

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	論文提出者 金田 紗季
論文題目  糖尿病性神経障害に対する歯髄幹細胞移植および 歯髄幹細胞分泌因子投与による治療効果の比較検討	

## I. 緒言

糖尿病性神経障害は、糖尿病合併症の中で最も罹患率が高く、痺れや痛みを伴い、患者のQOLに悪影響を及ぼす。糖尿病性神経障害の発症には、末梢神経の変性と血流障害が主に関与している。さらに、加齢、慢性炎症、心血管疾患などの要因も糖尿病性神経障害の病態に影響を与える。良好な血糖コントロールは、糖尿病性神経障害の発症や進行を低下させるが、2型糖尿病患者に対し、血糖コントロールを含む集約的治療を行った Steno type2 randomized study (STENO-2 研究) では、糖尿病性神経障害の発症は抑制されず、血糖コントロールに加えた新たな治療の必要性が示された。しかしながら、糖尿病性神経障害に対する治療法は、痛みなどに対する対症療法が主であり、病因に基づく原因療法の開発が求められている。再生医療は糖尿病性神経障害の新たな治療法として期待されている。

糖尿病性神経障害に対する再生医療として、主に幹細胞移植療法の研究が行われている。これまでに、骨髄由来間葉系幹細胞、胚性幹細胞 (embryonic stem cell : ES)、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell : iPS) および歯髄幹細胞 (dental pulp stem cells : DPSCs) などの幹細胞移植により、糖尿病により低下した神経伝導速度、神経内血流量および表皮内神経線維密度が改善することが認められている。間葉系幹細胞の一種である DPSCs は、矯正治療による便宜抜歯などによる抜去歯や智歯から容易に採取可能であり、分化能や増殖能に優れ、凍結による機能低下を認めないため、魅力的な幹細胞の供給源である。矯正治療による抜歯は若年齢で行われることが多く、糖尿病だけでなく、老化やその他疾患による幹細胞の機能低下および機能不全に陥る以前の DPSCs を容易に入手することができる。これまでに我々は、ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病モデルを使用して、DPSCs の移植が糖尿病性神経障害に有効であることを報告した。

幹細胞移植は、虚血性心血管疾患や脳梗塞などの疾患の治療法として広く研究されており、良好な結果が報告されている。しかし、これまでの研究より、移植された幹細胞のほとんどが移植部位には定着せず、我々の検討においても移植4週間後に、移植部位に残存する幹細胞は少数であることが確認された。したがって、幹細胞移植の治療メカニズムとして、移植後の幹細胞からの豊富なセクレトームが大きく影響していると考えられている。

さらに我々は、歯髄幹細胞分泌因子 (secreted factors from DPSCs : DPSC-SFs) の投与が糖尿病ラットの神経伝導速度と神経内血流量を改善することを示した。しかし、DPSCs 移植と DPSC-SFs 投与を比較し糖尿病性神経障害の治療にどちらがより効果的であるかは明らかになっていない。この研究では、糖尿病性神経障害に対する DPSCs 移植と DPSC-SFs 投与による糖尿病性神経障害における治療効果について検証することを目的とし、STZ 誘導1型糖尿病モデルラットの片側後肢骨格筋に DPSCs または DPSC-SFs を投与し、一定期間後の糖尿病性神経障害治療効果について直接比較検討した。

## 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) から6週齢雄性Sprague-Dawley (SD) ラットを購入した。STZ (Wako, Osaka, Japan) を腹腔内投与 (50mg/Kg) し、糖尿病を誘発し

た。血糖値が14 mmol / L 以上のラットを糖尿病モデルラットとした。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

6週齢雄性green fluorescent protein (GFP) トランスジェニックSDラット (SD-Tg (CAG-EGFP) Cz-0040sb) を日本エスエルシー株式会社 (Hamamatsu, Japan) から購入した。抜去した下顎切歯から歯髄を採取し、0.1%コラゲナーゼと0.25%トリプシン/EDTA容液を用いて酵素処理を行い、その後、20%ウシ胎児血清 (GIBCO) を添加した培養液を用いて、DPSCsの分離・培養を行った。なおDPSCsは、CD29やCD90などの間葉系幹細胞の細胞表面マーカーを発現し、軟骨細胞、脂肪細胞、骨芽細胞への多能性を確認した。

## 3. 歯髄幹細胞分泌因子の作製

10 cm dish上で $1 \times 10^6$ 個/dish まで培養したDPSCsを、無血清培地にて24時間培養した後、培養上清を回収し、3-kDa centrifugal filters (Amicon Ultra-15, Millipore, Japan) を用いて、10倍に濃縮したものをDPSC-SFsとして使用した。

## 4. 歯髄幹細胞および歯髄幹細胞分泌因子の投与

実験群は、正常ラット、糖尿病ラット、DPSC移植糖尿病ラットおよびDPSC-SF投与糖尿病ラットの4群とした。STZ腹腔内投与にて糖尿病を誘発したラットを8週間後に、DPSC移植糖尿病ラットの片側左側後肢骨格筋にDPSCs (1.0 mL、 $1 \times 10^6$ 個 / ラット) を10箇所に分けて投与した。DPSC-SFsは、DPSC-SF投与糖尿病ラットの片側後肢骨格筋にDPSC-SFs (1.0 mL / ラット) を10箇所に分けて投与した。投与4週間後に、以下の測定を行った。

## 5. 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のラットを、坐骨神経周囲を37°Cに維持するため加温パッド上に置き、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間で活動電位を測定し、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間で活動電位を測定した。

## 6. 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のラットを、坐骨神経周囲を37°Cに維持するため加温パッドに置き、Laser Doppler Blood Flow Meter (FLO-N1:Omega Wave Inc., Tokyo, Japan) を用いて坐骨神経内血流量 (sciatic nerve blood flow: SNBF) を測定した。SNBFは、大腿皮膚を切開し、露出した坐骨神経にセンサーをあて計測を実施した。

## 7. 足底皮膚における表皮内神経線維密度の評価

ラットをCO<sub>2</sub>吸入により屠殺し、足底皮膚を採取した。固定後、ドライアイスを用いてOTCコンパウンド (Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan) に包埋し、クリオスタット (Leica Microsystems,

Wetzlar, Germany) を用いて厚さ25  $\mu$ mの組織切片を作製した。切片を、一次抗体としてPGP9.5抗体 (Millipore, Tokyo, Japan)、二次抗体として、Alexa Fluor 555 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて蛍光免疫染色を行った。神経線維はFV10i共焦点システム (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて計測した。

#### 8. 後肢骨格筋における免疫組織染色

パラフィン包埋した腓腹筋を用いて組織学的分析および免疫染色のために5  $\mu$ mの組織切片を作製した。切片をヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色し、筋束の面積を測定した。腓腹筋における血管内皮細胞の測定のために、切片を一次抗体として抗血小板内皮細胞接着分子-1 (PECAM-1) 抗体 (Dianova, Hmburg, Germany)、二次抗体としてAlexa Fluor 555 (Invitrogen) を用いて蛍光免疫染色を行った。スライドは光学顕微鏡と蛍光顕微鏡下で観察した。

#### 9. 後肢骨格筋における遺伝子発現解析

ラットから採取した腓腹筋を、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) を使用して合成した。Nerve growth factor (NGF)、basic fibroblast growth factor (bFGF)、およびneurotrophin-3 (NT-3) のTaqMan Gene Expression Assayプライマーおよびプローブは、Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) から購入した。Real-time PCRは、LightCyclerR 480 Instrument II (Roche, Basel, Switzerland) を用いて解析した。内在性コントロールとして $\beta$ 2 microglobulinを用いて $\Delta\Delta$ Ct法で計算した。

#### 10. 歯髄幹細胞分泌因子の解析

DPSC-SFsに含まれるタンパク質を解析するため、L-Series rat antibody array

90 (Ray Biothech, Peachtree Corners, GA, USA) を使用した。ビオチン標識DPSC-SFsをメンブレンに添加し、1時間反応させた後洗浄し、HRP標識ストレプトアビジンを添加した。メンブレンは、Chemidoc Touch (Bio-rad, Hercules, CA, USA) によって画像化され、データはImageJを用いて分析した。

#### 11. 統計処理

データはGraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用し、平均値 $\pm$ 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

DPSC移植およびDPSC-SF投与4週間後に、体重を測定した。糖尿病ラットは、正常ラットと比較して有意な体重減少と高血糖を認めた。また、DPSC移植とDPSC-SF投与は糖尿病ラットの体重と血糖値に有意な変動を与えなかった (体重: 糖尿病ラット 360.0 $\pm$ 47.4 g、DPSC移植糖尿病ラット 273.3 $\pm$ 9.5 g、DPSC-SF投与糖尿病ラット 295.0 $\pm$ 13.6 g、血糖: 糖尿病

ラット 419.4±74.0 mg / dL、DPSC 移植糖尿病ラット 409.8±42.9 mg / dL、DPSC-SF 投与糖尿病ラット 478.3±27.9 mg / dL)。

## 2. 坐骨神経運動/感覚神経伝導速度および坐骨神経内血流量

DPSCsまたはDPSC-SF投与4週間後に、MNCV、SNCVおよびSNBFを測定した。正常ラットと比較して、糖尿病ラットでは、MNCV、SNCVの遅延、SNBFの減少を認めた。DPSC移植、DPSC-SF投与ともに、糖尿病ラットで低下したMNCV、SNCVおよびSNBFの改善が認められたが、DPSC移植とDPSC-SF投与による改善効果に有意な差は認められなかった (MNCV : DPSC移植糖尿病ラット 49.8±0.8 m / s、DPSC-SF投与糖尿病ラット 50.2±1.0 m / s、SNCV : DPSC移植糖尿病ラット 45.2±1.5 m / s、DPSC-SF投与糖尿病ラット 45.8±0.8 m / s、SNBF : DPSC移植糖尿病ラット 12.6±0.3 mL / min / 100 g tissue、DPSC-SF投与糖尿病ラット 12.4±0.2 mL / min / 100 g tissue)。

また、DPSC 移植糖尿病ラットと DPSC-SF 投与糖尿病ラットの DPSCs および DPSC-SFs 投与側と非投与側の MNCV、SNCV、SNBF を比較した。DPSC 移植、DPSC-SF 投与はともに投与側において、MNCV、SNCV および SNBF を非投与側と比較して、有意に増加させた。以上より、DPSC 移植および DPSC-SF 投与の効果は、投与部位に限局された効果であることが示唆された。

## 3. 足底皮膚における表皮内神経線維密度

糖尿病性神経障害では、表皮内にいたる末梢神経線維の低下が認められるため、足底における表皮内神経線維密度 (intraepidermal nerve fiber density : IENFD) を評価した。 IENFD は、糖尿病ラットにおいて正常ラットと比較し、50%の減少を認めた。糖尿病ラットへのDPSC移植およびDPSC-SF投与により、DPSC移植では88%、DPSC-SF投与では81%の IENFD の有意な増加を認めた。 DPSC移植とDPSC-SF投与の間の改善効果に有意な差は認められなかった。

## 4. 後肢骨格筋における筋束サイズおよび毛細血管筋束比

後肢骨格筋の形態学的変化を確認するため、腓腹筋の筋束サイズを測定した。糖尿病ラットでは、筋束の平均サイズが、正常ラットと比較して44%に減少した。DPSC移植とDPSC-SF投与はどちらも、糖尿病ラットと比較して、筋束サイズの1.5倍の増加を認めた。DPSC移植糖尿病ラットとDPSC-SF投与糖尿病ラット間の筋束サイズに有意差は認めなかった。

次に、後肢骨格筋における筋束あたりの毛細血管数を評価した。毛細血管は、PECAM-1抗体による血管内皮細胞の染色によって測定した。毛細血管筋束比は、糖尿病ラットで正常ラットと比較し、41%減少した。DPSC移植およびDPSC-SF投与により、糖尿病ラットの後肢骨格筋における毛細血管筋束比の減少がDPSC移植糖尿病ラットで90%、DPSC-SF投与ラットで82%の改善を認めた。DPSC移植とDPSC-SF投与との間の毛細血管筋束比における改善効果に有意な差は認められなかった。

## 5. 後肢骨格筋における遺伝子発現

DPSCsは神経栄養因子を発現するため、後肢骨格筋における遺伝子発現を、DPSC移植およびDPSC-SF投与の4週間後にリアルタイムPCRで評価した。糖尿病ラットと比較し、DPSC-SF投与糖

尿病ラットでは、NGF、bFGF、およびNT-3 遺伝子発現の増加傾向、DPSC移植糖尿病ラットではNT-3 遺伝子発現の増加傾向を認めたが、どちらも遺伝子発現に有意差は認めなかった。

#### 6. 歯髄幹細胞分泌因子におけるタンパク質発現

我々は以前にDPSCsにおける遺伝子発現を検討し、血管新生因子(例:vascular endothelial growth factor (VEGF)、bFGF)、神経栄養因子(例:NGF、NT-3)および免疫制御因子(例:macrophage colony stimulating factor (M-CSF))などの複数の遺伝子発現を示した。DPSC-SFsにおける発現物質の解析のため、L-Series rat antibody array 90を使用し、DPSC-SFsにおけるタンパク質解析を行った。

DPSC-SFsには調査した90種類のタンパク質のうち、血管新生因子(例:VEGF-C)、神経栄養因子(例:brain-derived neurotrophic factor (BDNF))および免疫制御因子(例:interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ))、interleukin-4 (IL-4)、toll-like receptor 4 (TLR4))などを中心に17種類以上のタンパク質が含まれており多因子が認められた。

#### IV. 考察

本研究では、糖尿病性神経障害に対するDPSC移植とDPSC-SF投与の治療効果を直接比較検討した。糖尿病ラットは、正常ラットと比較して、坐骨神経におけるMNCV、SNCVの遅延およびSNBFの減少を示した。後肢骨格筋へのDPSC移植とDPSC-SF投与のいずれにおいても、糖尿病ラットで遅延および減少したMNCV、SNCVおよびSNBFが改善され、これら2つの異なる治療法の間で改善効果の程度はほぼ同じであった。

糖尿病では、高血糖により末梢神経の神経血流障害と神経機能障害を引き起こす。さらに、加齢、慢性炎症、脂質代謝異常などの様々な要因も、糖尿病性神経障害の悪化を招く因子である。糖尿病性神経障害を伴う末梢神経では、虚血、軸索変性、シュワン細胞機能障害、軸索伸長障害、脱髄、神経フィラメント合成障害などのさまざまな障害が発生し、これらによって、糖尿病性神経障害が発症し、進行していく。

糖尿病性神経障害に対する再生医療として行われている研究は、主に幹細胞移植療法である。糖尿病性神経障害に対する幹細胞移植の治療メカニズムとして、(1)血管新生作用による血流改善、(2)抗炎症作用、(3)神経保護作用がすでに報告されている。一方、関連する研究では、ほとんどの移植された前駆細胞および幹細胞は、移植後一定期間経過すると、移植部位より消失する。現在、前駆細胞および幹細胞移植の治療メカニズムは、移植の初期段階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。我々は、糖尿病性神経障害に対するDPSC-SFsの効果を検討したところ、DPSC-SF投与により、後肢骨格筋のMNCV、SNCV、SNBF、IENFDならびに毛細血管筋束比が改善されることを確認した。また、DPSC-SF投与が後根神経節細胞の神経突起伸長、シュワン細胞の増殖、およびミエリンタンパク質形成を促進することを明らかにした。

糖尿病性神経障害の評価において、神経伝導速度検査は最も信頼性の高い検査方法である。本研究では、高血糖下でもDPSC移植により運動神経伝導速度が3.5 m/s、感覚神経伝導速度が5.0 m/s改善し、DPSC-SF投与により運動神経伝導速度が3.9 m/s、感覚神経伝導速度が5.6 m/s改善することを示した。糖尿病性神経障害に対するDPSC移植およびDPSC-SF投与の有効性が期待される。

ラットDPSCsは、血管新生因子、神経栄養因子および免疫制御因子を含む多数の遺伝子を発現している。ヒトDPSCsにおいても、多数の増殖能や分化能を持つ遺伝子や、サイトカインなどの発現が認められている。今回、DPSC-SFsに血管新生因子、神経栄養因子、免疫制御因子を含む多数のタンパク質が含まれていることを確認した。一方で、DPSC移植部位およびDPSC-SF投与部位でDPSCsからの分泌因子の発現量を検討したところ、DPSC移植とDPSC-SF投与の間に有意差は認めなかった。さらに、DPSC移植とDPSC-SF投与を直接比較すると、糖尿病性神経障害に対する治療の有効性は、どちらも投与後少なくとも4週間の時点において、ほぼ同等の効果を認めることが明らかとなった。さらにDPSC移植、DPSC-SF投与いずれもその効果は、投与側に限局されていた。これらの結果より、DPSC移植およびDPSC-SF投与の4週間後の糖尿病性神経障害に対する両者の治療効果は、DPSC移植初期のDPSCsまたは直接投与されたDPSC-SFsから分泌された複数のセクレトームによることが主な要因であることが示唆された。

加齢や糖尿病による幹細胞機能障害への対応として、若年時にDPSCs採取し冷凍保存することが有効であるが、DPSC移植については、いくつかのリスクを考慮する必要がある。移植された幹細胞の腫瘍形成の報告はあまりされていないが、注意は必要である。同種移植の場合、移植片対宿主病発症のリスクがあり、場合によっては免疫抑制剤の投与が必要となる。DPSC-SFsを用いることにより、腫瘍形成のリスクを軽減し、目的とした細胞以外の細胞の混入リスクを低下させ、さらに、高品質のDPSCsを選択し、高性能なDPSC-SFsを大量に採取することにより、安定して供給が行えることよりコスト削減につながる可能性が考えられる。一方で我々は、移植されたDPSCsの少なくとも一部は移植部位に残存し、血管内皮様細胞に分化することを確認している。こうした事実は、DPSC移植がDPSC-SF投与より長期間の治療効果を示す可能性を示唆しており、さらに両者の治療効果について投与量、投与回数、有効期間を含めて検討していく必要がある。

## V. まとめ

本研究より、骨格筋へのDPSC移植とDPSC-SF投与による治療効果の直接比較では、同等の効果をもって糖尿病性神経障害を改善することが明らかとなった。一方で、それぞれの有用性とリスクには違いもあるため、今後投与方法へ適応についてのさらなる検討が必要である。