

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08598

研究課題名(和文) 臨床応用へ向けたヒト乳歯歯髄幹細胞を用いた肝再生医療の基盤整備

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

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：XF/SF条件下でマルチコロニー由来のSHEDを単離・培養・増殖をおこなう製造工程ならびにMCBとWCBの2段階で細胞保管するシステムを構築した。最終製品としてのSHEDならびにMCBとWCBに保管するSHEDにおける安全性・品質(ポピュレーションダブリング、染色体の安定性、微生物学的安全性、幹細胞特性)についての品質管理を構築した。さらに、最終製品や保管製品としてのSHEDにおけるin vivoでの免疫原性や造腫瘍性、さらに四塩化炭素誘導慢性肝線維症マウスモデルを用いた肝再生作用についての評価系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でおこなった製造と品質検査によって得られたSHED最終製品は、慢性肝線維症の治療のために安全で有効な治療成績が示された。

研究成果の概要(英文)：We have developed a manufacturing process for isolating, culturing, and propagating multi-colony-derived SHEDs under XF/SF conditions, as well as a system for storing cells in two stages, MCB and WCB. We established quality control for the safety and quality (population doubling, chromosome stability, microbiological safety, and stem cell characteristics) of SHEDs as final products and SHEDs stored in MCBs and WCBs. In addition, we established a system to evaluate the in vivo immunogenicity and tumorigenicity of SHEDs as final products and stored products, as well as their liver regeneration effects using a mouse model of carbon tetrachloride-induced chronic liver fibrosis.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：小児外科、肝臓移植、再生医療

キーワード：歯髄幹細胞 肝再生医療 SHED

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

1989年に生体肝移植が始まって以来、これまで本邦では8387件の肝移植手術が行われ、そのうち小児例は2942例に行われている。現在では肝移植は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なく、肝臓を提供するための手術という問題があり、手術侵襲も大きく死亡例の報告もある。我々小児外科の分野において、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、周術期管理や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。

肝移植後も、免疫抑制剤の長期内服を余儀なくされ、さらに免疫抑制状態による日和見感染症なども問題となってくる。

以上のような問題点から、肝移植に代わる新たな治療方法の開発が望まれており、その中で肝再生医療が注目を浴びている。

我々は再生医療の細胞源としてヒト乳歯歯髄幹細胞(SHED:stem cells from human exfoliated deciduous teeth)を用いて研究を行っているが、SHED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.)された。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.)、免疫寛容性が高く、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。さらにiPS細胞のように遺伝子導入が不要であるため、造腫瘍性のリスクが少ないとも言われている。

我々はこれまでマウスを用いた動物実験で、免疫疾患(Yamaza T, et al. Stem Cell Res Ther. 2010 Mar 15; 1(1):5.)、そして肝硬変(Yamaza T, et al. Stem Cell Research & Therapy (2015) Sep 10; 6:171)においてSHEDが有用であることを報告してきた。

乳歯は、自然脱落または抜歯してもあとから永久歯が生えてくるため従来は不要となる歯であり、また生えかわりの時期を待たなくても使用可能であるため、乳歯歯髄をソースとすることは容易である。この乳歯歯髄幹細胞はHLA発現が乏しいため免疫寛容を得やすく同種移植が可能であること、骨、脂肪、軟骨、肝臓、神経細胞など種々の細胞への分化能を有することなどが学術的特色である。これまでSHEDを臨床に応用した報告はなく、我々が臨床応用を行えば世界初となり、世界中の胆道閉鎖症の患児を救う有用な治療法となり得る。

2. 研究の目的

今後、胆道閉鎖症術後に肝硬変になった患児に対し、SHEDを臨床応用することを目標としている。そのためには、投与するSHEDの品質(増殖能・分化能が維持されている)、安全性(感染症、造腫瘍性、遺伝子変異など)、有効性に関して担保されている必要がある。よって、本研究では臨床グレードのSHEDの品質、安全性、有効性に関する評価を目的とする。

3. 研究の方法

臨床グレードの質・安全性・治療学的有効性が担保されたSHEDを大量に製造するシステムの構築が不可欠であり、付着コロニー形成法とゼノフリー/無血清(xeno-free/serum-free, XF/SF)の条件下において、安全性・品質・幹細胞特性・治療学的有効性を備えたSHEDの製造工程とその評価系について検討をおこなった。

XF/SF条件の下で、マルチコロニー由来のSHEDを単離し、拡大培養をおこなった。SHED製造物は、マスターセルバンク(master cell bank, MCB)とワーキングセルバンク(working cell bank, WCB)の2段階に凍結保管した。SHED最終製品は、WCBから直接起眠した形態として製造した。最終製品ならびにMCBとWCBに保存されたSHED製品それぞれの安全性・品質・幹細胞特性・有用性について検査した。

4. 研究成果

XF/SF条件下でマルチコロニー由来のSHEDを単離・培養・増殖をおこなう製造工程ならびにMCBとWCBの2段階で細胞保管するシステムを構築した。最終製品としてのSHEDならびにMCBと

WCB に保管する SHED における安全性・品質（ポピュレーションダブリング、染色体の安定性、微生物学的安全性、幹細胞特性）についての品質管理を構築した。さらに、最終製品や保管製品としての SHED における *in vivo* での免疫原性や造腫瘍性、さらに四塩化炭素誘導慢性肝線維症マウスモデルを用いた肝再生作用についての評価系を構築した。

本研究でおこなった製造と品質検査によって得られた SHED 最終製品は、慢性肝線維症の治療のために安全で有効な治療成績が示された。しかしながら、SHED 製品を臨床へ応用するには、医薬品の製造管理および品質管理の基準（good manufacturing practice, GMP）を満たす必要がある。そのためには、未解決の様々な課題が残されている。たとえば、*in vivo* での毒性試験は本研究では行っていない。臨床グレードの hDPSC 製品の安全性を評価する、十分な質と再現性のある毒性試験を今後計画していく必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iwanaka T, Yamaza T, Sonda S, Yoshimaru K, Matsuura T, Yamaza H, Ohga S, Oda Y, Taguchi T	4. 巻 11;134
2. 論文標題 A Model Study for the Manufacture and Validation of Clinical-Grade Deciduous Dental Pulp Stem Cells for Chronic Liver Fibrosis Treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Res Ther .	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-020-01630-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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	松浦 俊治 (MATSUURA Toshiharu) (10532856)	九州大学・大学病院・准教授 (17102)	
研究分担者	田口 智章 (TAGUCHI Tomoaki) (20197247)	福岡医療短期大学・歯科衛生学科・学長 (47131)	
研究分担者	吉丸 耕一郎 (YOSHIMARU Koichiro) (60711190)	九州大学・医学研究院・講師 (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)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------