

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20345

研究課題名(和文) 小児劇症肝炎に対する間葉系細胞療法の研究

研究課題名(英文) Mesenchymal stem cell derived hepatocyte-like cells transplantation might be one of the treatment strategies for childhood fulminant hepatitis.

研究代表者

水口 壮一 (Mizuguchi, Soichi)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80747999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は間葉系幹細胞を肝細胞へ分化させた細胞を劇症肝炎の治療に応用することである。間葉系幹細胞由来肝細胞の免疫原性や肝機能の評価を行った。その結果、形態的に肝細胞に類似しているだけではなく、免疫原性が低く、肝細胞の機能を獲得していた。この細胞を用いて急性肝不全モデル動物に細胞移植を試みた。細胞移植は組織学的および生化学的解析において劇症肝炎に有効であった。本研究の成果は間葉系幹細胞由来肝細胞移植が小児劇症肝炎の治療戦略のひとつになりえる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to apply mesenchymal stem cells derived hepatocyte-like cells to treat childhood fulminant hepatitis. Immunogenicity and hepatic function of mesenchymal stem cell-derived hepatocytes were evaluated. As a result, these cells not only morphologically resembled hepatocytes, they had low immunogenicity and acquired the function of hepatocytes. We performed cell transplantation into acute liver failure model animals using these cell. The cell transplantation histologically and biochemically ameliorated fulminant hepatitis. Our findings showed mesenchymal stem cell derived hepatocyte-like cells transplantation might be one of the treatment strategies for childhood fulminant hepatitis.

研究分野：小児救急

キーワード：小児肝不全 細胞療法 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の研究背景

「小児劇症肝炎」は、年間 10 症例程度の希少疾患である。その多くは、乳幼児例であり、4 割程度は原因不明で、診断と治療に難渋することが多く、救命率が低い。

肝移植は、唯一の根治療法であるが、ドナー不足、対応施設の限定、肝移植の適応決定の困難さなど故、実施不能例も多い。一方、肝細胞を用いた細胞療法は、重症例が多い新生児期では臍静脈から肝臓へ接続する静脈管が開存しているために、低侵襲に肝へ直接アプローチできる利点があり、また、緊急性や手術侵襲などの肝移植の問題点が回避できることから、例えば、肝移植までの橋渡しであっても肝細胞療法の有用性が非常に期待される。しかしながら、ドナー細胞の不足ならびにドナー細胞のレシピエント肝への定着率の低さから、優れた臨床成績を残すには至っていない。

他の幹細胞と共通して、自己複製能ならびに多分化能を有している間葉系幹細胞は、免疫調節能を応用した間葉系幹細胞療法の基礎研究ならびに臨床研究が発展してきた。

肝疾患に対する未分化間葉系幹細胞の投与実験では、四塩化炭素などによる肝障害やコンカナバリン A による劇症肝炎などの肝疾患もえる動物において、活性化 T 細胞の抑制や抗炎症作用、抗アポトーシス作用を発揮し、肝機能不全の改善並びに肝組織の線維化抑制や再生に有効であった。

我々の予備的研究によると、未分化な間葉系幹細胞ならびに間葉系幹細胞から分化させた肝細胞を、肝炎モデル動物に投与したところ、未分化細胞投与群と比較して、肝細胞分化細胞投与群において優れた生存率を得ている。未分化な間葉系幹細胞は、レシピエント肝内で、アルブミン産生など肝機能を発現する肝細胞分化を遂げるまで数週間を要したことが、生存率の差を生じさせた原因と推測した。

以上の予備的研究成果を踏まえ、以下のような着想に至った。

【着想 1】劇症肝炎患者に、間葉系幹細胞より分化させた肝細胞を投与した場合、非常に早期にその治療効果が発揮されるのではないかと。

【着想 2】凍結保存した間葉系幹細胞由来肝細胞を用いる事で、ドナー不足と緊急性への対応が充分可能ではないかと。

本研究では、これら着想をモデル動物による実験にて実証し、『間葉系幹細胞由来肝細胞療法を小児劇症肝炎の治療戦略の 1 つにする足がかりとする研究』と位置づけたいと考えている。

2. 研究の目的

(1) 間葉系幹細胞由来肝細胞を用いた、小児劇症肝炎モデル動物に対する細胞治療効果の検討

(2) 凍結保存した間葉系幹細胞由来肝細胞の

機能解析と小児劇症肝炎モデル動物に対する細胞治療効果の検討である。

3. 研究の方法

間葉系幹細胞として、ヒト脱落乳歯由来幹細胞 (stem cell from human exfoliated deciduous teeth: SHED) を使用した。

(1) SHED 由来肝細胞の肝機能関連遺伝子発現を、マイクロアレイ法を用いて、SHED および成熟ヒト肝細胞と比較し、解析した。

(2) SHED 由来肝細胞に対するヒト T 細胞の同種異系反応を解析し、免疫寛容のメカニズムについて検討した。

SHED 由来肝細胞とヒト T 細胞の共培養を行い、ヒト T 細胞の細胞増殖の評価を行った。コントロールとして、ヒト T 細胞の同種異系共培養を行った。

(3) 劇症肝炎疾患モデル動物に SHED 由来肝細胞を投与し、治療効果の生化学的解析、細胞定着のメカニズム解析および生存率について比較検討した。

4 週齢よりウイルソン病モデルラットに銅負荷飼料を与え、ウイルソン病の劇症化を図った。6 週齢ウイルソン病モデルラットにおいて SHED 由来肝細胞を脾内投与した。投与後、生化学検査、ヒト血清アルブミン値および体重を経時的に観察した。細胞投与 4 週後において、病理学的解析、肝組織でのサイトカインと酸化ストレス、ヒト細胞定着について以下の項目を解析した。

体重推移

生化学的解析

血清総ビリルビン値

血清トランスアミナーゼ値

血清セルロプラスミン値

肝臓内銅定量

肝組織炎症性サイトカイン mRNA

相対的定量

肝組織酸化ストレス活性定量

病理学的解析

ヘマトキシリンエオジン染色

銅染色

生存期間の解析

ヒト細胞定着の解析

血清ヒトアルブミン定量

免疫染色 (ヒト肝細胞特異的抗体)

(倫理面への配慮)

ヒト脱落乳歯の採取に関しては九州大学倫理委員会に承認された形式に基づき、研究対象者が未成年であるため代諾者の同意を得た。

全てのラットは標準的な飼育環境下 (室温 23 ± 2 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12/12 時間の明暗周期) で市販の食餌と水を与え飼育した。処置や安楽死の際は苦痛軽減のため麻酔を用いた。

4. 研究成果

- (1) SHED 由来肝細胞の肝機能評価
SHED 由来肝細胞が形態学的に類似しているだけではなく、未分化な SHED と比較し、SHED 由来肝細胞はヒト成熟肝細胞に遺伝子発現がより類似していた。
- (2) SHED 由来肝細胞の免疫原性 SHED 由来肝細胞とヒト T 細胞を共培養したところ、コントロールと比較し、ヒト T 細胞の細胞増殖は少数であり、SHED 由来肝細胞の低免疫原性が示された。
- (3) 劇症肝炎動物モデルへの SHED 由来肝細胞を用いた細胞治療の有効性
無治療群と比較し、細胞治療群では、生存率が有意に高いことを示した。生化学的解析により肝機能への有意な改善効果が認められた(図)。病理学的解析では、細胞治療群で炎症細胞浸潤および銅沈着が無治療群より減少していた。肝組織の炎症性サイトカインおよび酸化ストレスの mRNA の発現も低下していた。免疫染色で、ヒト細胞の定着を確認し、血清中にヒトアルブミンも確認できた。

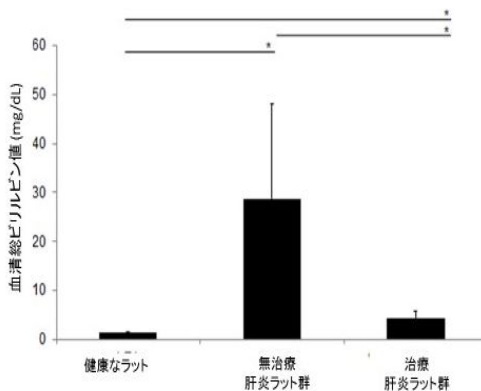


図 肝炎動物モデルに対するSHED由来肝細胞の細胞治療効果

以上の結果は、SHED を肝細胞に分化させることにより、肝機能を獲得したにもかかわらず、間葉系幹細胞の低免疫原性は保持していたことを示した。また、動物実験では SHED 由来肝細胞が生体内においても抗炎症作用、抗酸化作用を保持していることを示した。

本研究により低免疫原性の細胞を移植に用いることは免疫学的に優位であり、さらに SHED 由来肝細胞は正常に近い肝細胞機能、抗炎症作用および抗酸化作用があるため劇症肝炎に対する細胞療法としては至適な細胞源であることを支持した。この細胞療法が臨床応用可能となった場合、生体肝移植を早期導入が困難な小児の症例に対して、移植待機までの橋渡し治療となることが期待される。今後は、より長期間定着が可能な条件の検討および造腫瘍性など安全面などの確認を課題としている。

なお、当初の計画では 1)-3)の実験を凍結保存した SHED 肝細胞でも行う予定であったが、動物の管理および結果の解析に時間を要したため、現時点ではまだ結果を得られていない。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

水口壮一、松岡若利、一宮優子、平田悠一郎、賀来典之、牧盾、徳田賢太郎、赤星朋比古、高田英俊、前原喜彦：
当院小児救命救急センターで経験した VA ECMO 症例の神経学的予後と今後の課題
第 44 回日本救急医学会 2016.11.18 東京

水口壮一、松岡若利、一宮優子、平田悠一郎、賀来典之、牧盾、徳田賢太郎、安田光宏、高田英俊、前原喜彦：
化学療法開始前に敗血症性ショックから急性呼吸不全に至り、呼吸管理に難渋した小児急性白血病の 2 例
第 38 回日本呼吸療法医学会 2016.7.17 名古屋

水口壮一、松岡若利、一宮優子、平田悠一郎、賀来典之、牧盾、徳田賢太郎、安田光宏、高田英俊、前原喜彦：
腹壁欠損を有する児の呼吸管理における腹帯の有用性
第 43 回日本集中治療医学会総会 2016.2.13 神戸

〔図書〕(計 1 件)

水口壮一、生野雄二、牧盾：
心拍再開後脳障害における持続脳波モニタリングは、どのように施行し治療に活かすべきか？神経集中治療 - いま最も知りたい 20 の論点 - 総合医学社 救急・集中治療 Vol 28 No. 11・12 892-899

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

水口 壮一(Soichi Mizuguchi)
研究者番号：80747999
所属機関：九州大学
部局：大学病院
職名：助教

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

藤吉 順子 (Junko Fujiyoshi)

研究者番号：20467921

所属機関：九州大学

部局：大学病院

職名：助教