

令和 2 年 11 月 30 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09768

研究課題名(和文) シュワン細胞の神経終末誘引・保護作用の糖尿病多発神経障害に対する有益性の検討

研究課題名(英文) Study of nerve terminal attraction and neuroprotective effect by Schwann cells on diabetic polyneuropathy

研究代表者

中村 二郎 (Nakamura, Jiro)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：40283444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚由来神経堤幹細胞移植法を用いた糖尿病多発神経障害(DPN)における治療効果として神経伝導速度の改善と移植部位の細小血管再生が確認された。幹細胞から分泌されるサイトカイン(PGE₂、NGF)と移植部に生着する幹細胞の組織における血管構成細胞への分化がDPN治療効果を果たしていることが示唆された。

マウス皮膚由来幹細胞移植と同様、ヒトの剥離した乳歯からの歯髄幹細胞(DPSC)の馴化培地(SHED-CM)にて、4つの画分のうち6kDa未満の画分のみが、DMEMと比較して後根神経節ニューロンの神経突起伸長を有意に促進。SHED-CMは、糖尿病マウスの感覚神経伝導速度の低下と毛細血管血流を改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の成果により糖尿病神経障害の新たな治療法と末梢神経における合併症の発症機転に幹細胞の欠如が関係する可能性が示唆された。今後の糖尿病合併症治療に幹細胞移植療法または、幹細胞から産生される液性因子が補充されることで、合併症の進行を止めるだけでなく完治に向けた治療法の確立が可能となることが期待される。社会的な貢献としては、糖尿病合併症の重症化でADLの低下した患者の社会復帰を支援、補完する可能性もある。そのために、できる限り早期の幹細胞移植療法の実現に向けて更なる科学的根拠を積み上げていく所存である。

研究成果の概要(英文)：Improvement of nerve conduction velocity and regeneration of small blood vessels at the transplantation site were confirmed as therapeutic effects in diabetic polyneuropathy (DPN) using skin-derived neural crest stem cell transplantation. It was suggested that differentiation of cytokines secreted from stem cells (PGE₂, NGF) and stem cells engrafted at the transplanted site into vascular component cells plays a DPN therapeutic effect. In secretory factors derived from DPSC (dental pulp stem cells), the neurite outgrowth effect on the peripheral nervous system was confirmed in mouse dorsal root ganglion cells. It was suggested that VEGF is involved in the mechanism of action. Furthermore, in vivo, it was suggested that low molecular weight proteins other than cytokines exert therapeutic effects in DPSC secretion factor.

研究分野：代謝

キーワード：糖尿病性神経障害 細胞移植療法 幹細胞 サイトカイン 血管再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病多発神経障害(DPN)は、糖尿病患者の約半数に認められ(Dyck PJ, Neurology, 1993)、自発痛・しびれ感・知覚低下などの感覚障害に加え、一部の患者には足壊疽・切断といった生命予後悪化をもたらす病態を招く。DPNの発症・進展機序としては、高血糖に伴う代謝障害(ポリオール代謝亢進、神経栄養因子の低下、PKC活性の変化、AGE蓄積、酸化ストレス亢進等)と血流障害が重要であると考えられている。代謝障害に対する治療として、 α リポ酸およびアルドース還元酵素阻害薬 epalrestat が一部の国で使用されているが、有用性には限界がある。血流障害に対する治療では、血管内皮増殖因子 VEGF 遺伝子治療が報告された(Ropper AH, Ann Neurol 2009)が、広く臨床に応用されるには至っていない。また、根治療法となりうる再生医療・細胞移植療法の早期実用化は期待が高まるばかりである。そこで我々は簡便利用可能で、また腫瘍化リスクの少ない皮膚幹細胞を球状凝集化した立体構造を持つマウスやヒトの多能性幹細胞集合体から神経前駆細胞(neural progenitor like cell;以下 NPLC)に分化誘導し、糖尿病神経障害モデルマウスに移植することで神経障害の改善効果を確認している。本研究では、治療メカニズムの鍵となる生化学・代謝シグナル因子の発見や、その相互作用を解明し、早期臨床応用に繋げていくことを目的とする。以上のように、DPNの改善を目的とした治療法は確立されておらず、有効な治療法の確立のためには、発症機序の更なる解明が必要と考えられる。

2. 研究の目的

我々は、DPNの新規病態として、神経終末グリア細胞群の機能不全を仮定し、シュワン細胞あるいはシュワン系細胞を補充することでDPNが改善されると仮説を立てた。この仮説の検証のために、まず、DPNにおける神経終末グリア細胞群機能不全の詳細を解明し、更に、皮膚由来神経幹細胞から分化誘導したシュワン細胞あるいはシュワン系細胞の移植療法がDPNに有益性を発揮することを検証し、早期臨床応用に繋げていくことを目的とする。

3. 研究の方法

5週齢雄性EGFP-C57BL/6Jより皮膚線維芽細胞を初代培養・球状凝集化し、sDSCを作製。Nestin陽性神経前駆細胞(sDSC-NC)を誘導。8週齢C57BL/6Jを用い、STZ糖尿病マウスを作成。STZ投与3カ月後、糖尿病マウスと正常マウスの片側下肢筋にsDSC-NCsを各肢 3×10^4 cellsを移植し、対側には生食を投与。治療前および治療4週後にThermal Planter testおよび下肢神経伝導速度検査を施行。移植治療4週後、下肢組織における移植細胞の生着確認し、免疫組織学的解析、ならびにRT-PCRにて非移植組織と移植組織のNGF、PGI₂、PGE₂、FGF-2、VEGF、NT-3、IGF-1のmRNA発現を定量。

ヒトの剥離した乳歯からの幹細胞の無血清培地(DMEM)を用いた馴化培地(SHED-CM)を48時間後に収集し、分子量に応じて4つの画分に分離。C57BL/6Jマウス後根神経節ニューロンの神経突起伸長への影響を評価。ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスに、100 μ LのSHED-CMまたはDMEMを週2回、4週間にわたって片側後肢筋肉に注射。末梢神経機能は、PLANTAR Test、および運動神経と感覚神経の伝導速度によって評価した。表皮内神経線維密度、毛細血管数対筋線維比、毛細血管血流および腓腹神経の形態計測によって評価している。

4. 研究成果

移植後4週での下肢組織に多数のGFP陽性細胞(sDSC-NC)の生着確認、腫瘍形成は認めなかった。糖尿病状態では温覚機能及び神経伝導速度が低下し、sDSC-NC移植はこの低下を有意に改善した。細胞移植肢の組織所見において、CD34 or α SMA陽性のGFP陽性細胞を認めただのに対し、神経分化したと考えられるTuj1 + GFP陽性細胞は確認できず。これらの結果から、神経生理学的検査所見で認めた神経障害の治療メカニズムは、移植細胞の直接神経分化によるものではなく、移植前駆細胞が神経血管周辺細胞に分化し間接的に神経修復機能を発揮したと考えられる。同時に、sDSC-NC移植後組織ではNGF mRNAが上昇し移植細胞からの神経栄養因子等サイトカイン産生が示唆された。

マウス皮膚由来幹細胞移植と同様、ヒトの剥離した乳歯からの歯髄幹細胞(DPSC)の馴化培地(SHED-CM)についても、前述の方法にてDMEMと比較して後根神経節ニューロンの神経突起伸長を有意に促進した。SHED-CMの4つの画分のうち、6 kDa未満の画分のみが、後根神経節ニューロンの神経突起伸長を促進した。さらに、SHED-CMは、糖尿病マウスのDMEMと比較して、感覚神経伝導速度の低下を有意に防止した。SHED-CMは、表皮内神経線維密度または腓腹神経の形態改善を認めなかったが、下肢ヒラメ筋内毛細血管数と筋線維の比率および毛細血管血流を改善した。これらの結果より、DPSC由来の分泌因子においては末梢神経系への神経突起伸長効果とin vivoでは、SHED-CM治療においてサイトカイン以外の低分子量タンパクが糖尿病性神経障害治療効果を発揮していることが示唆された。

今後の課題として、移植細胞の血小板由来成長因子受容体(PDGFR)と血管内皮増殖因子(VEGF)の発現を確認し、移植後組織内でのPDGFR/VEGF発現細胞動態を観察することで、血管内皮細胞、血管周皮細胞(間葉系細胞)、平滑筋細胞、グリア細胞の何系統に変化し神経修復機能を発揮するのかを立証することで、最も効率よく治療効果を発揮する細胞系統を確認す

ることができる。また、乳歯歯髄幹細胞由来分泌因子に存在する神経突起を伸長する因子を同定することで DPN の修復メカニズムと新規治療法の開発、創薬等への発展を期待する。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Secreted factors from cultured dental pulp stem cells promoted neurite outgrowth of dorsal root ganglion neurons and ameliorated neural functions in streptozotocin-induced diabetic mice. Emiri Miura Yura, Shin Tsunekawa, Jiro Nakamura, et al. J Diabetes Investig. 2020 Jan;11(1):28-38. doi: 10.1111/jdi.13085.

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1 . 末梢神経系の Notch シグナリングおよび神経幹細胞・前駆細胞の マウス糖尿病多発神経障害の 発症機序に及ぼす影響の検討 2019 年 第 62 回日本糖尿病学会年次学術集会
- 2 . 皮膚幹細胞球状凝集体由来神経前駆細胞の 糖尿病多発神経障害治療効果と 移植後ミトコンドリア機能回復の検討 2017 年 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会
- 3 . Advances in treatment of diabetic polyneuropathy: For the goal of care and cure. 2017 年 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会
- 4 . Current and future strategies for treatment of diabetic neuropathy 2017 年 第 60 回 日本糖尿病学会年次学術集会
- 5 . 皮膚幹細胞球状凝集体由来神経前駆細胞を用いた DPN 移植治療の検討 2017 年 第 31 回 日本糖尿病・肥満動物学会
- 6 . マウス脊髄後根神経節細胞に対する歯髄幹細胞培養上清の効果の検討 2017 年 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：神谷 英紀

ローマ字氏名：Hideki Kamiya

所属研究機関名：愛知医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：70542679

研究分担者氏名：姫野 龍仁
ローマ字氏名：Tatsuhito Himeno
所属研究機関名：愛知医科大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号（8桁）：60753762

研究分担者氏名：加藤 宏一
ローマ字氏名：Koichi Kato
所属研究機関名：愛知学院大学
部局名：薬学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：40319322

(2)研究協力者

研究協力者氏名：近藤 正樹
ローマ字氏名：Masaki Kondo

研究協力者氏名：三浦 絵美梨
ローマ字氏名：Emiri Miura-Yura

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。