

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253094

研究課題名(和文)小児外科領域の難治性疾患における脱落乳歯幹細胞を用いた新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of new therapies for intractable diseases in pediatric surgery using stem cells from human exfoliated deciduous teeth

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,600,000円

研究成果の概要(和文)：小児領域の難治性疾患である1)肝不全、2)先天性代謝異常症、3)横隔膜ヘルニアに対する脱落乳歯幹細胞(SHED)を用いた新規治療法の開発を行った。1)SHEDおよびSHEDより分化誘導した肝細胞の慢性/急性肝不全モデルマウスに対する抗炎症、抗線維化、肝修復効果を確認した。2)SHEDより分化誘導した肝細胞の酵素発現を確認した。さらに、3D bioprinterを用いて作製したミニ肝臓を欠損酵素の補充源として移植する方法を開発した。3)幹細胞の経母体投与による横隔膜ヘルニア胎仔低形成肺に対する肺成熟効果を確認した。また、3D printerを用いて細胞性パッチを作製し、横隔膜修復に成功した。

研究成果の概要(英文)：We worked on the development of new therapies for 1)liver failure, 2)inherent metabolic liver disease and 3) congenital diaphragmatic hernia, using stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). The results were as follows; 1) We demonstrated anti-inflammatory, antifibrotic and liver regenerative effects of SHED and the SHED derived hepatocytes for both acute and chronic liver failure in mice. 2) We confirmed the expression of the metabolic enzymes in the SHED derived hepatocytes, which are absent in some inherent metabolic liver disease. Furthermore, we succeeded in biofabrication of a small liver tissue in vitro using a 3D bioprinter and developed a novel transplat method of a liver tissue. 3) We demonstrated the therapeutic potential of mesenchymal stem cell transplantation for pulmonary hypoplasia in a nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia rat model. Furthermore, we succeeded in diaphragmatic repair by a cellular patch fabricated with a 3D bioprinter.

研究分野：小児外科学

キーワード：乳歯幹細胞 難治性疾患 細胞移植 肝再生医療 肺成熟 組織工学

## 1. 研究開始当初の背景

**乳歯歯髓由来幹細胞(SHED)**は他の間葉系幹細胞と同様に多分化能と高い増殖能を持つだけでなく、細胞性免疫に不可欠な HLA の発現が乏しいため、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。すなわち、SHED は**細胞移植による再生医療**に適した特性を有すると考えられる。乳歯は従来「捨てる」ものであるため**入手が容易**であり、これを用いた**幹細胞のバンク**を作り、必要に応じて様々な細胞療法に利用できる。我々はすでに SHED の細胞単離と増殖・分化誘導法を確立し、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、肝細胞などに分化させている。これらを用いた新規治療法の開発を目指す。対象疾患は小児領域の難治性疾患である、1)**胆道閉鎖や劇症肝炎による肝不全**、2)**先天性代謝異常症や血液凝固異常症**、3)**重症横隔膜ヘルニア**である。

1) **胆道閉鎖や劇症肝炎による肝不全**、2) **先天性代謝異常症**(Wilson 病、尿素サイクル異常症、シトリン血症など)および**血液凝固異常症**(血友病など)は正常な機能を有する肝組織・肝細胞が生体内に生涯維持されれば根治となる。現在肝移植は唯一の根治療法だが、肝移植はドナーが必要で手術侵襲も大きく適応が限定される。また移植組織の永続的な生着には免疫抑制療法を必要とする。そこで、肝移植に代わる新たな治療法の開発が求められている。) **先天性横隔膜ヘルニア**に対してはいつでも**使える横紋筋のシート**を準備し、このシートで欠損孔を修復すればこれらの問題を解決できる可能性が高い。また、幹細胞を用いた肺低形成の治療も可能である。

## 2. 研究の目的

肝不全に対しては **SHED および SHED より分化誘導した肝細胞**を経門脈的に**細胞移植**することでの治療効果を確認し、病態に応じた新規治療法を開発する。代謝性肝疾患、血友病に対しては欠損タンパクの補充源として、細胞を組織化して作製した**小さな肝臓**を移植することにより新規治療法を開発する。さらに、SHED の免疫学的検討を行い、ドナーの選択などにより、**免疫抑制剤**から離脱した生着の可能性を模索する。 **先天性横隔膜ヘルニア(CDH)**に対しては、欠損孔を修復する**横紋筋のシート**を作製し、また、幹細胞を用いた肺低形成の治療法を開発する。

## 3. 研究の方法

### 肝臓

#### 1) 乳歯幹細胞から肝細胞への分化誘導

九州大学病院小児歯科外来で患児ならびにその保護者の同意のもと採取された**脱落乳歯**を細胞ソースとして用いる。既に確立されている手法にて乳歯歯髓より乳歯幹細胞を単離・培養。さらに、**肝細胞分化無血清培地**で乳歯幹細胞の**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**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)アプローチにて解析した。

#### 2) 乳歯幹細胞由来肝細胞の免疫寛容性の検討

乳歯幹細胞由来肝細胞と**ヒト末梢血由来 T 細胞**を共培養する。T 細胞の免疫学的特性を Flow cytometry やマイクロアレイなどを用いて分子生物学的に解析した。

#### 3) 乳歯幹細胞および乳歯幹細胞由来肝細胞の有効性、安全性確認

乳歯幹細胞および乳歯幹細胞から誘導した肝細胞を種々の疾患モデル動物(四塩化炭素誘導薬剤性肝硬変モデル、ウィルソン病モデルラット、コンカナバリン A 投与急性肝不全モデルマウス)の**脾臓内に注入**し、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った。

#### 4) 肝細胞を用いた立体的肝細胞構造体の作製および適切な形状の検討

ヒト成熟肝細胞から細胞凝集体(**スフェロイド**)を作製した。このスフェロイドを独自のロボットシステムを用いた**ラビッドプロトタイプングによる積層造形法(バイオ3D プリンター)**により立体的構造体を作製し、組織構造や機能を解析した。

#### 5) 移植適正部位の検討

肝組織は同所性に移植しないと発育しないという仮説の元、肝組織を同所性に移植する方法を検討した。ルシフェラーゼトランスジェニックラット肝組織を肝表面、実質内、切離断端および異所性移植の代表として門脈近傍の腸間膜内に移植し、ルシフェラーゼの発光強度および病理組織学的により、組織の生着と成熟を比較した。

#### 6) ミニ肝臓移植実証のための非臨床試験

**ヌードラット**に対し**ヒト成熟肝細胞**より作製した**ミニ肝臓**を移植し、植後1週間、1ヶ月、で剖検。肝構造体の定着ならびに機能発現を検討した。また、血中ヒトアルブミン濃度を測定し、機能発現を解析した。

### 横隔膜

#### 1) ヒト培養横紋筋細胞を用いた細胞パッチの作製

線維芽細胞の**スフェロイド**を作製し、バイオ3D プリンターを用いて**細胞パッチ**を作製した。作製したシートの**引っ張り強度**解析を行い、作製条件の最適化を行った。

#### 2) 外科的 CDH モデルラットにおける細胞パッチを用いた横隔膜修復試験

ヌードラットを全身麻酔、人工呼吸管理下に、左横隔膜を1.5x1.5cmの範囲で切除し、**横隔膜欠損孔**を作製した。欠損孔を3Dプリンターで作製した細胞パッチで修復した。無治療群、バクテリウムによる修復群との生存率を比較検討した。

#### 3) トロフェン誘導 CDH モデルラットの低

## 形成肺に対する幹細胞の有効性確認

妊娠9日目の母獣にニトロフェン100mgを胃内に投与。妊娠12日目にGFP+ラット肺組織より単離した幹細胞を母獣子宮静脈より投与した。妊娠20日目に胎仔を娩出し、CDHラットより肺を摘出し、**肺成熟効果を解析した**。肺成熟の指標は型肺胞上皮細胞のマーカ-:Aquaporin-5,T1-、型肺胞上皮細胞のマーカ-:Surfactant protein-C,TTF-1、血管平滑筋:-SMA、ピメンチン、血管内皮細胞:VEGF,CD34をRT-PCR,in situ hybridization,Western blotting,免疫染色などを用いて評価した。

## 4. 研究成果

### 1) 乳歯幹細胞から肝細胞への分化誘導

EGF,HGF,bFGF,OSMなどを段階的に培地に添加してSHEDを培養し、約1ヶ月でSHEDの肝細胞への分化誘導に成功した。分化誘導した細胞は形態的に肝細胞に類似し、アルブミン、Tyrosine Aminotransferase、CK18などの肝細胞マーカ-の発現や、上清中へのアルブミン、尿素の産生を確認した。また、OTC、CPS1などの尿素回路関連酵素の発現を確認した。

### 2) 乳歯幹細胞由来肝細胞の免疫寛容性の検討

さらに、ヒト末梢血由来T細胞との共培養でT細胞の増殖抑制、アポトーシスを誘導する結果が得られた。さらに四塩化炭素誘導肝硬変モデルマウスに対して非免疫抑制下に経脾臓的に投与。拒絶されることなく投与後4週目でも肝臓内に生着していることを確認した。

### 3) 乳歯幹細胞および乳歯幹細胞由来肝細胞の有効性、安全性確認

**乳歯幹細胞および乳歯幹細胞由来肝細胞の安全性試験** 乳歯幹細胞または乳歯幹細胞由来肝細胞を免疫不全マウスの皮下ならびに精巣へ移植し、移植後8週まで移植部位を観察した所、非移植部位と比較して異常増殖は認められなかった。また、飼育期間中のマウスの体重減少等の全身的異常も認められなかった。四塩化炭素誘導性肝障害モデルに、乳歯幹細胞ならびに乳歯幹細胞由来肝細胞を経脾的に移植後4週にて採取した肝組織より病理組織学的標本作製した。H&E染色による、レシピエント肝組織に腫瘍増殖を思わせる所見は認められなかった。また抗HLA-ABC抗体ならびに抗HepPar1抗体を用いた免疫組織学的解析により、ドナー細胞の生着が認められた。しかし、ドナー細胞による腫瘍組織像は観察されなかった。乳歯幹細胞と乳歯幹細胞由来肝細胞を比較したCGH解析では、明らかなゲノムDNAの過剰、欠失、増幅などのコピー数異常は検出されなかった。

### 乳歯幹細胞および乳歯幹細胞由来肝細胞の有効性試験性試験

四塩化炭素誘導肝硬変モデルマウスに対して非免疫抑制下にSHEDを経脾臓的に投与したところ、線維化の強い門脈周囲にSHED

の集簇がみられ、線維化の軽減が確認された。抗線維化の機序として、線維化を起こす星細胞の活性化を抑制されておりその結果、線維化誘導物質であるMMP9,MMP2,TIMP,TIMP2などの産生が抑制されていた。また、炎症を惹起するクッパー細胞やT細胞の増殖が抑制されており、炎症性サイトカインであるTGF、TNF、IL-6,IL-17などの産生が抑制されており、SHEDの抗炎症効果が確認された。その結果、肝障害の軽減(血中AST,ALT,ALP,T.Bilの減少)が見られ、非投与群より優位に生存率の上昇が得られた。この移植したSHEDを肝臓より単離して解析したところ、アルブミン、FAH,TAT,CYP1A1,CYP3A7などの肝特異的遺伝子の発現を認め、肝臓内での肝細胞への分化が証明された。次にSHEDより分化誘導した肝細胞を同様に四塩化炭素誘導肝硬変モデルマウスに対して非免疫抑制下に移植したところ、未分化のSHEDと同様な抗炎症、抗線維化、肝修復効果が見られた。

コンカナバリンA投与急性肝不全モデルに対しても、SHEDおよびSHED由来肝細胞を経脾臓的に投与したところ、疾患モデル動物の生命予後の有意な延長を認めた。この効果はSHEDよりもSHED由来肝細胞のほうが優れているという結果を得た。

さらに、Wilson病ラットに対しても、SHEDおよびSHED由来肝細胞を経脾臓的に投与したところ、疾患モデル動物の生命予後の有意な延長を認めた。また、血液生化学的検査にて黄疸、肝機能障害の改善を認め、病理学的検討では肝線維化の改善と銅沈着の軽減を認めた。この効果はSHEDよりもSHED由来肝細胞のほうが優れているという結果を得た。

### 4) 肝細胞を用いた立体的肝細胞構造体の作製および適切な形状の検討

まず、ラット初代肝細胞、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)、骨髄由来間葉系幹細胞のヘテロスフェロイドをバイオ3Dプリンターを用いて立体的に積み上げることで立体的肝細胞構造体の作成を行った。培養1週間で、内部に内皮細胞で被覆された毛細血管様の構造が構築された。そこで次にヒト成熟肝細胞を用い同様にHUVEC,MSCと共培養してスフェロイドを作製した。スフェロイド形成期間、サイズ、形状、アルブミン産生能などを元にスフェロイド作製の最適条件を検討し、肝細胞:HUVEC:MSC=10:7:3x10<sup>3</sup>/スフェロイドという条件を得た。このスフェロイドをバイオ3Dプリンターを用いて管状の立体構造体を作製し、1ヶ月間内腔を還流培養したところ、血管内皮ネットワークの形成が見られ、アルブミンの産生が徐々に上昇し、1ヶ月以上の培養が可能であった。また、培養1ヶ月時には胆管上皮細胞マーカ-であるCK19陽性の細胞が管様構造形成を認めた。さらに、ヒト乳歯幹細胞由来肝細胞を用いて、最適なスフェロイド作成条件を決定し、立体肝組織作製を行った。

## 5) 移植適正部位の検討

まず同所性移植の方法を比較検討した。ルシフェラーゼトランスジェニックラット肝組織を肝表面、実質内、切離断端に移植し、ルシフェラーゼの発光強度および病理組織学的解析を行ったところ、肝表面と肝実質内では生着はせず、切離断端でのみ生着を確認した。次に異所性移植では最も肝組織の生着および機能発現が良い門脈近傍の腸間膜内移植と肝切離断端移植を比較した。移植したルシフェラーゼトランスジェニックラット肝芽のルシフェラーゼの発光強度は、断端移植においては移植後14日間上昇した後、3ヶ月に渡り高値を維持した。一方、腸間膜内移植では移植後7日間で発光強度は低下し、低地のまま推移した。また、移植後3ヶ月目に肝再生刺激のため肝部分切除を付加したところ、断端移植したグラフトの再度発光強度の上昇が見られたが、腸間膜内移植では認められなかった。移植後3ヶ月目での病理組織学的検討では、断端移植では移植した肝芽の成熟がみられ、成熟肝細胞にやる索状配列を認められたが、腸間膜内移植では肝芽の成熟がみられず、偽腺管構造を多数みとめた。以上の結果から肝切離断端移植が最も優れた肝組織移植法と考えられた。

## 6) ミニ肝臓移植実証のための非臨床試験

ヒト成熟肝細胞より作製したミニ肝臓を断端移植法でヌードラットに移植したELISAを用いた血中ヒトアルブミンの測定により1ヶ月間のヒトアルブミンの産生を確認した。移植後1週間の組織学的検討にて、ミニ肝臓の生着およびヒトアルブミンの先生を確認し、さらにHUVECによって形成された血管の新生を認めた。しかし、移植後1ヶ月目で肝細胞内にはビリルビンが沈着。毛細胆管が構築されていないと考えられた。本研究では成熟肝細胞を移植したが、胆汁産生能を獲得する前の肝前駆細胞を移植すれば、胆管上皮細胞および肝細胞への二分化性を有することも踏まえ、胆汁うっ滞および胆管形成の問題が解決される可能性が示唆された。

## 横隔膜

### 1) ヒト培養横紋筋細胞を用いた細胞パッチの作製

3Dプリンターを用いてヒト横紋筋芽細胞、臍帯静脈内皮細胞、骨髄由来幹細胞を用いて血管内皮ネットワークを有する1x1cmの横紋筋シートを作製することに成功した。しかし、

横紋筋芽細胞の生存率が悪く、移植に耐える得る強度が得られなかった。そこで、まず線維芽細胞でパッチを作成した。Sheet状に作製するより、Tube状にして循環培養し、一边を切り開いて展開してパッチにすることで引っ張り強度が上昇した。さらにHUVECを1割入れることで最大強度を得た。このパッチ内には豊富なコラーゲンの産生が見られた。

### 2) 外科的CDHモデルラットにおける細胞パッチを用いた横隔膜修復試験

ヌードラットにおいて外科的に作製した横隔膜欠損孔を3Dプリンターで作製した細胞パッチで修復した。無治療群、バイクリルメッシュによる修復群はいずれも術後早期に死亡したが、細胞パッチによる修復群では全例生存が得られ、治療の有効性が示された。

### 3) トロフェン誘導CDHモデルラットの低形成肺に対する幹細胞の有効性確認

MSC移植群ではGFP陽性の細胞が肺に生着し、肺胞壁および動脈壁の正常化(菲薄化)および肺胞腔の増大を認めた。また、MSC移植文では、肺成熟マーカーの上昇が確認され、MSCの肺成熟促進効果が確認された。

## 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4件)

1. Yamaza T, Alatas FS, Yuniartha R, Yamaza H, Fujiyoshi JK, Yanagi Y, Yoshimaru K, Hayashida M, Matsuura T, Aijima R, Ihara K, Ohga S, Shi S, Nonaka K, Taguchi T.  
In vivo hepatogenic capacity and therapeutic potential of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in liver fibrosis in mice. *Stem Cell Res Ther.* 2015. 6:171.
2. Yuniartha R, Alatas F.S, Nagata K, Kuda M, Yanagi Y, Esumi G, Yamaza T, Kinoshita Y, Taguchi T. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell transplantation in a nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia rat model. *Pediatr Surg Int.* 30:907-914, 2014
3. 田口智章, 柳佑典, 吉丸耕一郎 「難病治療手段としての幹細胞移植および再生医療」九州臨床外科医学会会誌、第1巻、p2-9、2015
4. 田口智章 「小児外科領域の臨床研究：難治性疾患からTRまで」日本外科学会雑誌 第117巻 p236-238、2016

〔学会発表〕(計 8件)

1. 第113回日本外科学会総会(H25年4月福岡)「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」柳 佑典、林田 真、中山 功一、田口 智章
2. 第50回日本小児外科学会(H25年6月東京)「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」柳 佑典、林田 真、中山 功一、田口 智章
3. The 24<sup>th</sup> Fukuoka International Symposium on Pediatric/Maternal-Child Health research(Sep. 2013. Fukuoka)  
Title: Construction of scaffold-free three dimensional liver tissue by spheroid fusion using the bio 3D printer.  
Yusuke Yanagi Y, Hayashida M, Yoshimaru K, Nakayama K, Taguchi T
4. 第1回細胞凝集研究会(H25年11月福岡)「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」柳 佑典、田村 忠士、中山 功一、田口 智章
5. 第51回日本小児外科学会(H26年5月大阪)「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」柳 佑典、Fatima Safira Alatas、吉丸 耕一郎、林田 真、大賀 正二、山座 治義、山座 孝義、田口 智章
6. The 25<sup>th</sup> Fukuoka International Symposium on Pediatric/Maternal-Child Health research(Aug. 2014. Fukuoka)  
Title:The improvement of fetal lung development following mesenchymal stem cell transplantation in rat model of Congenital nataragmatic Hernia.  
Yuniartha R, Nagata K, Alatas FS, Kuda M, Yanagi Y, Esumi G, Yamaza T, Kinoshita Y, Taguchi T

7. The 25<sup>th</sup> conference of APASL (Asian Pacific Association for the Study of the Liver) (Feb,2016. Tokyo) Title: A new strategy for liver tissue fabrication and transplantation. Yanagi Y, Kobayashi E, Nakayama K, Enosawa S, Kohashi K, Yoshimaru K, Matsuura T, Yamaza T, Taguchi T
8. 第15回日本再生医療学会(H28年3月大阪)「肝組織移植を目指した肝組織構築と移植法の検討」柳 佑典、小林 英司、中山 功一、絵野沢 伸、山座 孝義、田口 智章

〔図書〕(計 1件)

1. Nakayama, K. Biofabrication: Micro- and nano-fabrication, printing, patterning, and assemblies.Ch.1,1-16 (Elsevier. Amsterdam. Press,2013)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: 肝臓組織スフェロイド  
発明者: 柳佑典、田村忠士、中山功一、田口智章  
権利者: 株式会社サイフューズ、九州大学  
種類:  
番号: 国際出願番号 PCT/JP2014/058152 国際公開番号 WO/2014/148647  
出願年月日: 2014年3月18日  
国内外の別: 国際

取得状況(計 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

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

(2)研究分担者

野中 和明 (NONAKA, Kazuaki)  
九州大学・歯学研究院・教授  
研究者番号：90128067

大賀 正一 (OHGA, Shouichi)  
山口大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：60233053

中山 功一 (NAKAYAMA, Koichi)  
佐賀大学・医学部・教授  
研究者番号：50420609

小田 義直 (ODA, Yoshinao)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号：70291515

井原 健二 (IHARA, Kenji)  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号：80294932

山座 孝義 (YAMAZA, Takayoshi)  
九州大学・歯学研究院・講師  
研究者番号：8030814

山座 治義 (YAMAZA, Haruyoshi)  
九州大学・歯学研究院・講師  
研究者番号：30336151

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

家入 里志 (IEIRI, Satoshi)  
鹿児島大学・医学部・教授  
研究者番号：00363359

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

永田 公二 (NAGATA, Kouji)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：20419568

吉丸 耕一郎 (YOSHIMARU, Koichiro)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：60711190