

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08966

研究課題名(和文) 脱落歯を用いた、将来の疾患罹患時に備えたテラーメド再生医療

研究課題名(英文) Regenerative medicine using deciduous teeth preparing for future diseases

研究代表者

大越 章吾 (Shogo, Ohkoshi)

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抜去歯から歯髄組織を分離し、Activin AとFGF、HGFを培地に加えると間葉系細胞は多角形の肝細胞の形態に類似した細胞に分化した(Hepatocyte-like cell:HLC)。この細胞は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。次にラット肝障害に、尾静脈からHLCを投与した結果、肝障害の程度が抑制された。更にヒトDNAをラットDNAから判別するPCRのプライマー配列を用いた特異的PCRによって、正常ラット門脈内に投与した歯髄MSC由来肝細胞のラット肝内の量的動態を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本歯科大では主に抜去歯歯髄の間葉系幹細胞を保存し、将来疾患に罹患した時に、この細胞を再生医療の細胞資源として利用する「歯の細胞バンク」の運用が行われている。この実験の学術的意義は、歯の細胞が肝細胞に分化することができるという細胞分化の多様性を示したことにあり、また社会的意義は、実際に運用されている歯の細胞バンクの細胞を実際に臨床応用できる道筋を示したことにあり、これによって細胞バンク事業が現実性を持って未来のテラーメド医療に役立つ可能性がでてきた。

研究成果の概要(英文)：Dental pulp-derived mesenchymal stem cells were differentiated into polygonal hepatocyte-like cells(HLCs) under the presence of Activin A, FGF and HGF in culture media. These cells could convert ammonium into urea and expressed HGFd HGF-4, that revealed mature hepatocyte function of the cells. We observed the suppression of severity of experimental chemical hepatitis by infusing cells via tail veins. We also developed specific PCR primers that could specifically differentiate human cells from rat cells. We clarified the dynamic changes of HLCs in nude-rat livers when infused directly into portal veins.

研究分野：肝臓病学

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 ヒト細胞特異的PCR

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は骨髄を初めとして多くの臓器の間葉組織中に存在する幹細胞であり、骨、脂肪細胞を初めとして多くの細胞に分化する。これは iPS 細胞のような遺伝子導入を必要とせず、また自家の細胞を用いた移植が可能であるため、腫瘍発生や免疫学的拒絶のリスクが少ない。また臍帯血に代表されるように低侵襲で取得できるため有用な再生医療の資源として期待されている。

歯髄の中に間葉系幹細胞が存在することは最初に 2000 年に報告され (*Proc Natl Acad Sci* 97,13625',2000)、その後これは骨、脂肪、神経を初め様々な細胞に分化することが報告されている。中でも小児時の脱落歯由来の歯髄由来幹細胞は極めて増殖能が高い。加えて、それらは全く侵襲なく得ることができるため、臍帯血のようにバンク化しやすい細胞資源である。

以前より、肝細胞株をバイオカラム化に生着させ 3 次元培養したバイオ人工肝臓が探求され、予後の極めて不良な劇症肝炎の脳症改善と肝移植までの橋渡し治療として臨床試験が行われてきたが十分な成果は得られてはいない。これは、In Vitro においても高度な肝機能を有しつつ、高い増殖能を持ち、容易に十分な数の細胞数が得られ、かつ安全性の高い細胞資源が存在しなかったことが原因である。

一方肝臓は薬物代謝の中心臓器である。従って、バイオ人工肝臓に使用される培養肝細胞のもう一つの有効な活用法は、薬物の毒性のアッセイに使用されることである。分子標的薬など今後の医学の進歩に伴って次々に新薬が出現してくるが、これらの毒性、副作用の有無を事前に予測することは極めて重要である。薬剤の代謝能は個人によって異なるため、新薬の肝毒性を Screening するためには、再生された個人由来の肝細胞が必要となり、それが達成されれば、事前に副作用の出現を予測するテーラーメイド医療が可能となる。

現在、再生医療における最も注目されている細胞資源は iPS 細胞である。Takebe らは主に iPS 細胞から分化させた肝細胞を主たる細胞資源とした "Organ Bud" と呼ばれる人工肝臓の構築に成功している (*Nature* 499,481',2013)。しかしながら、iPS 細胞の作成には遺伝子導入が必要であり、それによる発ガンなどのリスクは完全には排除できない。

申請者の研究分担者である石川らは、歯髄細胞が神経細胞、膵島細胞など様々な細胞へ分化することを報告してきた (*Odontology* 101,121-32',2013)。また彼らは CD117 陽性細胞を抽出し、HGF や Oncostatin の存在下に培養するとアルブミンを産生しかつ肝細胞の形態を有する Clonal な細胞に分化すると報告した。これらは同じ細胞形態のまま何十代も継代することが可能である。さらに、この細胞を肝不全ラットに移植すると肝に生着し、肝機能を代償した (*Tissue Eng Part A* 97,586',2015)。またこれらの細胞は HNF4 など肝細胞特異的転写因子を発現し、さらに旺盛な増殖力をもつため豊富な成熟肝細胞の機能を有する新たな細胞として利用が可能であり、今後のバイオ人工肝臓や薬剤毒性 Screening に用いる有力な自家肝細胞の細胞資源であると考えられていた。

2. 研究の目的

本研究は、実際に日本歯科大学生命歯学部で既に運用されている歯の細胞バンクの効果的な再生医療への貢献方法として、すでに実証されている歯髄細胞の肝細胞への分化能に着目し、アンモニアなどの除去や薬剤毒性スクリーニングに有効であるか否かを検証することを目的として行われたものである。具体的には、以下に沿って研究を行うことを目的とした。

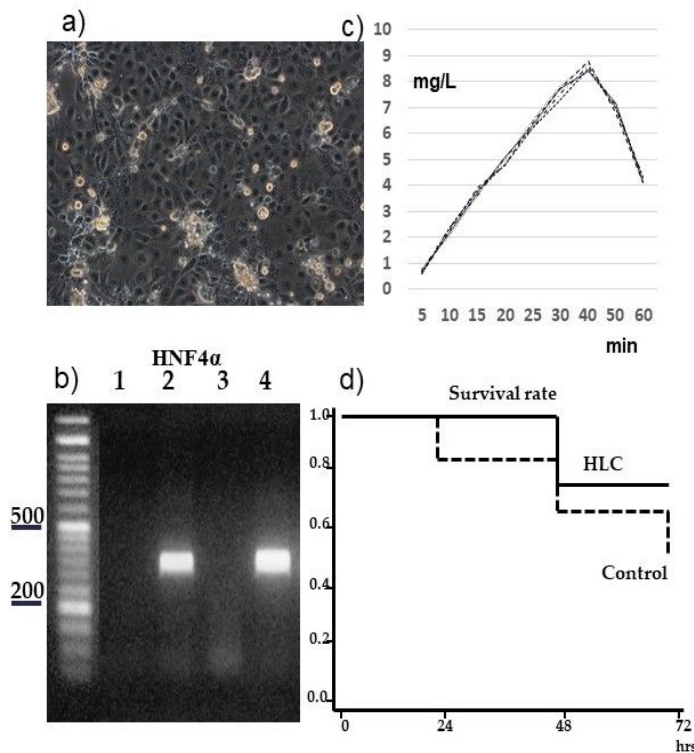
- (1) 歯髄細胞由来の肝細胞類似細胞(Hepatocyte-like Cell: HLC と以下略)がどの程度成熟した肝細胞に近い蛋白合成能や代謝能を有するか否かを明らかにする。特にアンモニアの尿素への変換能などについてバイオカラムを用いた3次元培養の還流実験によって調べる。
- (2) ラットに急性肝障害を惹起し、HLCの静脈内投与によって、コントロール群に比して肝障害の抑制効果があるか否かを検討する。また、もし効果的に作用した場合それはHLCが肝にHomingして、細胞増殖によって肝障害を抑制するのか、あるいはHLCから産生される何らかのCytokineやChemokineによってもたらされるものなのかを明らかにする。
- (3) この研究の効果を、日本歯科大学生命歯学部で運用されている歯の細胞バンクの具体的な臨床応用に向けた第一歩とし、今後バンクを用いた再生医療プロジェクトの一環として組み込み、歯科と医科を横断した臨床研究開始の試案を作成する。

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の機能解析
歯髄由来の間葉系肝細胞を既報の方法に従い肝細胞に分化させた後、無血清培地の3次元培養中空系膜カラム(旭化成メディカル社、商品名プラノバ)に生着させる。このカラムに1.5mM塩化アンモニウムを含む無血清培養液を約24~72時間持続ポンプを用いて還流させ流出液中の尿素をColorimetryで測定しアンモニアの尿素への変換能を検証する。
更に、この細胞が高度な代謝能を有するか否かについて更に 乳酸代謝能、 グルコース消費能について検討する。
- (2) 歯髄間葉系幹細胞から分化させた細胞の転写因子の解析
本段階では、上記の代謝機能の解析機能の後、実際にどのような肝細胞特異的な因子が作動してこの歯髄間葉系幹細胞由来の幹細胞が成熟した肝細胞形質に至るか否かをRT-PCR法を用いて解析する。特にBALのテーラーメイド医療への応用を視野に入れ、薬物代謝能について検証する。
- (3) 動物モデルを用いた歯髄由来肝細胞の肝炎抑制効果
ラットのConA + D-Galactoside肝障害モデルに対して、歯髄由来HLC (2×10^6) を尾静脈より移入し、培養上清のみのコントロール群に比して肝障害(T.Bil、AST/ALTなど)の改善効果があるか否かを検証する。またヒトミトコンドリア特異的抗体を用いて、実際にラット肝にどれ位HLCが生着しているかを判定的に検証する。

4. 研究成果

図 1 .



紡錘形の MSC は HGF など特異的な増殖因子の存在下で多角形の肝細胞様細胞に分化した (図 1 a)。肝細胞特異的転写因子である HNF-4 の発現が RT-PCR によって確認された (図 1 b)。この細胞の培養上清にアンモニアを加えると、細胞で代謝され尿素の濃度が一定レベルまで上昇した (図 1c)。またラットの ConA + D-Galactoside 肝障害モデルに細胞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結果細胞投与群で生存率が上昇した (図 1 d) (論文投稿中(1))。

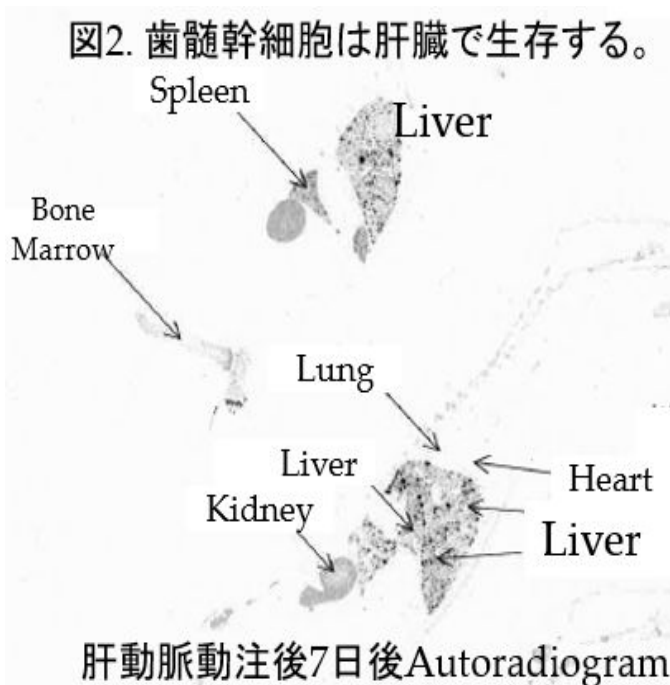


図 2 はヌードラットの肝動脈に Cr^{51} でラベルした歯髄 MSC 肝細胞を動注して Autoradiogram にて活性を投射したものである (協力ネモト・サイエンス、白井伸明博士)。

これによって歯髄 MSC 由来肝細胞が最低 7 日間に渡って肝に生着することが判明した。しかし、実際にこれらの細胞がどれくらい肝炎による障害肝に homing し、組織修復に関与するのかを明らかにする必要がある。

申請者はヒト RNA をラット RNA から判別する定量 PCR のプライマー配列を見出している。これによってヌードラットの門脈に歯髄から分化させた HLC を移入して解析した結果、障害のない肝では例えば T 細胞機能の欠落したヌードラットといえども、注入後 3 時間で約 100 分の 1 に細胞数は減少することを見出している。今後ラットに肝障害を誘発し、このような障害肝で注入細胞の生着が増強していくのか検討していきたいと考えている。

研究業績

原著論文

- (1) Differentiation of dental pulp-derived MSCs into hepatocyte-like cells and their therapeutic use against chemical liver injury in rats. Hara H, Ishikawa H, Ohkoshi S. *Journal of Hard Tissue Biology*. 論文 revise 中
- (2) Regenerative medicine using dental pulp stem cells for liver diseases. Ohkoshi S, Hara H, et al. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 8: 1-6. 2017.
- (3) Dental pulp cell bank as a possible future source of individual hepatocytes. Ohkoshi S, et al. *World J Hepatol*. 10: 702-707. 2018.

学会発表

- (1) Differentiation of mesenchymal dental pulp stem cells into hepatocytes. Hara H, Ishikawa H, Ohkoshi S. *World Dental Congress 2017 9. Madrid*
- (2) Differentiation of dental pulp cells into hepatocytes and their repopulation in nude rat liver. Ohkoshi S, Hara H, Ishikawa H. 2018; 10. 欧州肝臓病学会、ウイーン. (口頭発表).
- (3) 歯髄間葉系幹細胞から肝細胞への分化と In Vivo における細胞動態. 日本肝臓学会総会. 大越章吾ら、2019 5. 東京. (口頭発表).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ohkoshi S, Hara H, Hirono H, Watanabe K, Hasegawa K	4. 巻 8
2. 論文標題 Regenerative medicine using dental pulp stem cells for liver diseases.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 World J Gastrointest Pharmacol Ther	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4292/wjgpt.v8.i1.1	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, Ishikawa H, Ohkoshi S	4. 巻 -
2. 論文標題 Differentiation of dental pulp-derived MSCs into hepatocyte-like cells and their therapeutic use against chemical liver injury in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijge.2018.02.008	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 Ohkoshi S, Hirono H, Nakahara T, Ishikawa H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Dental pulp cell bank as a possible future source of individual hepatocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World J Hepatol.	6. 最初と最後の頁 702-707
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4254/wjh.v10.i10.702	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 Hirono Haruka, Watanabe Kazuhiko, Hasegawa Katsuhiko, Hiroyasu Kazuhiko, Shibasaki Koichi, Ohkoshi Shogo	4. 巻 12
2. 論文標題 Anti-Dementia Drugs and Hepatotoxicity Report of Two Cases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Gerontology	6. 最初と最後の頁 261-263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijge.2018.02.008	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大越章吾
2. 発表標題 歯髄間葉系幹細胞から肝細胞への分化とIn Vivoにおける細胞動態
3. 学会等名 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohkoshi S, Hara H, et al.
2. 発表標題 Differentiation of dental pulp stem cells into hepatocytes and their repopulation in nude rat liver
3. 学会等名 UEGW (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hara H, Sano K, Ishikawa H, Ohkoshi S
2. 発表標題 Differentiation of mesenchymal dental pulp stem cells into hepatocytes
3. 学会等名 World Dntal Congress (FDI 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔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	石川 博 (ISHIKAWA HIROSHI) (30089784)	筑波大学・医学医療系・研究員 (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	松田 康伸 (MATSUDA YASUNOBU) (40334669)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	
研究 分 担 者	廣野 玄 (HIRONO HARUKA) (80386268)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授 (32667)	