

令和元年6月25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：16K09742

研究課題名(和文) 糖尿病における歯髄幹細胞を利用した膵島移植の向上

研究課題名(英文) The co-transplantation of Islets with Dental Pulp Stem Cells Improved Survival and Function of Transplanted Beta-Cells

研究代表者

恒川 新 (Tsunekaewa, Shin)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40612768

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)：膵島移植における移植膵島の生着率をあげ、膵島移植の治療成績向上のため簡便に採取できるヒト歯髄幹細胞と膵島の同時移植を行った。ストレプトゾトシンを用いて薬剤性に膵β細胞を破壊した糖尿病モデル動物の腎臓の被膜下に膵島と歯髄幹細胞を同時に移植したところ、膵島単独移植に比べ血糖値は低下傾向を示し、移植した膵島の生着率はインスリン含有量や病理学的検討から生着率の改善が示唆された。その機序の一部として単離した膵島とヒト歯髄幹細胞の共培養においてインスリン分泌増強効果が考えられた。今後ヒト歯髄幹細胞は膵島移植における臨床応用の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

致死的低血糖を繰り返しインスリン注射のみでは治療困難な1型糖尿病治療のため、侵襲の少ない膵島移植が近年行われている。しかし、膵島移植後のインスリン離脱率は侵襲の大きな膵臓移植に比べ低い。その原因として単離され移植された膵島は、豊富な血管と神経組織がないため、膵臓移植に比べ生着率が低いため考えられる。また、膵島移植ではインスリン離脱するには複数ドナーからの単離膵島量が必要となるため、ドナー数の少ないわが国での膵島移植症例は欧米に比べ圧倒的に少ない。本研究で得られたヒト歯髄幹細胞による移植膵島の保護的な作用は、膵島移植の治療成績を上げ、ドナー数の少ないわが国での普及を広げ得る可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of co-transplantation of islets with Dental pulp stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) on glycemic control in streptozotocin diabetic mice to protect the viability of transplanted islets in the recipient. The co-SHED treatment reduced blood glucose levels in streptozotocin-diabetic mice. Co-SHED treatment groups preserved the insulin content of transplanted islets in the kidney capsule more than the islets-alone treatment group. Co-SHED transplantation histologically improved the islet engraftment, although this result is still only a preliminary study. SHED had beneficial effects in paracrine manner on insulin secretion of isolated pancreatic islets. This study demonstrated that co-transplantation of islets with SHED had a beneficial effect on the survival of transplanted islets than transplantation of islets alone and has a potential as a practical strategy for T1DM treatment.

研究分野：糖尿病代謝学

キーワード：糖尿病 膵島移植 組織幹細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病のインスリン強化療法は時として低血糖発作が頻発し、また根本的治療には至らないのが現状である。そのため、より安定した血糖コントロールを目的として、膵島移植が米国を中心に行われてきている。現在のインスリン離脱率は侵襲の大きい膵臓移植に比べ低く、移植膵島の低い生着率その原因として挙げられる。単離膵島は門脈から肝臓に入れるだけの為、本来膵臓内で存在するはずの豊富な血管と神経組織がないため、膵臓移植に比べ生着率が低いと考えられる。また、膵島移植では一人の患者がインスリン離脱するには複数ドナーからの単離膵島量が必要となり、ドナー数の少ないわが国では全膵島移植は欧米と比較すると圧倒的に少ない。再生医療での幹細胞から膵β細胞作成は、単離膵島に代わる移植治療となり得るが、分化誘導された膵β細胞は、生理的な膵β細胞とは異なり臨床応用までの時間は長いと考えられる。低侵襲な膵島移植の治療成績を上げ、複数回の移植やドナー負担軽減を図り、その普及を広げるには、移植膵島の生着率をあげる技術革新が特に我が国では求められている。

近年、骨髄由来間葉系幹細胞(BMSC)と膵島の同時移植が移植膵島の生着率を上げ、移植膵島数が半減した報告されている。作用機序は、BMSCの膵β細胞への分化ではなくBMSCからの液性因子による移植片への免疫抑制効果や移植周囲組織の血管新生、神経新生による移植効率の改善が考えられているが、その分子的メカニズムは不明である。また、間葉系幹細胞による移植片安定生着や拒絶反応(GVHD)抑制が、様々な疾患でその効果と臨床試験を目指した報告がなされている。一方で、BMSCや歯髄幹細胞などの体性幹細胞そのものの移植による耐糖能障害改善効果や、*in vitro*で幹細胞との共培養で膵β細胞増殖が増強する報告がなされ、我々は幹細胞からの分泌因子が膵β細胞保護効果を有していると考え、幹細胞培養上清、特にヒト歯髄幹細胞(SHED)培養上清が膵β細胞保護(抗細胞死/細胞増殖/インスリン分泌増強)を介した抗糖尿病効果を有していることを見出し、その効果はBMSC培養上清より遥かに強い作用であることを報告した(Izumoto T: BMJ Open Diabetes Research and Care in press)。SHEDは神経堤由来の幹細胞で、間葉系幹細胞マーカーCD90, CD73, CD105に加え、神経幹細胞マーカーNestin, Dcx, GFAPを共発現している。膵β細胞は内胚葉由来だが、その細胞特性は神経細胞に類似点が多く、SHEDの神経由来の特性から、間葉系幹細胞よりも膵β細胞保護効果が強いと予想される。

### 2. 研究の目的

SHEDと膵島同時移植により、より少ない膵島数での移植治療が可能であることを*in vivo*で証明し、その作用機序を単離膵島を用いた*ex vitro*解明し、低侵襲な膵島移植の生着率をあげる。

### 3. 研究の方法

(1) 膵島単独移植と歯髄幹細胞/膵島同時移植の耐糖能改善効果比較を*in vivo*で検討し確立する。

- ① 既報の膵島単独移植で糖尿病モデルマウスの耐糖能改善効果を示す膵島数(約200個)に比べ、その3分の1の膵島数(約75個)で耐糖能障害改善効果することを確認する。
- ② 移植先を従来動物実験で行われている腎臓に加えて、実際に人において行われている門脈を介した肝臓において確認する。

(2) 歯髄幹細胞による移植膵島片の保護作用機序を検討する。

- ① 歯髄幹細胞/膵島同時移植による移植膵島片の病理学的検討
- ② 歯髄幹細胞と膵β細胞株、血管内皮細胞、神経細胞の共培養による*in vitro*での効果の検討
- ③ 歯髄幹細胞からの分泌因子(分子量別の分泌蛋白とエクソソーム)による細胞保護効果の解明

### 4. 研究成果

(1)

- ① 9週齢雄C57Black6/Jマウスを用い、Streptozotosin(STZ:150 mg/kg)を腹腔内投与することで糖尿病モデルマウスを作成した。STZ投与2日後、血糖値300 mg/dL以上のマウスに対し、膵島移植を行った。なお移植する膵島は、9週齢雌C57Black6/Jマウスから採取した膵島を使用した。移植群は、コントロール(Sham)、膵島(50~100個)、BMSC(BM:1×10<sup>5</sup>+膵島:50~100個)、SHED(SHED:1×10<sup>5</sup>+膵島:50~100個)とした。随時血糖値上昇は移植後14日目より他群に比べ、SHED群は有意に抑制した時もあったが(図1)、その後のデータではばらつきを認めた。体重減少はSham群に比べ、islet群・BM群は抑制傾向にあるが、SHED群はさらに強い抑制傾向を認めた
- ② 移植先を腎皮膜から門脈を経由して肝臓への移植を試みたが、マウスにおいてはSham群やSHED群においても移植後数日で死亡するため動物モデルでは肝臓への移植では膵島とSHEDの同時移植では細胞量が多いため不適切と考えられた。

(2)

- ① 組織学的検討において SHED 群は、移植した insulin 陽性細胞が他群と比較して、より多く残存していた (図 2)。また、興味深いことに移植後の異種である SHED の残存も認められた。組織学的検討に加えて、移植後の腎臓におけるインスリン含有量も SHED 群はにおいて他群と比較して高値を示した (図 3)。
- ② 膵β細胞は SHED との共培養においてインスリン分泌の増強と膵島の viability の向上を認めた (図 4)。ヒト血管内皮細胞株 (HUEVEC) は SHED からの分泌因子により血管新生能 (tubeformation) が増強され (図 5)、マウスの神経後根節においては SHED からの分泌因子が神経突起長の延長作用を認めた (図 6)。
- ③ SHED からの分泌因子は対象となる細胞によってその効果を発揮する分泌蛋白の違いを認めた (図 5、図 6)。膵β細胞においては分子量 100kDa 以上の蛋白が効果を有し、マウスの神経後根節は 6kDa 以下の分子量蛋白、血管内皮細胞においては蛋白分画によらず血管新生効果を認めた。SHED からのエクソソームには、期待に反し今回検討した全ての細胞に対して影響を示さなかった。

図 1

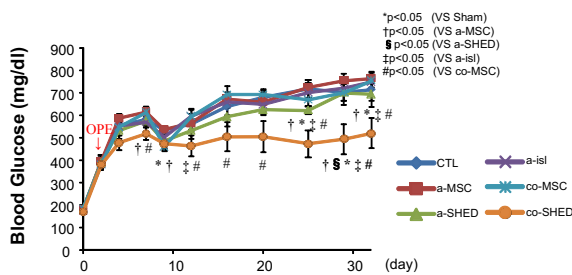


図 2

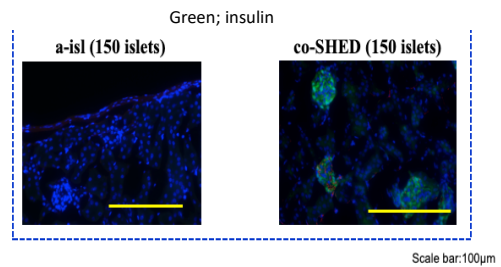


図 3

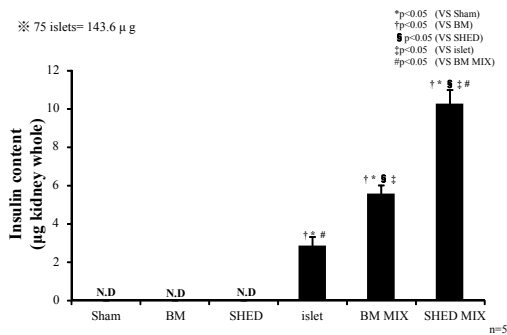


図 4

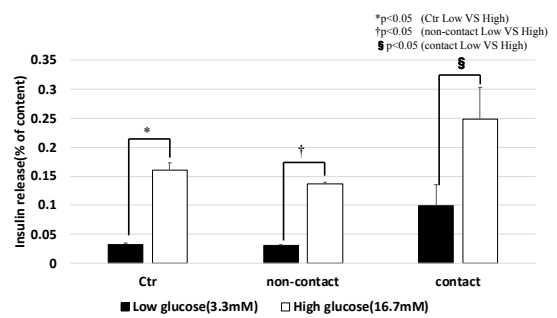


図 5

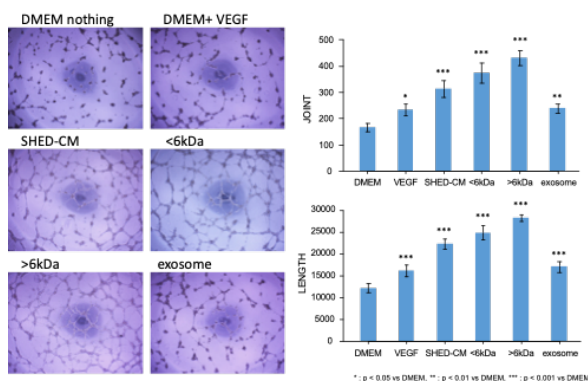
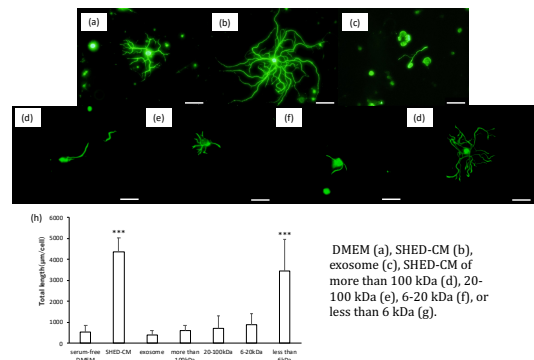


図 6



(結語)

SHED と膵島を同時移植することで、膵β細胞や血管内皮細胞、神経細胞を保護的に作用することにより膵島単独よりその生着率を上げ、より効果的な耐糖能障害改善作用を示すことが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計7件)

1: Miura-Yura E, Tsunekawa S, 以下14名 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. *J Diabetes Investig.* 査読あり 2019 May 29. doi: 10.1111/jdi.13085. [Epub ahead of print].

2: Mohiuddin MS, Himeno T, Inoue R, Miura-Yura E, Yamada Y, Nakai-Shimoda H, Asano S, Kato M, Motegi M, Kondo M, Seino Y, Tsunekawa S, 以下7名 Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonist Protects Dorsal Root Ganglion Neurons against Oxidative Insult. *J Diabetes Res.* 査読あり 2019 Feb 21;2019:9426014. doi: 10.1155/2019/9426014. eCollection 2019.

3: Murase M, Seino Y, Maekawa R, Iida A, Hosokawa K, Hayami T, Tsunekawa S, 以下5名 Functional adenosine triphosphate-sensitive potassium channel is required in high-carbohydrate diet-induced increase in β-cell mass. *J Diabetes Investig.* 査読あり 2019 Mar;10(2):238-250. doi: 10.1111/jdi.12907.

4: Maekawa R, Ogata H, Murase M, Harada N, Suzuki K, Joo E, Sankoda A, Iida A, Izumoto T, Tsunekawa S, 以下6名 Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is required for moderate high-fat diet- but not high-carbohydrate diet-induced weight gain. 査読あり *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2018 Jun 1;314(6):E572-E583. doi: 10.1152/ajpendo.00352.2017.

5: Maekawa R, Seino Y, Ogata H, Murase M, Iida A, Hosokawa K, Joo E, Harada N, Tsunekawa S, 以下5名 Chronic high-sucrose diet increases fibroblast growth factor 21 production and energy expenditure in mice. *J Nutr Biochem.* 査読あり 2017 Nov;49:71-79. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.07.010.

6: Hosokawa K, Hamada Y, Fujiya A, Murase M, Maekawa R, Niwa Y, Izumoto T, Seino Y, Tsunekawa S, Arima H. S100B impairs glycolysis via enhanced poly(ADP-ribosyl)ation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in rodent muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 査読あり 2017 Jun 1;312(6):E471-E481. doi: 10.1152/ajpendo.00328.2016.

7: Iida A, Seino Y, Fukami A, Maekawa R, Yabe D, Shimizu S, Kinoshita K, Takagi

Y, Izumoto T, Ogata H, Ishikawa K, Ozaki N, Tsunekawa S, 以下4名 Endogenous GIP ameliorates impairment of insulin secretion in proglucagon-deficient mice under moderate beta cell damage induced by streptozotocin. Diabetologia. 査読あり 2016 Jul;59(7):1533-1541. doi: 10.1007/s00125-016-3935-2.

〔学会発表〕（計 6 件）

泉本貴子 ヒト乳歯歯髄幹細胞培養上清による抗糖尿病効果の解析 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 2016年

三浦絵美梨 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 第60回日本糖尿病学会年次学術集会 2017年

三浦絵美梨 ヒト乳歯歯髄幹細胞培養上清が糖尿病多発神経障害にもたらす効果の検討 第61回日本糖尿病学会年次学術集会 2018年

三浦絵美梨 ヒト乳歯歯髄幹細胞培養上清が糖尿病多発神経障害にもたらす効果の検討 続報 第62回日本糖尿病学会年次学術集会 2019年

三浦絵美梨 Secreted Factors from Dental Pulp Stem Cells Ameliorated Diabetic Polyneuropathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. American Diabetes Association's 78th Scientific Sessions 2018年

三浦絵美梨 Secreted Factors from Dental Pulp Stem Cells Ameliorated neural functions in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. American Diabetes Association's 79th Scientific Sessions 2019年

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：山本 朗仁

ローマ字氏名：Akihito Yamamoto

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（歯学域）

職名：教授

研究者番号（8桁）：50244083

研究分担者氏名：清野 祐介

ローマ字氏名：Yusuke Seino

所属研究機関名：藤田医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：80534833

(2)研究協力者

なし

※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。