

1. 研究開始当初の背景

再生医療幹細胞には胚性幹細胞（ES 細胞）、体性幹細胞、そして多能性幹細胞（iPS）の3種類がある。しかし体性幹細胞で、僅かに臨床応用されているだけだ。臨床応用が遅れている理由として、表1に示す問題が挙げられる。

表1、幹細胞臨床応用の問題点

A. 胚性幹細胞(ES 細胞)の場合

1. 生命倫理を大きく侵害する。
2. 動物実験の範囲にしか留まれない。

B. 体性幹細胞の場合

1. 分化誘導が容易ではない
2. 体性幹細胞の供給源に限られる
3. 得られる幹細胞数が限られる
4. 継代培養では自然分化し幹細胞機能を失う
5. 各個体から幹細胞を採取し細胞株化が必要
6. 5に示す細胞株化を安全に行うのは不可能
7. 奇形腫を作る可能性がある

C. 多能性幹細胞(iPS)の場合

1. 臨床応用は、創薬、薬剤選択などに留まる
2. 臓器を再生しても悪性化する可能性が高い
3. 奇形腫を作る可能性が極めて高い
4. クローン体作製が可能で倫理管理が難しい
5. 分化誘導が体性幹細胞以上に難しい
6. 再生医療応用は近未来では不可能

研究開始当初は、ヒト iPS 作製に日本中が、まだ沸いていた頃である。iPS は、作製した山中伸弥氏自身が述べるように、難病の病態解明、新薬創生などに非常に適しており医学が一挙に進歩する可能性が高い。しかし、我が国では iPS 細胞が再生医療に大いに適しているとして過大評価を受け iPS 一辺倒であった。現実的に、欧米では、再生医療への期待は、胚性幹細胞・体性幹細胞のほうがはるかに高い。これらの研究は欧米で大きく進んでいる。iPS 再生医療実現には乗り越えるべき課題も少なくない。例えば、ES 細胞と同じ重大な倫理問題があることは、既に世界で周知の事実となっている。一方、体性幹細胞は、上記の問題をほとんどクリアし、多くの臓器細胞分化にも成功している。初歩的な体性幹細胞の心臓移植などは、既に臨床応用されているが、in vitro で分化させ移植

するという更に安全なプロトコルは確立するには至らなかった。申請者らは世界で初めて歯髄幹細胞には、多分化能がある事を報告した。(Ishkitiev et al. J Endod 36:469-474, 2010, Hirata et al., J Endod 36:1139-1144, 2010) すなわち、各種臓器の幹細胞/progenitor を意味する種々のマーカー；CD117、nanog、nestin、CD44H、Alkaline Phosphatase、Oct3/4、CK19、CK18、Osteonectin、p63 他に陽性であった。歯髄の幹細胞は「全細胞の1%」と信じられてきたが、歯髄細胞の80%が nanog に陽性で、50%が CD117 に陽性、75%が oct 3/4 に陽性で、歯髄 Primary Culture の平均60%以上が幹細胞であった。そのうえ、これらのほぼ全てが肝臓様細胞に分化しており幹細胞であることを証明した。一方、幹細胞を再生医療に利用するには継代培養の必要がある。しかし4代ぐらいから自然分化が始まり幹細胞機能を失う。市販の幹細胞でも12代が限度である。ところが申請者は、幹細胞を準株化する技術を開発し、歯髄からの臓器再生の可能性が示唆された。

2. 研究の目的

幹細胞による再生医療が普及しないのは、移植に十分な幹細胞数・分化細胞数の確保が難しい点が一因である。すなわち本研究では、ヒト治療に必要な肝臓様細胞 $1 \times 10^8-9$ 個の確保も3-5週間で可能であり、歯髄による再生医学が具現化できる可能性が高い。歯髄から幹細胞株を作成する。次に、申請者が開発した、あるいは新たに開発する分化法を用いて、移植レベルの成熟度を有する肝臓様細胞、膵臓様細胞を作製する。申請者らの既報に従い作製した無血清培養で作製した肝臓様細胞を移植実験を行う。作製過程では、必要に応じ progenitor を分離し、奇形腫・悪性化の完全予防法を確立する。また通常の培地はウシあるいは患者血清を用いるため、不顕性の為害作用発現の可能性もある。一方、申請者らは歯髄幹細胞の分化に適した安全性の高い無血清培地を既に開発しており、これを用い、幹細胞移植後の強い副

作用の防止対策とする。最終的には、臨床で汎用されるカテーテルを移植手技と想定して、門脈を介しスードラット肝臓に移植し臨床効果と安全性を判定する。さらにラットに肝硬変を作製し治療効果を判定する。

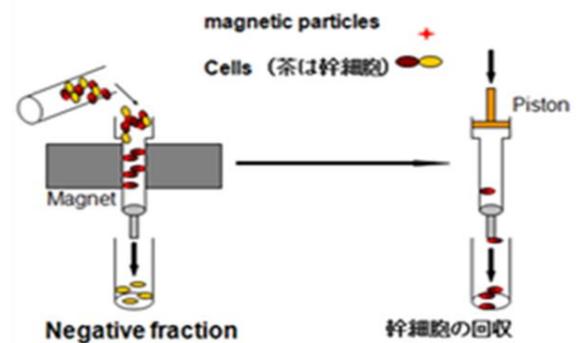
患者自身の歯髄を幹細胞源とする倫理的に問題のない再生医療確立も本研究の目的とする。肝臓では、危険な生体肝移植に取って代わる再生医療を目指す。ところが一方、Primary Levelでの幹細胞再生医療の普及は不可能だ。しかし公衆衛生学・社会医学的見地からすれば、新医療技術は大いに普及させるべきで、可能な限りの普遍化が必須である。本申請は「歯髄を使い、遺伝子操作もなく安全で容易な医療技術」であり、容易な手技を開発し、「社会医学的に普遍化可能な再生医療の開発」が本研究最大の目的となる。すなわち、国民のQOLの向上のために貢献する。一方、歯が（歯髄が）ヒトの命を救うとすれば、歯科保健医療への国民の価値観は飛躍的に向上して、オーラルヘルスプロモーションも進み、高い口腔保健思想の下、予防のため歯科を定期受診する者が増えと期待される。すなわち公衆衛生に寄与しながら、歯科界の発展につながる理想的な strategy を描くことができる。

3. 研究の方法

(1) 歯髄幹細胞 primary culture の確立
智歯の歯冠を切断する。歯冠・歯根部の歯髄、乳歯は歯冠部歯髄を採取し、4 mg/ml collagenase type I (和光純薬、大阪)で1時間インキュベートする。その後、回収した細胞は 25 cm² フラスコの Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM)、10% FBS、1% Antibiotic-Antimycotic 中で培養する。90% confluency で3:1の比で、継代を続ける。3回継代したのち trypsinize し phosphate-buffered saline (PBS)中に 1×10^8 個の濃度で suspend する。細胞を CD117 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec Inc., Germany)でラベルし。懸濁

液を、MACS® Separator (Miltenyi Biotec Inc.)に固定したカラムを通過させる。すると CD117 陽性 (CD117(+))細胞はカラムに取り込まれるので、磁場を外して回収する (図1)。その結果、多分化能の高い幹細胞が回収できる。本方法では、通法と異なり、蛍光色素を使わないため、発癌などの原因となる DNA 損傷が一切なく安全性は極めて高い。継代の際は、4代ごとに本操作を繰り返し、未分化幹細胞株を維持する。たとえばヒトの肝臓移植では、最低 10^9 - 10^{10} 個必要となるが、幹細胞を大量に培養するには今までは、危険な遺伝子操作が必要であった。もちろん容易な操作でもない。一方、本法は極めて容易で遺伝子操作もなく将来の発癌の危険も無く安全なのが特色で、本研究の社会医学的な普遍性確立に繋がる。

図1 MACSによるCD117(+)幹細胞の精製



(2) 肝臓細胞様分化

無血清培地 (SFM) を DMEM、1% insulin-transferrin-selenium-X (Invitrogen)、100 mg/mL embryotrophic factor を用い作製する。CD117 (+)細胞を、再度 anti-c-Met あるいは delta-like (Dlk) を用い MACS® Separator で分画した後、申請者の原法に従い SFM にて培養する。70% confluency に達した後、20 ng/mL recombinant human hepatocyte growth factor を添加し5日間培養する。その後 10 ng/mL Oncostatin M、10 nmol/L dexamethasone、1% Insulin-Transferrin-Selenium-X を添加し15日間培養して肝臓様細胞を得る。

Anti-human serum albumin、anti- α -fetoprotein、anti-insulin-like growth factor 1、anti-hepatic nuclear factor 4 α を用い、DAB 法による免疫染色にて発現を確認する。これらの結果は Image/J (NIH, USA) で解析する。肝臓細胞の glycogen storage は Periodic acid-Schiff (PAS) staining にて確認し、尿素生成は Urea Assay Kit (フナコシ、東京) にて測定する。以上から、CD117(+)細胞からの肝臓幹細胞の精製には、anti-c-Met あるいは Dlk のいずれが適当かを決定する。

(3) 奇形種発生の有無の確認

上記の肝臓様細胞をそれぞれヌードラットの腹腔内に播種し 2 ヶ月後に、腫瘍発生の有無を確認し、発生があれば病理学的に検索し、予防策を講じる。

(4) 肝臓様細胞の免疫抑制ラットへの移植

5 匹のヌードマウスの肝臓を、門脈部を残し 9 割切除する。2 x 10⁶ 個/100 μ L HBSS の肝臓様細胞を、開腹下にて注射器にて肝臓および腹腔内移植を行う、その後 20 日飼育し、最終日には開腹・開胸し腫瘍形成が無いことを確かめたうえで、全血採血、肝臓・脾臓組織標本を得て、血液学的・病理学的検討を行い肝細胞として機能するか確かめる。対照の 5 匹は同様に各臓器をバイオプシーし病理学的精査を行う。Anti-human serum albumin、anti-human α -fetoprotein、anti-human insulin-like growth factor 1、anti-human hepatic nuclear factor 4 α を用い、免疫染色にて発現を確認する。これらの結果は Image/J で解析する。肝臓細胞の特徴である glycogen storage は Periodic acid-Schiff (PAS) staining にて行う。また組織学的には小葉形成、胆管形成、胆汁生成も確認する。

(5) 肝臓様細胞の肝硬変ヌードラットへの移植

18 匹のヌードマウスの肝臓のうち 12 匹を開腹して胆管を結紮する。2 x 10⁶ 個の肝臓様細胞を、開腹下にて注射器にて門脈および脾臓に移植を行う。残り 6 匹には 100 μ L HBSS のみ脾臓に注入する。無処置ラットはネガティブコントロールと

する。60 日後すべてのラットを安楽死させ、全血採血、肝臓・脾臓組織標本を得て、血液学的・病理学的検討を行い肝細胞として機能するか確かめる。対照の 5 匹は同様に各臓器をバイオプシーし病理学的精査を行う。Anti-human serum albumin、anti-human α -fetoprotein、anti-human insulin-like growth factor 1、anti-human hepatic nuclear factor 4 α を用い、免疫染色にて発現を確認する。これらの結果は Image/J で解析する。肝臓細胞の特徴である glycogen storage は Periodic acid-Schiff (PAS) staining にて行う。また組織学的には小葉形成、胆管形成、胆汁生成も確認する。

(6) 膵臓様分化

CD117 分画が 70%コンフルエントになったら培地に 20 ng/ml HGF (R&D Systems Inc., MN, USA)、10 ng/ml aFGF (Biomedical Technologies Inc., MA, USA) を 5 日間添加する。そして、20 ng/ml EGF (R&D Systems Inc.) と 100 μ M b-mercaptoethanol (Invitrogen) を 7 日間追加する。最後に 20 ng/ml HGF, 10 mM nicotinamide (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan) と 100 μ g/ml embryotrophic factor 添加 DMEM にて 5 日間分化を行う。

(7) 膵臓様分化と Real-time RT-PCR

以下の primer について増幅を行い検出した：PDX1 (Hs.32938), HHEX(Hs.118651), MNX1 (Hs.37035), NEUROG3(Hs.532682), NEUROD1 (Hs.574626), PAX4(Hs.129706), PAX6 (Hs.270303), NKX2-2(Hs.516922), NKX6-1 (Hs.546270), ISL1(Hs.505), PTF1A (Hs.351503), INS (Hs.272259), PPY (Hs.558368), SST (Hs.12409), GCG(Hs.516494) and eukaryotic 18S RNA. Real-time RT-PCR は StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) で行い、The Ct data は RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5(Qiagen) で分析し相対値を求めた。

4. 研究成果

(1) 歯髄幹細胞と肝細胞分化

Adult dental pulp stem cells (DPSCs) と human exfoliating teeth (SHED)の幹細胞マーカーとくに胚性幹細胞マーカー Oct3/4, nanog そして未分化マーカー nestin が、DPSC と SHED の両方で発現しており多能性が示唆される。DPSC (SHED の呼称を変える) と WPSC(DPSC の呼称を変える)から分化せしめた肝臓様細胞と肝臓マーカーを免疫染色にて確認した。 Insulin-like growth factor-I, Hepatic nuclear factor-4 α 、Carbamoyl phosphate syntetase - 1, α -Fetoprotein,

Albumin, Glycogen に全て陽性であった。 Insulin-like growth factor-I, Hepatic nuclear factor-4 α 、Carbamoyl phosphate syntetase - 1, α -Fetoprotein, Albumin 発現細胞の Flow cytometry 結果を図2に示した。

DPSC の方が、WPSC に比べ全ての発現が強く、Alb では 90%に及ぶ。鏡見すると 100%が陽性であった。すなわち、乳歯歯髄の方が再生医療には適していると結論した。

肝硬変モデルヌードラットに、上記再生肝を移植した結果を図3・4に示す。胆汁性肝硬変モデルにヒト歯髄から再生した肝臓を移植したところ、肝硬変に特徴的な、線維性組織に囲まれた分葉構造が、完全に喪失した。

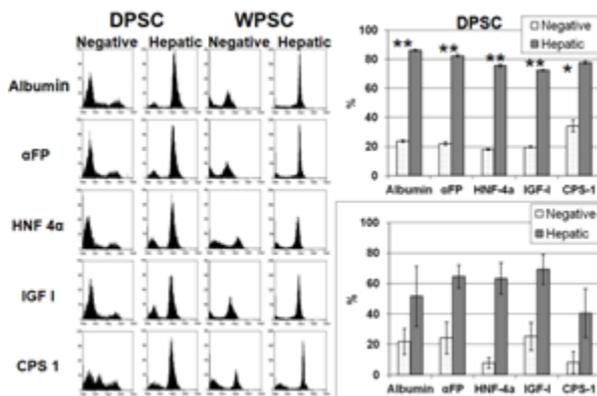


図2 肝臓様細胞の Flow cytometry の結果

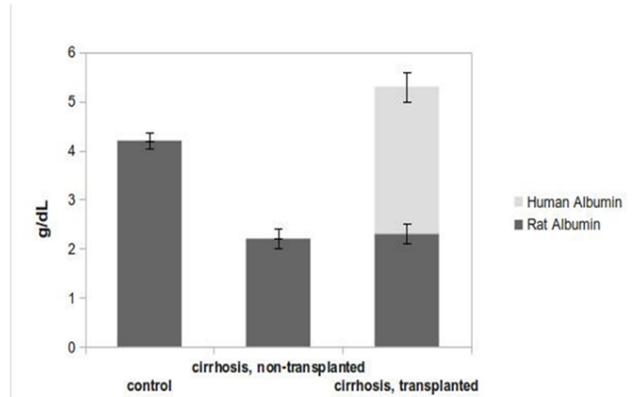


図3 血中アルブミンは肝硬変で半分以下になったが、ヒト歯髄からの肝臓移植で、ヒトアルブミンが劇的に増加した。

考察と結論

ヒト歯髄から肝臓再生に初めて成功した。また、ラット 6 匹の肝硬変を治癒せしめる事に成功した。この結果は、より安全で確実な肝臓再生医療が間近にある事を示すものである。不治の肝疾患で死を待つものは乳児から高齢者まで無数に居る。官による、体性幹細胞再生医療の現実性・安全性の再認識と、科学の指導者たとえば科学研究費審査委員などの再生医学の現実直視を、多くの患者の生存の為に臨む。

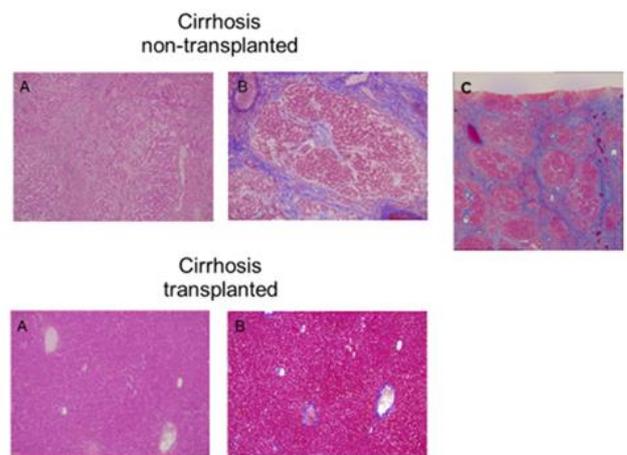


図4 胆汁性肝硬変モデルにヒト歯髄から再生した肝臓を移植した。線維性組織に囲まれた分葉構造が、完全に喪失した。

<引用文献>

Ishkitiev N, Yaegaki K, Calenic B, Nakahara T, Mitev V, Haapasalo M. Deciduous and Permanent Dental Pulp Mesenchymal Cells Acquire Hepatic Morphological and Functional Features in vitro. J Endod, 36:469-474, 2010

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Tanaka T, Fushimi N, Mitev V, Okada M, Tominaga N, Ono N, Ishikawa H. Novel management of acute or biliary conditions using hepatically-differentiated human dental pulp cells. Tissue Engineering part A 2015;21(3-4):586-93.

② Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Nakahara T, Mitev V, Ishikawa H, Haapasalo M. High-Purity Hepatic Lineage Differentiated From Dental Pulp Stem Cells in Serum-Free Medium. J Endod. 38: 475-480, 2011

[学会発表] (計 4 件)

① Ishkitiev N, Yaegaki K, Ishikawa H, Tominaga N, Imai T, Okada M, Transplantation of hepatic-like cells differentiated from human dental pulp cells JADR 59th Annual Meeting, Niigata, December 14-15, 2012

② Yaegaki K, Ishkitiev N, Kozhuharova A, Imai T. Pancreatic lineage differentiation of human dental pulp, The 10th International Society for Stem Cell Research, Yokohama,

Japan, June 13 - 16, 2012

③ Ishkitiev N, Yaegaki K, Ishikawa H, Tominaga N, Imai T. Hepatic Differentiation of human dental pulp stem cells: transplantation into rats with liver injury and cirrhosis, The 10th International Society for Stem Cell Research, Yokohama, Japan, June 13 - 16, 2012

④ Ishkitiev N, Yaegaki K, Ishikawa H, Liver regeneration using hepatic cells differentiated from human pulp cells, The 59 General Session of Japanese Association for Dental Research (IADR Japanese Branch), Hiroshima, Japan, October 22-23, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八重垣 健 (YAEGAKI, Ken)
日本歯科大学・生命歯学部・教授
研究者番号：40166468

(2) 研究分担者

中原 貴 (NAKAHARA, Taka)
日本歯科大学・生命歯学部・教授
研究者番号：10366768

石川 博 (ISHIKAWA, Hiroshi)
日本歯科大学・生命歯学部・教授
研究者番号：30089784