

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792042

研究課題名(和文) ヒト歯髄細胞からの機能性肝細胞の分化誘導と肝疾患モデルによる新規細胞医療法の開発

研究課題名(英文) Development of hepatocyte induction methods derived from dental pulp and cell transplantation therapy

研究代表者

富永 徳子 (Tominaga, Noriko)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：90546532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、子宮頸部扁平上皮癌(SKG)由来添加物であるembryotrophic factors(ETFs)を用いてヒト歯髄細胞から肝細胞の分化誘導をおこない、肝細胞を分離することを目的とする。また、樹立した歯髄由来肝細胞を、肝障害、肝硬変モデル動物に移植し肝機能を回復する新たな再生医療を創出する。初年度は、申請時に用いていたETFsに不活性化が認められたため、ETFsの作製をおこない、分化誘導法を検討した。また、樹立したヒト歯髄肝細胞を用いてSCIDマウスに移植し、移植後の細胞の局在を免疫染色を用いて検討した。

研究成果の概要(英文)：Embryotrophic factors (ETFs) derived from squamous cell carcinoma of the cervix (SKG2) were used to induce a hepatocyte population from dental pulp and we isolated. Our aim is to develop new regenerative medicines transplanting established hepatocytes into the damaged liver of animal models, such as into animals with cirrhosis of the liver, and then verifying the recovery of liver function. We used ETFs for hepatocyte induction, but the ETFs are inactivated prior to use, consequently, during the first year of the research project, we made ETFs collecting from SKG2 conditioned medium by culture in a serum-free medium. In addition, we transplanted hepatocytes from human dental pulp into SCID mice and observed the presence of hepatocytes after transplantation. Immunostaining of the transplanted hepatocytes showed that they expressed  $\alpha$ -fetoprotein and albumin, and contained human mitochondria. In addition, the hepatocytes did not become tumorous but did form clusters with the host cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯髄由来肝細胞 コロニアルクローニング 歯髄組織 fetoprotein albumin human mitochondria  
ETF SKG

## 1. 研究開始当初の背景

歯髄細胞には幹細胞が存在し、細胞移植による再生医療の細胞源として効果的な細胞の分化誘導法の研究が進められている。肝疾患に対する歯髄細胞を用いた再生の報告もある(Ikeda E et al. Differentiation. 2008; 76:495-505)。

Ishikitiev らは、磁気ビーズにより CD177 陽性細胞(幹細胞)を分離し、HGF などの誘導物質などを添加した培養液により、肝細胞へと分化誘導したことを報告している(Ishikitiev N et al. J Endod. 2010; 36(3):469-74)。しかし、この方法では培養下で誘導物質により刺激し続けなければ、細胞の形態が上皮細胞から線維芽細胞へと戻るため、肝細胞の特徴を維持できないと推察される。

別の報告で、子宮頸部扁平上皮癌細胞株の培養上清より抽出した embryotorophic factor(ETF)を用いて、マウス ES 細胞からテラトーム様組織を作製し、その中に肝臓原基の誘導に Ishiwata らは成功したと報告している(Ishiwata I et al. Hum Cell.2001; 14(4):283-291)。

このような背景から、ETF には、歯髄細胞を肝細胞へと分化させる物質が存在すると考え、本研究を立案した。

近年、マウス胎仔線維芽細胞に肝臓特異的遺伝子を形質導入することで肝細胞に転換させ、肝硬変モデルマウスに移植し肝機能と構造を再生させる研究報告がされた(Seiya S et al. Nnature. 2011; 475, 390-393)。遺伝子導入するためには、ウイルスをも用いており、この方法ではもともとの生体内にある細胞にも変異を起こさせる発癌遺伝子を活性化する危険生がある。また、現在、培養を行うにはウシ胎仔血清(FBS)が不可欠である。FBS は異種タンパクであり、未知のウイルスの存在する恐れがある。そのため、人工 ETF と無血清培

地を開発することは、未知のウイルスや免疫に問題のない安全な肝細胞を入手できると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、ヒト歯髄細胞から肝細胞を分離させる分化誘導培地の作製と、得られた肝細胞を肝障害または肝硬変モデル動物に移植し、肝機能の回復を図る新たな再生医療の創出を目的とする。本研究は、通常培養下で肝細胞の表現型を維持する増殖可能な肝細胞を樹立する培養技術を確立し、未知のウイルス、免疫、感染、生命倫理に問題のない細胞移植治療の開発を行う。

## 3. 研究の方法

### (1)歯髄由来肝細胞分離法の確立

ヒト抜去歯の歯間部をダイヤモンドディスクにより切断し歯髄組織を採取した。採取した歯髄組織は、カミソリメスにより細切し、15%FBS 含有 DMEM/F12(GM)を用いて 60mm シャーレにて静置培養を行った。歯髄細胞がサブコンフルエントに達した時点で、Trypsin-EDTA により細胞を分離し 24 ウェルプレートに播種した。播種直後より、ETF を添加して培養を行った。ETF 濃度は、1,2.5,5,10,15,20%で検討を行った。

### (2)ETF の再制作

これまで用いていた ETFs では、50%の誘導効率で歯髄細胞を肝細胞に分化させた。しかし、徐々に効果が減退したため新しい ETFs の作製を行った。

従来、ETFs は、SKG を Ham 's F-12 で培養した conditiond medium (CM) から作製されていたが、新しい ETFs の作製方法は、歯髄細胞を培養する GM の血清量から漸減し、無血清 DMEM/F12 にて培養可能な SKG -SF 細胞株を樹立した。次に、

培養上清を凍結乾燥させ、その粉末を PBS に溶解させた後、脱塩を行い、新しい ETFs の作製を行った。

### (3) 歯髄由来肝細胞の肝臓への移植

すでに樹立した誘導した肝細胞を用いて、肝臓への移植をおこなった。腹腔内麻酔下で、腹部正中を切開し、肝臓を傷つけないよう避けながら、脾臓に  $1 \times 10^6$  個の歯髄由来肝細胞を注入移植した。2 週間後、麻酔を過剰投与後、4%PFA にて灌流固定をおこない、肝臓、脾臓を採取した。

### (4) 移植後の評価

肝臓、脾臓を 4%PFA にて浸漬固定後、脱水をおこないパラフィン包埋をおこなった。5  $\mu$ m の切片を作製し、HE 染色、免疫染色を行った。移植した細胞が、肝細胞の表現型を維持していることを評価するため、免疫染色 (human- fetoprotein、albumin) を行った。また、移植細胞の局在を観察するため、ヒト特異的ミトコンドリア抗体を用いて免疫染色を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 歯髄由来肝細胞分離法の確立

培養液に添加する ETF の添加濃度を 1,2,5,10,15,20% で検討した。ETF の適正濃度が存在すると考えて実験を行ったが、歯髄由来肝細胞が観察されるウェルは濃度に依存しないことが確認された。今後は、さらに個体数を増やし検討する予定である。

### (2) ETFs の再制作

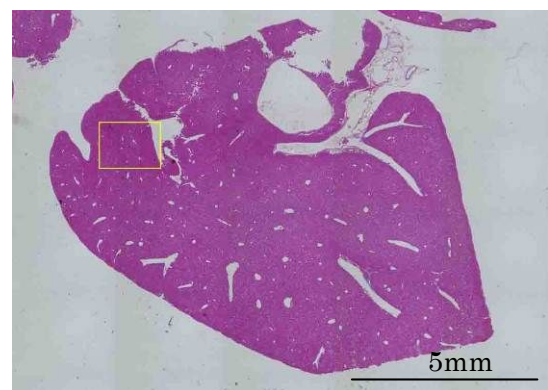
ETFs により誘導される肝細胞が減少したため、この原因を ETFs の活性の減退と考えた。そこで、新たに無血清培地で増殖可能な SKG -SF 細胞株を樹立した。無血清で培養可能になるまでおよそ半年を要した。無血清 DMEM/F12 培地を、培養 3 日

目の細胞から採取し凍結乾燥をおこなった。培養上清の粉末を Hanks's 液にて溶解し、本研究に用いた。

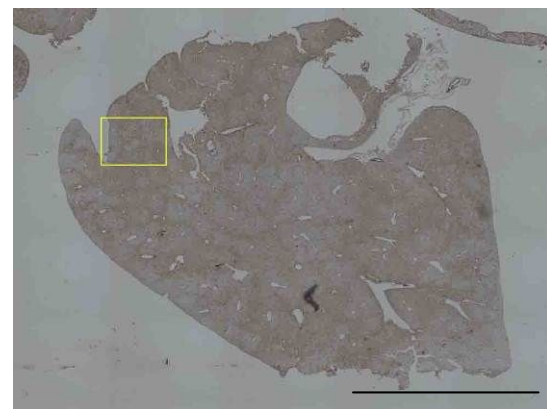
### (3) 歯髄由来肝細胞の SCID マウス肝臓への移植

肝臓の切片を作製後、HE 染色、免疫染色 (albumin,  $\alpha$ -fetoprotein) を行った。また、移植した細胞の局在を検証するため、ヒト特異的ミトコンドリア抗体を用いて染色を行った。

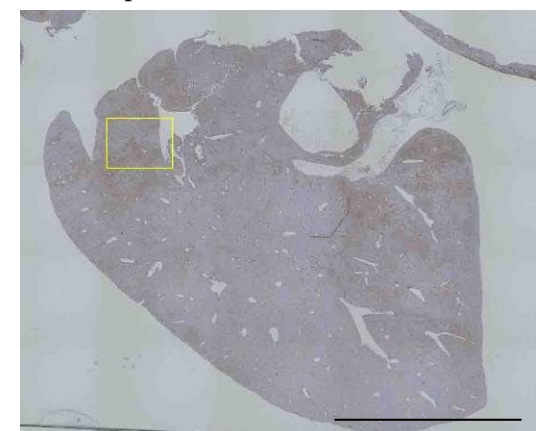
〔HE 染色〕



〔albumin〕

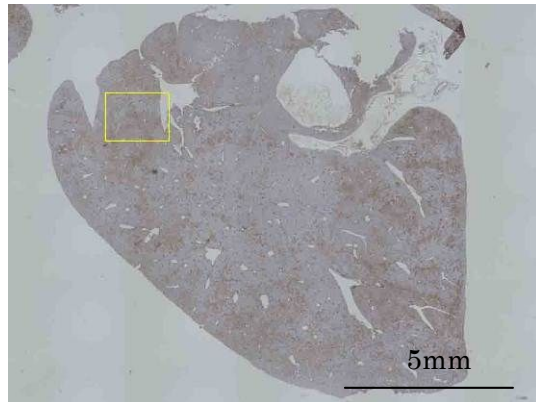


〔 $\alpha$ -fetoprotein〕

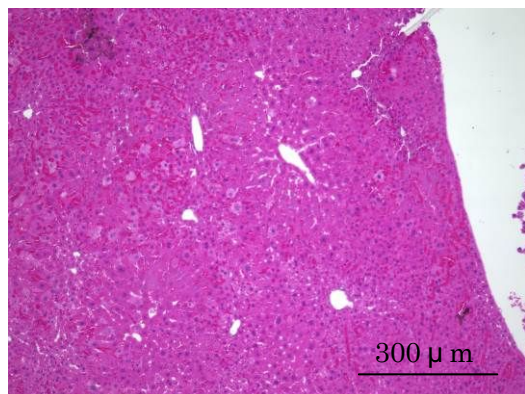




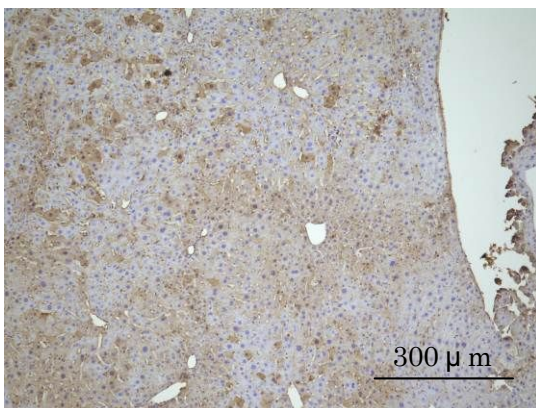
[ human mitochondoria ]



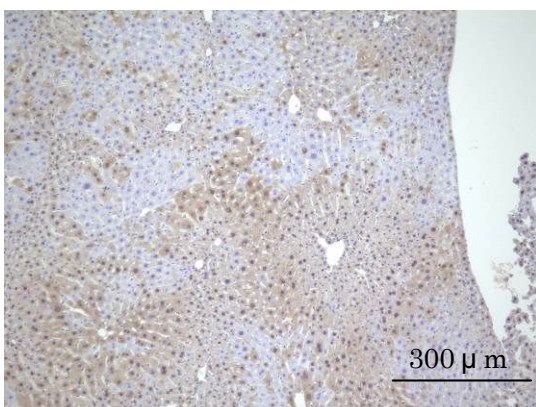
[ HE 染色 ]



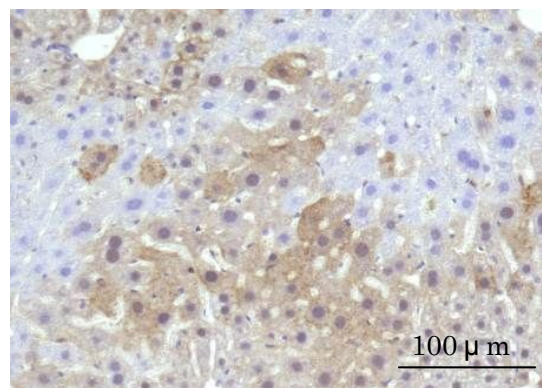
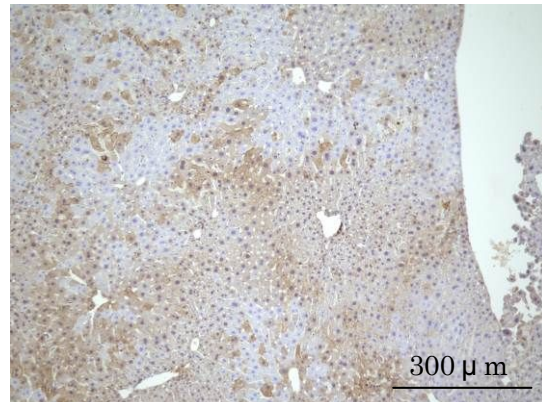
[ albumin ]



[ α-fetoprotein ]



[ human mitochondoria ]



HE 染色から、肝臓に正常構造を保ち、癒着は見られなかった。また、ヒト特異的 albumin, α-fetoprotein に陽性を示す細胞が散在し、マウス肝細胞と共に細胞束を形成している様子が観察された。この細胞は、human mitochondoria で陽性を示す細胞と分布パターンが一致すると考えられた。今後は、albumin, α-fetoprotein と human mitochondoria を共染色することにより、移植した細胞が albumin, α-fetoprotein を共発現することを証明する。また、ConA 投与による肝障害モデルマウスに移植し再生能を確認する。

##### 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 4 件 )

Tominaga N, Nakahara T, Nasu M, Satoh T. Isolation and characterization of

epithelial and myogenic cells by "fishing" for the morphologically distinct cell types in rat primary periodontal ligament cultures. *Differentiation*, 2013; volume 85 issue3, 91-100.

Nasu M, Nakahara T, Tominaga N, Tamaki Y, Ide Y, Tachibana T, Ishikawa H. Isolation and characterization of vascular endothelial cells derived from fetal tooth buds of miniature swine. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 2013; 49(3), 189-195.

Ide Y, Nakahara T, Nasu M, Matsunaga S, Iwanaga T, Tominaga N, Tamaki Y. Postnatal mandibular cheek tooth development in the miniature pig based on two-dimensional and three-dimensional X-ray analyses. *Anat Rec (Hoboken)*. 2013; 296(8), 1247-1254.

中原 貴, 富永徳子, 石川 博. ミニブタ胎仔乳臼歯の歯冠由来エナメル上皮細胞の分離培養と遺伝子発現の解析. *日本口腔外科学会雑誌*, 2013; 59, 266.

〔学会発表〕(計 12 件)

Tominaga N, Nakahara T: Periodontal ligament-derived skeletal muscle cells: isolation from primary whole-tooth cultures by using the "cell-fishing method", The 2nd Trilateral Dental Symposium on "Dental Virtual Education Today", The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo, Kudan hall, Tokyo, November 14, 2013.

富永徳子, 中原 貴, 石川 博: ラット臼歯歯根膜由来の初代培養および歯根膜由来骨格筋細胞群に幹細胞は存在するか?, 第 31 回日本ヒト細胞学会学術集会, 所沢市民文化センター「ミュージ」第 2 展示室, 所沢, 2013 年 8 月 10 日

Nakahara T, Tominaga N, Ishikawa H: Identification of putative stem cells in primary cultures derived from rat molar periodontal ligament and subcultures of myogenic-lineage committed cells, 11th Annual Meeting International Society for Stem Cell Research (ISSCR), Boston Convention and Exhibition Center, Boston, Massachusetts, USA, June 12-15, 2013.

中原 貴, 富永徳子, 石川 博: クラウン系ミニブタ胎仔の乳臼歯から分離培養したエナメル上皮細胞の遺伝子発現解, 第 57 回日本口腔外科学会総会・学術大会, パシフィコ横浜, 横浜, 2012 年 10 月 19 日 ~ 2012 年 10 月 21 日

井出吉昭, 中原 貴, 那須優則, 富永徳子, 田巻友一, 石川 博, マウス歯根形成機における頭部エックス線照射による障害歯根の形態およびヘルトヴィッヒ上皮鞘と周囲間葉の細胞動態の観察, 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 奥羽大学, 福島, 2012 年 09 月 14 日 ~ 2012 年 09 月 16 日

富永徳子, 中原 貴, 石川 博, ラット歯根膜から分離した筋細胞集団の解析, 第 10 回日本再生歯科医学会学術大会・総会, ニチイ学館神戸ポートアイランドセンター, 神戸, 2012 年 09 月 01 日 ~ 2012 年 09 月 02 日

中原 貴, 井出吉昭, 田巻友一, 富永徳子, 佐藤聡, 石川 博, 器官再生法で形成された歯根・歯周組織ユニットのマイクロCTを用いた三次元形態解析, 第 12 回日本抗加齢医学会総会, パシフィコ横浜会議センター, 横浜, 2012 年 06 月 22 日 ~ 2012 年 06 月 24 日

Tominaga N, Nakahara T, Ishikawa H, Isolation and characterization of neurons

and myogenic cells from rat molar periodontal ligament, 10th Annual Meeting International Society for Stem Cell Research (ISSCR), パシフィコ横浜、横浜, 2012 年 06 月 13 日 ~ 2012

年 06 月 16 日

中原 貴, 富永徳子, 石川 博, ミニブタ胎仔乳臼歯由来エナメル上皮細胞の分離と同定, 第 11 回日本再生医療学会, パシフィコ横浜、横浜, 2012 年 06 月 12 日 ~ 2012 年 06 月 14 日

大山晃弘, 井出吉昭, 田巻友一, 富永徳子, 中原貴, 立花利公, 渡邊美隆, 栗原邦弘, 石川 博, 再生医療のための骨組織形成—ヒト脂肪組織由来幹細胞を細胞源として—, 第 11 回日本再生医療学会, パシフィコ横浜、横浜, 2012 年 06 月 12 日 ~ 2012 年 06 月 14 日

大山晃弘, 井出吉昭, Tansriratanawong Kallapat, 田巻友一, 富永徳子, 中原 貴, 立花利公, 渡邊美隆, 栗原邦弘, 佐藤 聡, 石川 博, ヒト脂肪組織由来幹細胞の骨細胞への分化と骨形成, 平成 24 年度日本歯科大学歯学会大会, 日本歯科大学生命歯学部メモリアルホール, 東京, 2012 年 06 月 02 日

田巻友一, 富永徳子, 井出吉昭, 中原貴, 幹細胞医学に基づいた抗加齢医療アプローチの確立に向けて～幹細胞の発生学的起源と抗加齢ポテンシャル～, 平成 24 年度日本歯科大学歯学会大会, 日本歯科大学生命歯学部メモリアルホール, 東京, 2012 年 06 月 02 日

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

富永徳子(TOMINAGA, Noriko)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：9 0 5 4 6 5 3 2