

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K17241

研究課題名（和文）乳歯歯髄幹細胞由来培養上清を用いた誤嚥性肺炎の治療法の開発

研究課題名（英文）Development of the cure for aspiration-related pneumonia using condition media from stem cells from human exfoliated deciduous teeth

研究代表者

梶村 有紀子 (Sugimura, Yukiko)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10778658

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、幹細胞が分泌するパラクライン因子に含まれる嚥下障害改善に関与する因子を調べ、その因子群を嚥下障害モデルに適用し治療効果を検討することであった。近年、上喉頭神経が嚥下を誘発する受容器を支配していることがわかっている。そこで、ラットの上喉頭神経を圧挫し嚥下障害モデルを作製した。そのラットに培養上清を投与すると、嚥下機能が劇的に回復した。培養上清を網羅的に解析した結果、炎症抑制する因子、神経再生促進する因子、血管新生を促進する因子が含まれており、それらが機能回復に寄与していると考えられた。本研究では、幹細胞が分泌する培養上清が嚥下障害に対して治療効果があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、死亡率の高い高齢者の肺炎のほとんどは市中肺炎ではなく誤嚥性肺炎であるという報告がある。誤嚥性肺炎の発症のベースとして嚥下障害が存在していると言われている。誤嚥性肺炎に対し口腔ケアや嚥下訓練が行われているが、肺炎発症に深く関わる嚥下障害に対する治療法は確立されていない。近年、幹細胞が分泌するパラクライン因子が組織再生に着目されており、本研究では、培養上清を嚥下障害モデルに投与し治療メカニズムを明らかにした。この研究結果は、誤嚥性肺炎に対する新たな治療薬の開発につながると考えている。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to investigate the factors involved in improving dysphagia in the conditioned media (CM) secreted by stem cells, and to apply these factors to a model of dysphagia to examine the therapeutic effects. We showed that administration CM improved functional recovery of swallowing in rat model of dysphagia. A result of microarray analysis of the CM revealed that it contained factors that inhibited inflammation, promoted nerve regeneration, and promoted angiogenesis. This study suggests that the CM secreted by stem cells provide the therapeutic effect on dysphagia.

研究分野：再生医療

キーワード：幹細胞 パラクライン効果 誤嚥性肺炎 嚥下障害 再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の人口動態統計(概数)の報告によると、誤嚥性肺炎を含む肺炎は疾患別死亡原因の第4位であり、高齢になるほど比率が上昇している。そして、高齢者の肺炎の70%以上が誤嚥性肺炎であるとの報告がある。夜間の不顕性誤嚥は、高齢者に広く認める老化現象であるため、高齢者の肺炎は反復して起こる。誤嚥性肺炎のベースに嚥下障害が存在すると言われている。嚥下障害は、このような誤嚥性肺炎を引き起こすばかりでなく、人生の楽しみの1つでもある「食べること」が制限されてしまい患者のQOLが著しく低下する。現在、嚥下障害に対し口腔ケア、嚥下訓練、嚥下補助装置の製作といった方法が行われているが、有効な治療法や根本的な治療法がなく、新しい治療法の開発は急務と言える。

2. 研究の目的

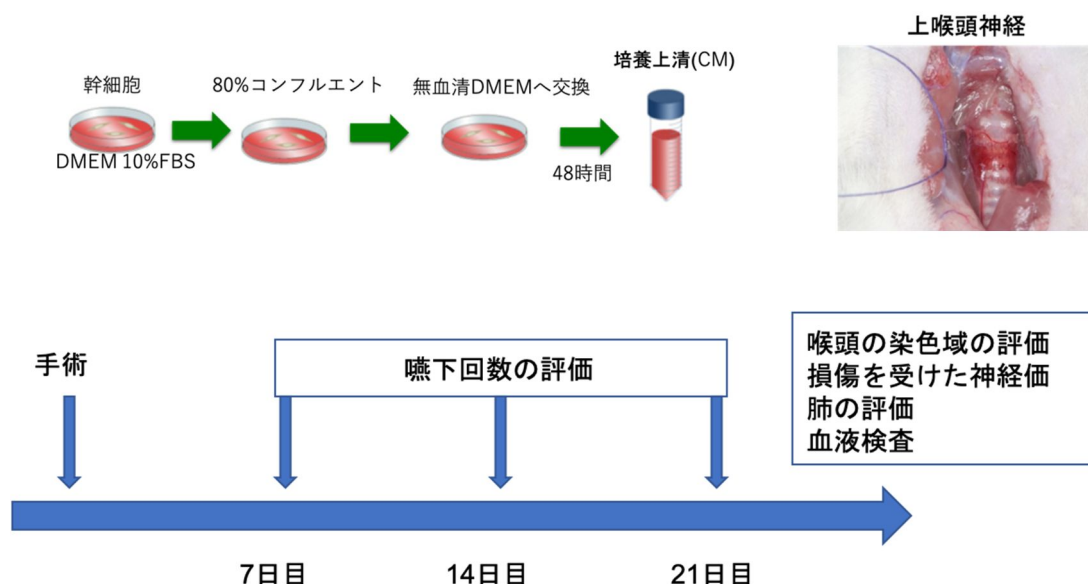
(1) 嚥下障害の改善は経口摂取が可能となるだけでなく、肺炎の死亡率が減少する可能性がある。しかし、動物モデルを用いた嚥下機能に関する研究報告は少なく、動物モデルは確立されていない。

(2) 再生治療において幹細胞移植の有効性が数多く報告されているが、移植細胞の生存率や分化頻度が低いことが指摘されており、移植した幹細胞の直接的な作用だけでは組織再生の全てを説明できない。近年、その治療効果は移植細胞が分泌するサイトカインによるパラクライン効果が主体ではないかとの報告がある。このような背景より幹細胞が分泌するパラクライン因子を多く含む培養上清に着目した。

よって、本研究の目的は、(1) ラット嚥下障害モデルを確立すること(2) 培養上清投与による治療効果を検証し、その機序を解明することである。

3. 研究の方法

ヒト乳歯歯髄幹細胞(SHED)を分離、培養し80%コンフルエントになった時点で無血清培地に交換し48時間後に培養上清を回収し、細胞残骸を除去した上清をCMとして使用した。上喉頭神経が嚥下を誘発する受容器をしていることがわかっているため、ラットの上喉頭神経を剖出し、フォーセップスを使用し圧挫させ嚥下障害モデルができるか検証した。圧挫方法は、フォーセップスで10秒、10秒×2回、10秒×3回の3通りを行い、健常ラットと嚥下回数で比較検討した。嚥下障害モデルラットにSHED-CMあるいはDMEM(対照群)を静脈内に単回投与した。嚥下回数、飲水量、誤嚥の評価、損傷を受けた神経の評価、肺の評価、血液検査をした。治療メカニズムの解析のため*in vitro*にて検証した。SHED-CMをシュワン細胞および脊髄後根神経節(DRG)に作用させシュワン細胞の増殖・遊走能とDRGの神経突起伸長について評価した。また、SHED-CMをマクロファージに作用させ分極化への影響について評価した。ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)をSHED-CM存在下で培養し血管新生に与える影響を評価した。



4. 研究成果

(1) モデルの作成

フォーセップスで 10 秒, 10 秒×2 回では, 嚥下回数にばらつきが大きく, 健常ラットと有意な差はなかった. 10 秒×3 回を行うとばらつきが少なくなり, 健常ラットと比較し有意に嚥下回数が減少していた. この結果を受けて, 上喉頭神経をフォーセップスで 10 秒×3 回圧挫を行なったラットを嚥下障害モデルとして使用した.

(2) 治療効果の検証

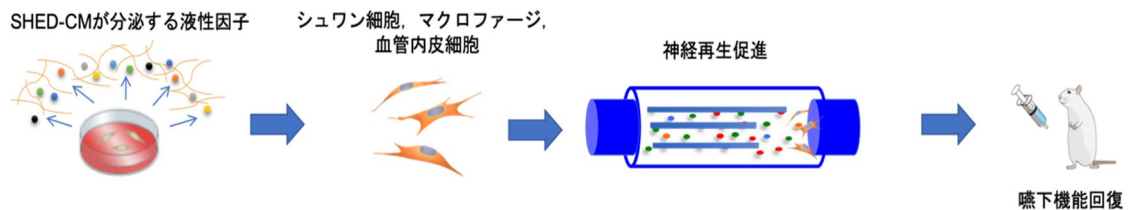
ラット嚥下障害モデルに SHED-CM, DMEM を静脈投与し嚥下回数, 飲水量を比較, トルイジブルー染色液を摂水させ喉頭を回収し染色された領域を比較した. 上喉頭神経を剖出し閉創したのみの Sham 群は, 嚥下機能の低下は認めなかった. SHED-CM 投与群では, 嚥下回数と飲水量は回復し, 染色域も減少した. しかし, DMEM 群では機能回復は認めなかった. 組織学的解析では, SHED-CM 投与群の再生軸索数は有意に増加し, 髄鞘形成程度の評価の指標である G-ratio (神経全体の直径に対する軸索の直径) は, 正常に近い値まで回復した. 損傷した神経の遺伝子発現解析では, *NGF*, *BDNF*, *NT-3* 等の神経栄養因子の発現が有意に上昇した. 肺の H-E 染色では好中球数が減少し肺胞構造の破壊もわずかであった. 遺伝子発現解析でも, *TNA-*, *IL-1*, *IL-6* 等の炎症性サイトカインの発現が有意に低下していた. 血液検査においても白血球数や C 反応性タンパクの値が DMEM 群と比較し減少していた.

シュワン細胞を SHED-CM 存在下で培養すると, 増殖・遊走能は有意に上昇した. DRG に SHED-CM を作用させると, 有意に神経突起伸長が促進した. マクロファージは炎症型の M1 と抗炎症型の M2 に大別される. マクロファージを SHED-CM 存在下で培養すると, M2 マクロファージの特徴的な紡錘形を呈し, 遺伝子学的解析にて M2 マクロファージのマーカーである *CD206*, *Ym1*, *Arginase-1* の発現が有意に上昇した. HUVEC を SHED-CM 存在下で培養すると, 血管の分岐, 長さいずれも有意に増加していた.

これらの結果より, SHED-CM 中の液性因子がシュワン細胞の遊走・増殖能を上昇させたり, 神経再生に必須である血管新生を促進させたり, またマクロファージを抗炎症型の M2 に誘導することで再生の場へと転換させたり, 神経再生の様々な課程に働きかけることにより神経機能回復および嚥下障害が改善したと考えられた.

(結語)

本研究より, 幹細胞が分泌する因子による新しい誤嚥性肺炎治療確立の可能性が示唆された.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakai Kiyoshi, Tsuruta Takeshi, Watanabe Junna, Sugimura Yukiko, Sakaguchi Kohei, Katagiri Wataru, Hibi Hideharu	4. 巻 2155
2. 論文標題 Peripheral Nerve in a Novel Rat Model of Dysphagia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 107 ~ 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0655-1_9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fumiya Kano, Norihisa Ichimura, Yukiko Wakayama, Kazuto Okabe, Hiroki Sakakura, Hideharu Hibi	4. 巻 13
2. 論文標題 Third molar pericoronitis in neutropenia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 IDCases	6. 最初と最後の頁 e00419 ~ e00419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.idcr.2018.e00419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogata Kenichi, Osugi Masashi, Kawai Takamasa, Wakayama Yukiko, Sakaguchi Kohei, Nakamura Seiji, Katagiri Wataru	4. 巻 30
2. 論文標題 Secretomes of mesenchymal stem cells induce early bone regeneration by accelerating migration of stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 445 ~ 451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2018.04.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 岡部 一登, 藤尾 正人, 酒井 陽, 梶村 有紀子, 坂口 晃平, 渡邊 純奈, 日比 英晴
2. 発表標題 骨再生についてのわれわれの取り組みの変遷
3. 学会等名 第 50 回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊 純奈, 岡部 一登, 酒井 陽, 藤尾 正人, 梶村 有紀子, 坂口 晃平, 佐世 暁, 日比 英晴
2. 発表標題 骨造成後の骨補填材に感染が波及した1例
3. 学会等名 第 50 回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kohei Sakaguchi, Kiyoshi Sakai, Yukiko Sugimura-Wakayama, Junna Watanabe, Hideharu Hibi
2. 発表標題 Bone regeneration using exosomes derived from hMSCs stimulated by hypoxia
3. 学会等名 European Association for Osseointegration CONGRESS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂口 晃平, 酒井 陽, 梶村 有紀子, 鶴田 剛士, 渡邊 純奈, 片桐 渉, 日比 英晴
2. 発表標題 骨髄間葉系幹細胞が分泌するエクソソームによる新規骨再生法
3. 学会等名 第63回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊 純奈, 酒井 陽, 岡部 一登, 梶村 有紀子, 坂口 晃平, 鶴田 剛士, 中道 瑛司, 日比 英晴
2. 発表標題 間葉系幹細胞由来エクソソームを用いたBRONJに対する治療の有効性の検討
3. 学会等名 第63回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukiko Sugimura, Kiyoshi Sakai, Kohei Sakaguchi, Takeshi Tsuruta, Junna Watanabe, Wataru Katagiri, Hideharu Hibi
2. 発表標題 Conditioned media from SHED enhanced peripheral nerve regeneration
3. 学会等名 The 96th General Sesseion and exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Junna Watanabe, Kiyoshi Sakai, Kazuto Okabe, Yukiko Sugimura, Kohei Sakaguchi, Takeshi Tsuruta, Hideharu Hibi
2. 発表標題 Effects of Mesenchymal stem Cell-derived Exsomes for Rat BRONJ Model
3. 学会等名 The 96th General Sesseion and exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kohei Sakaguchi, Kiyoshi Sakai, Yukiko Sugimura, Takeshi Tsuruta, Junna Watanabe, Wataru Katagiri, Hideharu Hibi
2. 発表標題 Exosomes derived from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration
3. 学会等名 The 96th General Sesseion and exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊 純奈、酒井 陽、岡部 一登、若山(椋村)有紀子、坂口 晃平、鶴田 剛士、日比 英晴
2. 発表標題 ビスホスホネート関連顎骨壊死に対する間葉系幹細胞由来エクソソームを用いた治療の可能性
3. 学会等名 第72回 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂口 晃平、酒井 陽、片桐 渉、若山（梶村） 有紀子、 鶴田 剛士、渡邊 純奈、日比 英晴
2. 発表標題 骨髄由来間葉系幹細胞が分泌するエクソソームによる新たな骨再生
3. 学会等名 日本再生医療学会総会 2018年3月21日
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鶴田剛士、片桐 渉、大杉将嗣、酒井 陽、梶村有紀子、坂口晃平、渡邊純奈、日比英晴
2. 発表標題 ラット末梢性嚙下障害モデルの確立と乳歯歯髄幹細胞由来成長因子による治療効果の検討
3. 学会等名 第16回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梶村有紀子、酒井 陽、坂口晃平、鶴田剛士、渡邊純奈、片桐 渉、日比英晴
2. 発表標題 乳歯歯髄幹細胞由来培養上清由来成長因子を用いた末梢神経再生治療の検討
3. 学会等名 第62回日本外科学会総会 学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鶴田剛士、片桐 渉、大杉将嗣、酒井 陽、梶村有紀子、坂口晃平、渡邊純奈、日比英晴
2. 発表標題 乳歯歯髄幹細胞由来成長因子は神経の血管新生を介してラット末梢性嚙下障害を改善する
3. 学会等名 第62回日本外科学会総会 学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鶴田剛士、片桐 渉、大杉将嗣、酒井 陽、梶村有紀子、坂口晃平、渡邊純奈、日比英晴
2. 発表標題 ラット末梢性嚙下障害モデルを用いた乳歯歯髄幹細胞由来成長因子の治療効果の検討
3. 学会等名 第71回日本口腔科学会総会 学術集会
4. 発表年 2017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

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