

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10019

研究課題名(和文) バンク事業の進む歯髄幹細胞の臨床応用に向けたメッセージの発信

研究課題名(英文) Dissemination of messages for clinical application of dental pulp stem cells that have been stored in cell bank.

研究代表者

大越 章吾 (Ohkoshi, Shogo)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授

研究者番号：70231199

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)：申請者は歯髄MSC由来肝細胞(Human Hepatocyte-Like Cell: HLC)による肝炎改善効果の機序を解明するため、ヒト細胞1個をラット細胞100万個内に検出する高感度の検出系を確立することができた。それを用いて解析した結果、肝に直接HLCを投与しても細胞生存率は極めて低いことが判明した。次に肝炎ラットの尾静脈にHLCを投与した結果、HLCの生存は、肝炎肝で正常肝に比して有意な定着の促進効果は認められなかった。この結果より、歯髄MSCの肝障害抑制効果は免疫調節効果が主であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は現在日本歯科大学で運用されている「歯の細胞バンク」の臨床応用に向けた基礎研究の1つである。歯髄間葉系幹細胞は多様な細胞に分化し、組織損傷の修復を目指した臨床応用に利用できる。本研究はこの細胞が肝細胞類似細胞に分化できることから、体内生着率をラットの肝炎モデルによって解析したものである。その目的で我々はヒトのmRNAを特異的に認識できるプライマーを用い、肝炎モデルにおいて細胞生着を動的に解析した。この研究結果より肝炎の治療効果は歯髄細胞の免疫抑制作用によるものであることが判明し、細胞バンクの臨床応用に向けた道筋の一助となった。

研究成果の概要(英文)：We established a highly sensitive real-time PCR system that was able to detect at least one human cell in about one million rat cells. Using this experimental system, we found that survival rate of human hepatocyte-like cell (HLC) which were derived from dental-pulp mesenchymal stem cells was quite low when transfused via portal or tail veins of rats. Survival rate of HLCs was not accelerated even animals were suffered with severe chemical hepatitis for which we previously showed that HLC infusion improved the severeness of liver injury. With the results of these experiments, we found that suppressive effects on liver injury of HLC for severe hepatitis was possibly caused by immune modulating effects of HLCs, not by direct engrafting effects of mesenchymal stem cells.

研究分野：再生医療

キーワード：歯髄幹細胞 肝細胞 ヒトmRNA特異的PCR 肝炎 細胞生着率 免疫調節効果 歯の細胞バンク 再生医療

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

様々な組織に存在する間葉系幹細胞(MSC)は iPS 細胞や ES 細胞と並んで、有力な再生医療の再生資源である。MSC は、iPS 細胞のように外からの遺伝子導入を必要としないため、腫瘍原性が少なく、より安全性に優れている。また、ES 細胞のように胚細胞を使用しないため、倫理面の問題が少ないなどの利点がある。

歯関連組織における間葉系幹細胞の研究は、2000 年の歯髄中に多能性幹細胞が存在する報告に端を発する。

申請者らは、歯髄 MSC が肝細胞の形態を有し、アルブミン産生能、アンモニア代謝能、肝細胞特異的な転写因子の HNF-4 を特異的に発現する細胞に分化することを示した。また、ラットの肝障害モデルに細胞投与を行うと肝障害の程度が改善した (*J Hard Tissue Biol*, 29 215-22, 2020.)。これらの研究によって、歯髄 MSC が肝細胞の形質を有する細胞に分化し、肝炎を改善することが明らかになった。また、今後、現在既に事業化されている歯の細胞バンクを利用して、細胞を医療に応用できる道筋の一つが視界に入ってきた。

本研究の学術的問いは、歯髄 MSC に重症肝炎の治療効果があるのなら、それはどのような機序によるのか？細胞が分泌する Cytokine などによる Paracrine 抗炎症作用が主体なのか？細胞自体が肝に生存して組織修復を行う作用が主体なのか？であった。

歯髄 MSC には骨髄 MSC に比してより高い分化能、増殖能があるという報告がある。更に歯髄 MSC は特に臓器への Homing 機能に優れているのか、特定の Cytokine や Chemokine を誘導しやすいのかなどの優れた特徴があるのであろうか？それが明らかになればバンク化された歯髄細胞が再生医療資源としてどのような効果を発揮し、どのような疾患に有用なのかという臨床応用のメッセージを発信できると考えた。

2. 研究の目的

研究の目的は歯髄MSCから分化させた肝細胞の抗炎症効果と組織修復効果の機序を詳細に検討し、同細胞資源が有する生物学的特質を明確にすることであった。同時に、難治性肝疾患の再生医療細胞資源としての有用性を検証し、既に運用されている“歯の細胞バンク”の臨床応用に備えたメッセージ発信を行う、ということを目指した。

これまでに基礎と臨床の両面から研究されてきた MSC は骨髄、脂肪組織、胎盤由来のものであり、歯髄はじめ歯関連組織由来の MSC に着目したものは極めて少ない。しかし、歯髄は抜去歯などから容易に得ることができる点から、骨髄などよりも遥かに利便性の高い細胞源であり、“組織再利用”のコンセプトに基づくことに学術的独自性がある。しかも申請者の所属する日本歯科大は既に歯の細胞バンクを運用しており(同バンクは本学を含めて2つのみ)、将来の臨床応用に向けた基盤は完備している。

3. 研究の方法

ラットのDNAからヒトDNAを特異的に検出するReal-Time PCRによって障害肝における歯髄MSC由来肝細胞の細胞生存曲線を明らかにする。

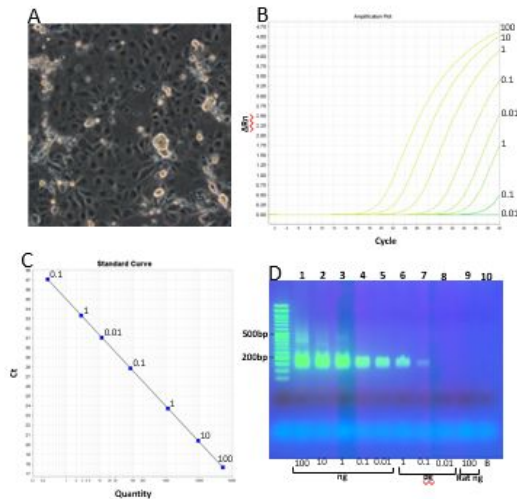
申請者らはラット DNA からヒト DNA を特異的に検出する GAPDH の PCR Primer 配列を見出し、ラット組織中にヒトの細胞 DNA を検出する系を確立した。これによってラットに移入したヒトの細胞の動態を定量的に知ることが出来る。さらにまず免疫不全ラットを用い歯髄 MSC 由来肝細胞の尾静脈経由投与と直接経門脈投与方法を比較し、投与方法によってどの程度細胞の Homing 効果が異なるのか明らかにし、また、骨髄 MSC 由来肝細胞との Cell Survival の比較を定量的に行った。

また、一般的に組織障害が強い時に移入幹細胞の臓器特異的 Homing が増強することが知られている。これを検証するため、D-galactosamine と Concanavalin A 投与を行って作製した肝炎ラットにおける肝細胞障害の程度による歯髄 MSC 肝細胞の生存延長との関連性を明らかにすることを試みた。また、ヒトミトコンドリア特異的抗体を用いた免疫組織染色によって移入した歯髄 MSC が実際に肝形質を有したまま検出されるか否かを検証した。

4. 研究成果

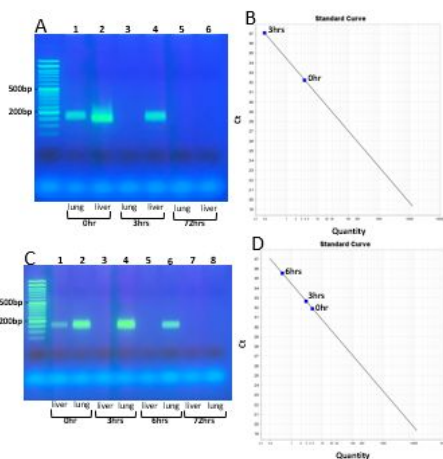
申請者は歯髄 MSC 由来肝細胞 (Human Hepatocyte-Like Cell: HLC) による肝炎改善効果の機序を解明するため、まずヒト細胞のラット体内での生着動態の解析を試みた。ラット RNA 内にヒト mRNA を特異的に検出する PCR によって移入 MSC の動態解析でヒト細胞 1 個をラット細胞 100 万個内に検出する高感度の検出系を確立することができた (Fig.1)。

Figure 1.



申請者らは次に HLC を開腹下ヌードラットの門脈に投与した結果、約 3 時間で細胞量は 1/50 に減少することが示された。つまり肝に直接投与しても細胞生存率は極めて低いことが判明した。一方、HLC を尾静脈投与した場合、多くの HLC は肺から検出されたがその量は 6 時間後に約 10% に減少していた (Fig.2)。

Figure 2.



次にヌードラットに D-galactosamine と Concanavalin A 投与を行って作製した肝炎ラットの尾静脈に HLC を投与して、同様に HLC の細胞動態を検討した。結果、HLC の生存は、肝炎肝で正常肝に比して有意に定着が促進されるということは見いだせなかった。またヒト抗ミトコンドリア抗体を用いた免疫組織染色においても肝内に HLC の存在は確認できなかった。しかし、肝炎ラットでは 24 時間後の肺における HLC の検出割合は、肝障害ラットで正常ラットより有意に高かった ($p < 0.05$)。この結果より、歯髄 MSC の障害肝への定着率は極めて低いため、効果は免疫調節効果が主であること、また肝障害ラットでは MSC が肺などの遠隔臓器に長期存在し、Paracrine 的に肝障害の改善を引き起こす可能性を示すことができた。このように申請者らは細胞培養、動物実験などの基礎研究によって、当初の目的通り歯の細胞バンクの臨床応用に向けた基礎研究を進展させることができたと考えている。

本研究に関連した研究成果と基礎的実験に従事した研究業績を以下に示す。

Differentiation of dental pulp-derived MSCs into hepatocyte-like cells and their therapeutic use. Hara H, Ishikawa H, Ohkoshi S. *J Hard Tissue Biol*, 29 215-22, 2020.
 Detection and quantification of human-specific mRNA from hepatocyte-like cells derived from dental-pulp. Shimamura N, Ohkoshi S, et al. *J Oral Biosci*.63 298-305 2021

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Shimamura N, Fujii K, Ohkoshi S	4. 巻 63
2. 論文標題 Detection and quantification of human-specific mRNA from hepatocyte-like cells derived from dental pulp using real-time polymerase chain reaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Oral Biosci .	6. 最初と最後の頁 298-305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2021.07.005.	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 -

1. 著者名 Hara H,Sano K, Ishikawa H, Ohkoshi S	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
研究分担者	中原 貴 (Nakahara Taka) (10366768)	日本歯科大学・生命歯学部・教授 (32667)	
研究分担者	石川 博 (Ishikawa Hiroshi) (30089784)	筑波大学・医学医療系・研究員 (12102)	

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
---------	---------