

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08874

研究課題名(和文) 糖尿病性虚血性疾患に対する体性幹細胞由来分泌因子を用いた治療法の開発

研究課題名(英文) Development of Novel Therapies for Diabetic Ischemic Diseases using Secreted Factors from Stem Cells

研究代表者

神谷 英紀 (Kamiya, Hideki)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：70542679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病は虚血性疾患の重要な危険因子である。今回我々は、ヒト乳歯歯髄幹細胞(SHED)培養上清(SHED-CM)の再生医療への可能性について検討した。SHED-CMはヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)のviabilityを有意に増加し、さらに血管内皮細胞遊走能および管腔形成を有意に促進した。また血管新生の一連の過程を包括的に評価するAortic ring assayにおいて、SHED-CMによりラット大動脈輪からの新生血管長の有意な伸長を認め、SHED-CMの血管新生促進効果が確認された。SHED-CMは虚血性疾患に対し今後の臨床応用が期待される治療リソースと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は心血管疾患および重症下肢虚血などの虚血性疾患の重要な危険因子である。近年、虚血性疾患の新たな治療法として再生医療が期待されている。今回我々は、ヒト乳歯歯髄幹細胞(SHED)培養上清(SHED-CM)には血管内皮細胞を直接刺激して血管新生の全ての過程を促進することを示すことができた。このことを考慮すると、SHED-CMはSHED自体を直接組織に移植する治療法に比べて安全でまた効率的であることから、SHED-CMは虚血性疾患に対し臨床応用が期待される治療リソースと考えられる。今後の研究の発展を継続していきたい。

研究成果の概要(英文)：Diabetes is a major risk factor for ischemic vascular diseases.

Here, we investigated the possibility of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) for regenerative medicine. Conditioned medium collected from SHED (SHED-CM) significantly increased the viability and migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and induced complex tubular structures of HUVECs. Furthermore, SHED-CM significantly increased neovascularization from the primary rat aorta, indicating that SHED-CM stimulated primary endothelial cells to promote comprehensive angiogenesis processes.

We can expect that SHED-CM is a useful therapeutic resource for diabetic ischemic diseases in future clinical applications.

研究分野：糖尿病

キーワード：再生医療 ヒト乳歯歯髄幹細胞 ヒト臍帯静脈内皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は心血管疾患および重症下肢虚血などの虚血性疾患の重要な危険因子である。近年、虚血性疾患の新たな治療法として再生医療が期待されている。様々な間葉系幹細胞移植治療による虚血性疾患の改善効果が多く報告されているが、歯髄幹細胞培養上清によるその効果はいまだ報告が少なく、また幹細胞移植治療の効果の詳細な機序も依然不明なままである。

我々は以前に、ヒト乳歯歯髄幹細胞 (stem cells from human exfoliated deciduous teeth: SHED) 培養上清 (SHED-CM) による膵β細胞保護効果¹⁾や神経修復効果を報告した²⁾。その要因としては、SHED からの分泌因子群による神経修復においては末梢神経栄養血管の血流改善および血管新生の促進が一因であることが示唆されているが、SHED 培養上清が血管新生を促進する詳細なメカニズムは未だに明らかでない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯髄幹細胞をはじめとする体性幹細胞からの分泌因子による糖尿病性虚血性疾患の改善効果とそのメカニズムを検討することである。

3. 研究の方法

10%の血清を含む Dulbecco 's Modified Eagle 's Medium (DMEM) で SHED を培養し、80%の細胞密度に達した時点でリン酸緩衝食塩水により洗浄した。その後無血清の DMEM で 48 時間培養し、培養上清を回収・遠心して SHED-CM を作成した。さらに限外濾過法を用いて、培養上清分泌蛋白を分子量 6 kDa 以上、6 kDa 未満の 2 群の分画に分けた。また、超遠心法によって上清中のエクソソームを回収した。

SHED 分泌因子の cell viability に対する効果を 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay で、遊走能に対する効果を Wound healing assay および Boyden chamber assay で、管腔形成に対する効果を Tube formation assay で、whole SHED-CM、6 kDa 以上および 6 kDa 未満の蛋白分画、エクソソームそれぞれで検討した。

4~6 週齢の C57BL/6J マウスを用いた Matrigel plug assay により、SHED 分泌因子が内皮細胞の遊走能へ及ぼす効果を確認した。

ex vivo での SHED 分泌因子の血管新生への効果の検討として、14 週齢の SD ラットを用いた Aortic ring assay を行った。

4. 研究成果

MTT assay において、SHED-CM は HUVECs の viability を有意に増加させた (fig1)。Wound healing assay, Boyden chamber assay および Matrigel plug assay では SHED-CM による血管内皮細胞遊走能の有意な促進が認められた (fig 2)。Tube formation assay において、SHED-CM による HUVECs の管腔形成の有意な促進が認められた (fig 3)。血管新生の一連の過程を包括的に評価する Aortic ring assay において、SHED-CM の添加によってラット大動脈輪からの新生血管長の有意な伸長を認め、SHED-CM の血管新生促進効果が確認された (fig 4)。いずれの assay においても、6 kDa 以上の分画は whole SHED-CM と同等かそれ以上の効果を示した。MTT assay および Tube formation assay においてエクソソームは統計学的には有意な促進効果を示したが、SHED-CM と比較してその効果は小さく、エクソソームが血管新生に及ぼす影響はごく僅かと考えられた。

Figure 1

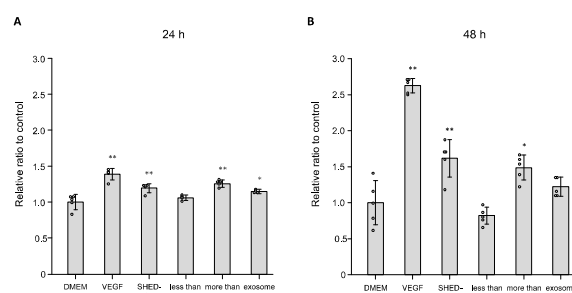
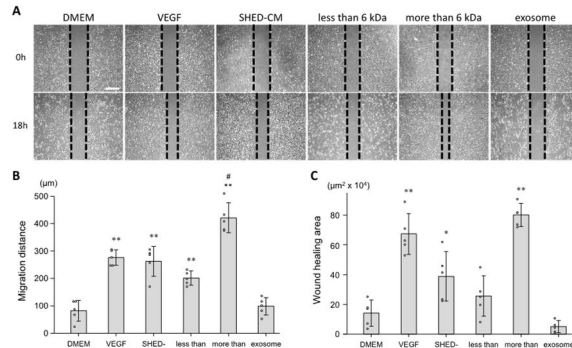


Figure 2



以上より, SHED-CM は血管内皮細胞を直接刺激して血管新生の全ての過程を促進することが示唆され, 虚血性疾患に対し今後の臨床応用が期待される治療リソースと考えられた.

< 引用文献 >

1)

Secreted factors from dental pulp stem cells improve glucose intolerance in streptozotocin-induced diabetic mice by increasing pancreatic β -cell function. Izumoto-Akita T, Tsunekawa S, Yamamoto A, Uenishi E, Ishikawa K, Ogata H, Iida A, Ikeniwa M, Hosokawa K, Niwa Y, Maekawa R, Yamauchi Y, Seino Y, Hamada Y, Hibi H, Arima H, Ueda M, Oiso Y.

BMJ Open Diabetes Res Care. 2015 Oct 19;3(1):e000128.

2)

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.

Miura-Yura E, Tsunekawa S, Naruse K, Nakamura N, Motegi M, Nakai-Shimoda H, Asano S, Kato M, Yamada Y, Izumoto-Akita T, Yamamoto A, Himeno T, Kondo M, Kato Y, Nakamura J, Kamiya H.

J Diabetes Investig. 2020 Jan;11(1):28-38.

Figure 3

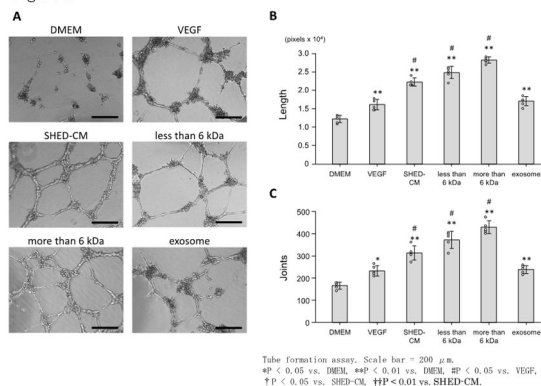
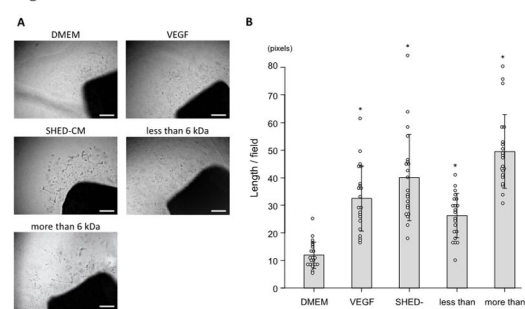


Figure 4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kato M, Tsunekawa S, Nakamura N, Miura-Yura E, Yamada Y, Hayashi Y, Nakai-Shimoda H, Asano S, Hayami T, Motegi M, Asano-Hayami E, Sasajima S, Morishita Y, Himeno T, Kondo M, Kato Y, Izumoto-Akita T, Yamamoto A, Naruse K, Nakamura J, Kamiya H.	4. 巻 9(11)
2. 論文標題 Secreted factors from stem cells of human exfoliated deciduous teeth directly activate endothelial cells to promote all processes of angiogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9112385.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 M. Kato, S. Tsunekawa, N. Nakamura, E. Miura-Yura, Y. Yamada, Y. Hayashi, Y. Morishita, T. Himeno, M. Kondo, Y. Kato, H. Kamiya, K. Naruse, J. Nakamura
2. 発表標題 Conditioned medium from dental pulp stem cells directly activate endothelial cells to promote all process of angiogenesis
3. 学会等名 56th Annual meeting European Association for the Study of Diabetes(EASD)（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤 誠, 恒川 新, 中村 信久, 井上 利恵子, 林 優佑, 三浦 絵美梨, 山田 祐一郎, 石川 貴大, 森下 啓明, 姫野 龍仁, 近藤 正樹, 加藤 義郎, 神谷 英紀, 成瀬 桂子, 中村 二郎
2. 発表標題 血管新生に対するヒト乳歯歯髄幹細胞培養上清の効果の検討
3. 学会等名 第63回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤 誠, 恒川 新, 中村 信久, 井上 利恵子, 林 優佑, 三浦 絵美梨, 山田 祐一郎, 森下 啓明, 姫野 龍仁, 近藤 正樹, 加藤 義郎, 神谷 英紀, 成瀬 桂子, 中村 二郎
2. 発表標題 ヒト乳歯歯髄幹細胞培養上清が血管新生に及ぼす効果の検討
3. 学会等名 第35回 日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	恒川 新 (Tsunekawa Shin) (40612768)	愛知医科大学・医学部・准教授 (33920)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------