

## 主論文の要旨

**Secreted factors from dental pulp stem cells improve glucose intolerance in streptozotocin-induced diabetic mice by increasing pancreatic  $\beta$ -cell function**

乳歯歯髄幹細胞から分泌される因子群は、膵 $\beta$ 細胞の機能を向上することにより、ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルマウスにおける耐糖能障害を改善させた

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻  
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

(指導：日比 英晴 教授)

泉本 貴子

## 〔緒言〕

糖尿病は、インスリン抵抗性や膵β細胞によるインスリン分泌・合成能低下により慢性高血糖状態をきたす代謝疾患である。膵β細胞の細胞量やその機能向上が糖尿病の究極の治療と考えられるが、既存の治療薬では根本的治療には至らないのが現状である。近年、糖尿病モデル動物に移植した骨髄由来間葉系幹細胞（BM）による耐糖能障害改善効果が報告されている。その作用機序は移植した幹細胞が膵β細胞に分化する細胞補給効果ではなく、幹細胞が分泌する組織再生因子によるパラクライン効果によるものと考えられている。今回、我々はヒト乳歯歯髄幹細胞（SHED）が分泌する因子群を無血清培養上清（CM）として回収し、ストレプトゾトシン（STZ）誘発糖尿病モデルマウスを使用し、膵β細胞保護・インスリン分泌能に及ぼす効果を検討した。

## 〔方法〕

特異的膵β細胞死を誘発する STZ を C57B/6J マウスに投与し、Multiple low-dose STZ-induced diabetic mice（MLDS: 50mg/kg 5days）もしくは High-dose STZ-induced diabetic mice（HD:150mg/kg）の2種類の糖尿病モデルマウスを作成した。これらの糖尿病モデルマウスに Figure 1 A に示す実験プロトコールにて、Dulbecco's modified Eagle's Medium（DMEM）、SHED-CM、BM-CM、あるいは既存薬剤で唯一膵β細胞増殖作用を持つ Exendin-4 を投与した。随時血糖と腹腔内グルコース負荷試験（IPGTT）を用いて耐糖能を比較検討し、単離膵臓インスリン含有量と病理学的解析によって膵β細胞への影響を評価した。*in vitro* 実験では SHED-CM によるマウス膵β細胞株（MIN6）の細胞死抑制効果を DAPI 染色、LDH assay と MTT assay を用いて評価した。さらに SHED-CM による MIN6 のグルコース応答性インスリン分泌能（GSIS）の改善効果も検討した。

## 〔結果〕

SHED-CM 群では他群に比べ、MLDS における随時血糖値と IPGTT において有意な血糖値改善効果と、インスリン分泌の有意な増加を認めた（Figure 1 B-E）。その効果は膵β細胞を完全に破壊した HD においても同様の効果が得られた（Figure 1 F, G）。単離膵臓の HE 染色における病理組織学的評価では、SHED-CM 群で STZ 投与による膵島の面積減少が抑制され、正常膵島に近い円形像を呈した（Figure 2A）。また単離膵臓のインスリン含有量は SHED-CM 群では他群に比べ有意に増加していた（Figure 2A）。さらに単離膵臓における免疫組織学的検討において、SHED-CM 群ではインスリン陽性細胞面積が有意に増加し（Figure 3）、それは Ki67 陽性細胞数増加から膵β細胞の増殖促進効果によるものと考えられた（Figure 4）。一方、MIN6 を用いた *in vitro* の検討で、SHED-CM 群では DAPI 陽性ネクロース細胞の有意な減少、LDH 値の低下、MTT 値の上昇を認めた。これらの結果より SHED-CM は直接的に膵β細胞に働きかけ、STZ 刺激による細胞生存率の低下を抑制した（Figure 5 A-C）。

さらに SHED-CM は STZ により低下した GSIS を増強させた (Figure 5 D)。これら抗糖尿病効果に関して、SHED-CM は他の治療群より有意な改善効果を示した。

#### 〔考察〕

本研究において、SHED-CM は STZ 誘発糖尿病マウス対し膵β細胞保護を介した耐糖能改善効果を示した。SHED-CM は膵β細胞へ直接的に働き、膵β細胞の抗細胞死効果およびグルコース応答性インスリン分泌能を増強することが示された。

SHED-CM は、他の幹細胞分泌因子である BM-CM より高い耐糖能改善効果を有した。SHED は外胚葉由来である神経堤由来の幹細胞であり、内胚葉由来である膵β細胞と発生機序は異なるが、膵β細胞と神経細胞は転写因子や分泌などの細胞機能など多くの共通点を有するため高い耐糖能改善効果を示したと考えられる。

また既報において、歯髄幹細胞 CM が含有する VEGF やその PI3K 活性化効果が血管新生を促進することが知られている。VEGF は膵β細胞の発生や増殖に重要であり、また PI3K の活性化は膵β細胞の細胞死を抑制し増殖を促進させるため、これら分泌因子やシグナル制御メカニズムを介して SHED-CM は耐糖能を改善したのかもしれない。

さらに予備実験において SHED-CM 由来の Exosome、あるいは SHED-CM 中の分子量 100kDa 以上の分泌タンパクが抗細胞死及び GSIS 増強に重要であることが明らかとなっている (Supplemental Figure)。今後更なる SHED-CM の耐糖能改善因子の同定およびその治療メカニズムの解明が重要と考える。

#### 〔結語〕

STZ 誘発糖尿病モデルマウスに対する SHED-CM の投与は、直接的な膵β細胞の抗細胞死作用とインスリン分泌能改善作用により耐糖能改善効果を示した。それらの効果は BM-CM や Exendin-4 と比べより強力であり、SHED-CM は膵β細胞保護効果を基盤とした新規糖尿病治療薬となる可能性が示唆された。