

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18945

研究課題名(和文)胆道閉鎖症患児由来の乳歯幹細胞を用いた病態解析および疾患治療のための基礎研究

研究課題名(英文) Impact of patients-derived stem cells from exfoliated deciduous teeth on the pathogenesis and a novel therapeutics for biliary atresia.

研究代表者

園田 聡一郎 (Sondoa, Soichiro)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：10831985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胆道閉鎖症(BA)は胆管の閉塞に起因する胆汁うっ滞性疾患である。病状の進行により、肝臓の線維化が生じる。本研究では健康児及びBA患児から提供された乳歯幹細胞の特性と肝線維化に対する治療効果を解析した。BA患児由来乳歯幹細胞では転写因子HNF6の発現が活性化しており、胆管を形成する胆管上皮細胞への分化に重要であるTransforming growth factor beta (TGF-beta)受容体の発現が抑制されているが、HNF6の発現を抑制することでTGF-beta受容体の発現が回復することを明らかにした。上記の結果から、BA患者由来乳歯幹細胞の自家移植応用へ向けた治療標的を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道閉鎖症は新生児期に発症する難知性の疾患であり、その原因は不明である。胆管の閉鎖による胆汁のうっ滞を呈するため、胆汁の流路を形成する外科手術が行われるが、手術が奏功しない症例も多く、最終的に肝移植が必要になる。しかし、小児に移植可能な肝臓ドナーは限られており、移植待機中の肝線維化を抑制する方法が望まれる。本研究の成果は、胆道閉鎖症患者由来の乳歯幹細胞を肝線維症に対する自家細胞移植の細胞ソースとして用いるための学術的基盤を提示することに学術的・社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Biliary atresia (BA) is a cholestatic disease caused by bile duct obstruction. In some cases, BA patients get hepatic fibrosis. In this study, we isolated stem cells from exfoliated deciduous teeth of healthy donors (SHED) and BA patients (BA-SHED). Then we examined the stem cell properties of and therapeutic effects of transplantation of SHED and BA-SHED. BA-SHED expressed higher levels of HNF6 and lower levels of Transforming growth factor-beta receptor (TGFBR), which is important for differentiation of cholangiocyte. Downregulation of HNF6 expression in BA-SHED ameliorated TGFBR expression. These results indicate that downregulation of HNF6 in BA-SHED is a possible cell processing method for autologous transplantation of BA-SHED.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：乳歯幹細胞 胆道閉鎖症 エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

成体幹細胞は生体の恒常性の維持と組織修復に働く。一方で、成体幹細胞に生じた変異が疾患を誘発することも知られている。幹細胞は、外因性に受けた障害をエピジェネティックな変異として遺伝情報に記憶し、その組織発生や再生・修復の能力が障害され、病態へ発展することが報告されている。従って、その成体幹細胞の障害記憶を解析することが病因解明へ繋がると考えられる。指定難病 296 である胆道閉鎖症 (biliary atresia, BA) は、新生児期に発症し、肝外胆管閉鎖を原因とする胆汁うっ滞性疾患である。残念なことに、現在までにその発症機序は分かっていない。遺伝子変異を伴わないことから、後天的な病因が考えられており、患児の成体幹細胞が病因となる後天的な障害の記憶を保持している可能性が大いに考えられる。

発生学的知見から、肝臓の主な成体幹細胞である肝幹細胞は、肝細胞と胆管上皮細胞へ分化能力を持つ幹細胞である。胎児肝臓ではその存在が同定されている。しかし、成体ヒト肝臓においては、肝障害に伴って出現する肝幹細胞様細胞の報告や、肝幹細胞マーカー (EPCAM や SOX9, Axin2) を用いた解析でその存在が示唆されているが、未だ統一見解はなく、肝幹細胞の同定には至っていない。正常・疾患由来の肝組織を得る機会は非常に限られているため、十分な解析に足る肝幹細胞を採取することは現状非常に困難である。

肝幹細胞の他、MSCs が肝組織の発生・修復に働くことが知られている。MSCs が肝幹細胞から肝細胞および胆管上皮細胞への分化成熟に関与すること、そして MSCs 自身が肝細胞様細胞へ分化することが報告されている。従って、申請者らは解析困難であるヒト肝幹細胞ではなく疾患由来の MSCs を解析することで、BA の病因を解明できる可能性があると考えた。

そこで本研究では、疾患由来の乳歯幹細胞 stem cells from exfoliated deciduous teeth (SHED) の間葉系幹細胞 mesenchymal stem cells (MSCs) としての障害記憶力を利用して、BA の病因解明ならびに自家幹細胞移植治療を目指す研究を行うこととした。

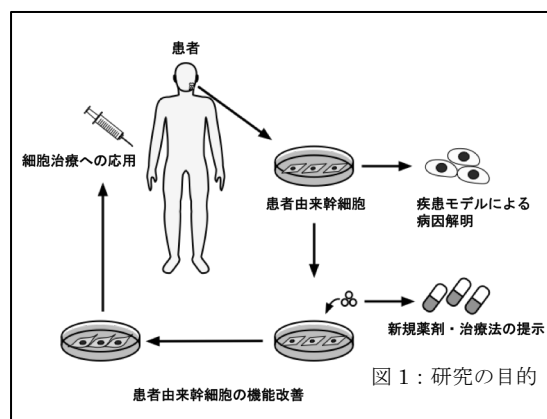
## 2. 研究の目的

本研究の目的は以下である (図 1)。

- 1) SHED を用いた BA の病因解明
- 2) BA 患者由来 SHED (BA-SHED) の医療応用への適格化
- 3) BA に対する新規治療標的の提示

ヒト発生過程での全身性の誘因を持つ疾患においては、各組織の MSCs がステータスの変異を共有していることが推察される。本研究では SHED を用いた。その理由は、SHED は、①MSCs の亜群、②採取性が非常に容易、③成体幹細胞としての primitive さ、④肝線維症への治療効果が報告されており、本研究の目的に非常に適した MSCs であると考えられるためである。

マウス移植実験より、ドナー MSCs がレシピエント肝内で肝細胞へ分化するため、肝疾患の幹細胞治療において MSCs は非常に有望なソースである。しかし、何らかの変異を有する疾患由来 MSCs では組織再生能力の低下が予想される。したがって、本研究では自家移植による細胞治療方法の確立を目指し、病因解明に加えて疾患由来 SHED の組織再生能力の改善および病因に基づく新規治療標的の提示を目的とした。



## 3. 研究の方法

### (1) BA-SHED の HNF6 に関するエピジェネティック解析【2019 年度】

バイサルファイトシーケンス解析により、健常 SHED と比較して、BA-SHED の HNF6 プロモーター領域の DNA メチル化に有意な差はなかった。従って、本研究では以下を解析する。

- ①HNF6 プロモーター領域の Chromatin accessibility 解析
- ②HNF6 プロモーターの Histone 修飾解析 (ChIP-qPCR 法)

(2) in vitro での肝細胞・胆道上皮細胞への分化・解析【2019 年度】

①肝細胞分化:2D culture による分化誘導。

- a. 肝細胞マーカー遺伝子の発現解析(qRT-PCR)
- b. 肝細胞分化マーカーの発現解析(免疫蛍光染色):ALB、CK18、EPCAM など
- c. 肝細胞機能解析:ALB 分泌、代謝活性(グルコース・尿素・薬物・ビリルビン)

②胆管上皮細胞分化

- a. 胆管上皮細胞マーカー遺伝子の発現解析(qRT-PCR)
- b. 胆管上皮細胞分化マーカーの発現解析(免疫蛍光染色):CK7、CK19、Alpha-tubulin

(3) BA-SHED の組織再生能力改善【2019 年度、2020 年度】

①BA-SHED における HNF6 の発現抑制(siRNA)

(4) 健常 SHED を用いた BA-SHED の変異再現【2020 年度】

①CRISPR-dCas9 システムを用いて恒常的な HNF6 発現亢進を再現し、解析を行う。

4. 研究成果

(1) BA-SHED の HNF6 に関するエピジェネティック解析

SHED と BA-SHED の HNF6 プロモーター領域に関するエピジェネティック解析を行い、BA-SHED で HNF6 の発現を亢進するクロマチンステータスにあることを解明した。

(2) in vitro での肝細胞・胆道上皮細胞への分化・解析

SHED と BA-SHED の肝細胞分化能を比較解析した。2D culture による分化誘導における肝細胞分化マーカーによる解析では、SHED も BA-SHED も肝細胞様細胞への分化能力を示した。胆道上皮細胞への分化解析では、胆道上皮細胞マーカー遺伝子の発現を示した。

(3) BA-SHED の組織再生能力改善

SHED と比較して BA-SHED では HNF6 の発現が亢進しており、TGFBR2 の発現が抑制されていることを解明した。また、siRNA を用いて BA-SHED の HNF6 発現を抑制すると、TGFBR2 の発現が改善されることを明らかにした。

また、SHED および BA-SHED を肝細胞様細胞へ分化誘導し、TGFBR2 の発現を解析した。分化した細胞でも、BA-SHED において TGFBR2 の発現が抑制されることを解明した。

(4) 健常 SHED を用いた BA-SHED の変異再現

CRISPR-dCas9 システムを用いて、健常 SHED の HNF6 遺伝子発現を活性化し、TGFBR2 の発現を解析した。HNF6 発現を活性化することにより、TGFBR2 の発現が抑制されることを明らかにした。

(5) 今後の展望

生体内で、肝臓の組織修復において肝細胞から胆道上皮細胞への分化転換が生じており、TGFβ シグナルが分化転換のメカニズムの起点となることが報告されている[1]。以前の研究ならびに本研究において、肝線維症モデルマウスに移植された SHED は生体内で肝細胞様細胞に分化することが示されている。本研究で、BA-SHED は肝細胞様細胞へ分化した際に TGFBR2 の発現が抑制されることが示された。この結果から、SHED および BA-SHED 移植による治療効果において、肝細胞様細胞への分化と、分化した肝細胞様細胞からの胆道上皮細胞への分化転換が関与している可能性が考えられる。したがって、今後の研究で SHED および BA-SHED より分化した肝細胞様細胞から胆道上皮細胞への分化転換について解明したい。

(6) 本研究で得られた知見から派生した研究成果

①細胞外小胞による全身的疾患の治療効果についての研究を報告した。乳歯幹細胞を用いた細胞治療機構として、移植細胞から分泌される細胞外小胞が宿主細胞機能を正常化することで治療効果を発揮することを示した。全身性エリテマトーデスモデルマウスおよび卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスに細胞あるいは細胞外小胞を移植し、治療効果を得た。

②肝線維症モデルマウスへの乳歯幹細胞移植を解析することで、臨床グレードの移植用細胞を調整する方法の開発を報告した。また、試験管内で肝細胞様細胞に分化させた乳歯幹細胞を肝線維症モデルマウスへ移植し、細胞移植治療効果および生体内での胆道再生を報告した。

<引用文献>

1. Schaub JR et al. Nature. 2018.557.247-51.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

|   |                   |
|---|-------------------|
| 1. 著者名<br>Soichiro Sonoda, Sara Murata, Hiroki Kato, Fouad Zakaria, Yukari Kyumoto-Nakamura, Norihisa Uehara, Haruyoshi Yamaza, Toshio Kukita, Takayoshi Yamaza.                    | 4. 巻<br>In press. |
| 2. 論文標題<br>Targeting of deciduous tooth pulp stem cell-derived extracellular vesicles on telomerase-mediated stem cell-niche and immune regulation in systemic lupus erythematosus. | 5. 発行年<br>2021年   |
| 3. 雑誌名<br>The Journal of Immunology   | 6. 最初と最後の頁<br>-   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし   | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>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<br>-         |
| 1. 著者名<br>Yuniartha Ratih, Yamaza Takayoshi, Sonoda Soichiro, Yoshimaru Koichiro, Matsuura Toshiharu, Yamaza Haruyoshi, Oda Yoshinao, Ohga Shouichi, Taguchi Tomoaki                | 4. 巻<br>12        |
| 2. 論文標題<br>Cholangiogenic potential of human deciduous pulp stem cell-converted hepatocyte-like cells   | 5. 発行年<br>2021年   |
| 3. 雑誌名<br>Stem Cell Research & Therapy  | 6. 最初と最後の頁<br>-   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1186/s13287-020-02113-8   | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する      |
| 1. 著者名<br>Sonoda Soichiro, Murata Sara, Nishida Kento, Kato Hiroki, Uehara Norihisa, Kyumoto Yukari N., Yamaza Haruyoshi, Takahashi Ichiro, Kukita Toshio, Yamaza Takayoshi         | 4. 巻<br>11        |
| 2. 論文標題<br>Extracellular vesicles from deciduous pulp stem cells recover bone loss by regulating telomerase activity in an osteoporosis mouse model                                 | 5. 発行年<br>2020年   |
| 3. 雑誌名<br>Stem Cell Research & Therapy  | 6. 最初と最後の頁<br>-   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1186/s13287-020-01818-0   | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>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<br>-         |
| 1. 著者名<br>Iwanaka Tsuyoshi, Yamaza Takayoshi, Sonoda Soichiro, Yoshimaru Koichiro, Matsuura Toshiharu, Yamaza Haruyoshi, Ohga Shouichi, Oda Yoshinao, Taguchi Tomoaki               | 4. 巻<br>11        |
| 2. 論文標題<br>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<br>2020年   |
| 3. 雑誌名<br>Stem Cell Research & Therapy  | 6. 最初と最後の頁<br>-   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1186/s13287-020-01630-w   | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>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<br>-         |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>園田 聡一郎、村田 早羅、加藤 大樹、久本 由香里、上原 範久、久木田 敏夫、山座 孝義 |
| 2. 発表標題<br>胆道閉鎖症患児由来乳歯幹細胞の細胞移植治療効果低下をもたらす機構の解析          |
| 3. 学会等名<br>第62回歯科基礎医学会学術大会                              |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>園田聡一郎、村田 早羅、久本由香里、上原 範久、久木田敏夫、山座 孝義 |
| 2. 発表標題<br>胆道閉鎖症患児に対する自家乳歯幹細胞移植治療を目指した基礎研究     |
| 3. 学会等名<br>第61回歯科基礎医学会学術大会                     |
| 4. 発表年<br>2019年                                |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|