

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592506

研究課題名（和文）歯髄幹細胞を用いた糖尿病性神経障害に対する再生医療

研究課題名（英文）Regenerative medicine for diabetic polyneuropathy using dental pulp stem cells

研究代表者

成瀬 桂子（NARUSE KEIKO）

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：30387576

研究成果の概要（和文）：STZ 誘導糖尿病ラットまたはマウスの後肢骨格筋に歯髄幹細胞を移植し，糖尿病性神経障害に対する効果を検討した．ラット，ヒト歯髄幹細胞ともに糖尿病において低下した電流知覚閾値，坐骨神経伝導速度および坐骨神経内血流を改善した．また，移植したヒト歯髄幹細胞は骨や脂肪に分化することなく，未分化の状態ですら筋束間隙に存在していた．以上より歯髄幹細胞移植は糖尿病性神経障害に対する新しい治療法として有効であることが示唆された．

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined whether transplantation of rat or human DPSCs improve diabetic polyneuropathy. DPSCs were injected into unilateral hindlimb skeletal muscles of streptozotocin-induced diabetic animals. Transplantation of DPSCs ameliorated the decrease of sensation, sciatic nerve conduction velocity and sciatic nerve blood flow under the diabetic condition. Immunohistological study revealed that transplanted DPSCs existed in perimucle bundle area without differentiation into osteoblasts or adipocytes. These results indicate that DPSCs are promising cell source for regenerative medicine and the transplantation of DPSCs may be a new therapy for diabetic polyneuropathy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医薬薬学

科研費の分科・細目：歯学、歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯髄幹細胞・糖尿病性神経障害・細胞治療・再生

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯髄幹細胞は間葉系幹細胞の一種であり，それぞれの分化刺激に応じて，主に骨，軟骨，筋肉，脂肪といった間葉系組織に分化するとともに，象牙質様細胞や歯根膜への分化も報告されている．骨髄由来の間葉系幹細胞は骨髄採取が必要となるが，歯髄幹細胞は抜歯の必要な歯から採取できることより，侵襲も少なく採取できる再生医療の細胞ソースとして歯科領域だけでなく，医科領域への応用も期

待される．また，凍結保存後もその増殖能，再生能が保持されることも報告されており，歯髄幹細胞バンクも一部で開始されようとしている．

(2) 糖尿病は世界レベルで増加を続けており，糖尿病合併症への対応は急務である．とくに糖尿病性神経障害は，糖尿病合併症の中で，最も早期に出現し患者のQOLを損なうだけでなく，生命予後とも関連する重篤な合併

症である。これまでに、糖尿病性神経障害における自覚症状に対し、三環系抗鬱薬、抗てんかん薬などが使用されているが、これらは疼痛コントロールが目的であり、神経自体の保護や機能保持の作用は弱い。糖尿病における代謝障害治療薬であるアルドース還元酵素阻害薬は一定の効果をあげているが、その治療効果が十分でない場合もあり、より強力な神経保護作用や神経機能改善作用を持つ治療が求められている。

(3) 我々は、すでに血管内皮前駆細胞や骨髄由来間葉系幹細胞を用いた細胞移植が、糖尿病性神経障害における有用な治療法となり得ることを報告しており、糖尿病性神経障害に対する前駆細胞・幹細胞を用いた細胞移植が有効であることを証明した。

2. 研究の目的

(1) ラット歯髄より分離・培養した歯髄幹細胞を糖尿病ラット後肢骨格筋に移植し、糖尿病性神経障害に対する有効性を証明する。

(2) 同意の得られたヒトの不要歯より分離・培養した歯髄幹細胞を用いて、糖尿病性神経障害に対する改善効果を動物モデルで証明する。

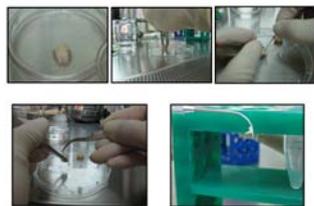
(3) 移植した歯髄幹細胞の移植後の細胞動態を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ラット歯髄幹細胞の分離・培養
Sprague-Dawley (SD) ラットを過量のペントバルビタールにより屠殺後、両側切歯を抜去する。抜去歯より、清潔に歯髄を摘出し、コラゲナーゼ処理後、プラスチックディッシュ上に播種する。細胞は、10%FBS 含有 α -minimum essential medium (α -MEM)にて培養する。数代経代することにより、純度の高い歯髄幹細胞を得ることができる。

(2) ヒト歯髄幹細胞の分離・培養
同意の得られた抜去歯より、同様に清潔に歯髄を摘出し、コラゲナーゼ処理した後、プラスチックディッシュ上に播種し、10%FBS 含有 α -MEM培地にて培養した (図1)。

図1.



(3) 歯髄幹細胞の 同定

フローサイトメトリーを使用し、表面抗原にて歯髄幹細胞を同定した。歯髄幹細胞は、CD34, CD45 陰性, CD29, CD49d, CD90陽性として検出される。

(4) 歯髄幹細胞の分化能の評価

得られた歯髄幹細胞を既報に従い、骨および脂肪への分化能を確認した。骨誘導は、骨誘導培地 (deзамethasone, L-glutamine, ascorbate, MSGS, β -glycerophosphate 含有) で2-3 週間培養することにより分化誘導し、osteocalcin, ALP 活性で同定した。脂肪誘導は、脂肪誘導 (h-insulin, L-glutamate, MCGS, dexamethasone, Indomethasone, 3-isobutyl-methyl-xanthine 含有) で2-3 週間培養することにより分化誘導し、oil red O, FABP染色により同定した。

(5) 糖尿病の誘導

6週齢の雄性SD ラットおよび雄性ヌードマウスに対しstreptozotocin (STZ) を腹腔内投与し、糖尿病を誘導した。

(6) 歯髄幹細胞の後肢骨格筋への移植

STZ 投与後8 週間後の糖尿病動物に対し、ラットまたはヒト歯髄幹細胞 (1×10^6 個/ラット, 1×10^5 個/マウス) を、片側後肢骨格筋に10 箇所に分けて移植し治療側とした。反対側には、コントロールとして1%アルブミン含有生理食塩水を同様に注入し非治療側とした。

(7) 糖尿病性神経障害の改善効果の判定

細胞移植治療 4 週間後に効果判定を行った。神経障害改善効果の判定は、正常および糖尿病ラットの治療側および非治療側に対し、下記の項目について検査した。

① 感覚機能検査

Neurometer を用いて感覚機能検査を行った。Neurometer はラットの足底に電気刺激を繰り返し行い、ラットが痛み刺激を感じ逃避した時点の閾値を痛み閾値として測定した。

② 末梢神経伝導速度

坐骨神経伝導速度は、誘発電位・筋電図検査装置を用いて測定した。

③ 坐骨神経内血流量

糖尿病群、正常群においてそれぞれ、治療側および非治療側の坐骨神経内血流量を、レーザー血流計オメガフロー (FL0-N1)を用いて、定量した。

④ 病理組織学的検討

組織を4%パラホルムアルデヒド固定後、パラフィン包埋する。既報の方法に準じ、血管内皮細胞を第VIII因子抗原抗体、末梢神経をPGP9.5抗体、骨芽細胞を抗オステオカルシン

抗体、脂肪細胞を抗 FABP 抗体を用いて免疫組織染色した。

4. 研究成果

(1) 歯髄幹細胞の培養・同定

上記の方法により得られた3世代目の歯髄幹細胞に対し、フローサイトメトリーを用いて、表面抗原を同定した。ラット歯髄幹細胞、ヒト歯髄幹細胞ともに CD34, CD45 陰性, CD29, CD49d, CD90 陽性であることが確認された。また、既法に従い骨および脂肪分化誘導を行ったところ、それぞれ osteocalcin 陽性, ALP 陽性骨芽細胞, FABP 陽性脂肪細胞に分化したことが確認された(図2)

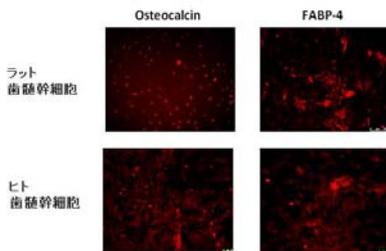


図2. ラット/ヒト歯髄幹細胞における骨/脂肪分化誘導

(2) ラット歯髄幹細胞移植の糖尿病性神経障害に対する効果

① 体重・血糖

STZ 投与8週後のSDラット片側後肢骨格筋に別の6週齢のラットの切歯より分離・培養した歯髄幹細胞を 1×10^6 個移植した後、4週間後の体重、血糖は、正常ラットにおいて体重 502.5 ± 71.2 g, 血糖 99.5 ± 22.2 mg/dL, 糖尿病ラットにおいて体重 322.0 ± 92.6 g, 血糖 455.8 ± 171.8 mg/dL であった。

② 坐骨神経伝導速度

ラット歯髄幹細胞移植4週間後に坐骨神経における運動伝導速度および感覚神経伝導速度を測定した。糖尿病ラット対照側では運動神経伝導速度、感覚神経伝導速度ともに有意に低下していたが、歯髄幹細胞の移植は、低下した伝導速度を有意に改善した(運動神経伝導速度: 正常ラット対照側 52.7 ± 1.0 m/s, 糖尿病ラット対照側 39.0 ± 2.1 m/s, 糖尿病ラット治療側 54.5 ± 1.4 m/s, 感覚神経伝導速度: 正常ラット対照側 49.5 ± 1.2 m/s, 糖尿病ラット対照側 36.5 ± 1.5 m/s, 糖尿病ラット治療側 50.6 ± 1.3 m/s)。

③ 坐骨神経内血流

坐骨神経内血流量は、糖尿病群において正常群と比較し、約40%の有意な低下を認めた。歯髄幹細胞の移植は、糖尿病群において低下した坐骨神経内血流量を有意に増加させた。

④ 後肢骨格筋における毛細血管/筋束比

糖尿病群で有意に低下した筋束あたりの毛

細血管数は、歯髄幹細胞の移植により約2倍の有意な増加を認めた。

⑤ 表皮内神経密度

糖尿病群では正常群と比較し、有意な低下を認めたが、歯髄幹細胞移植は、表皮内神経線維密度を有意に増加させ、正常群と同レベルにまで改善した。

(3) ヒト歯髄幹細胞移植の糖尿病性神経障害に対する効果

① 体重・血糖

STZ 投与8週後のヌードマウス片側後肢骨格筋にヒト歯髄幹細胞を 1×10^5 個移植した後、4週間後の体重、血糖は、正常群において体重 27.2 ± 2.3 g, 血糖 92.6 ± 35.0 mg/dL, 糖尿病群において体重 24.7 ± 2.1 g, 血糖 332.0 ± 71.1 mg/dL であった。

② 電流知覚閾値

250Hz, 2000Hz の電流刺激における電流知覚閾値を測定した。250Hz, 2000Hz ともに糖尿病対照側において電流知覚閾値は増加していた。歯髄幹細胞の移植は、増加した知覚閾値を有意に改善した。

③ 坐骨神経伝導速度

ヒト歯髄幹細胞移植4週間後に坐骨神経における運動伝導速度および感覚神経伝導速度を測定した。糖尿病群対照側では運動神経伝導速度、感覚神経伝導速度ともに有意に低下していたが、歯髄幹細胞の移植は、有意な改善を認めた(運動神経伝導速度: 正常群対照側 49.9 ± 4.4 m/s, 糖尿病群対照側 32.4 ± 1.7 m/s, 糖尿病群治療側 40.5 ± 1.4 m/s, 感覚神経伝導速度: 正常群対照側 42.0 ± 4.2 m/s, 糖尿病群対照側 23.8 ± 2.8 m/s, 糖尿病群治療側 37.9 ± 2.1 m/s)。

④ 坐骨神経内血流

坐骨神経内血流量は、糖尿病群において正常群と比較し有意な血流量の低下を認めたが、ヒト歯髄幹細胞の移植により、有意な増加が確認された。

⑤ ヒト歯髄幹細胞の移植後の骨分化/脂肪分化の有無

移植したヒト歯髄幹細胞の動態を確認するため、anti-human nuclei 抗体と FABP-4 抗体を用いることにより、脂肪細胞への分化を検討した。human nuclei 陽性細胞と FABP-4 陽性細胞の重なり認めず、脂肪細胞に分化していないことが確認された。また同様に anti-human nuclei 抗体と osteocalcin 抗体を用いることにより、骨芽細胞への分化を検討したところ、human nuclei 陽性細胞は筋束周囲に存在していたが、osteocalcin 陽性

細胞は認めず、骨芽細胞には分化していないことが確認された。

以上より、歯髄幹細胞はラットのみならずヒトの不要歯からも分離・培養・増殖させることができ、再生医療の細胞ソースとして非常に有用であることが確認された。糖尿病性神経障害に対する歯髄幹細胞移植は、糖尿病で低下した神経伝導速度および坐骨神経内血流を改善させるとともに、糖尿病で鈍化した知覚を改善させ、表皮における神経密度を増加させた。移植した歯髄幹細胞は骨や脂肪に分化することなく筋束周囲にとどまっておき、筋束周囲で豊富なサイトカインを分泌していることが、神経障害改善に結びついていると考えられた。歯髄幹細胞移植は、糖尿病性神経障害を統合的に改善させる新しい治療法として有用である可能性が示唆された。今後、臨床応用を目的とした臨床治験が求められる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件)

- ① Nisikawa T, Naruse K(2 番目/14 名), Matsubara T(14 番目), et al. Involvement of nitrosative stress in experimental periodontitis in diabetic rats. *Journal of Clinical Periodontology*, 査読有、39 巻、2012、pp 342-349、DOI:10.1111/j.1600-051X.2011.01848.x.
- ② Morita I, Matsubara T(5 番目/10 名), Sabbah W, et al. Relationship between periodontal status and levels of glycosylated hemoglobin. *Journal of Dental Research*, 査読有、91 巻、2012、pp161-166、DOI: 10.1177/0022034511431583
- ③ Naruse K(1番目/13名), Sato J, Matsubara T(11番目/13名), Nakamura J(13番目), et al. Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells improves mechanical hyperalgesia, cold allodynia and nerve function in diabetic neuropathy. *PLoS One*, 査読有、6巻、2011、e27458、DOI:10.1371/journal.pone.0027458
- ④ Himeno T, Kamiya Y, Naruse K(3番目/17名), Nakamura J(17番目), et al. Beneficial effects of exendin-4 on experimental polyneuropathy in diabetic mice. *Diabetes*, 査読有、60巻、2011、pp 2397-2406、DOI: 10.2337/db10-1462
- ⑤ Nakamura N, Naruse K(2番目/15名), Matsubara T(13番目), Nakamura J(15番目), et al. High glucose impairs the proliferation and increases the apoptosis of endothelial progenitor cells by suppression of Akt. *Journal of Diabetes Investigation*, 査読有、2巻、2011、pp262-270、DOI: 10.1111/j.2040-1124.2010.00093.x
- ⑥ Takeuchi F, Nakamura J(12番目/18名), Takayanagi R, Kato N, et al. Association of genetic variants for susceptibility to obesity with type 2 diabetes in Japanese individuals. *Diabetologia*, 査読有、54巻、2011、pp 1350-1359、DOI: 10.1007/s00125-011-2086-8
- ⑦ Suzuki J, Nakamura J(3番目/13名), Naruse K(4番目), Hamada Y et al. Palmitate induces apoptosis in Schwann cells via both ceramide-dependent and independent pathways. *Neuroscience*, 査読有、176巻、2011、pp 188-198、DOI:10.1016/j.neuroscience.2010.11.035
- ⑧ Tanimura D, Naruse K(13番目/15名), Matsubara T(14番目), Yokota M, et al. Relation of a common variant of the adiponectin gene to serum adiponectin concentration and metabolic traits in an aged Japanese population. *European Journal of Human Genetics*, 査読有、19巻、2011、pp 262-269、DOI: 10.1038/ejhg.2010.201
- ⑨ Hotta N, Nakamura J(2番目/10名), Iwamoto Y, et al. Causes of death in Japanese diabetics: A questionnaire survey of 18,385 diabetics over a 10-year period. *Journal of Diabetes Investigation*, 査読有、1巻、2010、pp 66-76、DOI: 10.1111/j.2040-1124.2010.00019.x
- ⑩ Asano H, Naruse K(10番目/13名), Matsubara T(11番目), et al. Plasma resistin concentration determined by common variants in the resistin gene and associated with metabolic traits in an aged Japanese population. *Diabetologia*, 査読有、53巻、2010、pp234-246、DOI: 10.1007/s00125-009-1517-2
- ⑪ Nakashima E, Naruse K(5番目/11名), Nakamura J(11番目) et al. Association of resistin polymorphism, its serum levels and prevalence of stroke in Japanese type 2 diabetic patients. *Journal of Diabetes Investigation*, 査読有、1巻、2010、pp154-158、DOI: 10.1111/j.2040-1124.2010.00040.x
- ⑫ Nakamura N, Naruse K(2番目/11名), Matsubara T(7番目), Nakamura J(11番目),

et al. Adiponectin promotes migration activities of endothelial progenitor cells via Cdc42/Rac1. FEBS letters、査読有、583 巻、2009、pp2457-2463、DOI: 10.1016/j.febslet.2009.07.011

[学会発表] (計 36 件)

- ① Kato J: Mesenchymal stem cells improve impaired foot ulcer healing in diabetic rats. 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (Lisbon), 2011.9.14.
- ② Himeno T: Transplantation of mesenchymal stem cell-like cells derived from mouse induced pluripotent stem cells improves diabetic polyneuropathy in mice. 71st Scientific Sessions American Diabetes Association (San Diego), 2011. 6.26.
- ③ Okawa T: Transplantation of p75 positive cells derived from mouse iPS cells ameliorates diabetic polyneuropathy in mice. 71st Scientific Sessions American Diabetes Association (San Diego), 2011. 6. 25.
- ④ Hata M. : Differentiation and mechanical stress response of dental pulp stem cells. 89th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (San Diego), 2011. 3. 17.
- ⑤ 秦 正樹: 糖尿病性神経障害の治療における歯髄幹細胞移植の有効性. 口腔先端応用医科学研究会 第 3 回 学術会議(東京), 2011. 1. 22.
- ⑥ 姫野龍仁: Exendin-4 の糖尿病性多発神経障害に対する治療効果の検討. 第 25 回日本糖尿病合併症学会(大津), 2010. 10. 23.
- ⑦ 大川哲司: マウス iPS 細胞由来 p75 陽性細胞移植の糖尿病性多発神経障害に対する治療効果の検討. 第 25 回日本糖尿病合併症学会(大津), 2010. 10. 22.
- ⑧ 神谷 英紀: インクレチンと神経障害. 第 25 回日本糖尿病合併症学会(大津), 2010. 10. 22.
- ⑨ 秦 正樹: 糖尿病性神経障害の治療における歯髄幹細胞の有効性. 第 25 回日本糖尿病合併症学会(大津), 2010. 10. 22.
- ⑩ Kondo M. : The therapeutic efficacy of Bone Marrow-Derived mononuclear cells on diabetic polyneuropathy depend on their age. 70th Scientific session American Diabetes Association(Orlando), 2010. 6. 27.
- ⑪ Himeno T. : Transplantation of Flk1-Positive mesodermal cells derived from Mouse embryonic Stem Cells improves diabetic polyneuropathy in mice. 70th Scientific session American Diabetes Association (Orlando), 2010. 6. 26.
- ⑫ 秦 正樹: 歯髄幹細胞のメカニカルストレス応答に関する検討—第 2 報—. 社団法人日本補綴歯科学会 第 119 回学術大会(東京), 2010. 6. 11.
- ⑬ 姫野龍仁: Mouse embryonic stem cell (ES 細胞) 由来初期中胚葉系細胞 (Flk1 陽性細胞) 委嘱による糖尿病性神経障害治療効果の検討. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会(岡山), 2010. 5. 27.
- ⑭ Naruse K: Therapeutic neovascularization using stem / progenitor cells for diabetic complication; a new strategy for diabetic neuropathy. 第 20 回 World Congress of the International Society for Heart Research (京都), 2010. 5. 13.
- ⑮ 成瀬桂子: 糖尿病性神経障害の重要性～病態・治療と今後の展望～. Nagoya Ophthalmic week 2009(名古屋), 2009. 12. 5.
- ⑯ 姫野龍仁: ES 細胞由来 Flk1⁺細胞の糖尿病性末梢神経障害に対する治療効果の検討. 第 24 回日本糖尿病合併症学会(岡山), 2009. 10. 9.
- ⑰ 神谷英紀: 糖尿病性末梢神経障害に対する骨髄単核球移植療法の効果—ドナーラットの性状相違による治療効果への影響—. 第 24 回日本糖尿病合併症学会(岡山), 2009. 10. 9.
- ⑱ 成瀬桂子: 糖尿病性神経障害に対する前駆細胞/幹細胞を用いた細胞治療. 第 24 回日本糖尿病合併症学会(岡山), 2009. 10. 9.
- ⑲ Kondo M. : The functions of bone marrow-derived mononuclear cells and their therapeutic efficacy on diabetic polyneuropathy are affected by their age. 45th European Association for the Study of Diabetes (Vienna). 2009. 9. 30.
- ⑳ 近藤正樹: 糖尿病性末梢神経障害に対する骨髄単核球移植治療の効果—ドナーラットの性状相違による治療効果への影響—. 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会(大阪), 2009. 5. 22.
- ㉑ 成瀬桂子: 2 型糖尿病患者における末梢血単核球のアルドース還元酵素遺伝子発現量は頸動脈病変と相関する. 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会(大阪), 2009. 5. 22.

[図書] (計 14 件)

- ① 成瀬桂子、糖尿病合併症、今日の治療指針 2011、pp. 634-638.
- ② 中村二郎、照林社、糖尿病神経障害、IV 糖

- 尿病の合併症、すべてがわかる 最新・糖尿病、2011、pp. 212-217
- ③ 中村二郎、医学出版、糖尿病性神経障害Ⅲ 糖尿病性血管障害の薬物療法、月刊糖尿病別冊糖尿病治療薬ハンドブック 2011、pp. 172-178
- ④ 成瀬桂子：日本臨床社、糖尿病性細小血管症(第2版)－発症・進展抑制の最前線－. 2010, pp. 627-631.
- ⑤ 尾澤昌悟、学建書院、スタンダード部分床義歯補綴学第2版、2010、 252

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成瀬桂子 (NARUSE KEIKO)
愛知学院大学・歯学部・准教授
研究者番号：30387576

(2) 研究分担者

松原達昭 (MATSUBARA TATSUAKI)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：30209598

田中貴信 (TANAKA YOSHINOBU)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：60014271

尾澤昌悟 (OZAWA SHOGO)
愛知学院大学・歯学部・准教授
研究者番号：50323720

中村二郎 (NAKAMURA JIRO)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：40283444