

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 2 5 年 5 月 2 3 日現在

機関番号：1 7 1 0 2

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659618

研究課題名（和文）

先天性代謝異常症及び凝固異常症に対する乳歯幹細胞を用いた肝再生療法の開発

研究課題名（英文） Liver regeneration using stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) for congenital metabolic disease and coagulopathy

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

研究成果の概要（和文）：

ヒト乳歯幹細胞（SHED）は MSC と HSC の両方の性質をもち HLA の発現が低いことが判明。SHED に種々のサイトカインを作用させ肝細胞への分化に成功。この細胞は四塩化炭素肝硬変マウスやウイルス病ラットの治療に有効性がみられた。さらに球状の構造体 sphere として培養することに成功した。

一方、sphere を用いて 3D バイオプリンターにてチューブ状の構造体を作成し、小さな肝臓モデルを作成した。

研究成果の概要（英文）：

SHED was shown to have the character of MSC as well as HSC. SHED low expression of HLA. SHED was successfully induced to the hepatocyte-like cell in medium. These hepatocyte-like cells were settled to the damaged liver tissue in CCl4 induced liver chirrrosis as well as Wilson disease. These cells could compose the sphere structure.

On the other hand, 3D liver structure was built using 3D bioprinter.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：移植外科学、肝細胞移植、乳歯幹細胞、立体物、免疫寛容

## 1. 研究開始当初の背景

先天性代謝異常症のうち欠損酵素蛋白が主に肝臓で産生される 1-antitrypsin 欠損症、Wilson 病、糖原病（肝型）、チロジン血症、シトルリン血症、尿素サイクル欠損症などでは肝臓移植により治療させることが可能になってきた。しかし肝臓移植も、ドナー不足、手術侵襲による合併症、術後の長期にわたる免疫抑制療法など多くの解決すべき問題がある。一方、先天性血液凝固異常症は肝臓で産生される凝固因子が欠乏する疾患で、このうち X 連鎖劣性遺伝病である血友病が最も多く、血友病 A（先天性第 Ⅰ因子欠乏症）のわが国の頻度は男子出生 10 万人あた

り 12 人、血友病 B（先天性第 Ⅱ因子欠乏症）はその 1/5 程度である。現在、いずれも濃縮凝固因子製剤の定期補充療法が標準的治療となっている。しかしこの頻回注射は乳児期から生涯必要であることや、予期しない感染症や同種中和抗体（インヒビター）などが問題点である。これらの凝固因子は肝臓で産生され 5-20%の活性が維持できれば、重篤な出血の予防には十分である。

従って、先天性代謝異常症や凝固異常症は小さなボリュームの肝組織が蛋白補充目的に移植され、それが長期に機能すれば根治が期待できる。

乳歯は従来は「捨てる」ものであるが、その

歯髄由来幹細胞は、免疫寛容性があり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ているため、歯髄幹細胞から同種の肝組織移植はこれらの疾患の治療に応用できる可能性が高い。

## 2. 研究の目的

既に単離・培養を行なっている乳歯歯髄から採取した間葉系幹細胞を肝細胞に分化させる方法を明らかにし、その肝細胞から立体構築をもった立体的肝細胞構造体をつくりあげる。すでに我々はさまざまな形態の構造体を作る技術を有しているため、肝臓としての適切な形態を構築し、これを個体に移入し長期に維持させる方法を確立する。

## 3. 研究の方法

### (1) SHED から肝細胞への分化誘導

SHED を直接肝細胞へ分化させ、肝シートを作成し、先天性代謝疾患・先天性血液凝固異常症に不可欠な蛋白群の合成ならびに分泌を *in vitro* で確認する。

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乳歯を細胞ソースとしてもちいる。既に確立されている手法にて乳歯歯髄より SHED を単離・培養する。具体的には、残存歯髄を酵素処理することで細胞を分離し、付着性コロニーを形成させる事で SHED を単離する。肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF)、oncostatin M などを含む肝細胞分化無血清培地で SHED の肝細胞への分化誘導を促し、形態学的 (Periodic acid-Schiff (PAS) 染色、抗  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) 抗体、抗アルブミン抗体を用いた免疫蛍光染色) および生化学的 / 分子生物学的 (RT-PCR 法、Western blotting 法、ELISA 法による AFP、アルブミン、第 VIII 因子 (FVIII)、尿素、アルブミンの遺伝子およびタンパク発現の解析) アプローチにて肝細胞への分化を同定する。

### (2) SHED の免疫寛容に関する研究

SHED の表面マーカー特に HLA の発現について flow cytometry にてチェックする。

### (3) 立体的肝細胞構造体のサイズ、デザインの検討

細胞構造体内部には血管が存在しないため、*in vitro* での構造体内部に培養液が浸透できるように立体的デザインが必須と思われる。そのため、チューブ状に構造体を作成し、細胞内部の生存率及びアンモニアやアルブミンの代謝などを指標に *in vitro* での最適な構造体のデザインを比較検討する。特に最近、肝細胞は線維芽細胞などと共培養すると代謝能が向上することが報告されており、本研究でも様々な配置パターンをもった構造体の比較検討を行い、少ない容積でも十分な代謝能をもつ肝細胞構造体の形成を試みる。さ

らに、移植後の構造体内部への血管新生促進を期待して内皮細胞の配置も検討する。

### (4) 移植適応疾患モデルでの検討

SHED から誘導した肝細胞に対するマウスに生着させ *in vivo* での機能解析を行う。さらに、先天性代謝異常および凝固異常症のモデル動物を選定し、疾患治療に対する検討に展開する。九州大学病院ならびに関連病院で担当している患児のなかから本治療の適応疾患をピックアップし、疾患の重症度による適応基準などについても検討する。

## 4. 研究成果

### (1) SHED から肝細胞への分化誘導

ヒト乳歯歯髄を酵素処理することで細胞を分離し、付着性コロニーを形成させる事で MSC の一種である SHED を単離した。さらに SHED に肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) oncostatin M などを含む肝細胞分化無血清培地で SHED の肝細胞への分化誘導を促し、Step1 から Step4 の肝細胞-like cell への分化に成功した (図 1)。その細胞は培養液および免疫組織染色にて人アルブミンや 因子が検出できた (図 2)。さらにこの肝細胞-like cell をペレットの底で培養しある程度の大きさを持つ球状の構造体 sphere として培養することに成功した (図 3)。組織学的にも肝細胞に特有のコード状の配列がみられている。

図 1 乳歯幹細胞の肝細胞分化

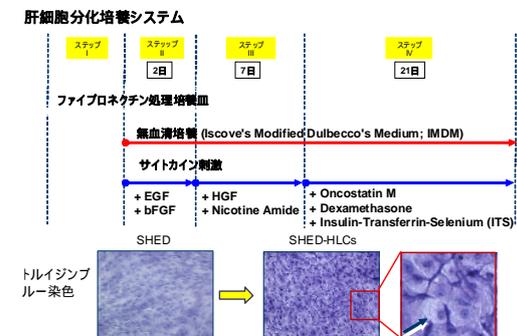


図 2 肝細胞特異的機能発現

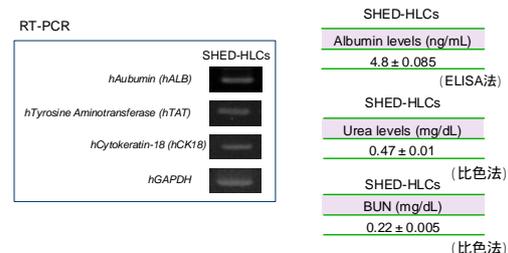
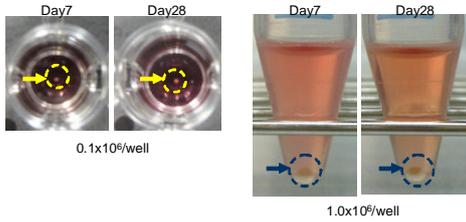


図3 乳歯幹細胞由来肝細胞を用いた細胞凝集塊(スフェロイド)形成

低接着性培養ウェル(またはチューブ)に播種



長径1.5mmのスフェロイド

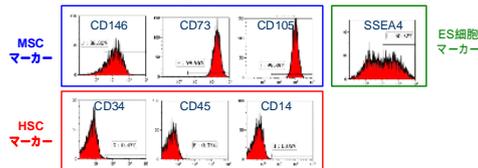
## 2) SHED の免疫寛容に関する研究

SHEDの表面マーカーをfluocytometryにてチェックしたところ HLA の発現が低いことが判明した(図4)。

図4 乳歯幹細胞のマーカー

- 1.細胞表面マーカー発現 :MSCとHSCと共通する発現様式
- 2.HLAの発現に乏しく、拒絶反応が起こりにくい

フローサイトメリー解析



## (3) 立体的肝細胞構造体のサイズ、デザインの検討

培養肝細胞から球状の構造体 sphere を作成、その状態でどれくらい生存が維持できるかを検討し、in vitro での構造体内部に培養液が浸透できるような立体的デザインであるチューブ状の構造体を作成し(図5)、内側の細胞の生存率及びアンモニアやアルブミンの代謝などを指標に評価した(図6)。また sphere 内部へ培養液が浸透しやすいように血管新生を促す目的で肝細胞に加えて内皮細胞を共培養し、血管付グラフトのモデルを作成した(図7)。

図5 立体的肝細胞構造体の作製

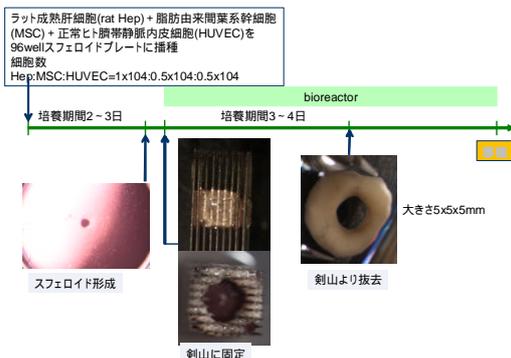


図6 立体的肝細胞構造体の組織学的解析

細胞播種後10日目

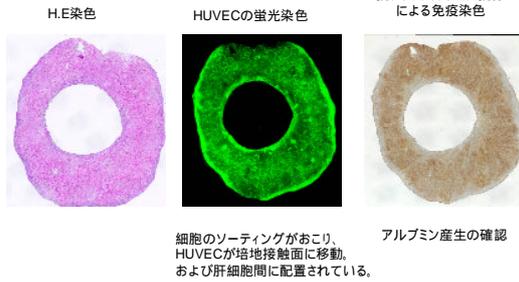
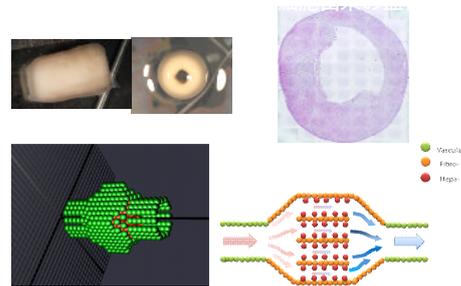


図7 血管付肝構造体作成



## (4) 移植適応疾患モデルでの検討

四塩化炭素肝硬変マウスの脾臓に注射すると肝臓内の組織傷害部位に生着していることが確認できた。四塩化炭素肝硬変マウスに SHED から分化した肝細胞-like cell を脾内投与すると、傷害された肝細胞部に SHED が生着しているのが確定された。さらに、ウイルソン病モデルラットに SHED から分化した肝細胞-like cell を脾内投与すると、Wilson 病が発症しなかった。つまり先天性代謝疾患の治療に使える可能性が大である。

## 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 21 件)

1. Matsunaga Y, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Fukumoto Y, Ito N, Doi T, Kang D, Hara T, Neonatal asphyxia and renal failure as the presentation of severe protein C deficiency, J Perinatol, 査読有, 33, 2013, 239-241, DOI: 10.1038/jp.2012.55.
2. Saeki I, Tokunaga S, Matsuura T, Hayashida M, Yanagi Y, Taguchi T, A formula for determining the standard liver volume in children: a special reference for neonates and infants, Pediatr Transplant, 査読有, 16, 2012,

- 244-9, DOI:  
10.1111/j.1399-3046.2011.01624.x.  
Epub 2011 Dec 12
3. Uchiyama H, Kayashima H, Matomo R, Shirabe K, Yoshizumi T, Ikegami T, Soejima Y, Matsuura T, Taguchi T, Maehara Y, Relevance of HLA compatibility in living donor liver transplantation : the double-edged sword associated with the patient outcome, *Clin Transplant*, 査読有, 26, 2012, E522-9, DOI: 10.1111/ctr.12019.
  4. Alatas FS, Hayashida M, Matsuura T, Saeki I, Yanagi Y, Taguchi T, Intracranial hemorrhage associated with vitamin K-deficiency bleeding in patients with biliary atresia : focus on long-term outcomes, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 査読有, 54, 2012, 52-7, DOI: 10.1097/MPG.0b013e3182421878.
  5. Matsuura T, Kohashi K, Yanagi Y, Saeki I, Hayashida M, Aishima S, Oda Y, Taguchi T, A morphological study of the removed livers from patients receiving living donor liver transplantation for adult biliary atresia, *Pediatr Surg Int*, 査読有, 28, 2012, 1171-5, DOI: 10.1007/s00383-012-3183-6. Epub 2012 Oct 12.
  6. Alatas FS, Masumoto K, Esumi G, Nagata K, Taguchi T, Significance of abnormalities in systems proximal and distal to the obstructed site of duodenal atresia, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 査読有, 54, 2012, 242-247, DOI: 10.1097/MPG.0b013e31822d0d57.
  7. Taguchi T, Nagata K, Kinoshita Y, Ieiri S, Tajiri T, Teshiba R, Esumi G, Karashima Y, Hoka S, Masumoto K, The utility of muscle sparing axillar skin crease incision for pediatric thoracic surgery, *Pediatr Surg Int*, 査読有, 28, 2012, 239-244, DOI: 10.1007/s00383-011-3013-2. Epub 2011 Oct 19.
  8. Nishi M, Nishimura R, Suzuki N, Sawada A, Okamura T, Fujita N, Kanai R, Yano J, Adachi S, Yasumi T, Sato E, Yasutomo K, Ishii E, Ohga S, Reduced-intensity conditioning in unrelated donor cord blood transplantation for patients with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis, *Am J Hematol*, 査読有, 87, 2012, 637-639, DOI: 10.1002/ajh.23190. Epub 2012 Apr 10.
  9. Shiraishi A, Hoshina T, Ihara K, Doi T, Ohga S, Hara T, Acute liver failure as the initial manifestation of Wilson disease triggered by human parvovirus B19 infection, *Pediatr Infect Dis J*, 査読有, 31, 2012, 103-104, DOI: 10.1097/INF.0b013e31823662ee.
  10. 松永友佳, 山本順子, 大賀正一, 横田千恵, 高橋保彦, 末延聡一, 浦田美秩代, 栢森裕三, 康東天, 原寿郎, 臀部血管腫に伴う Kasabach-Merritt 症候群を疑われた新生児プロテイン C 欠損症の 1 例, *日本小児皮膚科学会雑誌*, 査読有, 31, 2012, 19-23
  11. Nanishi E, Ohga S, Doi T, Ishimura M, Ihara K, Takada H, Shima M, Hara T, Complete immunotolerance induction after FEIBA prophylaxis in a hemophilia A patient with high titer inhibitor, *Haemophilia*, 査読有, 18, 2012, e75-7, DOI: 10.1111/j.1365-2516.2012.02776.x. Epub 2012 Mar 8.
  12. Saeki I, Matsuura T, Hayashida M, Taguchi T, Ischemic preconditioning and remote ischemic preconditioning have protective effect against cold ischemia-reperfusion injury of rat small intestine, *Pediatr Surg Int*, 査読有, 27, 2011, 857-862, DOI: 10.1007/s00383-010-2810-3. Epub 2010 Nov 28.
  13. Hayashida M, Matsuura T, Saeki I, Yanagi Y, Yoshimaru K, Nishimoto Y, Takahashi Y, Fujita K, Takada N, Taguchi S, Uesugi T, Hirose R, Nakamura M, Nakao M, Taguchi T, Association of lymphocyte crossmatch and the outcome of intestinal transplantation in swine, *Pediatr Surg Int*, 査読有, 27, 2011, 279-281, DOI: 10.1007/s00383-010-2796-x.
  14. Masumoto K, Nagata K, Oka Y, Kai H, Yamaguchi S, Wada M, Kusuda T, Hara T, Hirose S, Iwasaki A, Taguchi T, Successful treatment of an infected wound in infants by a combination of negative pressure wound therapy and arginine supplementation, *Nutrition*, 査読有, 27, 2011, 1141-5, DOI: 10.1016/j.nut.2011.01.006. Epub 2011 May 31.
  15. Alatas FS, Masumoto K, Matsuura T, Hayashida M, Saeki I, Kohashi K, Oda Y, Taguchi T, Synchronized expressions of hepatic stellate cells

- and their transactivation and liver regeneration during liver injury in an animal model of cholestasis, *J Pediatr Surg*, 査読有, 46, 2011, 2284-90, DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2011.09.016.
16. Souzaki M, Kubo M, Kai M, Kameda C, Tanaka H, Taguchi T, Tanaka M, Onishi, Hedgehog signaling pathway mediates the progression of non-invasive breast cancer to invasive breast cancer, *Cancer Sci*, 査読有, 10, 2011, 373-381, DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01779.x. Epub 2010 Nov 22.
  17. Fujita K, Yamamoto H, Matsumoto T, Hirahashi M, Gushima M, Kishimoto J, Nishiyama K, Taguchi T, Yao T, Oda Y, Sessile serrated adenoma with early neoplastic progression: a clinicopathologic and molecular study, *Am J Surg Pathol*, 査読有, 35, 2011, 295-304, DOI: 10.1097/PAS.0b013e318205df36
  18. Sozaki R, Tajiri T, Teshiba R, Kinoshita Y, Yosue R, Kohashi K, Oda Y, Taguchi T, Correlation between the Number of segmental chromosome aberrations and the age at diagnosis of diploid neuroblastomas without MYCN amplification, *Journal of Pediatric Surgery*, 査読有, 46, 2011, 2228-2232, DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2011.09.005.
  19. Matsuura T, Yanagi Y, Saeki I, Hayashida M, Taguchi T, Outcome of modified portal vein anastomosis for recipients with portal vein thrombosis or stenosis before living donor liver transplantation, *Journal of Pediatric Surgery*, 査読有, 46, 2011, 2291-2295, DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2011.09.015.
  20. Kitajima J, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Hara T, Serum prohepcidin concentrations at birth and one month after birth in premature infants, *Pediatric Blood & Cancer*, 査読有, 56, 2011, 267-272, DOI: 10.1002/pbc.22773. Epub 2010 Sep 9.
  21. Eljaafari FM, Takada H, Tanaka T, Doi T, Ohga S, Hara T, Potent induction of IFN- $\gamma$  production from cord blood NK cells by the stimulation with singlestrand RNA, *J Clin Immunol*, 査読有, 31, 2011, 728-735, DOI: 10.1007/s10875-011-9528-4. Epub 2011 Apr 13.
- [学会発表](計 16 件)
1. 柳佑典、中山功一、田村忠士、田口智章、バイオラ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、平成25年3月21日-23日、横浜
  2. 柳佑典、林田真、江角元史郎、中山功一、田口智章、バイオラ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、平成24年11月17日、大阪
  3. 柳佑典、林田真、田村忠士、所村正晴、中山功一、田口智章、バイオラ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、平成24年9月20-22日、愛知
  4. Alatas FS, Yamaza T, Yamaza H, Hayashida M, Yanagi Y, Kukita T, Nonaka K, Ohga S, Taguchi T, Trans-differentiation and spheroid formation of hepatocyte-like cells of stem cells from human exfoliated deciduous teeth ~ A New treatment tool for coagulopathy and metabolic disease ~, The Twenty-third FUKUOKA International Symposium on Pediatric / Maternal-Child health research, 2012.9.1, FUKUOKA
  5. 林田真、柳佑典、鹿毛政義、入戸野博、田口智章、頭蓋内出血で発症した非症候性肝内胆管低形成症の一例、第39回日本小児栄養消化器肝臓学会、平成24年7月13-14日、大阪
  6. 林田真、柳佑典、池上徹、吉住朋晴、副島雄二、調憲、前原善彦、田口智章、Transplantation Eraにおける胆道閉鎖症の予後~ A Single-Center Experiences ~、第30回日本肝移植研究会、平成24年6月14-15日、福岡
  7. Alatas FS, Yamaza T, Yamaza H, Hayashida M, Yanagi Y, Kukita T, Nonaka K, Ohga S, Taguchi T, Trans-differentiation capacity into hepatocyte-like cells of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, PAPS2012, 2012.6.3-7, Shanghai, China
  8. Hayashida M, Matsuura T, Saeki I, Yanagi Y, Taguchi T, The Outcome of Biliary Atresia in Transplantation Era: A Single-Center Experience PAPS2012, 2012.6.3-7, Shanghai, China
  9. 林田真、柳佑典、田口智章、脳死肝臓移植希望レシピエント選択基準の現状と

- 問題点、第 49 回日本小児外科学会学術集会、2012 年 5 月 14-16 日、横浜
10. Alatas FS, Yamaza T, Yamaza H, Hayashida M, Yanagi Y, Kukita T, Nonaka K, Ohga S, Taguchi T, Trans-differentiation capacity into hepatocyte-like cells of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, 第 49 回日本小児外科学会学術集会、2012 年 5 月 14-16 日、横浜
  11. Souzaki R, Tajiri T, Teshiba R, Kinoshita Y, Yosue R, Kohashi K, Oda Y, Taguchi T, The number of Segmental Chromosome Aberrations Significantly Increases in Proportion To the Age at Diagnosis in Subjects with Diploid/Tetraploid Neuroblastomas without MYCN Amplification, 43rd Congress of the International Society of Pediatric Oncology, 2011.10.27-30, Auckland, New Zealand
  12. 林田真、松浦俊治、柳佑典、田口智章、Transplantation Era における胆道閉鎖症予後に関する検討～A Single-Center Experience～、第 38 回日本小児栄養消化器肝臓学会、平成 23 年 10 月 8-9 日、盛岡
  13. 松浦俊治、柳佑典、佐伯勇、林田真、田尻達郎、副島雄二、内山秀昭、武富紹信、調憲、前原喜彦、田口智章、小児生体肝移植後の消化管穿孔における成績、第 29 回日本肝移植研究会、平成 23 年 7 月 22-23 日、仙台
  14. Matsuura T, Yanagi Y, Saeki I, Hayashida M, Taguchi T, The outcome of the modified portal vein anastomosis for biliary atresia patients with portal vein thrombosis or stenosis before living donor liver transplantation, ISW2011, 2011.8.28-9.1, Yokohama
  15. 林田真、松浦俊治、佐伯勇、保科隆之、金城唯宗、内山秀昭、副島雄二、武富紹信、原寿郎、前原喜彦、田口智章、当院における小児劇症肝不全 / 急性肝不全症例の治療成績、第 25 回日本小児救急医学会、平成 23 年 6 月 10-11 日、東京
  16. Alatas FS, Masumoto K, Matsuura T, Hayashida M, Saeki I, Taguchi T, Synchronized expressions of hepatic stellate cells, its transactivation and liver regeneration during liver injury in animal model of cholestasis, 44th Annual Meeting of Pacific Association of Pediatric Surgeons (PAPS), 2011.4.10-14, Cancun, Mexico

〔図書〕(計 3 件)

1. 田口智章、岩中督 監修、メジカルビュー社、スタンダード小児外科手術、2013、387
2. 田口智章、他、医学書院、標準小児外科学、2012、404 (9-51)
3. 田口智章、他、医学書院、17 消化器疾患標準小児科学 第 7 版、2009、744 (33)

#### 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：20343329

中山 功一 (NAKAYAMA KOICHI)  
佐賀大学・工学系研究科・教授  
研究者番号：50420609

大賀 正一 (OHGA SHOICHI)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号：60233053

山座 孝義 (YAMAZA TAKAYOSHI)  
九州大学・歯学研究院・助教  
研究者番号：80304814

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

松浦 俊治 (MATSUURA TOSHIHARU)  
宮崎県立宮崎病院・医師  
研究者番号：10532856

増本 幸二 (MASUMOTO KOJI)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：20343329

林田 真 (HAYASHIDA MAKOTO)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：70457761

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：