

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592696

研究課題名(和文)先天性肝疾患に対する乳歯歯髄幹細胞を用いた肝立体構造体による新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapy for congenital metabolic disorders using functional three-dimensional liver structures constructed by stem cells from human exfoliated deciduous teeth

研究代表者

柳 佑典 (Yanagi, Yusuke)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30596664

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)：ヒト乳歯幹細胞(SHED)から肝細胞への分化誘導法を確立し、拒絶反応が起こりにくい細胞であることを明らかにした。四塩化炭素投与肝障害モデルマウス肝臓に対して非免疫抑制下にSHED由来肝細胞を移植し、肝臓への生着と肝障害・線維化および生命予後の改善がえられた。また、バイオ3Dプリンターを用いてヒト初代肝細胞・臍帯静脈内皮細胞・骨髄由来間葉系幹細胞を含む立体肝組織の作製に成功し、組織学的に生体肝に類似した構造を有し、肝臓の機能発現を確認した。さらに、SHED由来肝細胞を用いて立体肝組織の構築に成功した。今後これを移植することによる肝再生療法の開発に発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We successfully differentiated stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth(SHED) to hepatocyte-like cells by our culture system. SHED derived hepatocyte-like cells(SHED-Hep) showed low immunogenicity and suppression of T cells in vitro. Following these result, we xenografted SHED-Hep into carbon tetrachloride (CCl4)-induced chronic liver fibrosis model mice without immunosuppressive therapy, showing the engraftment in the recipient liver, anti-fibrotic efficacy and prolonged survival. In the next step, we fabricated 3D liver construct with human primary hepatocytes, umbilical vein endothelial cells and mesenchymal stem cells using a bio-3D printer. It's microstructure resembled real liver tissue in histology, and it showed liver specific functions. We also succeed in biofabrication of 3D liver construct with SHED-Hep. In future, we will transplant this SHED derived construct to develop new liver regenerative therapy.

研究分野：再生医療

キーワード：歯髄幹細胞 肝細胞移植 肝組織工学 代謝性肝疾患 人工臓器

1. 研究開始当初の背景

肝臓は様々な蛋白質の合成や有害物質の代謝を行い、生命維持にかかせない臓器である。先天性肝代謝異常症では、欠損蛋白を産生する肝組織が体内に生涯維持されれば根治療法となる。現在、肝移植が唯一の根治術だが、侵襲が大きいことが問題であり、また、最近肝細胞移植が一部で行われているが、移植細胞の生着が悪く永続的な効果は得られていない。そこで、新たな安全で低侵襲は治療の開発が必要である。

2. 研究の目的

近年、乳歯歯髄から採取した幹細胞 (SHED: Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth) は HLA の発現が乏しいため拒絶反応が起こりにくいことが知られており、これを肝細胞に分化させ、共同研究者の中山らが開発した細胞だけで複雑な立体構造体を作成する手法を用い、肝機能活性が持続する立体的肝細胞構造体を作成する。この構造体を体内に移植することにより先天性肝疾患の新たな低侵襲治療の開発することを目的とする。

3. 研究の方法

1) SHED から肝細胞への分化誘導法の確立

SHED に EGF, FGF, HGF, オンコスタチン M など種々のサイトカインを段階的に加える独自の培養系において肝細胞へ分化させ、先天性代謝疾患に不可欠な蛋白群の合成ならびに分泌を in vitro で確認した。

2) SHED 由来肝細胞の肝再生効果の検証

8週齢C57BL/6マウスに、四塩化炭素CCl₄ (0.5ml/kg) を週2回、計4週間腹腔内投与し、肝障害モデルマウスを作製。その後SHED由来肝細胞1.0x10⁶を脾臓内に注入し異種移植を行った。細胞移植後、免疫抑制剤は投与せず、CCl₄投与をさらに4週間継続し、屠殺後、血清ならびに肝組織を採取して解析した。

3) ヒト凍結肝細胞を用いた立体的肝細胞構造体の作成および適切な形状の検討

ヒト凍結肝細胞をスフェロイドプレートに播種・培養し、立体的細胞凝集体であるスフェロイド (直径 500 μm) を多数作成。このスフェロイドを中山らが開発したバイオ 3D プリンターを用いて、立体的構造体を作成した。

4) SHED 由来肝細胞を用いた立体組織の作製の最適化

ヒト歯髄幹細胞より分化誘導した肝細胞を 2x10⁴~1x10⁶/spheroid で段階的に細胞数を変えてスフェロイドを作成。スフェロイド形成期間、スフェロイドサイズ、および低酸素マーカー (HIF1-α) の染色、TUNNEL 染色による細胞生存率を解析し、最適なスフェロイド作成条件を解析した。

5) 移植適正部位の検討

ドナーラットより摘出した肝小片を同種ラットの肝臓表面に鈍的にポケットを作成して埋植する方法と肝の切離断端に接着さ

せるコラーゲンシートでカバーする方法で移植し、組織の生着を比較した。

4. 研究成果

1) 肝特異的機能を有する細胞へ分化誘導することに成功し、**尿素回路異常症に必要な関連酵素の発現を確認した** (図1)。さらに、SHED およびその誘導肝細胞は HLA class II 発現に乏しいだけでなく、第3者リンパ球と共培養を行うと、Tリンパ球の増殖抑制やアポトーシス誘導を示すことから**拒絶反応が起こりにくい**ことがわかった (図2)。

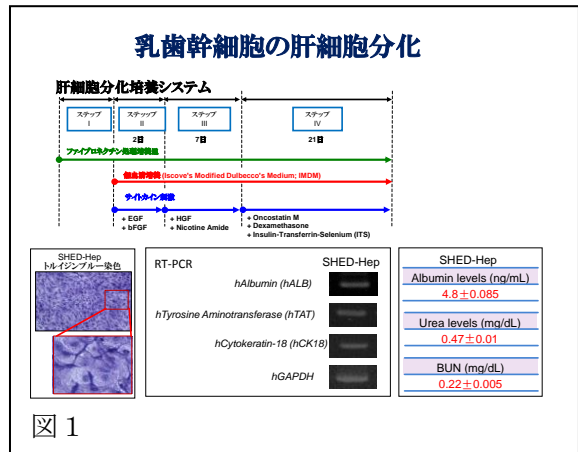


図1

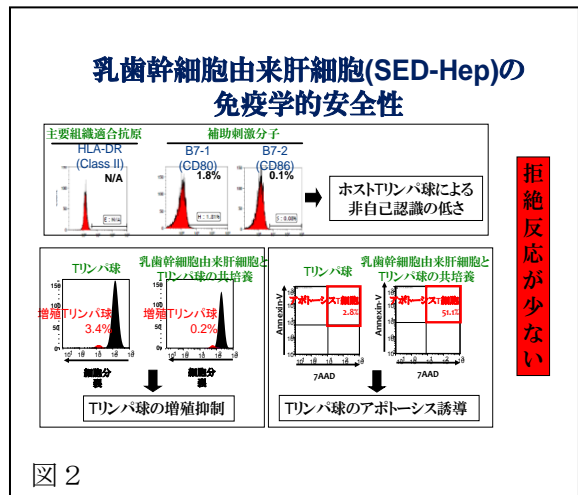


図2

2) 生化学的解析により、肝機能の著名な改善が認められた。病理学的解析により、移植細胞の線維化組織周辺への生着・集簇を認め、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 (図3)。

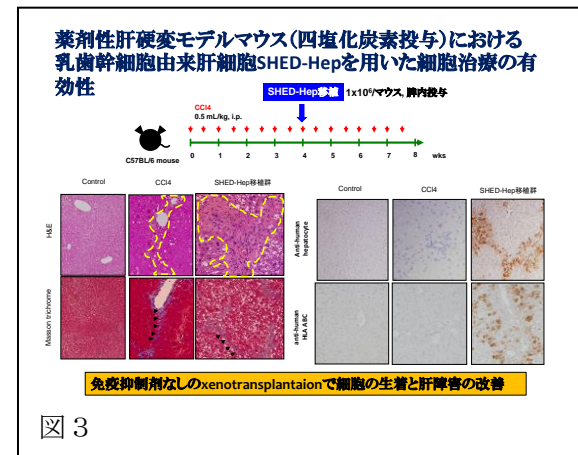
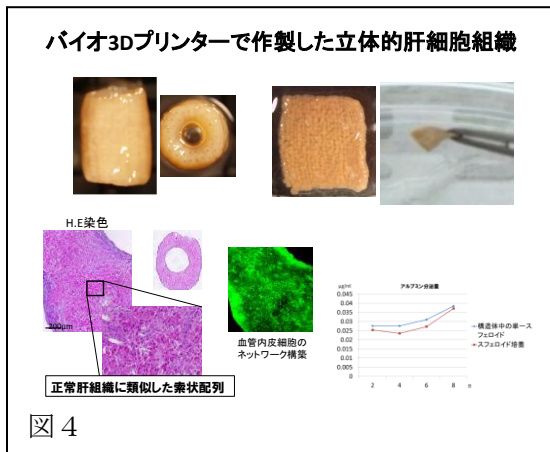
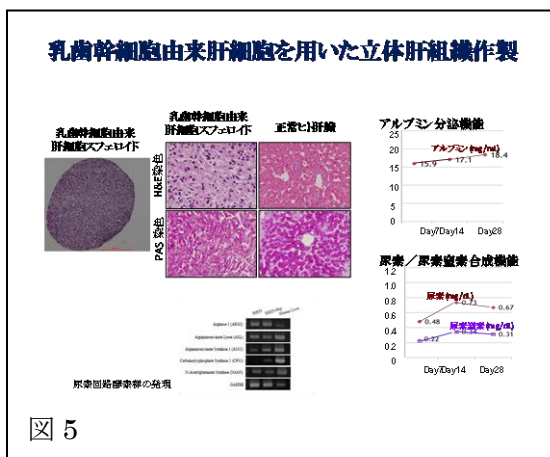


図3

3) ヒト凍結肝細胞のみでは直径500 μ mのスフェロイドは形成されなかったが、間葉系幹細胞と共培養することで可能であった。さらに、立体構造体内での血管ネットワーク形成の為、臍帯静脈内皮細胞を加えて共培養し、バイオ3Dプリンターで3種細胞ヘテロスフェロイドを積層し、約1cm³の立体的な肝細胞組織の構築に成功した。組織学的に肝細胞の索状配列といった正常肝組織に見られる構造を認め、血管内皮細胞のネットワークも認めた。また、アルブミンの産生能を高く維持していた。(図4)



4) 細胞数 5×10^5 個以上のスフェロイドは直径が1mmを超え、培養7日目において中心部の低酸素および細胞死が観察された。スフェロイドのサイズや強度の問題からバイオ3Dプリンターによる立体化には適して 1×10^5 が最適であり、バイオ3Dプリンターによる立体化が可能であった。SHED由来肝細胞のスフェロイドは28日間肝細胞特異的機能が維持されることを確認した(図5)



5) 肝切離断端移植では組織の生着が確認できたが、埋植法では周囲組織による圧迫のため移植片内のうっ血所見がみられ生着は見られなかった。

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 件)

[学会発表] (計 11件)

①柳 佑典、「バイオリピッドプロトタイピングシステム(BRP system)を用いた scaffold free 肝臓構造体の構築」第 11 回日本再生医療学会 (H24 年 6 月 横浜)

②柳 佑典、「バイオリピッドプロトタイピングシステム(BRP system)を用いた立体的肝細胞構造体の構築」第 48 回日本移植学会総会 (H24 年 9 月 名古屋)

③柳 佑典、「バイオリピッドプロトタイピングシステム(BRP system)を用いた肝組織再構築の試み」第 39 回日本胆道閉鎖症研究会 (H24 年 11 月 大阪) 遼太郎ちゃん基金優秀演題賞受賞

④柳 佑典、「バイオリピッドプロトタイピングシステム(BRP system)を用いた機能的三次元肝構造体の構築」第 12 回日本再生医療学会総会(H25 年 3 月 横浜)

⑤柳 佑典、「バイオリピッドプロトタイピングシステム(BRP system)を用いた肝組織再構築の試み」113 回日本外科学会総会(H25 年 4 月 福岡)

⑥柳 佑典、「バイオリピッドプロトタイピングシステム(BRP system)を用いた立体的肝組織の構築」第 50 回日本小児外科学会(H25 年 6 月 東京)

⑦柳 佑典、「Construction of scaffold-free three dimensional liver tissue by spheroid fusion using the bio 3D printer.」The 24th Fukuoka International Symposium on Pediatric/Maternal-Child Health research(H25 年 9 月 Fukuoka)

⑧柳 佑典、「スフェロイド自動積層装置を用いた scaffold-free 機能的三次元肝組織の構築」第 1 回細胞凝集研究会 (H25 年 11 月 福岡)

⑨柳 佑典、「四塩化炭素誘導肝硬変モデルマウスに対するヒト脱落乳歯幹細胞移植療法の有効性に関する研究」第 51 回日本小児

外科学会(H26年5月 大阪)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：肝組織型スフェロイド
発明者：柳 佑典、田村 忠士、中山 功一、
田口 智章
権利者：国立大学九州大学法人、株式会社サ
イフューズ
種類：特許
番号：PCT/JP2014/058152
出願年月日：2014年3月18日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

柳 佑典 (YANAGI, Yusuke)
九州大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・
研究員
研究者番号：30596664

(2) 研究分担者

田口 智章 (TAGUCHI, Tomoaki)
九州大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・
教授
研究者番号：20197247

中山 功一 (NAKAYAMA Koichi)
佐賀大学・工学 (系) 研究科 (研究院)・
教授
研究者番号：50420609

林田 真 (HAYASHIDA, Makoto)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：70452761

孝橋 賢一 (KOHASHI, Kenichi)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：10529879

井原 健二 (IHARA, Kenji)

大分大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・
教授

研究者番号：80294932

(3) 連携研究者

山座 孝義 (YAMAZA, Takayoshi)
九州大学・歯学 (系) 研究科 (研究院)・
講師
研究者番号：80304814