

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04229

研究課題名(和文)臍帯血を用いた新生児・小児の肝再生細胞療法の研究

研究課題名(英文) Neonatal and pediatric research on liver regenerative medicine using umbilical cord blood

研究代表者

大賀 正一 (Ohga, Shouichi)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：60233053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,600,000円

研究成果の概要(和文)：私達は臍帯血や自然に取れた乳歯から、軟骨・脂肪・骨といった様々な臓器の細胞へ変化する能力を持った「間葉系幹細胞」という幹細胞を取り出し、それらを肝臓の細胞と近い能力をもつ「肝様細胞」に変化させることができた。小児の先天性肝臓病に対する新しい治療法を開発するため、銅が肝臓に蓄積するWilson病と、アミノ酸の一種であるチロシンが肝臓で正常に処理できない高チロシン血症一型の二つの遺伝性疾患を動物モデルで再現し、間葉系幹細胞や肝様細胞を投与した。肝様細胞や間葉系幹細胞は、欠損した肝臓の機能を補完したり、肝毒性のある物質の産生を抑えたりすることで、これらの肝臓病の症状を軽減することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児の先天性肝疾患には、肝移植以外に根本的な治療法がないものがいくつかある。しかし小さな体に肝移植という大きな手術は大変な負担になり、また肝臓の状態が悪いため臓器移植の負担に耐えられないことも経験する。間葉系幹細胞および間葉系幹細胞由来の肝様細胞による先天性肝疾患の治療は、肝移植に代わる新たな治療法として、あるいは根治は難しいながらも肝臓の状態を少しでも改善し、より安全に肝移植に進むための治療法として、現在の医学では治療法のない肝疾患を持ったお子さんの新たな治療の選択肢となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We were able to extract stem cells called "mesenchymal stem cells" that have the ability to transform into cells of various organs, such as cartilage, fat, and bone, from umbilical cord blood and naturally extracted baby teeth. We transform them into "liver-like cells" that have abilities similar to those of the liver. To develop a new treatment for congenital liver disease in children, two inherited diseases, Wilson's disease, in which copper accumulates in the liver, and hypertyrosinemia type 1, in which tyrosine, an amino acid, cannot be processed normally in the liver, were reproduced in animal models and treated with mesenchymal stem cells and liver-like cells. Liver-like and mesenchymal stem cells have been found to reduce the symptoms of these liver diseases by complementing the function of the liver and suppressing the production of hepatotoxic substances.

研究分野：血液学

キーワード：間葉系細胞 肝様細胞 肝不全 ウィルソン病 高チロシン血症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝移植療法は高度な医療技術を必要とし、手術侵襲が大きくレシピエントの状態とドナー選定が常に課題となる。成人の対象疾患は主に劇症肝炎と肝腫瘍であるが、小児では、胆道閉鎖症、Wilson 病、代謝異常症などの先天性疾患と原因不明のものが多い。とくに新生児および乳児には、リスクの高い重症肝不全が多く、肝移植の適応も制限される。また遺伝性疾患保因者の両親は、ドナーになれない。新生児・小児の重症肝不全には侵襲の少ない新規治療法の開発が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、“同種肝細胞移植”に発展する臍帯血由来細胞を用いた“新たな肝細胞療法”の開発を目的とした。まず、帯血由来間葉系幹細胞の樹立と、肝様細胞への分化誘導を行い臍帯血由来細胞による細胞治療の可能性を探った。さらに肝不全をきたす代謝疾患などの疾患モデルに、乳歯由来間葉系細胞を移入して、長期に肝機能が維持される細胞源を探索し、次世代の肝再生療法の開発をめざした。

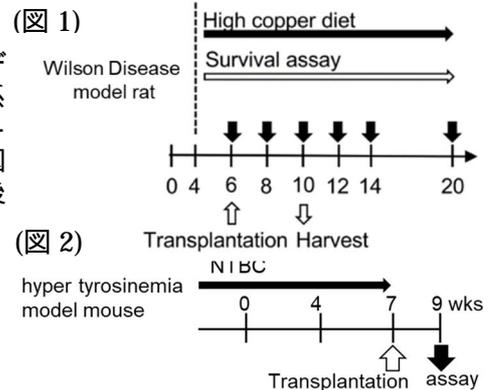
3. 研究の方法

1) 間葉系幹細胞の樹立

ヒト臍帯血、骨髄、乳歯由来の間葉系幹細胞を樹立し、間葉系幹細胞マーカーの発現、分化能の確認を行った。また、各細胞を肝様細胞へ分化誘導した。

2) 疾患モデル動物への細胞移植

モデルラットへの移植実験を行った。Wilson 病 (WD) モデル Long-Evans Cinnamon (LEC) ラットに乳歯由来の間葉系幹細胞 (SHED-MSC) と MSC から分化誘導した肝様細胞 (SHED-Hep) を移植し、肝庇護効果とメカニズムの解析を行った (図 1)。次に高チロシン血症モデルマウスを用いて、MSC 移入後の肝庇護効果と肝組織再生効果を解析した (図 2)。



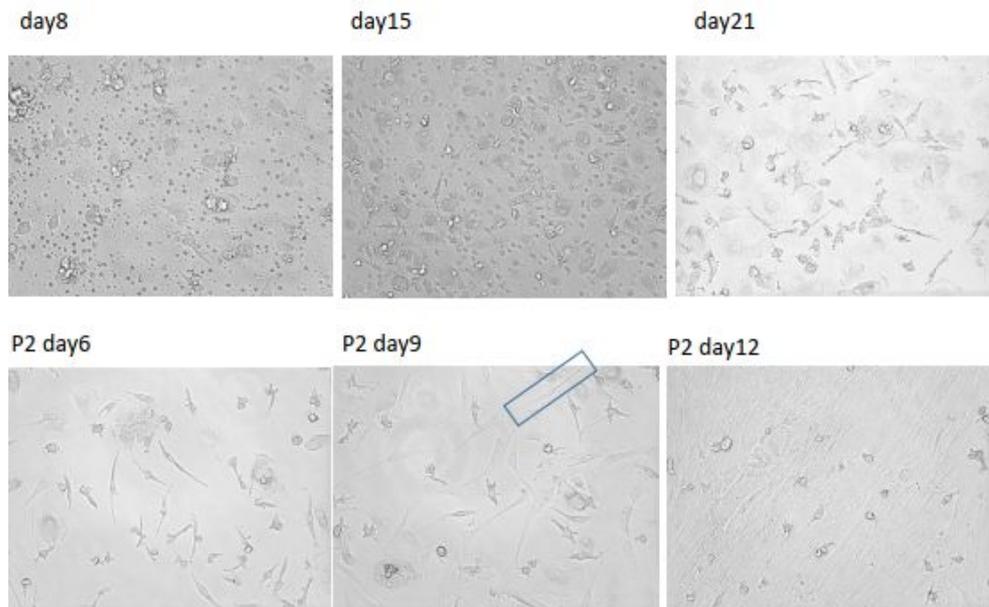
3) 間葉系細胞療法における肝庇護効果の評価

樹立した SHED-Hep の肝細胞としての機能を生化学・遺伝子学的に評価した。また SHED-MSC および SHED-Hep を移植したモデル動物において、放射線同位元素により肝組織のキメラを確認した。肝組織再生効果については、生存率、体重、免疫学的および病理学的に解析した。肝組織は、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) 手法を用いて、肝障害の程度、各種生体活性物質の代謝に必須の酵素群、および肝毒性物質の発現を解析した。

4. 研究成果

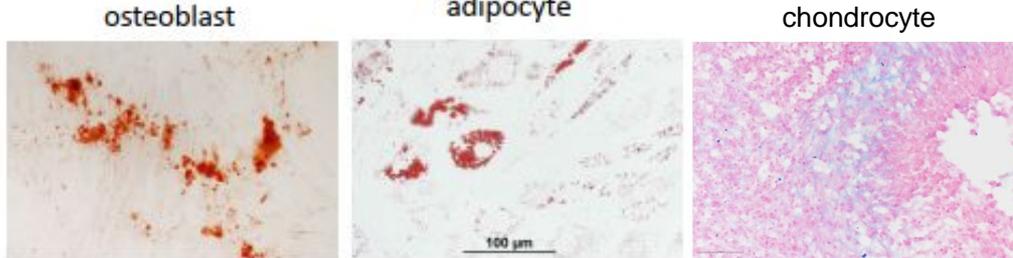
ヒト臍帯血、骨髄、乳歯細胞を用いてそれぞれの間葉系幹細胞 (MSC) を樹立した (図 3)。脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞への分化能を *in vitro* で確認した (図 4)。各種間葉系幹細胞において肝様細胞への分化誘導効率は異なっていると推察された (図 5)。SHED-Hep は MSC としての性質を部分的に残しながらも、肝細胞特異的な遺伝子発現や代謝機能を有した。肝不全モデルラットと同系対照に SHED と SHED 肝様細胞を移植して、肝不全治療の効果を検討した。Atp7b に変異がある WD モデル LEC ラットに銅負荷食餌を与え、致死的劇症型 WD モデルを作製した。この劇症型 WD モデル LEC ラットに SHED および SHED 肝様細胞を移植して治療効果を比較した。ATP7B を発現している SHED 肝様細胞は、ATP7B 発現のない SHED に比べ、ATP7B を介した銅耐性能によって、劇症型 WD モデル LEC ラットの生存期間を有意に延長させた (図 6)。SHED 肝様細胞移植は SHED より、レシピエントの肝機能障害と組織傷害に対してより高い改善効果をもたらした (図 7)。さらに、SHED 肝様細胞は、ATP7B と独立して stanniocalcin-1 を分泌しており、銅毒性による活性酸素の組織傷害をオートクライン的あるいはパラクライン的に抑制することが示唆された。SHED 肝様細胞による移植後肝への長期生着効果は証明が困難だったが、この細胞集団が劇症型 WD に対して肝保護作用を有し、肝移植までの橋渡しおよび肝不全発症予防を目的とした細胞療法源となる可能性が示された。もうひとつ、高チロシン血症モデル (Fah^{-/-}) マウスに、NTBC を投与したモデルを作成した。このモデルでは治療薬である NTBC の投与を中断することで肝不全を発症した。これに SHED を移植したところ生存期間の明らかな延長はなかったが (図 7)、体重と肝重量の低下および機能増悪に有意な軽減効果を確認することができた。

(図 3)



(図 3)臍帯血由来細胞の経時的変化。P2day9 以降、間葉系幹細胞様の細胞が出現している。

(図 4)



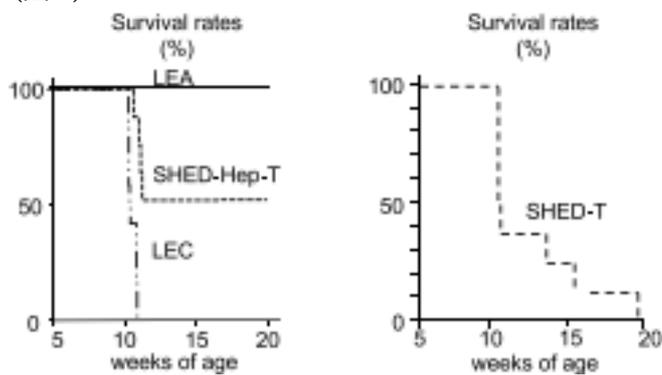
(図 4) 骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化。それぞれ alizarin red S 染色、Oil red O 染色、Alcian blue 染色により確認した。

(図 5)



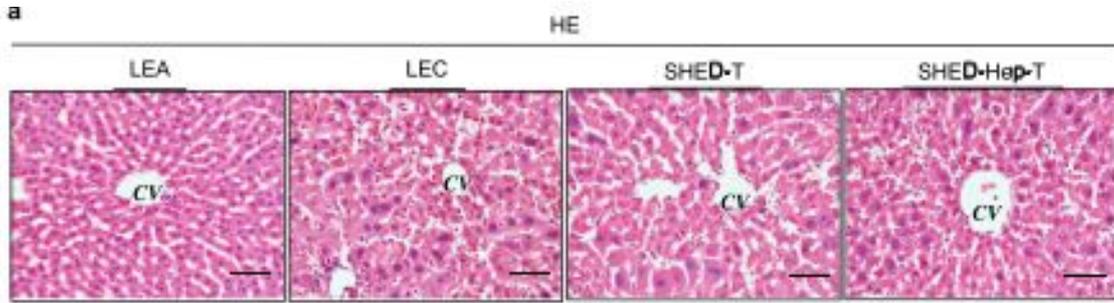
(図 5) 臍帯血由来間葉系幹細胞から分化誘導した肝様細胞

(図 6)



(図 6) Wilson 病ラット生存期間 SHED-Hep 移植により、Wilson 病ラットの生存期間が延長した。

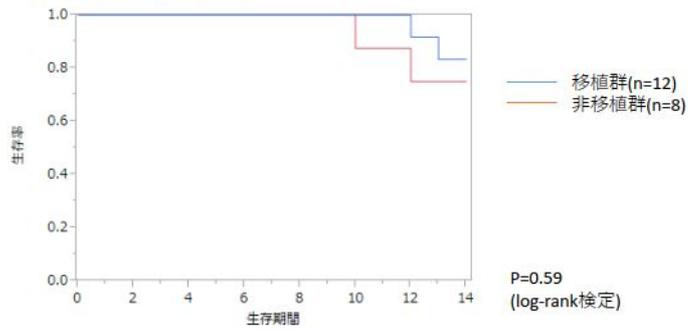
(図 7)



(図 6) Wilson 病ラットの肝組織 HE 染色像。
SHED 移植、SHED-HepT 移植において組織障害が軽減している

(図 8)

生存曲線(Kaplan-Meier)



(図 8) 高チロシン血症マウス生存曲線
両群で生存期間の有意差は見られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 10件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Fujiyoshi J, Yamaza H, Sonoda S, Yuniartha R, Ihara K, Nonaka K, Taguchi T, Ohga S, Yamaza T	4. 巻 9
2. 論文標題 Therapeutic potential of hepatocyte-like-cells converted from stem cells from human exfoliated deciduous teeth in fulminant Wilson's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep. 2019 Feb 7;9(1):1535	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s41598-018-38275-y.	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 該当する
1. 著者名 Taguchi T, Yanagi Y, Yoshimaru K, Zhang XY, Matsuura T, Nakayama K, Kobayashi E, Yamaza H, Nonaka K, Ohga S, Yamaza T	4. 巻 49
2. 論文標題 Regenerative medicine using stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): a promising new treatment in pediatric surgery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surgery Today. 2019 Apr 49(4)	6. 最初と最後の頁 316-322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.1007/s00595-019-01783-z	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 該当する
1. 著者名 Yoshimaru K, Matsuura T, Takahashi Y, Yanagi Y, Nagata H, Ohga S, Taguchi T	4. 巻 22
2. 論文標題 The efficacy of serum brain natriuretic peptide for the early detection of portopulmonary hypertension in biliary atresia patients before liver transplantation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatr Transplant. 2018 Aug;22(5):e13203.	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/ptr.13203.	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 該当する
1. 著者名 Noda Y, Koga Y, Ohta M, Miyazono M, Wakasugi Y, Funakoshi Y, Urabe Y, Kifune M, Ueda T, Oba U, Nakashima K, Souzaki R, Kinoshita Y, Taguchi T, Ohga S	4. 巻 45
2. 論文標題 Survey of Anticancer Drug Exposure to Attendant Families in Pediatric Medical Centers.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy.2018 Jun;45(6):945-948	6. 最初と最後の頁 945-948
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Nguyen HTN, Kato H, Masuda K, Yamaza H, Hirofuji Y, Sato H, Phama T, Takayama F, Sakai Y, Ohga S, Taguchi T, Nonaka K	4. 巻 16
2. 論文標題 Impaired neurite development associated with mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons differentiated from exfoliated deciduous tooth-derived pulp stem cells of children with autism spectrum disorder.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep	6. 最初と最後の頁 24-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbrep.2018.09.004	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 該当する

1. 著者名 Kobayashi T, Koga Y, Ishimura M, Nakashima K, Kato W, Ono H, Sonoda M, Eguchi K, Fukano R, Honjo S, Oda Y, Ohga S	4. 巻 40
2. 論文標題 Fever and Skin Involvement at Diagnosis Predicting the Intractable Langerhans Cell Histiocytosis: 40 Case-Series in a Single Center.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pediatr Hematol Oncol. 2018 Apr;40(3):e148-e153.	6. 最初と最後の頁 148-153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1097/MPH.0000000000001080.	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 該当する

1. 著者名 Hagio Y, Shiraishi A, Ishimura M, Sonoda M, Eguchi K, Yamamoto H, Oda Y, Ohga S	4. 巻 66
2. 論文標題 Posttransplant recipient-derived CD4+ T-cell lymphoproliferative disease in X-linked hyper-IgM syndrome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatr Blood Cancer. 2018 Oct 30:e27529.	6. 最初と最後の頁 1-2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1002/pbc.27529.	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 該当する

1. 著者名 Eguchi K, Ishimura M, Sonoda M, Ono H, Shiraishi A, Kanno S, Koga Y, Takada H, Ohga S	4. 巻 65
2. 論文標題 Nontuberculous mycobacteria-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in MonoMAC syndrome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatr Blood Cancer.	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1002/pbc.27017.	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 該当する

1. 著者名 Fujimoto Y, Hasegawa S, Matsushigea T, Wakiguchi H, Nakamura T, Hasegawa H, Nakajima N, Ainai A, Oga A, Itoh H, Shirabe K, Toda S, Atsutae R, Morishima T, Ohga S	4. 巻 7
2. 論文標題 Pulmonary inflammation and cytokine dynamics of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during A(H1N1)pdm09 infection	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep 2017 Aug 22;7(1):9128.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41598-017-08030-w.	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 該当する

1. 著者名 Yamada Y, Kinoshita I, Kenichi K, Yamamoto H, Iwasaki T, Otsuka H, Yoshimoto M, Ishihara S, Toda Y, Kuma Y, Setsu N, Koga Y, Honda Y, Inoue T, Yanai H, Yamashita K, Ito I, Takahashi M, Ohga S, Furue M, Nakashima Y, Oda Y.	4. 巻 72
2. 論文標題 Histopathological and Genetic Review of Phosphaturic Mesenchymal Tumours, Mixed Connective Tissue Variant	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Histopathology 2017 Aug 31.	6. 最初と最後の頁 460-471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/his.13377.	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 該当する

1. 著者名 Masuda K, Hirofujii Y, Hirofujii S, Kato H, Yamaza H, Sato H, Takayama F, Torio M, Sakai Y, Ohga S, Taguchi T, Nonaka K.	4. 巻 498
2. 論文標題 Mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons differentiated from exfoliated deciduous tooth-derived pulp stem cells of a child with Rett syndrome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun. 2018 Apr 15	6. 最初と最後の頁 898-904
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.077.	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 該当する

1. 著者名 Yasuoka K, Inoue H, Tanaka K, Fujiyoshi J, Matsushita Y, Ochiai M, Koga Y, Matsuura T, Taguchi T, Ohga S	4. 巻 112
2. 論文標題 Successful Liver Transplantation for Transient Abnormal Myelopoiesis-Associated Liver Failure.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neonatology	6. 最初と最後の頁 159-162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1159/000474930.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Fujiyoshi J, Yamaza H, Sonoda S, Yuniartha R, Ihara K, Nonaka K, Taguchi T, Ohga S, Yamaza T
2. 発表標題 HEPATOCYTE-LIKE-CELLS CONVERTED FROM STEM CELLS FROM HUMAN EXFOLIATED DECIDUOUS TEETH FOR A NOVEL CELL THERAPY FOR FULMINANT WILSON ' S DISEASE
3. 学会等名 The 15th Congress of Asian Society for Pediatric Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大賀正一
2. 発表標題 造血・免疫不全症に対する細胞療法
3. 学会等名 第47回千葉基礎臨床免疫セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大賀正一
2. 発表標題 小児科外来で疑う免疫不全症
3. 学会等名 第29回日本外来小児科学会年次集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大賀正一
2. 発表標題 ～ 小児から成人へ ～ IBD患者の移行期ケアを考える
3. 学会等名 IBDトランジショナルケア連携セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eguchi K
2. 発表標題 Systemic EBV-positive T/NK lymphoproliferative diseases with SH2D1A/XIAP hypomorphic gene variants.
3. 学会等名 The 81st Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢田裕太郎, 石村匡崇, 沼田晃彦, 江口克秀, 園田素史, 白石暁, 古賀友紀, 大賀正一
2. 発表標題 AYA世代発症の家族性血球貪食症候群3型
3. 学会等名 第181回 福岡血液懇話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江口克秀, 石村匡崇, 白石暁, 幸伏寛和, 長谷川一太, 矢田裕太郎, 園田素史, 古賀友紀, 大賀正一
2. 発表標題 非腫瘍性疾患に対する造血細胞移植 ~ 九州大学小児科での10年間の検討 ~
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2019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	田口 智章 (Taguchi Tomoaki) (20197247)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

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	鈴木 淳史 (Suzuki Atsushi) (30415195)	九州大学・生体防御医学研究所・教授 (17102)	
研究分担者	山座 孝義 (Yamaza Takayoshi) (80304814)	九州大学・歯学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	長谷川 俊史 (Hasegawa Shunji) (90314806)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	