

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10923

研究課題名(和文) ヒト歯髄幹細胞による肝不全に対する新規再生医療の開発

研究課題名(英文) Development of new therapy using stem cells from human exfoliated deciduous teeth for liver failure

研究代表者

林田 真 (Hayashida, Makoto)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：70452761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：四塩化炭素誘導肝不全モデルマウスに未分化乳歯幹細胞 1.0×10^6 B臓内に注入した。病理学的解析により、肝組織における線維化の軽減ならびに肝細胞壊死像の減少が認められた。治療効果の機序として、星細胞の活性化抑制による線維化の軽減および免疫担当細胞(クッパー細胞、Tリンパ球)の抑制効果による抗炎症効果が示唆された。in vitroにて乳歯幹細胞より肝細胞への分化誘導に成功し、上記実験方法にて肝障害モデルマウスにこの分化誘導肝細胞を移植したところ治療効果が確認されるに至った。さらに臨床応用を視野にXeno-Freeの細胞培養培地で乳歯幹細胞の増殖および肝細胞へ分化誘導させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：We transplanted 1.0×10^6 SHEDs into the CCl₄ induced liver failure-model mouse via spleen. Histological analysis showed that the fibrotic lesion was decreased and the necrotic lesion of hepatocyte was improved. We investigated the mechanisms of these effects. It showed that the amelioration of activation of stellate cells lead to decrease the fibrotic lesion, and that the inhibition of the proliferation of immune cells such as macrophages and T lymphocytes resulted in the anti-inflammatory effect. Moreover, we successfully established the culture methods to differentiate SHED into hepatocyte-like cell in vitro. The SHED-derived hepatocyte also showed the anti-fibrotic and anti-inflammatory effect in the liver failure-model mouse. We next established the culture methods of SHEDs with Xeno-free culture for the usage in clinical stage.

研究分野：小児外科

キーワード：小児外科 幹細胞 肝不全 肝再生

1. 研究開始当初の背景

1989年に本邦で生体肝移植が始まって以来、現在まで6500例を超える生体肝移植が施行され、末期肝不全患者に対する確立した治療法となっている。2010年7月17日に、改正臓器移植法が施行され、臓器提供件数の増加はあるものの、本邦では待機患者に対し臓器提供が少なく、脳死移植を受けられる患者は限られ、移植患者の約99%は生体肝移植が行われている。生体肝移植ドナーに対する肝切除術は本来自己の疾患に対する手術ではなく、肝臓を提供するための手術という問題があり、その手術侵襲も大きく、死亡例も報告されている。胆道閉鎖症は、半数以上が肝移植を必要とする新生児期、乳児期に最も多く見られる外科的黄疸疾患である。葛西手術を施行した場合でも、約3割の症例で急激に肝硬変の進行を認め、乳児期に肝移植を余儀なくされることがある。近年、周術期管理の向上および小児肝移植手術手技の進歩により体重の小さな新生児・乳児症例においても肝移植が施行されるようになった。しかし、新生児・乳児症例に対する肝移植では、過大グラフトや腹壁閉鎖に関する問題があり、技術的に容易ではない。また、劇症肝不全は緊急肝移植が必要となる場合も多く、極めて限られた時間の中で、ドナーの選定、評価、脳死登録など行う必要があり、待機中に死亡することも少なくない。このような症例に対して、肝移植までのbridgeとして肝細胞移植が行われている。肝細胞のソースとして肝移植用のドナー肝の未使用部分が使用されているが、成熟肝細胞は生体以外で増殖させることは困難であり、臓器移植と同様ドナー不足の問題は解決し得ない。再生医療として期待されている細胞ソースにはiPS細胞や骨髄由来の間葉系幹細胞、DPSC(dental pulp stem cell; 歯髄幹細胞)などがあり、現在研究が進められているが、SHED(Stem cells from human exfoliated deciduous teeth; ヒト脱落乳歯歯髄幹細胞)は、2003年にMiuraらにより最初に報告(Miura M, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 May 13;100(10):5807-12.)されて以来、頭蓋骨や脊髄、肝細胞、免疫疾患(Yamaza T, et al. Stem Cell Res Ther. 2010 Mar 15;1(1):5.)に応用する研究が報告されている。SHEDは多分化能と強い増殖能を持つだけでなく、細胞性免疫に不可欠なHLAの発現が乏しく(Porada CD, et al. Adv Drug Deliv Rev. 2010.)、またDPSCに比較してその分化能や増殖能、間葉系細胞への分化に関して有意に優れている(Wang X, et al. Arch Oral Biol. 2012 Sep;57(9):1231-40)。免疫寛容性が高く、免疫抑制なしで同種あるいは異種の移植も可能であることがマウスで確認された。また、SHEDは、homing機能を有し、静脈内注射など全身投与を施した場合、全身諸臓器に分布・生着するが、中でも特に障害部

位に集積し修復を行う性質を持つ(Porada CD, et al. Adv Drug Deliv Rev. 2010.)。このため、SHEDを静脈内もしくは腹腔内に注入することで細胞が生体内を遊走し、病的肝に分布、分化し生着することが期待される。

2. 研究の目的

現在の重篤な肝不全にする有効な治療法は肝移植である。しかし、臓器移植はドナーの不足、手術侵襲の大きさ、拒絶反応または感染、高額医療といった深刻な問題を抱えている。成熟肝細胞を移植する肝細胞移植では、肝細胞を生体外で増殖させることは困難であり、ドナー不足の問題は解決し得ない。近年、組織幹細胞を用いた移植が試みられるようになってきている。免疫寛容能を有しAllo細胞移植に適した移植源になりうるヒト脱落乳歯歯髄幹細胞(SHED; Stem cells from human exfoliated deciduous teeth)を利用することで末期肝不全の機能を改善させ、免疫抑制剤不要の低侵襲な新規治療法を追求する。

3. 研究の方法

① 肝不全モデルの作成 (i)慢性肝不全モデルとして、マウスに四塩化炭素(CCL4)を0.2ml/bodyの腹腔内投与を週2回、10週行ない、不可逆的な肝硬変モデルを作成。肝不全モデルとしての肝機能の評価および予後を検討する。

②乳歯歯髄由来幹細胞(SHED)を単離・培養(Miura M, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 May 13;100(10):5807-12. Yamaza T, et al. Stem Cell Res Ther. 2010 Mar 15;1(1):5.)した後に、乳歯幹細胞ならびに乳歯幹細胞由来幹細胞の大量培養をおこない、余剰細胞でバンクを作成する。コントロール群とSHEDの腹腔内投与群、静脈内投与群の3群に分け、週齢11にてSHED投与を行う。投与後の臨床的肝機能の評価としてアルブミンやコレステロール、ChEなどに代表される生化学的検査を用いて行う。その他の肝特異的機能である薬物代謝や各種生体活性物質の代謝に必須の酵素群(チトクロームやG6P, チロシン分解酵素など)の発現を解析する。また、予後の評価、臨床症状の改善を確認し、非移植群との生存率の比較検討を行う。全肝を摘出した肝標本に関しては、HE染色及び免疫染色(抗HLA-ABC抗体にてヒト組織の存在の有無の評価等)にて病理組織学的を行う。FISH及びフローサイトメトリを用いた解析にてSHEDの存在を証明する予定である。

① 歯髄幹細胞から肝細胞への分化誘導法の確立 歯髄より幹細胞を単離。肝細胞分化専用培地で歯髄幹細胞の肝細胞への分化誘導を促す。薬物代謝や各種生体活性物質の代謝に必須の酵素群(チトクロームやG6P, チロシン分解酵素など)の発現を形態学的(免疫蛍光染色)および生化学的/分子生物

学的(RT-PCR法、Western blotting 法、ELISA法)アプローチにて細胞機能特性解析を行う。

② 疾患モデル動物への乳歯幹細胞由来肝細胞移植の非臨床試験 肝不全モデル動物に対し乳歯幹細胞由来肝細胞移植を行う。細胞の定着ならびに目的とするタンパク質の発現および臨床症状の改善を確認し、非移植群との生存率の比較検討を行う。SHED の 局所投与も期待がもてるため、SHED を分化誘導した後に、全身投与のみならず、経門脈的に投与を行うことで平成 27 年度同様の評価を行い、至適な投与経路をさらに深く多岐に検証してゆく。

4. 研究成果

①8 週齢 C57BL/6 マウスに、四塩化炭素 CCl₄ (0.5m /kg) を週 2 回、計 8 週間腹腔内投与し、肝障害モデルマウスを作製した。病理学的解析により、肝組織における線維化および肝細胞壊死像が認められた。

また、コンカナバリン A 投与による急性化不全モデルの作製を試みた。コンカナバリン A 40mg/kg 投与で投与後 24hr 以内に死亡に至ったが、現在さらに投与量などの検討を行っている。

②四塩化炭素 CCl₄ を週 2 回、計 4 週間腹腔内投与後、未分化乳歯幹細胞 1.0x10⁶ を脾臓内に注入した。さらに 4 週間 CCl₄ 投与を継続し、解析を行ったところ。病理学的解析により、肝組織における線維化の軽減化ならびに肝細胞壊死像の減少が認められた。

③線維化抑制の機序として、星細胞の活性化のマーカーである α SMA 陽性細胞の減少および α SMA の RNA 減少を確認し、SHED により星細胞の活性化が抑制されていることが分かった。

④炎症の抑制：クッパー細胞や T リンパ球の抑制し、炎症性サイトカインである TGFβ、TNFα、IL-6 などの産生が低下しており、肝臓においても抗炎症効果があることが示唆された。

⑤レシピエントマウス肝組織において、ドナー未分化乳歯幹細胞が生着し機能的肝細胞へ分化している事がヒトアルブミンや Hep Per1 の染色で確認された。この生体内で分化した乳歯幹細胞由来肝細胞を一度単離して取り出し、再度同様の実験にて肝障害モデルマウスに移植した場合でも抗線維化、抗炎症効果がみられた。

⑥EGF,FGF,HGF,OSM などを段階的に添加して SHED を培養することで、肝細胞様の形態をとり、Alb や尿素の産生を認め、種々の尿素回路に関与する酵素の発現を認めるようになり、in vitro での肝細胞分化法を確

立した。

⑦臨床応用を視野に Xeno-Free の細胞培養培地で乳歯幹細胞の増殖および肝細胞へ分化誘導させるため、市販の Xeno-Free 培地でも最も SHED の増殖能のより培地を選定した。さらに、数種類の Lot の異なる SHED をすでに確立した方法で肝細胞に分化させ、様々な肝特異的マーカーの発現を比較し、Lot 間に差があることおよび、目的として機能を得るのにもっとも効率的な Lot の選定を行った。

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 1 件)

[学会発表] (計 1 件)

第 52 回 日本周産期・新生児学会学術集会 (2016 年、富山)

シンポジウム「新生児外科の移植医療と再生医療」

演題名：乳歯幹細胞を用いた肝再生研究の現状と展望

演者：柳 佑典

[図書] (計 1 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 1 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林田 真 (Makoto Hayashida)
九州大学大学院医学研究院 共同研究員
研究者番号：70452761

(2) 研究分担者

田口 智章 (Tomoaki Taguchi)
九州大学大学院医学研究院 小児外科
教授
研究者番号：20197247

松浦俊治 (Toshiharu Matsuura)
九州大学大学院医学研究院 小児外科
准教授
研究者番号：105328

柳 佑典 (Yusuke Yanagi)
九州大学大学院医学研究院 小児外科
助教
研究者番号：30596664

吉丸 耕一朗 (Koichiro Yoshiaru)
九州大学大学院医学研究院 小児外科
助教
研究者番号：60711190

山座 孝義 (Takayoshi Yamaza)
九州大学大学院歯学研究員 分子口腔解剖
学 准教授
研究者番号：80304814

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()