

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09851

研究課題名（和文）体性幹細胞とその分泌因子を用いた世界初の糖尿病性神経障害治療法の開発

研究課題名（英文）Development of the new treatment for diabetic neuropathy using somatic stem cells and their secreted factors

研究代表者

神谷 英紀 (Hideki, Kamiya)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70542679

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：今回の研究において、歯髄幹細胞から分泌される分泌因子の投与（移植）が糖尿病性神経障害の治療法となり得るかどうかにについて検討した。

その結果、歯髄幹細胞から分泌される分泌因子中には、血管・神経を再生・新生する成長因子が含まれていることが明らかとなり、その分泌因子を糖尿病性神経障害を呈するモデル動物の筋肉内に移植することにより、糖尿病で低下した血流の改善に加え、低下した神経機能の改善ができることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性神経障害は糖尿病患者の生活の質および健康寿命を大きく低下させる糖尿病性合併症である。糖尿病性神経障害は一旦進行するとその改善は難しく、また現時点で血糖コントロール以外の有効な治療法が確立されていない。今回、糖尿病性神経障害のモデル動物に対し歯髄幹細胞の分泌因子を投与する研究において、歯髄幹細胞の分泌因子には神経細胞および血管を再生・新生する因子が含まれており、それが糖尿病性神経障害の改善につながる可能性を示すことができた。歯髄幹細胞は歯科との連携により比較的容易に入手でき自家移植も可能なため、将来的なヒトへの応用も期待できるものと考えている。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we examined whether the secreted factors in conditioned medium of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED-CM) had beneficial effects on diabetic polyneuropathy. In results, we found 1) SHED-CM contained several angiogenic and neurotrophic factors, and 2) injection of SHED-CM into the hindlimb muscles improved impaired sensory functions and increased nerve blood flows in diabetic mice. These results suggested that injection of SHED-CM might have a therapeutic effect on diabetic polyneuropathy through promoting neurite outgrowth and increasing nerve blood flow.

研究分野：糖尿病性神経障害

キーワード：糖尿病性神経障害 再生医療 歯髄幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病性多発神経障害(diabetic polyneuropathy: DPN)において、障害された神経を修復する有効な治療法はなく、新規治療法の開発が求められている。様々な組織幹細胞または前駆細胞を用いた筋肉内移植療法が、疾患モデル動物で有効であると報告されており、幹細胞からの分泌因子が特に重要と考えられている。

(2) 近年幹細胞の中でもヒト乳歯歯髄幹細胞(stem cells from human exfoliated deciduous teeth: SHED)が注目されている。SHED は採取が簡便であり、神経堤細胞由来で高い再生能力が期待でき、間葉系マーカーと神経幹細胞マーカーを発現しているという特徴から、DPNの改善において有用である可能性が高いと我々は考えた。

2. 研究の目的

今回、DPN の新規治療法開発を目的とし、ヒト乳歯歯髄幹細胞培養上清(conditioned medium of stem cells from human exfoliated deciduous teeth: SHED-CM)の DPN への効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) 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 100kDa 以上、20-100kDa、6-20kDa、6kDa 以下の 4 分画に分けた。また、SHED-CM を超遠心しエクソソームを回収した。

(2) SHED-CM の神経突起伸長への影響を確認するため、C57BL/6J マウスの脊髄より後根神経節細胞(Dorsal root ganglion neurons: DRG neurons)を摘出し、SHED-CM あるいはエクソソームを添加して、48 時間培養後に神経突起伸長を評価した。さらに血管新生に与える影響を調べるため、SHED-CM のヒト臍帯静脈内皮細胞(human umbilical vein endothelial cells: HUVEC)における細胞増殖作用を評価した。

(3) 5 週齢の C57BL/6J マウスへの腹腔内ストレプトゾチン投与により、糖尿病モデルマウスを作製した。血糖上昇および明瞭な末梢神経機能の低下を確認後、週 2 回・4 週にわたって右下腿筋肉内に SHED-CM または DMEM を 100 μ l ずつ投与し、神経機能評価および病理学的評価を行った。

4. 研究成果

(1) SHED-CM の添加によって DRG neurons の神経突起の有意な伸長を認め、分子量 100kDa 以上、20-100kDa、6-20kDa、6kDa 以下の 4 分画中 6kDa 以下の蛋白分画においてのみ同様の結果を認めた(図 1)。エクソソーム添加では神経突起の伸長は認めなかった(図 1)。

既存の神経成長因子は、6kDa 以下の分画には含まれなかった。

(2) SHED-CM は HUVEC の増殖を促進し、6kDa 以下と 6kDa 以上の両蛋白分画において HUVEC の増殖促進作用を認めた。

(3) DMEM 投与と比較して、SHED-CM 投与により糖尿病状態で惹起される感覚神経伝導速度の低下が有意に抑制された。

(4) 腓腹神経の有髄神経に対する病理学的評価の検討および表皮内神経線維に対する検討においては、いずれも SHED-CM による改善効果は認めなかった。

(5) SHED-CM の投与は、糖尿病状態で低下した筋肉内毛細血管密度を改善させ(図 2)、また足底および坐骨神経内血流を有意に上昇させた。

【結論】

SHED-CM は神経突起伸長作用を介した DPN の治療効果を有することが示唆された。SHED-CM に含まれる約 6kDa 以下の分泌因子は、神経突起伸長作用および血管新生促進作用を有すると考えられた。また、SHED-CM 投与による毛細血管の増加が、神経機能の改善に寄与した可能性が考えられた。以上より本研究は、DPN の新規治療法の開発に寄与すると期待される。

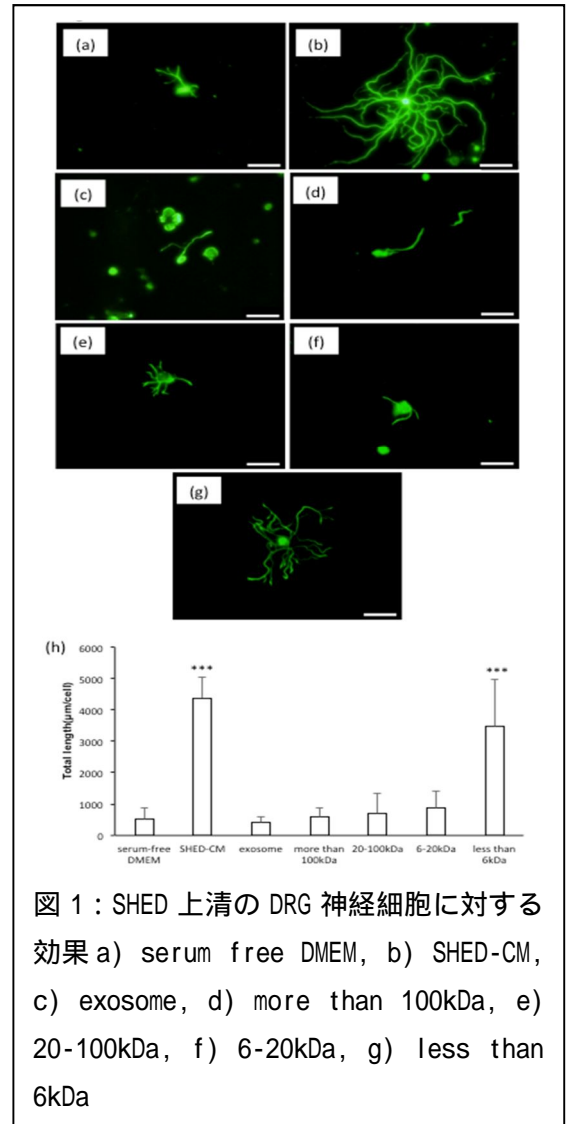


図 1 : SHED 上清の DRG 神経細胞に対する効果 a) serum free DMEM, b) SHED-CM, c) exosome, d) more than 100kDa, e) 20-100kDa, f) 6-20kDa, g) less than 6kDa

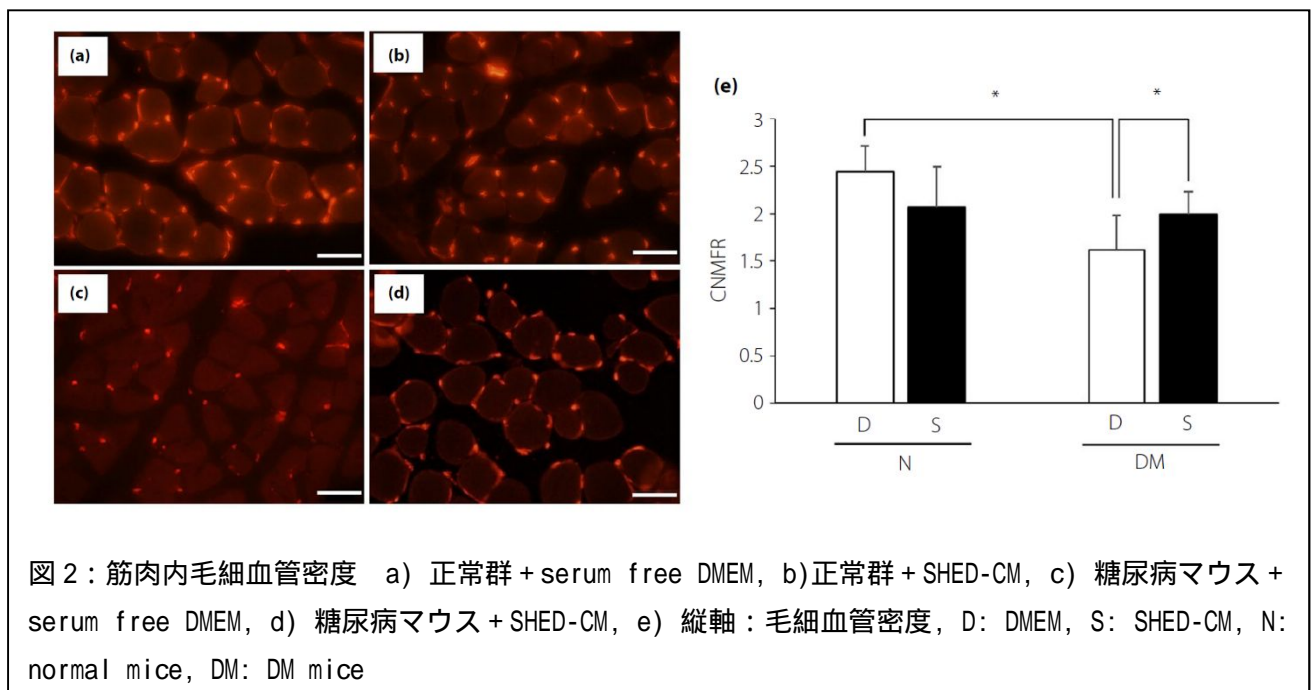


図 2 : 筋肉内毛細血管密度 a) 正常群 + serum free DMEM, b) 正常群 + SHED-CM, c) 糖尿病マウス + serum free DMEM, d) 糖尿病マウス + SHED-CM, e) 縦軸 : 毛細血管密度, D: DMEM, S: SHED-CM, N: normal mice, DM: DM mice

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 Emiri Miura-Yura, Shin Tsunekawa, Keiko Naruse, Nobuhisa Nakamura, Mikio Motegi, Hiromi Nakai-Shimoda, Saeko Asano, Makoto Kato, Yuichiro Yamada, Takako Izumoto-Akita, Akihito Yamamoto, Tatsuhiro Himeno, Masaki Kondo, Yoshiro Kato, Jiro Nakamura, Hideki Kamiya	4. 巻 11
2. 論文標題 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	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 28-38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13085	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 三浦絵美梨、恒川新、成瀬桂子、姫野龍仁、近藤正樹、加藤義郎、神谷英紀、中村二郎
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 EMIRI MIURA-YURA, SHIN TSUNEKAWA, TATSUHIRO HIMENO, KEIKO NARUSE, MIKIO MOTEGI, HIROMI SHIMODA, MAKOTO KATO, YUICHIRO YAMADA, MASAKI KONDO, YOSHIRO KATO, HIDEKI KAMIYA, JIRO NAKAMURA
2. 発表標題 Secreted Factors from Dental Pulp Stem Cells Ameliorated Diabetic Polyneuropathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice
3. 学会等名 The American Diabetes Association's 78th Scientific Sessions（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦絵美梨、恒川新、成瀬桂子、茂木幹雄、浅野紗恵子、加藤誠、下田博美、山田祐一郎、姫野龍仁、近藤正樹、加藤義郎、神谷英紀、中村二郎
2. 発表標題 ヒト乳歯歯髄幹細胞培養上清が糖尿病性多発神経障害にもたらす効果の検討
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 EMIRI MIURA-YURA, SHIN TSUNEKAWA, KEIKO NARUSE, MIYUKA KAWAI, MAKOTO KATO, HIROMI SHIMODA, YUICHIRO YAMADA, MIKIO MOTEGI, SAEKO ASANO, TATSUHITO HIMENO, MASAKI KONDO, YOSHIRO KATO, JIRO NAKAMURA, HIDEKI KAMIYA
2. 発表標題 Secreted Factors from Dental Pulp Stem Cells Ameliorated neural functions in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice
3. 学会等名 The American Diabetes Association's 79th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019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	近藤 正樹 (Kondo Masaki) (00717910)	愛知医科大学・医学部・講師 (33920)	
研究分担者	恒川 新 (Tsunekawa Shin) (40612768)	愛知医科大学・医学部・准教授 (33920)	
研究分担者	姫野 龍仁 (Himeno Tatsuhiro) (60753762)	愛知医科大学・医学部・講師 (33920)	