

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32667

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670898

研究課題名(和文)次世代リバースエイジング：体内硫化水素曝露幹細胞による老化組織の新生

研究課題名(英文)Reversing Aging: Regeneration of Aged Tissues using Adult Stem Cells Inside a Tissue exposed to Hydrogen Sulfide

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、硫化水素がヒト歯髄からの細胞分化細胞数を増やし、インスリン合成も増加させた。機序はWNTやPI3K/AKTの促進による。ところが、高グルコースでは細胞数・インスリン分泌が激減した。しかしこれは、糖毒性によるアポトーシスであることを明らかにした。さらに、細胞分化方法を変え、かつ硫化水素濃度を10倍としたところ、糖毒性は、ほぼ消滅し、インスリン分泌能の高い細胞が得られた。すなわち、硫化水素曝露にて膵臓のリバースエイジングが可能と思われた。

研究成果の概要(英文)：This study had shown that hydrogen sulfide increases the number of b-cells and also insulin secretion from the cells reproduced from human tooth pulp. However high glucose decreased the number of cells and insulin secretion because of apoptosis. Hence we revised the protocol of regeneration of b-cells from human tooth pulp, and increased hydrogen sulfide concentration to 10 times, and glucotoxicities were almost disappeared, and the cells produced large amount of insulin. Thus exposing human tissue to hydrogen sulfide may cause reversing aging of the pancreas.

研究分野：口腔衛生

キーワード：再生医療 若返り 膵臓 肝臓 細胞 インスリン

1. 研究開始当初の背景

iPS は、難病の病態解明、新薬創生などに非常に適しており、医学を一挙に進歩させる可能性が高い。しかし iPS 細胞が再生医療に適しているとの考えには、iPS が遺伝子組み換えである限り大きな疑問が残る。一方、先進国は、胚性幹細胞・体性幹細胞に再生医療への期待が大きい。しかし ES/iPS には倫理的問題もある。体性幹細胞には、問題はほとんど無く、多くの臓器再生を現実化した。また体性幹細胞ヒト移植など、多くの臓器で臨床研究も進んでいる。しかし幹細胞による再生医療そのものは普及せず、補助的治療にとどまる。その原因は、移植に十分な幹細胞や分化細胞の数が得られないことにある。しかし歯髄では、臨床応用に必要な肝臓様細胞 1×10^8 個の確保も 3-5 週間で可能で、低濃度の硫化水素が肝臓分化レベルを向上させるとの所見を得た(J Breath Res 2012: 6: 017103)。以上の背景のもとに、老化の影響を受けやすい膵臓の再生に硫化水素がいかに関与するか本研究を行った。

2. 研究の目的

歯髄から幹細胞株を作成し、申請者が開発した、あるいは新たに開発する硫化水素を用いた分化法を用いて、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。これにより、硫化水素の体内曝露によるリバーエイジング開発の基礎データを得る。申請者らの既報に変わる方法で、無血清培養・硫化水素曝露で膵臓様細胞を分化する。

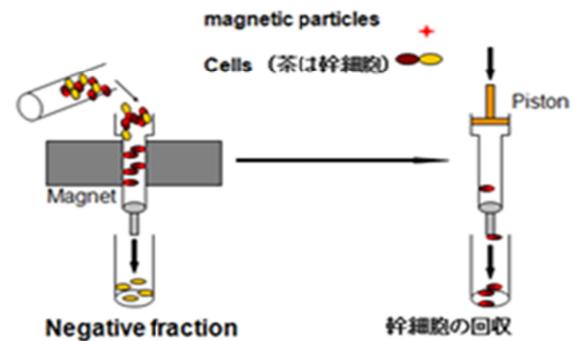
分化後、膵臓機能を判定し機能向上が見られたことを確認する。そして今までとは異なる再生医療:リバーエイジングを目指す。これは、Primary Level での幹細胞再生医療の普及を可能にするもので、公衆衛生学・社会医学的には、大きな社会的貢献が期待できる。本申請は「歯髄を使い、遺伝子操作もなく安全で容易な医療技術」であり、容易な手技を例えば「硫化水素の体内曝露(硫化

水素アスピリン内服)」を開発し、リバーエイジングを実現するもので、申請者が望む社会医学的に普遍的な再生医療の開発として、国民の QOL の向上のために貢献する。

3. 研究の方法

(1) 歯髄幹細胞 primary culture の確立
自然脱落前の乳歯を得る方法は既報の如くとする。

図1 MACSによるCD117(+)幹細胞の精製



(2) 膵臓細胞様分化

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。申請者らの原法に従い SFM にて培養する。SFM を使用するの、血清中の未知の生理活性物質により何らかの影響を受けた細胞が、臨床応用時すなわち移植後、悪性腫瘍など何らかの有害作用を発揮しないように予防するためである。培養方法は既報の如くとする。

(3) 硫化水素曝露システム

図2



Chamber には 0.1 ng/mL の硫化水素 5 %CO₂ 流れている。この硫化水素は Permeator で作られ 5 %CO₂ で上記濃度に希釈する。この濃度では培養液中で 1 nmol/L を示す。

(4) 膵臓様分化と Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR は StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) で行い、CRT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5(Qiagen)で分析し相対値を求めた。

(5) WNT and PI3K-AKT signaling pathway の real-time RT-PCR for

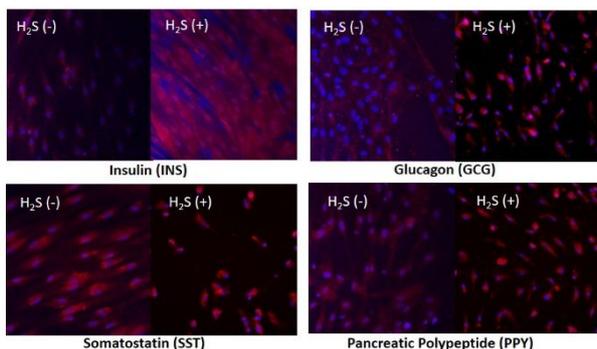
WNT or PI3K-AKT Signaling Pathway PCR Array (Qiagen) を manufacturer's protocol に従い実施した。発現を検索した： WNT canonical pathway; planar cell polarity; WNT/Ca²⁺; cell development, proliferation, migration; WNT signaling target genes; and WNT signaling negative regulation.

4 . 研究成果

(1) 膵臓様分化に対する硫化水素の影響 : pancreatic endocrine factors

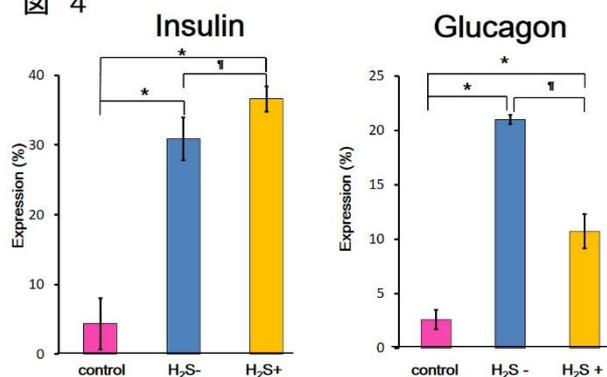
CD117+ cells からの pancreatic differentiation に対する 0.1 ng/mL H₂S 6 日間曝露の影響を曝露無しと比較した。INS, GCG, SST そして PPY の免疫染色結果を図 3 に示す。

図 3



免疫染色は定性試験なので、フローサイトメータ - Guava EasyCyte flow cytometer (Guava Technologies, Hayward, CA, USA)で、Insulin 陽性細胞数および Glucagon 陽性細胞数の定量を行った。結果を図 4 に示す。

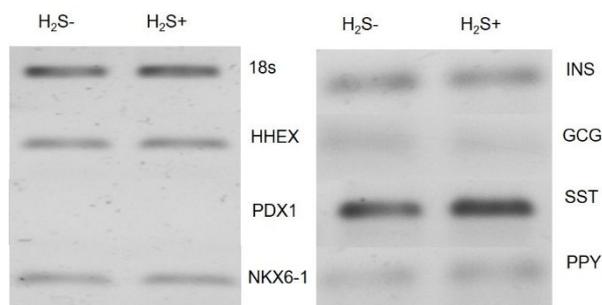
図 4



硫化水素曝露により Insulin 陽性細胞数は優位に増加し、逆に Glucagon 陽性細胞数は優位に減少し、硫化水素曝露により高血糖をコントロールしやすい再生膵臓が出来たことが証明された。

Insulin 産生を制御する INS, GCG, SST, PPY, PDX1, HHEX, NKX6-1 の発現を RT-PCR で調べたところ、図 5 に示すように差はみられない。

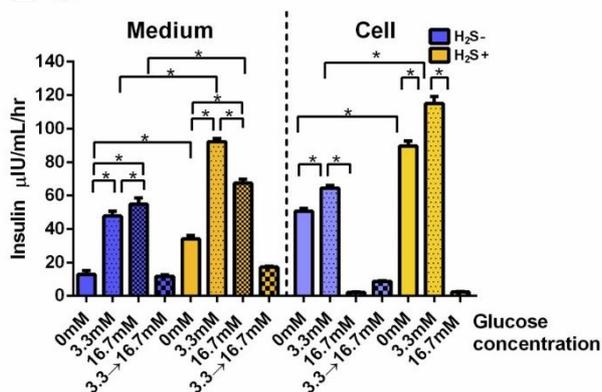
図 5



(2) グルコース刺激と Insulin・c-peptide 産生 細胞内外における Insulin 量および Insulin 産生副産物である c-peptide 濃度はグルコース刺激で増加すると、一般に考えられる。そこでグルコース刺激効果への硫化水素曝露の影響を検討した。

結果を図6に示した。過去の再生膵臓の1000倍程度のインスリン増加が見られる。

図6



全体にグルコース刺激で Insulin 濃度は高くなる また細胞内外で硫化水素曝露により Insulin 濃度は高い傾向にある。しかしグルコースを最高濃度にすると Insulin 濃度は激減する。これは糖毒性の為であり、アポトーシスが発生することを本研究で確かめている。

(3) WNT signaling pathway の RT-PCR

硫化水素曝露により増加した gene は多岐にわたり、the canonical WNT pathway: DKK1, FZD5, FZD9, NFATC1, SOX17, TCF7, WNT10A, WNT16, WNT3A, WNT6, WNT7A and WNT7B, the WNT/calcium pathway: NFATC1, WNT10A, WNT16, WNT3A, WNT6, WNT7A and WNT7B WNT signaling negative regulation and cell development, proliferation, migration pathway : FOSL1, MMP7, MYC, DKK1, SOX17 など優位な増加が見られた (図7)。Cell development, proliferation and migration associated genes にも増加が見られた。

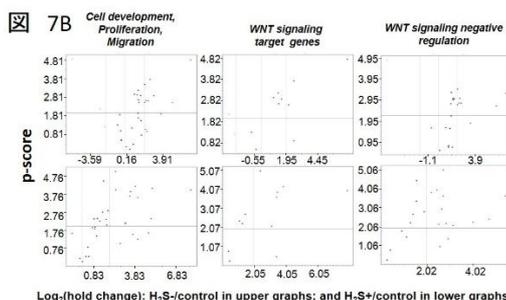
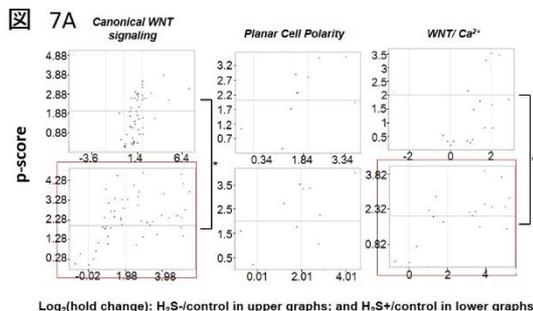


図7C

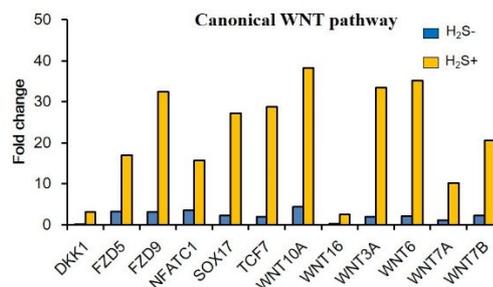


図7D

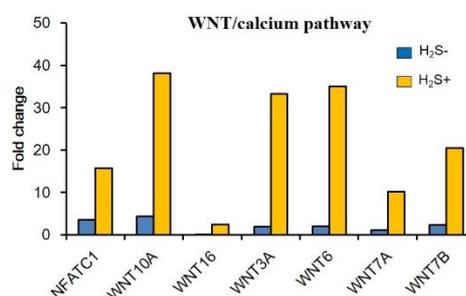


図 7E

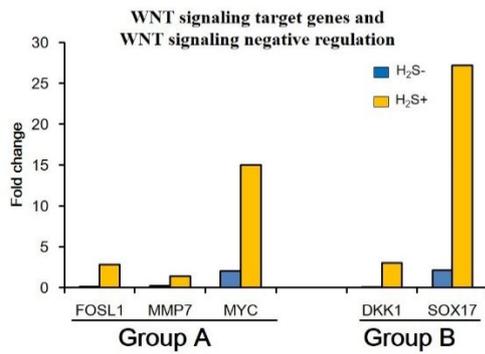


図 8B

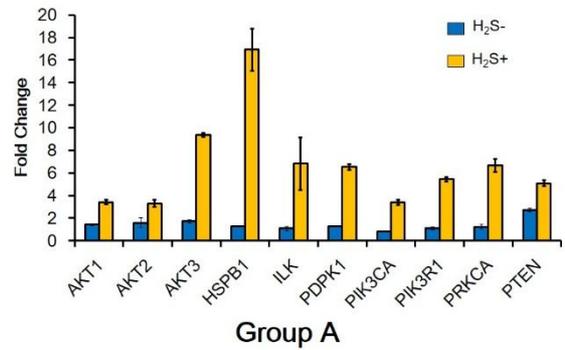


図 7F

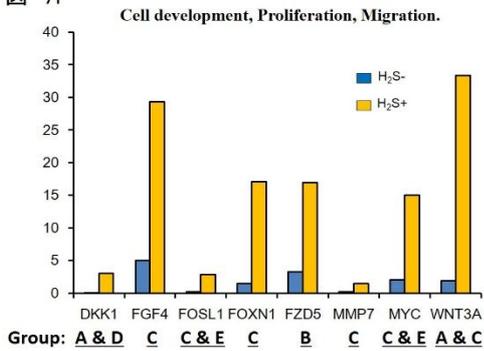
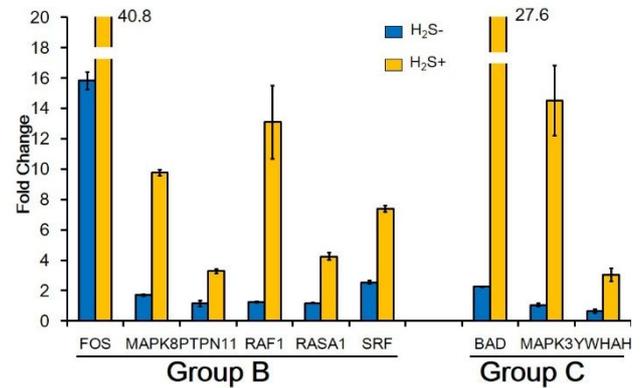


図 8C



(4) Fold change of PI3K-AKT related genes
 Fold change of PI3K-AKT related genes の全体的な蛍光を図 8A に示した。硫化水素曝露により遺伝子発現が全体的に強くなっているのが分かる。Group A-E の強発現 gene を示した。

図 8A

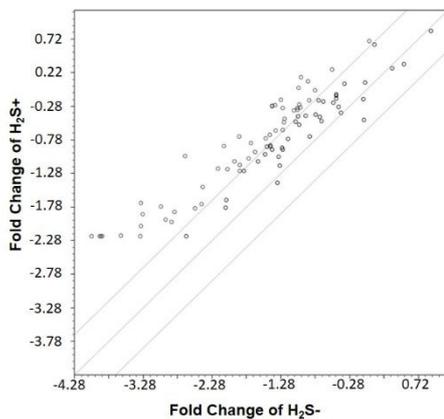
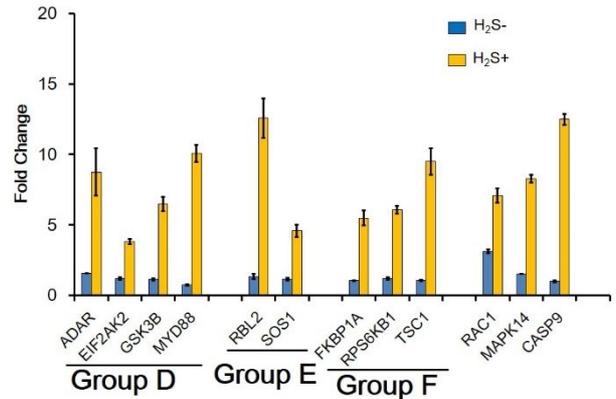


図 8D



考察と結論

ヒト歯髄からの腭臓再生の際、硫化水素に曝露すると機能の高い細胞が発現することが分かった。しかし、糖毒性により細胞が apoptosis を起こしインスリンを産生しない減少も観察された。これは硫化水素が誘導したのではなく、分化した細

胞全般に認められる。更なる分化法の改善が必要だが、この結果は、より安全で確実な硫化水素剤投与による膵臓機能再生医療が間近にある事を示すものである。これは糖尿病患者から高齢者まで膵臓のリーバースエイジングの可能性を強く示唆するものである。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、科学の指導者の再生医学の現実直視が必要とされる。

<引用文献>

- A) 文部科学省科学研究費補助金、基盤研究(B)、研究成果報告書(平成22年度～平成24年度)、八重垣 健、2015
- B) Ishkietiv 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
- C) 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.

D)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

Okada M, Imai T, Yaegaki K, Ishkitiev N, Tanaka T: Regeneration of insulin-producing pancreatic cells using a volatile bioactive compound and human teeth , J Breath Res.

2014 ; 8(4) : 046004, doi:10.1088/1752-7155/8/4/046004 . (査読あり)

Okada M, Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Tanaka T, Fukuda M, Ono S, Haapasalo M: Hydrogen sulphide increases hepatic differentiation of human tooth pulp stem cells compared with human bone marrow stem cells. Int Endod J. 2014; 47: 1142-1150, doi:10.1111iej.12262. (査読あり)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権] (計0件)

[その他] (計0件)

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