

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：32667

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24106

研究課題名(和文)医療応用を目指した歯髄幹細胞の基礎研究

研究課題名(英文)Basic research on dental pulp stem cells for medical applications

研究代表者

原 基(Hara, Hajime)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・助教

研究者番号：90845281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：抜去歯の歯髄細胞を培養し多角形の肝細胞の形態に類似した細胞に分化させた(Hepatocyte-like cell:HLCs)。この細胞はアルブミンを産生し、アンモニアを尿素に転換し、肝細胞特異的転写因子HNF-4の発現を認めた。肝障害ラットの尾静脈からHLCsを投与すると肝障害の程度が抑制された。次に、門脈内または尾静脈にHLCsを投与した場合、門脈からでは短時間のみ肝臓からHLCsが検出された。尾静脈からでは多くのHLCsが肺から検出された。このHLCsが何らかの因子を産生して、免疫抑制効果や細胞増殖効果を発揮し病態改善に関与する可能性を示した。(Paracrine効果)

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の歯髄の幹細胞は骨髄の幹細胞と同程度の増殖力と分化能をもっている。更に幼児期の抜け落ちた乳歯や抜歯した親知らずなどからとることが出来るため、費用や刺激が少なく特に優れた細胞資源である。日本歯科大学ではこの歯髄細胞を保管し細胞資源として活用する『歯の細胞バンク』の運用を行っている。この実験の学術的意義は、歯髄細胞の分化の多様性と肝細胞様に分化した細胞が肝機能の性質を持つことが示されたことである。この実験の社会的意義は、この細胞を使用して、将来病気になった時に使用する薬の副作用や毒性を確認するためのテラーメイド細胞資源としての有用性を示す第一歩となったと考える。

研究成果の概要(英文)：Dental pulp - derived mesenchymal stem cells from extracted teeth were cultured and differentiated into polygonal hepatocyte-like cells (Hepatocyte-like cells: HLCs). These cells produced albumin, converted ammonia to urea, and expressed the hepatocyte-specific transcription factor HNF-4. Administration of HLCs through the tail vein of hepatotoxic rats suppressed the degree of hepatotoxicity. Then, when HLCs were administered into the portal vein or tail vein, HLCs were detected in the liver only for a short time in the portal vein. In the tail vein, most of HLCs were detected in the lungs. This suggests that HLCs may be involved in the improvement of the disease state by producing some factors and exerting immunosuppressive and proliferative effects.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：歯髄細胞 間葉系幹細胞 肝細胞 歯の細胞バンク 再生医療 劇症肝炎

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は iPS 細胞や ES 細胞のほかにも元々体にある組織幹細胞がある。組織の間葉系幹細胞は多くの細胞に分化する有力な再生医療の細胞資源である。歯の歯髄の幹細胞は骨髄の幹細胞と同程度の増殖力と分化能をもっている。更に幼児期の自然脱落歯や抜去智歯から得られるため、費用や侵襲性の少なさにおいて特に優れた細胞資源である。申請者の所属する日本歯科大学では 2015 年より歯髄のバンク事業がスタートしており、再生医療の実現に向けた基礎的研究が開始されている。

本研究は、歯髄間葉系幹細胞から分化させた肝形質を有する細胞を用いて、将来疾患に罹患した時に用いる薬剤の副作用や毒性スクリーニングのためのテラーメイド細胞資源としての有用性の確立に向けた基礎研究を行う。

本課題の学問的価値は歯髄間葉系幹細胞が肝形質を有する細胞に分化するという、歯科と医科を横断する研究対象の新規性にある。臨床上の特徴は、脱落歯や抜去歯を再利用し、更にテラーメイド再生医療の実用化に向けた基礎データを蓄積することにある。

2. 研究の目的

本研究では、歯髄間葉系幹細胞を肝細胞に分化させ、この細胞の肝機能の有無を検討することを目的とした。この細胞が肝細胞としての機能を有しているのかを検討する。さらに、ラット劇症肝炎モデルにこの細胞を投与することで肝障害を改善し、生存率を向上させることができるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 歯髄間葉系幹細胞から分化させた肝細胞様細胞の機能解析

この細胞のグルコース消費能を検討するため、PAS (Periodic Acid-Schiff) 染色を行い、細胞のグリコーゲン蓄積を検討する。この細胞の尿素サイクルの存在を検討するため、培養液中の尿素を加え (5mmol/L NH₄Cl)、24 時間暴露した後の培養液中の尿素濃度の変化を測定し、尿素生成の時間経過を検討する。

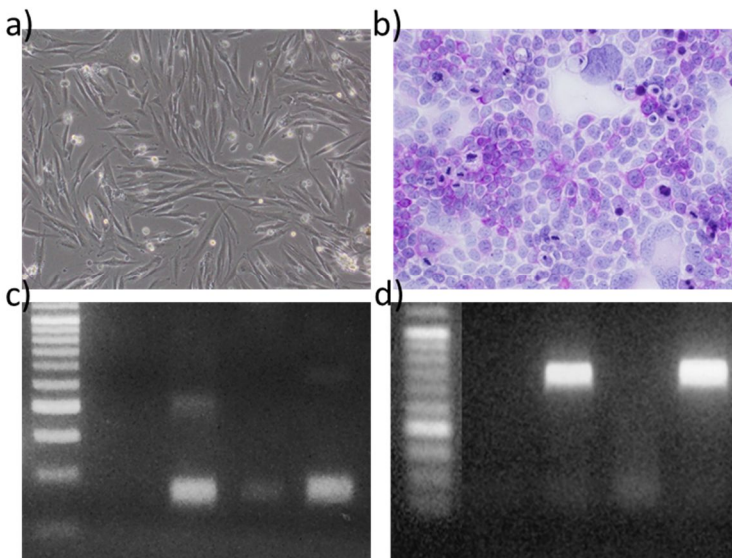
(2) 歯髄間葉系幹細胞から分化させた肝細胞様細胞の転写因子解析

歯髄間葉系幹細胞から分化させた肝細胞様細胞はどのような肝細胞に特異的な因子が作用しているのかを RT-PCR を用いて検討する。(Albumin、HNF4)

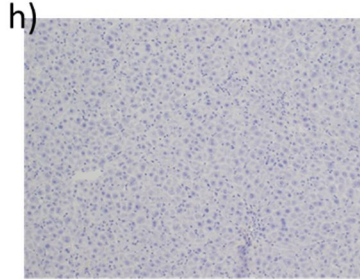
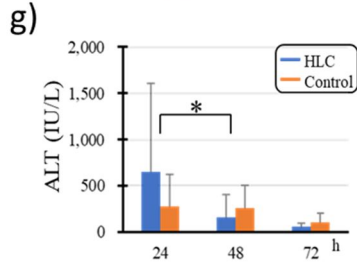
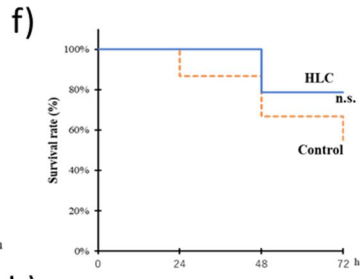
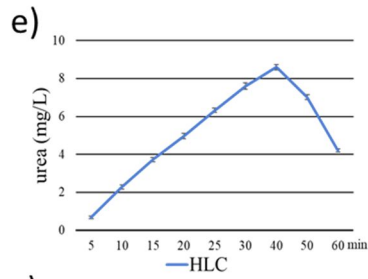
(3) 歯髄間葉系幹細胞から分化させた肝細胞様細胞の機能解析

4 週齢の雄性 SD ラットに Concanavalin A + D-Galactosamine を投与し肝障害モデルを作成する。歯髄間葉系幹細胞から分化させた肝細胞様細胞をこのモデルラットの尾静脈から投与し、培養上清のみを投与したコントロール群と比較して 72 時間までの生存率に差が出るのかを検討する。また、肝障害の改善効果を細胞投与後 24 時間、48 時間、72 時間で採血し肝機能の状態の変化を検討する。(AST、ALT、LDH、T-Bil)次に、細胞を投与した群のラット肝にどの程度の細胞が生着しているのかをヒトミトコンドリア特異抗体を用いて免疫組織化学染色で検討する。

4. 研究成果



抜去歯の歯髄を Collagenase 処理した後に細胞培養へと移行させた。その後 Friedenstein 法(薄播き法)によって、最も増殖能の高いコロニーを選択した。紡錘形の形をした MSCs(図 a)を更に Activin A、FGF 存在下で培養すると、コロニーは内胚葉性細胞に分化した。その後、HGF を加えて培養すると多角形の肝細胞様細胞 (Hepatocyte-like cell: HLCs) に分化した。この細胞は PAS 染色で細胞内にグリコーゲン陽性を示した。(図 b)この細胞は RT-PCR によってアルブミンや肝細胞特異的転写因子である HNF-4 の発現が確認された。(図 c, d)



また、この細胞の培養上清にアンモニアを加えると、代謝された尿素の濃度が一定レベルまで上昇した。(図 e)

ラットに Concanavalin A + D-Galactosamine を投与し作成した肝障害モデルに、HLCs とコントロール培養上清を尾静脈から投与して生存率を比較した。生存率解析では、対照群と実験群で差は認めなかった(図 f)が、細胞投与群で肝機能の改善率が上昇していた。(p<0.05)

(図 g)72 時間後に採取した実験群の肝臓からは HLCs は検出されなかった。(図 h)このことから、投与した HLCs は免疫抑制効果や細胞増殖効果を発揮

し病態改善に関与する可能性を示した (Paracrine 効果)。(J. *Hard Tissue Biology* 29. 2020)

申請者は、次に門脈内または尾静脈に HLCs を投与した場合、門脈からでは短時間のみ肝臓から HLCs が検出された。尾静脈からでは多くの HLCs が肺から検出された。また、肝の障害の有無により投与した HLCs の生着率に差が生じ、肝障害時の方が HLCs は長期にわたり生存していた。

今後はどのような因子により免疫抑制効果や細胞増殖効果を発揮するのか、肝障害によりどのように生着率が增強していくのかを検討していきたいと考える。

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 Hara Hajime, Sano Kimito, Ishikawa Hiroshi, Ohkoshi Shogo	4. 巻 29
2. 論文標題 Differentiation of Dental Pulp-Derived MSCs into Hepatocyte-Like Cells and Their Therapeutic Use for Chemical Liver Injuries of Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 215 ~ 222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2485/jhtb.29.215	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0件

〔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
---------	---------