースとして注目されている。また、便宜抜歯や智歯の抜歯は十代から二十代の若い時期に行われることが多いことから、糖尿病発症前の細胞を入手することができる。さらには、採取した細胞を凍結保存しておくことで、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。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。

## II. 実験材料および方法

実験動物には6週齢雄性の Sprague-Dawley (SD) ラットおよび GFP ラット (SD-Tg (CAG-EGFP) Cz-0040sb) を用い、抜歯した上下顎中切歯より探針を用いて丁寧に歯髄組織を採取し、歯髄幹細胞の分離、培養を行った。

6週齢雄性の GFP ラット歯髄より分離・培養した3継代目の歯髄幹細胞を

用いて、フローサイトメトリーによる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。得られた歯髄幹細胞を用いて移植実験を次のように行った。6週齢雄性SDラットにSTZを腹腔内投与により糖尿病を誘発し、8週後に6週齢雄性GFPラットから採取した歯髄幹細胞 ( $1.0 \times 10^6$  cells/rat) を正常ラットおよび糖尿病ラット片側後肢骨格筋に10か所に分けて移植した。対照側には生理食塩水を投与した。歯髄幹細胞移植4週後に、神経生理学的評価、組織学的評価および遺伝子発現解析を行った。

In vitro において、マウス由来マクロファージ系細胞であるRAW264.7細胞を用いて、大腸菌由来 lipopolysaccharide (LPS) 刺激に対する歯髄幹細胞培養上清の抗炎症作用を検討する目的で、RAW264.7細胞の遺伝子発現解析を行った。また、培養歯髄幹細胞の発現するサイトカインを検討する目的で、培養歯髄幹細胞の遺伝子発現解析を行った。

### III. 結果・考察

6週齢雄性GFPラット歯髄より分離・培養した歯髄幹細胞は、間葉系幹細胞マーカーであるCD29およびCD90を高く発現していた。また、脂肪細胞分化誘導培地にて14日間培養した結果、oil red O染色およびFABP-4免疫染色により脂肪細胞への分化が確認された。骨芽細胞分化誘導培地にて21日間培養した結果、Alizarin red S染色およびosteocalcin免疫染色により骨芽細胞への分化が確認された。軟骨細胞への分化誘導培地にて21日間ペレット培養した結果、Aggrecan免疫染色により軟骨細胞への分化が確

認められた。

STZ 誘発糖尿病ラット後肢骨格筋への歯髄幹細胞の移植は、坐骨神経において抗炎症作用を示すとともに、糖尿病ラットで低下した坐骨神経伝導速度および坐骨神経内血流量を改善した。また、歯髄幹細胞の移植は、坐骨神経における M1/M2 マクロファージの比率を減少させ、さらに、*in vitro* において、LPS 刺激した RAW264.7 細胞において、歯髄幹細胞培養上清の添加により M2 マクロファージマーカーの発現が増加することが確認された。糖尿病性神経障害の病因に、炎症が関与することが数多く報告されており、サイトカインのシグナル伝達に関与する阻害薬など生物学的製剤が治療効果を有することが報告されている。今回の実験において、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を減少させ、TNF- $\alpha$  を含む炎症性サイトカイン遺伝子発現を抑制することが明らかとなった。また、糖尿病ラットにおいて抗 TNF- $\alpha$  療法により、神経伝導速度が改善し、神経機能の回復が促進されることが報告されている。これらのことから、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る。マクロファージは異なる性質を持った二つのタイプに分化し、古典的活性型マクロファージとオルタナティブ型マクロファージはそれぞれ M1 型、M2 型と呼称されている。M2 マクロファージは炎症性サイトカインの発現が低く、interleukin (IL) -10 のような抗炎症サイトカインを高く発現する。今回の実験において、糖尿病ラット末梢神経において、M1 マクロフ

マクロファージマーカーである CD11c の発現が増加した。糖尿病ラットにおいて、歯髄幹細胞移植により、M1 マクロファージマーカーの遺伝子発現の減少と同時に、M2 マクロファージマーカーの遺伝子発現の増加が認められた。これらのことから、歯髄幹細胞移植は、M1/M2 マクロファージの比率を制御して、末梢神経における炎症を抑制している可能性が示唆された。これらの効果を培養実験により検討した結果、LPS 刺激した RAW264.7 細胞において、歯髄幹細胞培養上清は、M2 マクロファージマーカーである CD206 および IL-10 遺伝子発現を増加させることを確認した。培養実験において、M1 型は TNF- $\alpha$  や interferon (IFN) - $\gamma$  などにより誘導され、M2 型は IL-4、IL-13 および IL-10 により誘導されることが証明されている。特に、IL-10 は炎症性サイトカインの分泌を抑制することから、抗炎症作用をもつサイトカインであることが注目され、急性および慢性炎症、自己免疫疾患などの動物モデルに対し、その効果が検討されている。granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) や macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) もまた M1/M2 を調整するサイトカインである。今回の実験において、培養歯髄幹細胞は M2 マクロファージ誘導因子である IL-10 および M-CSF を高く発現することを確認した。これらのことから、生体内において移植歯髄幹細胞は 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。培養歯髄幹細胞では、他にも basic fibroblast growth factor (bFGF)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、nerve growth factor (NGF) などの血管新生因子および神経栄養因子を多く発現していることが確認された。すでに、bFGF および VEGF などの血管新生因子が糖尿病性神経障害に有効であることが報告されており、また細胞移植治療において、幹細胞や前駆細胞が bFGF や VEGF を分泌することにより糖尿病性神経障害に対して治療効果を示す可能性が報告されている。さらに、NGF などの神経栄養因子の低下は糖尿病性神経障害の発症に密接に関係しており、NGF の投与が進行した糖尿病性神経障害に対して、神経の構造的および機能的回復に有効であることが報告されている。これらのことから、歯髄幹細胞の分泌する血管新生因子や神経栄養因子も、糖尿病性神経障害に対する歯髄幹細胞移植の抗炎症作用において重要な因子であると考えられる。

#### IV. まとめ

これまでに、様々な細胞を用いた細胞移植療法が糖尿病性神経障害に有効であることが報告されているが、その中でも特に非侵襲的に採取できる細胞が求められている。また、糖尿病患者より得られた前駆細胞や幹細胞においては、細胞の機能低下が認められており、細胞の機能改善が重要な課題となっている。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。

現在、歯髄幹細胞を用いた再生医療として、脳梗塞や脊髄損傷などの難治性疾患への応用が期待されている。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ことがすでに報告されている。歯髄幹細胞移植の抗炎症作用は、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可能性が高いと考えられる。したがって本研究は、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ると考える。