

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22707

研究課題名(和文) 乳歯歯髄細胞を用いたHLAゲノム改変iPS細胞ストックの構築

研究課題名(英文) HLA genome editing of dental pulp cells for iPS cell stock.

研究代表者

手塚 建一 (Tezuka, Ken-ichi)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50236973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：コロナ禍は本研究に大きな影響を与えた。しかし、それがわれわれが持つ歯髄細胞ストックの活用に繋がる、新しいトレーサビリティシステムの開発に繋がった。大学発スタートアップ起業にもつながり、ブロックチェーンを使った医療用トレーサビリティシステムとして注目を集めている。特定のHLA領域をターゲットにしたゲノム編集についても、特許等の問題が少なく低コストなzinc finger nucleaseの高い特異性と切断活性の有用性を再発見することができた。これらの成果は総説として発表、ならびに論文準備中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在再生医療技術を用いた治療が、自家移植から他家細胞移植にシフトしつつある。われわれは、少数の細胞ラインで多くの患者に適合するiPS細胞ストック構築に寄与できる2つの研究成果をあげることができた。ひとつは、zinc finger nucleaseによるゲノム編集が特異性と活性の双方で優れた性質を持つことの再確認。もうひとつは、ゲノム編集を含めたトレーサビリティ情報を記録するシステムをブロックチェーン技術を用いて構築できたことである。ブロックチェーンは生成型AIとともに、近年注目されている技術であり、個人情報等の厳格な管理が必要な医療分野での活用が期待されている。

研究成果の概要(英文)：COVID-19 cast a significantly negative impact on this research. However, we already had a large stock of dental pulp cells derived from wisdom teeth, that could be used for our research in place of deciduous teeth we planned at initial stage. The shortage of new tooth collection lead us to construct a traceability system based on a blockchain technology. We also built a startup company, Shizui Laboratory Co., Ltd., and the new blockchain based-system applicable for medical application is attracting a large attention. We also found that traditional zinc finger nuclease (ZFN) is superior to novel CRISPR/dCas9-BE3 system for HLA locus specific genome editing. The activity and specificity of ZFN was remarkably high and will be used for HLA genome editing. We have published one review article and a preparing another paper to be published.

研究分野：再生医学

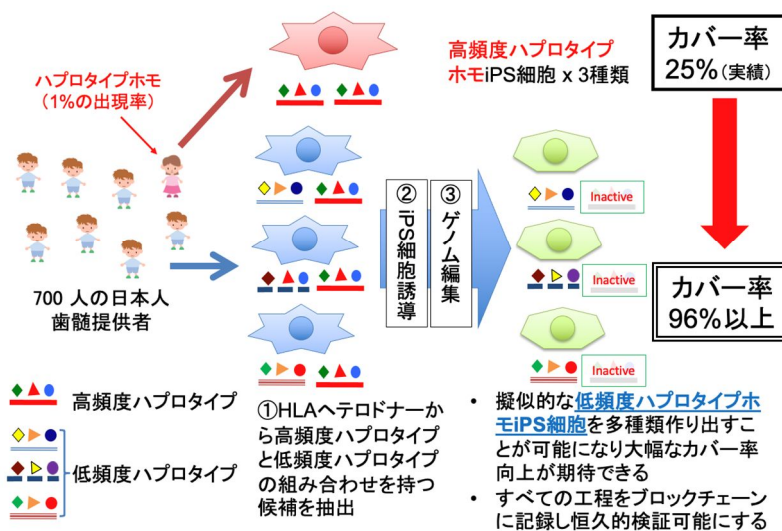
キーワード：歯髄細胞 ゲノム編集 ヒト白血球抗原 iPS細胞ストック ブロックチェーン トレーサビリティ Sy  
mbol zinc finger nuclease

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

現在の再生医療の問題は、同種移植(他家移植)を前提とした細胞供給システムが十分に機能しておらず、自家移植という非常にコスト高な方法に偏っていることである。そのため、1ラインで多くの患者に適合して、移植拒絶を受けにくい iPS 細胞ストックやユニバーサル ES/iPS 細胞の作製など、少数の細胞ラインを多くの患者に移植するための試みがなされている。

### ゲノム編集による高カバー率iPS細胞ストック構築



など、少数の細胞ラインを多くの患者に移植するための試みがなされている。

これまでわれわれは、同じ HLA ハプロタイプを持つ両親から 25%の確率で生まれてくる HLA ハプロタイプホモ (HHH) ドナー収集を中心に研究を進めてきた。統計的には日本人の約 1%が、HHH ドナーとなる。iPS 細胞研究財団では、骨髄バンク、臍帯血バンク、日本赤十字社の協力のもと、日本人人口カバー率 50%以上を達成する iPS 細胞ストックプロジェクトが進行中である。臨床サイドでは、実際に HHH-iPS 細胞由来の網膜色素上皮が患者に移植され、パーキンソン病に対する細胞移植臨床研究も開始された。しかし、この先 50%を超える高い人口カバー率を達成していくには、これまでよりもはるかに多くの数のドナーをスクリーニングしなければならないことが分かっている。

われわれは、18年間の歯髄細胞ならびに iPS 細胞研究の経験から、日本人人口の 96%以上をカバーできる他家移植用の iPS 細胞ストックをゲノム編集技術によって構築し、それを安全に供給するためのブロックチェーンをベースにしたトレーサビリティシステムが必要と考えて、研究を続けてきた(図)。

## 2. 研究の目的

日本骨髄バンクの HLA データベースから試算したところ、700人のドナーを集めれば 100種類以上の HLA ハプロタイプを持つ細胞が収集できることがわかった。われわれは、これらの細胞の一方の HLA ハプロタイプを不活化した擬似的な HHH 細胞 (HLA ヘミ細胞) を作り出せば、iPS 細胞ストックの人口カバー率は 96%を超えると予想した。また世界に目を向ければ、異なる人種ごとに 0.1%以上の出現頻度を持つ HLA ハプロタイプについて HLA ヘミ細胞を作り出せば、世界人口の 7割以上をカバー可能な世界規模の iPS 細胞ストックが構築できる。これは倫理的問題や、免疫抑制剤が必要ない、理想的な細胞移植医療を実現する画期的な打開策であると考えられる。さらにわれわれは、供給が限られる血液や智歯と比較して、供給が安定しており、同じドナーから複数回得られる医療廃棄物である乳歯にも着目している。本

研究においては、他家細胞移植医療の普及を目的として、Zinc Finger Nuclease (ZFN)と最新の CRISPR/dCas9-BE3 (ゲノム切断しない塩基編集酵素) による、特定の HLA 遺伝子のノックアウト効率を比較し、特異性が高く効率の良い HLA ゲノム編集ツールを探索した。また、その工程を含めたトレーサビリティ情報を恒久的かつ施設横断的に共有できるブロックチェーンシステムを開発した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 乳歯細胞の採取と HLA 検査

今回、岡山大学 (共同研究者: 上岡寛) で得られる乳歯や唾液から DNA を抽出して、ゲノム編集に適した HLA 型を持つドナーをスクリーニングしようと試みた。乳歯は複数回の入手機会があり、必要な HLA 型を持つドナーを施設横断的に追跡できるトレーサビリティシステムがあれば、たとえ別の医療機関であっても次回の乳歯抜歯時に細胞を採取できる。今回は、コロナ禍でドナー確保が困難だったため、トレーサビリティシステム構築を中心に研究をおこなった。

#### (2) 最新のゲノム編集技術の導入と ZFN との比較

永久歯由来歯髄細胞に、CRISPR/dCas9-BE3 システム (文献 ) を導入して HLA ヘミ細胞作製をこころみた。CRISPRdCas9-BE3 は DNA 切断活性を持たない dCas9 と、塩基置換活性を持つ酵素 (Base Editor, BE) を融合させ、ターゲット遺伝子を切断することなく、塩基の変異を導入できる技術である。一方比較対照として、従来からわれわれが設計してきた HLA-A\*02 特異的 ZFN を用いて同じ細胞を用いてゲノム編集をおこない、ゲノム配列解析によってオフターゲット変異の部位や頻度を詳細に調べた。

#### (3) 細胞の移送・培養・ゲノム編集に関するトレーサビリティの実現

共同研究先企業と協力して、最新の Symbol ブロックチェーン技術を使った細胞トレーサビリティシステム「ShizuiNet」を構築しサーバーを立ち上げた。パブリックブロックチェーンを用いることによって施設間での情報共有ができ、細胞凍結保存等の正確な記録も恒久的に残すことができるようにシステム設計した。細胞 ID を個人情報と完全に切り離れた上で公開すれば、政府機関等の第三者による検証も可能になるため、情報保護に配慮したうえでできるだけ情報がオープンになるよう設計した。

### 4. 研究成果

(1) 研究開始直後より、新型コロナウイルス感染症の広がりによって岡山大学病院での歯科診療が大きな制限を受けた。ドナーとなるはずの小児の受診がほぼなくなり、同意を得て乳歯を採取しても感染拡大のリスクが高いため、乳歯の収集や輸送を諦めざるを得なかった。細胞移送を記録するためのデバイスも、学外者の出入りが大きく制限を受けたため、施設をまたいでテストはほぼ不可能な状態が続いた。そのため、岐阜大学が保有する 300 人分の歯髄細胞ストックにユニークな ID を付与し、細胞凍結保存容器内での位置情報とともにブロックチェーンに記録するデバイスを開発し、シミュレーションによる PoC を進めた。また、世界中の研究者が利用できるように、48 ドナー分の歯髄細胞を理化学研究所バイオリソース研究センターに寄託し、配布が始まっている。

(2) ZFN と CRISPR/dCas9-BE3 を比較検討した結果、ZFN が高いノックアウト効率を示し

たのに対して、CRISPR/dCas9-BE3 では目的のノックアウト細胞をまったく得ることができなかった。gRNA の設計を変えても結果は同じで、少なくとも HLA-A\*02 遺伝子をターゲットとした場合の編集効率は、ZFN の方が大きく勝っていると考えられた。ゲノム編集後、HLA-A\*02 陰性画分をソーティングによって純度 97%まで高め、ゲノム解析をおこなったところ、HLA-A\*02 領域に集中的に変異が見つかった。ターゲットサイト上流の約 200 300bp の範囲で遺伝子が読めない領域が現れ、今回用いた ZFN の変異導入活性と特異性の高さが示唆された。しかし、HLA-A\*02 と似た配列を持つ偽遺伝子 HLA-H\*01 にも、類似の欠失領域が見つかった。PCR を用いた塩基配列解析では、HLA-A と HLA-H が融合したと考えられる配列も発見された。

以上のことから、HLA-A\*02 の特定の領域に対しては、CRISPR/dCas9-BE3 の変異導入活性は ZFN に比べて大きく劣っており、認識配列の短さから特異的な gRNA 設計も難しく、本目的には使用できないとわかった。さらに、認識配列が長く活性と特異性の高い ZFN であっても、偽遺伝子の類似配列にオフターゲット変異が導入されていた。最新のリファレンス配列として用いられるヒトゲノム配列データも、偽遺伝子や HLA 遺伝子の高い多型性についてはまだ十分に網羅できておらず、特定の HLA アリルに高い特異性を持つゲノム編集技術の開発には、歯髄細胞や iPS 細胞を用いたさらなる技術革新が必要であろう。

(3) 新規の乳歯細胞の供給が絶たれたため、われわれが保有する永久歯歯髄細胞ストックと iPS 細胞について棚卸し整理をおこなった。その一部は、理化学研究所バイオリソース研究センターに寄託し、配布も始まっている。細胞培養プロトコルの標準化や、高い精度で細胞の移動、培養、保管、遺伝子導入などを記録する、新しいトレーサビリティ技術の開発を進め、ベンチトップでのバーコード読み取りのみで正確かつ証明性を提供できる記録システムを目指した。産学官連携推進本部の協力で、ブロックチェーンを取り扱う大学発スタートアップしず



い細胞研究所（代表：手塚建一）を立ち上げ、地元企業である 4D Pocket 社と共同で、細胞凍結チューブなどにつけられたバーコードを読み取って、ブロックチェーンに記録するデバイス「CellPi」を開発した（写真）。さらに、ブロックチェーン企業テックピューロ社との共同研究で、データを取りまとめるサーバーを中心としたブロックチェーンデータベースシステム「ShizuiNet」を Symbol ブロックチェーン上に構築した（文献）。ブロックチェーンを用いた精度の高い医療用トレーサビリティ事例は国内外でも注目を集め始めており、新聞やネット媒体で取り上げられた。さらに、医療用大麻や米、自然薯などの農産物トレーサビリティに関する共同研究も開始している。

今回、コロナ禍は本研究に大きな影響を与えた。しかし、それがわれわれが持つ歯髄細胞ストックの活用に関わり、新しいトレーサビリティシステムが完成した。ゲノム編集についても、必ずしも新しい技術が全ての局面で優れているとは限らず、特許が切れ枯れた技術である ZFN の高い特異性と切断活性の有用性を再発見することができた。トレーサビリティの概要は総説（文献）にまとめ、ZFN による HLA 領域への特異的な変異導入についても論文準備中である。

<引用文献>

Gaudelli et al. Nature, 551, 2017, 464-471

手塚建一、mijin ブロックチェーンを活用した歯髄細胞製造・流通管理「ShizuiNet」 in ブロックチェーン 3.0～国内外特許からユースケースまで～、NTS 出版、2020, 299-308

手塚 建一、再生医療実現化を目指しブロックチェーンで歯髄細胞を追跡する ShizuiNet、ILSI Japan vol.154, 2023, 1-9

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimizu Yuta, Takeda Kawaguchi Tomoko, Kuroda Izumi, Hotta Yasuaki, Kawasaki Hideya, Hariyama Takahiko, Shibata Toshiyuki, Akao Yukihiro, Kunisada Takahiro, Tatsumi Junichi, Tezuka Ken ichi	4. 巻 57
2. 論文標題 Exosomes from dental pulp cells attenuate bone loss in mouse experimental periodontitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 162 ~ 172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12949	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 川口知子, 手塚建一	4. 巻 63
2. 論文標題 歯髄細胞からのiPS細胞樹立	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 整形・災害外科	6. 最初と最後の頁 1573-1577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Ken Sugiyama, Kosuke Nagashima, Takahiro Miwa, Yuta Shimizu, Tomoko Kawaguchi, Kazuki Iida, Naritaka Tamaoki, Daijiro Hatakeyama, Hitomi Aoki, Chikara Abe, Hironobu Morita, Takahiro Kunisada, Toshiyuki Shibata, Hidefumi Fukumitsu, Ken-ichi Tezuka	4. 巻 37
2. 論文標題 FGF2 responsive genes in human dental pulp cells assessed using a rat spinal cord injury model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J.Bone Miner. Metabol.	6. 最初と最後の頁 467-474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-018-0954-8	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 手塚建一	4. 巻 154
2. 論文標題 再生医療実現化を目指しブロックチェーンで歯髄細胞を追跡するShizuiNet	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ILSI Japan	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水雄太, 川口知子, 黒田依澄, 飯田一規, 畠山大二郎, 辰巳順一, 手塚建一
2. 発表標題 ヒト歯髄細胞エクソソームは歯周炎の進行を抑制する
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 第21回日本再生医療学会
2. 発表標題 ヒト歯髄細胞のHLA-A領域に対する選択的ゲノム編集
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 手塚建一
2. 発表標題 ブロックチェーン技術を用いた細胞トレーサビリティソリューション
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会テクノオークション
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 手塚建一, 望月こもも, 黒田依澄, 川口知子, 上岡寛
2. 発表標題 NEMブロックチェーンを用いた細胞流通・系譜記録システム「ShizuiNet」
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川口知子, 清水雄太, 黒田依澄, 飯田一規, 畠山大二郎, 國貞隆弘, 柴田敏之, 手塚建一
2. 発表標題 ヒト歯髄細胞由来iPS細胞からのエクソソームの精製
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川口知子, 清水雄太, 黒田依澄, 柴田敏之, 國貞隆弘, 手塚建一
2. 発表標題 歯髄細胞由来エクソソームの特性評価およびLPS誘導性歯周炎モデルへの応用
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 手塚建一, 高橋滉平, 川口知子, 清水雄太, 黒田依澄
2. 発表標題 畳み込みニューラルネットワークを用いた 培養歯髄細胞密度評価法 : ShizuiAI
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒田依澄, 手塚建一
2. 発表標題 ヒト歯髄細胞の HLA-A 領域に対する選択的ゲノム編集
3. 学会等名 第40回日本骨代謝学会
4. 発表年 2022年



〔図書〕 計1件

1. 著者名 手塚建一	4. 発行年 2020年
2. 出版社 NTS	5. 総ページ数 440
3. 書名 ブロックチェーン3.0	

〔産業財産権〕

〔その他〕

株式会社しずい細胞研究所ホームページ <a href="http://shizuilab.com">http://shizuilab.com</a>
--

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	上岡 寛  (Kamioka Hiroshi)  (80253219)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授    (15301)	

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
---------	---------