

図1. 本研究のデザイン

hiPSCsから分化させた腸管神経前駆細胞を使った機能評価を行い、Hirschsprung病モデルを作成する。

Neural crest cells; 神経堤細胞

Autonomic/enteric neural crest cells; 自律/腸管神経前駆細胞

Autonomic/enteric neurons; 自律/腸管神経細胞

## B. 研究方法

- 1) H病家族例 (父・娘、娘の方がより重症) よりインフォームドコンセントを得て末梢血を採取した。得られた末梢血より単核球を分離し、それぞれにOct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28, shp53の6つの遺伝子をエピソーマルベクターで導入し、iPS細胞の樹立を行った。
- 2) ヒトES細胞(hESCs)を無血清凝集浮遊培養法(SFEBq method)により神経堤細胞へ分化誘導した。培地にはTGF- $\beta$  阻害薬・GSK3 $\beta$  阻害薬・Rock阻害薬を添加した。分化6日目に、神経堤細胞表面マーカーである、CD271(LNGFR)、CD57(HNK-1)の発現解析をフローサイトメーターにて行った。分化6日目よりレチノイン酸を添加することで、神経堤細胞を腸管神経へ誘導した。分化16日目に免疫染色を行い、自律神経および腸管神経マーカーであるPHOX2B、末梢神経マーカーであるPeripherinの発現解析を行った(図2)。

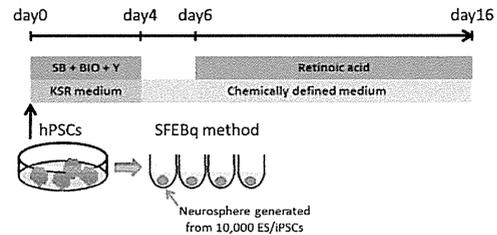


図2. hPSCsから神経堤細胞を経た自律/腸管神経系細胞への分化プロトコール

SB(SB431542); TGF- $\beta$  阻害薬

BIO(6-bromoindirubin-3'-oxime); GSK3 $\beta$  阻害薬

Y(Y27632); Rock阻害薬

KSR; Knock-out serum replacement

- 3) TALEN(transcription activator-like effector nucleases)を用いたゲノム編集技術により、hESCsゲノムPHOX2B 遺伝子3' UTR領域にeGFPレポーターを導入した(図3)。TALEN発現vectorおよびtargeting vectorを作成し、hESCsにトランスフェクションした。薬剤選択の後、コロニーを選別して目的の組み換え体を得た。

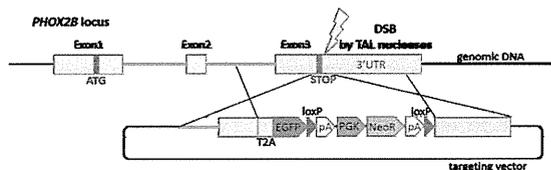


図3. TALENを用いたPHOX2B 発現レポーターの導入

PHOX2B遺伝子3' UTR領域にeGFPレポーターを導入する。

- 4) 3)により得られたPHOX2Bレポーター導入組み換えhESCs(PHOX2B::eGFP hESCs)を用いて自律神経/腸管神経誘導を行った。分化16日目にeGFPの発現を観察した。

(倫理面への配慮)

本研究は、九州大学病院および京都大学の

臨床研究・遺伝子解析研究に関する倫理委員会の承認を得て開始された。

また、すべての試料は書面にてインフォームドコンセントを得て収集された。

### C. 研究結果

1) H病患者2名(家族例)より採取した末梢血より疾患特異的 iPSCs を樹立した(図1; daughter-iPS と father-iPS)。得られた iPSCs の未分化マーカー発現、transgene の silencing、テラトマ形成能を確認した。また、核型解析ではいずれも正常核型であった。

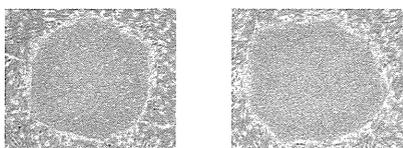


図4. 樹立した疾患特異的 iPSCs

左: father iPSCs、右: daughter-iPSCs

2) hESCs を用いて神経堤細胞および腸管神経細胞への分化系構築を行った。

福田・中井・桐野らは2014年に無血清培地を用いた hPSCs から神経堤細胞への分化法を報告した。我々はこの系を modify して神経堤細胞を経た、自律神経/腸管神経分化系を構築した。図2に示した方法により分化を行い、分化6日目に行ったフローサイトメトリーにて、神経堤細胞マーカーである CD271 および CD57 を高効率に発現する事がわかった(図5, 89.2 ± 3.2%, mean ± SEM)。

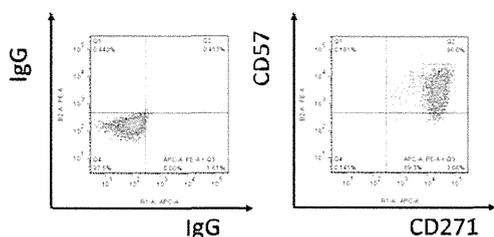


図5. 神経堤細胞マーカーの発現

左: isotype control

右: CD271、CD57 の発現

次に分化6日目からレチノイン酸刺激を加えて培養を継続した。分化16日目に分化細胞を免疫染色したところ、自律神経/腸管神経系マーカーである PHOX2B および末梢神経マーカーである Peripherin とともに発現する細胞を観察することができた(図6)。

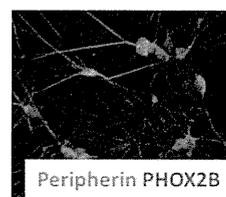


図6. 分化誘導された自律神経/腸管神経細胞  
緑; Peripherin, 末梢神経マーカー  
赤; PHOX2B, 自律神経/腸管神経系マーカー

3) 自律神経/腸管神経細胞を誘導することが可能であることがわかったが、分化効率が低いため、これらの細胞を分離・濃縮するために、PHOX2B 遺伝子の発現レポーターを構築することとした。

PHOX2B は呼吸中枢および末梢自律神経・腸管神経系細胞に特異的に発現する転写因子であるが、この遺伝子の3' UTR 領域に T2A ペプチドに連なる eGFP 遺伝子を Knock-in することとした。

この Knock-in のために、TALEN を用いた部位特異的ゲノム DNA 二重鎖切断と相同組み換え修復のメカニズムを利用した。

PHOX2B 遺伝子の3' UTR 領域を特異的に切断する TALEN プラスミドを作成。また組み換えに用いる targeting vector を作成した(図3)。これらの vector プラスミドを hESCs にトランスフェクションし、G418 で薬剤選択の後、クローンを選別することで目的の組み換え hESCs を得た。

4) 3)により得られた PHOX2B レポーター導入組み換え hESCs (PHOX2B::eGFP hESCs) を

用いて2)と同様の自律神経/腸管神経誘導を行ったところ、分化16日目にeGFP陽性細胞が観察された(図7)。

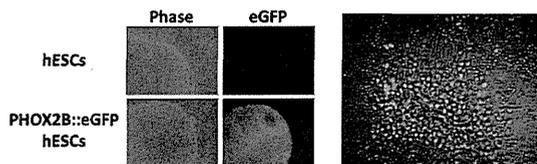


図7. PHOX2B発現レポーター

左; eGFP陽性細胞(細胞凝集体)

右; eGFP陽性細胞(位相差画像と合成)

#### D. 考察

Hirschsprung病の病態解明を目指した研究を行うにあたり、まず我々は疾患特異的iPSCsを樹立した。樹立されたiPSCsの質的評価を行い、iPSCsとして既報に矛盾しないことを証明した。

また、hPSCsを比較的短期間でかつ高効率に神経堤細胞に分化誘導することに成功した。

次に、この神経堤細胞から自律神経/腸管神経の分化誘導を行い、これらの神経系細胞に特異的に発現する、PHOX2B遺伝子の発現レポーター作成を行った。

hPSCsから自律神経/腸管神経細胞への分化方法に関してはこれまであまり多くの報告がなく、①効率が低いこと、②分離・濃縮する方法がないこと、などの問題がある。

今回我々はPHOX2B発現レポーターを作成することで、②の分離が可能となった。また、PHOX2B発現レポーターを用いることで、分化効率の上昇を目指したシステム構築が容易となりえる。

今後、分化細胞の評価をすすめ、Hirschsprung病疾患特異的iPSCsを用いた、疾患解析(分化能・遊走能・増殖能)の検討をすすめていく。

#### E. 結論

hPSCsを用いることにより、これまで困難であったヒト神経堤細胞の機能異常を解析することが可能となった。

腸管神経堤細胞の機能異常に起因するHirschsprung病の病態については不明な点が多い。

本研究はこれらの疾患原因を解明する糸口になると考えた。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Honda Y., Tsuchida M., Zaike Y., Masunaga A., Yoshimi A., Kojima S., Ito M., Kikuchi A., Nakahata T., Manabe A.: Clinical characteristics of 15 children with juvenile myelomonocytic 1 leukemia who developed blast crisis: MDS Committee of Japanese Society of Pediatric Hematology/Oncology (JSPHO). Br J Haematol.165(5):682-7. 2014 Jun, doi: 10.1111/bjh.12796. Epub 2014 Mar 4. Daifu T., Kato I., Kozuki K., Umeda K., Hiramatsu H., Watanabe K., Kamiya I., Taki T., Nakahata T., Heike T., Adachi S.: The clinical utility of genetic testing for t(8;16)(p11;p13) in congenital acute myeloid leukemia. J Pediatr Hematol Oncol. 36(5): e325-7. 2014 Jul doi: 10.1097/MPH.000000000000099.

Hasegawa D., Chen X., Hirabayashi S., Ishida Y., Watanabe S., Zaike Y., Tsuchida M., Masunaga A., Yoshimi A., Hama A., Kojima S., Ito M., Nakahata T., Manabe A.: Clinical characteristics and treatment outcome in 65 cases with refractory cytopenia of childhood

defined according to the WHO 2008 classification. Br J Haematol. 2014 Jun 4. doi: 10.1111/bjh.12955. [Epub ahead of print]

Moriwaki K., Manabe A., Taketani T., Kikuchi A., Nakahata T., Hayashi Y.: Cytogetics and clinical features of pediatric myelodysplastic syndrome in Japan. Int. J. Hematol. 100:478-484,2014.

Fukuta M., Nakai Y., Kirino K., Nakagawa M., Sekiguchi K., Nagata S., Matsumoto Y., Yamamoto T., Umeda K., Heike T., Okumura N., Koizumi N., Sato T., Nakahata T., Saito M., Otsuka T., Kinoshita S., Ueno M., Ikeya M., Toguchida J.: Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media.. PLOS ONE Published: December 02, 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0112291

Suzuki N., Niwa A., Yabe M., Hira A., Okada C., Amano N., Watanabe A., Watanabe K., Heike T., Takata M., Nakahata T., Saito M.: Pluripotent cell models of Fanconi anemia identify the early pathological defect in human hemoangiogenic progenitors. Stem Cells Translational Medicine in press.

Yoshida M., Kitaoka S., Egawa N., Yamane M., Ikeda R., Tsukita K., Amano N., Watanabe A., Morimoto M., Takahashi J., Hosoi H., Nakahata T., Inoue H., Saito M.K.: Modeling the early phenotype at the neuromuscular junction of spinal muscular atrophy using patient-derived iPSCs. Stem Cell Reports in press.

中畑龍俊 : iPSC細胞からHTSに耐えうる疾患モデル評価系の構築. (特別インタビュー) 国際医薬品情報 通巻第1026

号 : 25-27 2015年1月26日

中畑龍俊 : 特集によせて. 遺伝子医学MOOK27 : 23-26 (iPS細胞を用いた難病研究—臨床病態解明と創薬に向けた研究の最新知見、編集 : 中畑龍俊) 2015年2月5日 メディカルドゥ発行

## 2. 学会発表

中畑龍俊 : 特別講演、iPS細胞を用いた小児医療の将来. 第50回中部日本小児学会会 2014年8月10日 信州大学医学部付属病院

中畑龍俊 : 特別講演、iPS細胞時代 : 医療はどうか変わるか. 日本早期認知症学会 (JSED) 第15回学術大会 in 佐倉 2014年9月12-14日 (14日) ウィシントンホテル・ユーカー (佐倉市)

中畑龍俊 : 特別講演、臍帯血中の造血幹細胞発見秘話と最近のiPS細胞研究. 第38回日本血液事業学会総会 2014年10月29-31日 (29日) 広島国際会議場

中畑龍俊 : 招待講演、iPS細胞が変えるリハビリテーションの未来—臨床応用の可能性—. 第49回日本理学療法学術大会 (市民公開講座) 2014年5月30日~6月1日 (6/1) パシフィコ横浜

中畑龍俊 : iPS細胞—臨床への挑戦. 第3回不整脈薬物治療サミット~不整脈薬物治療の近未来を考える~ (第29回日本不整脈学会学術大会/第31回日本心電学会学術集会合同学術大会サテライトシンポジウム) 2014年7月25日 ザ・プリンスパークタワー東京

中畑龍俊 : iPS細胞の小児がん治療への様々な応用. 東京都福祉保健局委託事業小児がん早期診断推進研修会 公開シンポジウム「小児がん治療の現在」 2015

年2月11日 聖路加国際大学アリス・C・セントジョンメモリアルホール

Niwa Akira, Nakahata Tatsutoshi, Saito Megumu: Efficient and less labor-intensive methods for inducing vascular endothelial cells from human pluripotent stem cells. ISSCR 12th Annual Meeting, Vancouver Convention Center(CANADA) June 18-21,2014(6/18, poster)

Iki Takehiro, Tanaka Michihiro, Saito Megumu, Fijibuchi Wataru, Nakahata Tatsutoshi: Microarray analyses cochlea-derived otospheres reveal putative transcription factors which regulate characters of the otospheres. ISSCR 12th Annual Meeting, Vancouver Convention Center(CANADA) June 18-21,2014(6/20, poster)

Shoji Emi, Sakurai Hidetoshi, Heike Toshio, Awaya Tomonari, Nakahata Tatsutoshi, Sehara-Fujisawa Atsuko: Modelling duchenne muscular dystrophy (DMD) with patient derived human induced pluripotent stem cells. ISSCR 12th Annual Meeting, Vancouver Convention Center(CANADA) June 18-21,2014(6/20, poster)

Suzuki Naoya, Samata Bumpei, Habu Toshiyuki, Watanabe Akira, Nakahata Tatsutoshi, Takahashi Jun, Saito Megumu: Impaired neuronal maturation on seckel syndrome is caused by loss of self-organization and centrosome integrity during early neuronal development. ISSCR 12th Annual Meeting, Vancouver Convention Center (CANADA) June 18-21,2014(6/20, poster)

Norihiro Nishimoto, Miho Murakami, Mari Ito,

Yukari Saito,, Megumu Saito, Akira Niwa, Tatsutoshi Nakahata: Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Rheumatoid Arthritis (RA) Patients Reproduce CD14 (+) CD15 (+) Abnormal Myeloid Cells Observed in Bone Marrow of Severe RA Patients. The American College of Rheumatology (ACR) and the Association of Rheumatology Health Professionals (ARHP) annual meeting 2014 November 14 - 19, 2014, Boston Convention and Exhibition Center (USA), 口演

Nishinaka Yoko, Akira Niwa, Mitsujiro Osawa, Akira Watanabe, Tatsutoshi Nakahata, Megumu K Saito: Exploring the Pathogenesis of Down Syndrome-Related Myeloproliferative Disorders Using iPSCs. 56th Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 6-9, 2014, San Francisco (poster).

Akira Niwa, Akitsu Ho+a, Megumu K Saito, Tatsutoshi Nakahata: Phenomic Screen in Vivo and in Vitro to Explore Novel Pathogenesis of AML1-ETO-Positive Leukemia Using PSC-Derived Hematopoietic Cells. 56th Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 6-9, 2014, San Francisco (poster).

Ito M.N., Murakami M., Saito M., Niwa A., Osawa M., Nakahata T., Nishimoto N.:

Monocytes differentiated from iPS cells derived from rheumatoid arthritis patients express more M-CSF receptor together with RANK than those from healthy donors resulting in the accelerated osteoclastogenesis. EULAR 15-3229,2015.

横山宏司, 西小森隆太, 納富誠司郎, 田中孝之, 齋藤潤, 梅田雄嗣, 池谷真, 中

畑龍俊, 戸口田淳也, 平家俊男: 患者由来iPS細胞を用いたCINCA症候群における関節症病態の解明. 第117回日本小児科学会学術集会 2014年4月11-13日 (11日)

名古屋国際会議場 口演

桐野浩輔, 尾崎富美子, 丹羽明, 畑龍俊, 齋藤潤, 平家勇司: 末梢血Natural Killer細胞を用いた人口多能性幹細胞の樹立. 第35回日本炎症・再生医学会 2014年7月1-4日 (2日) 万国津梁館 (沖縄) ポスター発表

王茂治, 丹羽明, 齋藤潤, 畑龍俊: 疾患特異的iPS細胞を用いたChediak-東症候群の病態解析. 第35回日本炎症・再生医学会 2014年7月1-4日 (2日) 万国津梁館 (沖縄) ポスター発表

伊藤眞理, 村上美帆, 丹羽明, 齋藤潤, 畑龍俊, 西本憲弘: 疾患iPS細胞を用いた破骨細胞分化系の構築と分化能の検討. 第1回日本骨免疫会議 2014年7月1-4日 (1日) 万国津梁館 (沖縄) ポスター発表

畑龍俊: アカデミアの立場から (テーマ: 日本から発信するレギュラトリーサイエンス). 第4回レギュラトリーサイエンス学会学術大会-レギュラトリーサイエンスの世界展開 2014年9月5-6日 (6日) 一橋大学一橋講堂

Shigeharu Oh, Akira Niwa, Megumu K. Saito, Tatsutoshi Nakahata: Modeling Chediak-Higashi Syndrome using patient's specific iPS cells. (一般口演) 第76回日本血液学会学術集会 2014年10月31日-11月2日 (31日) 大阪国際会議場

Kazuki Taoka, Syunya Arai, Masataka Hosai, Fimihiko Nakamura, Masashi Miyauchi, Sho Yamazaki, Akira Honda, Keisuke Kataoka,

Keiki Kumano, Akihide Yoshimi, Koji Eto, Hiromitsu Nakauchi, Tatsutoshi Nakahata, Mineo Kurokawa: Modeling chronic myelomonocytic leukemia through patient-derived induced pluripotent stem cells. (一般口演) 第76回日本血液学会学術集会 2014年10月31日-11月2日 (31日) 大阪国際会議場

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

## CHARGE症候群の患児由来iPS細胞の神経堤細胞への誘導

業務担当責任者 奥野 博庸 慶應義塾大学医学部総合医科学研究センター 特任助教

### 【研究要旨】

疾患特異的iPS細胞の樹立と病因解明; ヒルシュスプルング病及び類縁疾患と同じく神経堤細胞の発生異常が関与するCHARGE症候群の患児由来iPS細胞より神経堤細胞を誘導し、in vitro モデルを作成した。

### 研究協力者

岡野 栄之 (慶應義塾大学医学部生理学 教授)

(倫理面への配慮)

#### A. 研究目的

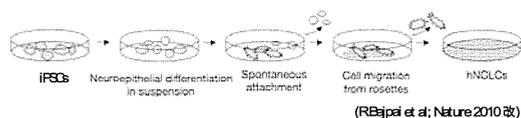
ヒルシュスプルング病及び類縁疾患と同じく神経堤細胞の発生異常が関与するCHARGE症候群の患児より樹立した疾患特異的iPS細胞より神経堤細胞を誘導し、in vitro モデルを作成する。これを応用して、同じく神経堤細胞の異常が関与するヒルシュスプルング病及び類縁疾患のin vitroモデルの作成へ応用する。

本研究ではCHARGE症候群患者2名より皮膚線維芽細胞を得て、作成したiPS細胞を用いた。患者より検体を得る前に、患者および両親に皮膚線維芽細胞を取得しiPS細胞を樹立する旨、作製したiPS細胞を分化培養する旨、を説明し、インフォームド・コンセントを得た。またこれらについては、皮膚生検を行う前に、慶應義塾大学病院内の倫理委員会の承認をあらかじめ得ている。

#### B. 研究方法

1) CHARGE症候群患児由来iPS細胞を神経堤細胞(CHARGE-NCCs)へ分化誘導させた。

<神経堤細胞誘導方法>



2) 正常神経堤細胞(Control-NCCs)とCHARGE由来神経堤細胞(CHARGE-NCCs)を顕微鏡下で層間剥離、遊走極性に関して比較した。またtranswell assayを行い、遊走能を比較した。

#### C. 研究結果

CHARGE症候群患者iPS細胞由来神経堤細胞において、層間剥離、遊走極性、遊走能のいずれも低下を認めた。

#### D. 考察

CHARGE症候群と同じ神経堤症であるヒルシュブルング病及び類縁疾患の病態を解明するために、我々が用いたiPS細胞由来神経堤細胞は有用なin vitroモデルの材料となると考えられる。In vitroモデルを作成することで、病態解明や創薬研究に繋がると期待される。

#### E. 結論

疾患特異的iPS細胞を用いて、神経堤症のin vitroモデルを作成した。

#### F. 研究発表

特記事項なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表：該当なし
2. 学会発表：該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## H類縁に対する腸管神経再生療法の開発の研究

担当責任者 吉丸耕一朗 九州大学 大学病院・小児外科 医員  
山座 孝義 九州大学歯学研究院・分子口腔解剖学分野 講師  
小田 義直 九州大学医学研究院・形態機能病理学分野 教授  
家入 里志 九州大学医学研究院・小児外科学分野 准教授  
田口 智章 九州大学医学研究院・小児外科学分野 教授

### 【研究要旨】

小児期に発症し腸管蠕動不全をきたす疾患として、ヒルシュスプルング病(H病)とその類縁疾患(H類縁)がある。H類縁は、その希少性から病態解明や治療法の開発は進み難く、生存例も静脈栄養の離脱が困難である。H類縁の現在の唯一の根治的治療法は小腸移植であるが、強い拒絶反応など多くの合併症に起因する治療成績不良や保険適応ではないことから本邦での実施は容易ではない。小腸移植の代替治療として、幹細胞を用いた再生医療が注目されている。H類縁のうち腸管神経細胞僅少症は、腸管神経節細胞の減少が蠕動運動の不良を招いていることから、幹細胞を疾患部位に移植する事で、蠕動不全腸管の神経系を再生し腸管機能を改善させることができれば、患児の腸管を温存し劇的なQOL改善に繋がると考えられる。

### A. 研究目的

腸管神経節細胞が少なく、腸管の収縮及び弛緩が正常に比較し劣っているヒルシュスプルング病類縁疾患(H類縁)モデルマウスを用いた腸管神経再生有効性指標の確立。

### B. 研究方法

ヒト脱落乳歯歯髄幹細胞(SHED)をマウスに移植した移植群と非移植群に対し、臨床的評価(体重推移、糞便個数の推移)、電気生理学的腸管蠕動機能評価、病理組織学的評価の各評価を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト脱落乳歯の採取は、九州大学倫理委員会での承認形式に基づき、研究対象者が未成年

のため代諾者の同意を得、九州大学病院小児科で行われた。動物実験については、九州大学動物実験委員会での承認形式に基づき、動物愛護を充分考慮し、施行された。

### C. 研究結果

SHED移植群において非移植群に比較し、体重増加・糞便量増加を有意に認め、電気生理学的評価にて、ACh刺激に対する収縮の有意な改善を認めた。病理組織学的評価では、HE染色及び免疫染色にて神経節細胞の増加傾向を認め、SHED移植後、腸管筋間神経叢にSHEDの生着を確認した。

### D. 考察

研究結果を踏まえると、SHEDが腸管筋間神

経叢に生着し、腸管神経細胞に分化もしくは、神経細胞の増殖を促し、神経細胞の量的もしくは質的改善、ないし、腸管神経系細胞への分化をしえ、その結果、腸管蠕動が改善し、体重増加をなしえたと考えられる。今後はさらなる病理組織学・電気生理学・栄養学的評価を行う予定である。

## E. 結論

H類縁モデルマウスにおけるSHEDの有効性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ratih Yuniartha, Fatima Safira Alatas, Kouji Nagata, Masaaki Kuda, Yusuke Yanagi, Genshiro Esumi, Takayoshi Yamaza, Yoshiaki Kinoshita, Tomoaki Taguchi. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell transplantation in a nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia rat model. *Pediatric Surgery International*, 2014; 9: 907-914.
- 2) Yamamoto H, Arakaki K, Morimatsu K, Zaitzu Y, Fujita A, Kohashi K, Hirahashi M, Motoshita J, Oshiro Y, Oda Y: Insulin-like growth factor II mRNA-binding protein-3 (IMP3) expression in gastrointestinal mesenchymal tumors. *Hum Pathol* 45(3): 481-7, 2014.
- 3) Kohashi K, Yamamoto H, Kumagai R, Yamada Y, Hotokebuchi Y, Taguchi T, Iwamoto Y, Oda Y: Differential microRNA expression profiles between malignant rhabdoid tumor and epithelioid sarcoma: miR193a-5p is suggested to downregulate SMARCB1 mRNA expression. *Mod Pathol*. 2014 Jun;27(6):832-9. (corresponding)
- 4) Hirahashi M, Koga Y, Kumagai R, Aishima S, Taguchi K, Oda Y: Induced nitric oxide synthetase and peroxiredoxin expression in intramucosal poorly differentiated gastric cancer of young patients. *Pathol Int*. 2014 Apr;64(4):155-63.
- 5) Miyoshi K, Kohashi K, Fushimi F, Yamamoto H, Taguchi T, Iwamoto Y, Oda Y: Close correlation between CXCR4 and VEGF expression and frequent CXCR7 expression in rhabdomyosarcoma. *Hum Pathol*. 2014 Sep;45(9):1900-9. (corresponding)
- 6) Taguchi T, Kobayashi H, Kanamori Y, Segawa O, Yamataka A, Sugiyama M, Iwanaka T, Shinojima N, Kuroda T, Nakazawa A, Oda Y, Miyoshi K, Ieiri S. Isolated intestinal neuronal dysplasia Type B (IND-B) in Japan: results from a nationwide survey. *Pediatr Surg Int*. 2014 Aug;30(8):815-22.
- 7) Zaitzu Y, Oki E, Yoshida A, Ando K, Ida S, Kimura Y, Saeki H, Kawanaka H, Morita M, Ikeda T, Kusumoto T, Hirahashi M, Oda Y, Maehara Y: Loss of heterozygosity of encoding phosphate and tensin homolog associated with elevated HER2 expression is an adverse prognostic indicator in gastric cancer. *Oncology*. 2014 Nov 27;88(3):189-194.
- 8) Kohashi K, Yamada Y, Hotokebuchi Y, Yamamoto H, Taguchi T, Iwamoto Y, Oda Y: ERG and SALL4 expressions in SMARCB1/INI1-deficient tumors: a useful tool for distinguishing epithelioid sarcoma from malignant rhabdoid tumor. *Hum Pathology*

- 46(2): 225-230, 2015 (corresponding)
- 9) Kinoshita Y, Tanaka S, Souzaki R, Miyoshi K, Kohashi K, Oda Y, Nakatsura T, Taguchi T: Glypican 3 Expression in Pediatric Malignant Solid Tumors. Eur J Pediatr Surg. 2015 Feb;25(1):138-44.
2. 学会発表
- 1) 山座孝義 : 口腔幹細胞とトランスレシヨナルメディシン. 第68回日本口腔科学学会シンポジウム1「口腔組織に由来する幹細胞の医科への応用」. 2014年5月.
- 2) 柳佑典, Alatas, Fastima Safira, 吉丸耕一朗, 林田真, 大賀正一, 山座治義, 山座孝義, 田口智章: 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. 第51回日本小児外科学会. 2014年5月.
- 3) 山座孝義 : 乳歯幹細胞とトランスレシヨナルメディシン. 九州大学母子総合研究リサーチカンファレンス. 2014年6月.
- 4) 山座孝義 : 間葉系幹細胞移植におけるレシピエントの組織・細胞の反応. 第56回歯科基礎医学会. サテライトシンポジウム7「間葉系幹細胞の直接的・間接的な組織再生への関与を考える」. 2014年9月.
- 5) 星野慶弘, 山座孝義, 馬蘭, 友田恵利佳, 山座治義, 野中和明: ビリルビン影響下におけるヒト歯髄幹細胞の機能回復. 第56回歯科基礎医学会. 2014年9月.
- 6) 小田義直  
骨肉腫およびFibroosseous lesionのトピックス. コンパニオンミーティング (教育講演) 第103回日本病理学会学術集会, 2014.4.24-26, 広島
- 7) 小田義直  
軟部腫瘍の2013年新WHO分類 (教育講演) 第47回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会. 2014年7月17-18日, 大阪
- 8) 小田義直  
骨肉腫における転写因子YB-1およびケモカインレセプターCXCR4発現.  
シンポジウム「骨微小環境とがんの遭遇」  
第32回日本骨代謝学会学術総会 2014年7月24日, 大阪
- 9) 小田義直, 山田裕一, 孝橋賢一, 山元英崇, 岩本幸英. 紡錘型細胞軟部肉腫におけるAkt-mTORシグナル経路の活性化とその治療応用の可能性シンポジウム: 肉腫における基礎・臨床研究の最前線. 第73回, 日本癌学会学術総会, 2014.9-25-27日, 横浜
- 10) 小田義直.  
軟部腫瘍病理診断における分子病理の応用 (教育講演) 第53回 日本臨床細胞学会秋季大会 2014.11.9 下関
- 11) 小田義直:  
骨腫瘍における新WHO分類の変更点  
シンポジウム: 骨軟部腫瘍の新WHO分類 (シンポジスト、モデレーター) 2014年国際病理アカデミー日本支部教育シンポジウム. 2014.11.22 浦添市
- 12) 木下義晶, 宗崎良太, 川久保尚徳, 代居良太, 中島健太郎, 古賀友紀, 久田正昭, 三好きな, 孝橋賢一, 小田義直, 高田英俊, 原寿郎, 田口智章. 九州大学病院における小児固形腫瘍のキャンサーボード活動状況 第56回 日本小児血液・がん学会学術総会 2014.11.28-30, 岡山
- 13) 宗崎良太, 川久保尚徳, 代居良太, 家入里志, 木下義晶, 古賀友紀, 三好きな, 小田義直, 原寿郎, 橋爪誠, 田口智章. 新生児副腎嚢胞性病変の4例. 第56回 日本小児

- 血液・がん学会学術総会 2014.11.28-30, 岡山
- 14) 中島健太郎、古賀友紀、小野宏彰、小林賢子、宗崎良太、木下義晶、三好きな、山元英崇、小田義直、高田英俊、原寿郎.小児顆粒球肉腫の3例.第56回 日本小児血液・がん学会学術総会 2014.11.28-30, 岡山
- 15) 代居良太、宗崎良太、岩中剛、吉田聖、安松隆治、三好きな、久田正昭、木下義晶、小宗静男、田口智章.先天性浸潤性顔面脂肪腫瘍の一例.第56回 日本小児血液・がん学会学術総会 2014.11.28-30, 岡山
- 16) 仲正喜、大久保文彦、山元英崇、平橋美奈子、孝橋賢一、宗崎良太、田口智章、小田義直.横紋の認識が診断に有用であった胎児型横紋筋肉腫の1例.第30回福岡県臨床細胞学会 2014.12.14 福岡市 (福岡赤十字病院)
- 17) Oda Y.Recent advances in molecular pathology of soft tissue sarcomas: Keynote lecture (Invited lecture)2014 Annual Meeting of Taiwan Society of Pathology and IAP Taiwan Division,May 25, 2014, Taipei, Taiwan
- 18) Oda Y.Myoepithelial carcinoma: Slide seminar (Invited Lecture)2014 Annual Meeting of Taiwan Society of Pathology and IAP Taiwan Division,May 25, 2014, Taipei, Taiwan
- 19) Oda Y.Activation of Akt-mTOR pathway and its therapeutic implication in spindle cell soft tissue sarcomas. (Invited lecture)Joint Japanese German Symposium.The 98th Annual Meeting of the German Society of Pathology, June 13, 2014, Berlin, Germany
- 20) Oda Y.Soft tissue tumors including entities currently under discussion. (Invited lecture)Diagnostic Courses in Cooperation with the German Division of the International Academy of Pathology.The 98th Annual Meeting of the German Society of Pathology, June 14, 2014, Berlin, Germany
- 21) Oda Y.Fibrogenic and Fibrohistiocytic Tumors (Invited lecture)19th Korean Academy of Science and Technology, International Symposium.Bone Health-Occurrence of tumors and genetic personalized therapy.June 28, 2014, Seoul, Korea
- 22) Oda Y.Slide seminar: Angiofibroma of soft tissue (Invited lecture) XXXth Congress of the International Academy of Pathology.Oct 8, 2014, Bangkok, Thailand
- 23) Oda Y.:Short course: Unusual soft tissue (Invited lecture) XXXth Congress of the International Academy of Pathology.Oct 10, 2014, Bangkok, Thailand
- 24) Oda Y: (Invited lecture).Recent advances in molecular pathology of bone and soft tissue sarcomas.1st International Symposium Foundation for Promotion of Cancer Research Recent Global Advances in Cancer Research ~Rare Cancers: Seeking for Ideal Medical Care~.Feb 12, 2015, Tokyo

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 乳歯幹細胞による肝障害モデルマウスにおける 肝再生に関する研究

担当責任者	山座 孝義	九州大学歯学研究院・分子口腔解剖学 講師
	山座 治義	九州大学歯学研究院・小児口腔医学分野 講師
	吉丸耕一朗	九州大学 大学病院・小児外科 医員
	柳 佑典	九州大学医学研究院・小児外科学分野 共同研究員
	林田 真	九州大学 大学病院・小児外科 助教
	井原 健二	大分大学医学部小児科学 教授
	大賀 正一	山口大学大学院医学系研究院・小児科学 教授
	野中 和明	九州大学歯学研究院・小児口腔医学分野 教授
	中山 功一	佐賀大学・工学系研究科先端融合専攻医工学講座(医工学) 教授
	田口 智章	九州大学医学研究院・小児外科学分野 教授

### 【研究要旨】

ヒルシュスプルング病および類縁疾患患児では、その根本的治療法が確立されていないばかりか、長期の静脈栄養による肝障害に悩まされ、時に肝不全にて死に至るケースもある。本研究では、肝障害モデルマウスにおいて、肝障害に対する乳歯幹細胞療法の効果を検討した。乳歯幹細胞投与群では、血清学的解析ならびに病理組織学的解析により、著しい肝機能の改善が認められた。移植細胞のレシピエント肝組織への生着ならびにヒト肝細胞への分化も確認された。乳歯幹細胞療法は肝障害の治療に有用であることが示唆された。

### 研究協力者

RATIH YUNIARTHA

(九州大学医学研究院・小児外科 大学院生)

### A. 研究目的

ヒルシュスプルング病およびその類縁疾患では、先天的に腸管蠕動運動不全を来し、腸閉塞症状を呈する。根治療法である小腸移植は、生着率の低さから、適応例が非常に限られている。現状の治療法は、蠕動不全部腸管の切除による腸管減圧および静脈栄養による延命である。長期生存例では、静脈栄養により肝障害を

合併することから、その改善が課題である。本研究では、肝障害の治療に対する乳歯幹細胞療法の有効性を試験するために、薬剤誘導性慢性肝障害モデルマウスに、乳歯幹細胞を投与し、その治療効果を解析することを目的とした。

### B. 研究方法

8週齢C57BL/6マウスに、オリーブオイルで4:1に懸濁した四塩化炭素(0.5ml/kg)を週2回、計4週間腹腔内投与し、慢性肝障害モデルマウスを作製した。同量のオリーブオイルを投

与したマウスを対照群とした。

培養した未分化乳歯幹細胞 $1.0 \times 10^6$ を作製された慢性肝障害モデルマウスの脾臓内に注入し、細胞移植を行った。細胞移植後も $\text{CCl}_4$ 投与を4週間継続し、肝障害誘発を継続した。

乳歯幹細胞移植4週後、末梢血ならびに肝組織を採取して解析に用いた。

#### (倫理面への配慮)

ヒト脱落乳歯の採取は、九州大学倫理委員会での承認形式に基づき、研究対象者が未成年のため代諾者の同意を得、九州大学病院小児科で行われた。動物実験については、九州大学動物実験委員会での承認形式に基づき、動物愛護を充分考慮し、施行された。

### C. 研究結果

#### ①血清肝機能検査

薬剤誘導性慢性肝障害モデルマウスで著大な上昇を認めていた血清中のASTならびにALTは、乳歯幹細胞投与群では、対照群とほぼ同じレベルを示していた。

#### ②病理組織学的解析

##### (1) 肝線維化の解析

H&E染色ならびにトリクローム染色による肝組織の組織学的観察薬剤誘導性慢性肝障害モデルマウスの肝組織では、グリソン野に著しい線維組織の沈着が認められた。その沈着部位は、肝組織のおよそ20%に及んでいた。また肝細胞の配列が乱れ、また壊死像も認められた。一方、乳歯幹細胞投与群では、グリソン野に著しい線維組織の沈着が減少し、正常肝組織のように肝細胞の再配列が認められた。

肝障害モデルマウスの肝組織では、ヒドロキシプロリンの含有ならびにマウスI型コラーゲン遺伝子の発現が著しく上昇していたのに対

し、乳歯幹細胞投与群では、正常肝組織と同等まで低下していた。

##### (2) 肝星細胞の解析

活性化した肝星細胞は $\alpha$ SMAを発現し、I型コラーゲンを大量に産生すると考えられている。 $\alpha$ SMAの発現を免疫組織化学ならびにリアルタイムRT-PCRで解析すると、障害肝では顕著な発現上昇を認めていたが、乳歯幹細胞投与群では、正常肝組織と同等まで下降していた。肝星細胞の活性化やI型コラーゲン沈着に深い関与を示す因子の分子群(MMP9, MMP2, TIMP1, TIMP2, IL-6, TGF $\beta$ 1, TNF $\alpha$ )の発現をリアルタイムRT-PCRで解析した所、薬剤誘導性障害肝組織では、いずれの遺伝子もその発現が著しく増加していたのに対し、細胞移植群では全て減少していた。

##### (3) ドナー細胞の生着の評価

乳歯幹細胞投与群では、乳歯幹細胞投与群では、ヒト白血球抗原HLA-ABCに免疫陽性反応を示す細胞が、線維組織沈着部位相当部に局在していた。また、ヒト特異的肝細胞マーカーHepPar1抗体に免疫陽性反応を示す細胞が、HLA-ABC陽性細胞と同様、線維組織沈着部位相当部に局在していた。さらに、ヒトアルブミン抗体陽性細胞も同様の局在様式を示した。いずれの陽性細胞も、四塩化炭素障害肝の線維化領域(約20%)に相当する領域を移植肝組織のグリソン野で占めていた。

一方、非投与群肝組織では、いずれの陽性反応も観察出来なかった。

血清中のヒトアルブミン量をELISAで解析すると、乳歯幹細胞投与群では検知可能であったが、非投与群では検知できなかった。

### D. 考察

血清肝機能検査から、乳歯幹細胞移植群で

は、四塩化炭素による肝障害におけるAST,ALT異常上昇ならびに線維沈着の増加が著しく軽減化されたこと、さらに線維化を増悪化させる活性化肝星細胞を抑制していたことから、障害肝に対する乳歯幹細胞移植治療の有効性が示された。

乳歯幹細胞移植群において、免疫組織学的解析から、ヒト白血球抗原陽細胞ならびにヒト肝細胞特異的マーカー（HepPar1ならびにヒトアルブミン）がグリソン野相当部に検出し、さらにELISAにより血清中にヒトアルブミンが検出された。加えて、この分化したヒト肝細胞様細胞は、四塩化炭素障害肝の線維化領域と同等領域を占拠していたことから、脾臓より移植されたドナー未分化乳歯幹細胞が、レシピエント肝組織に生着し、さらにレシピエント肝組織内でヒト肝細胞様細胞へ分化することで、線維化により障害された肝組織を再生している事が示された。この再生過程により、肝機能が改善されたと考えられる。

その生着ならびに分化メカニズムについては不明な点が多いが、レシピエント肝組織ならびに乳歯幹細胞が産生する液性因子の関与が推測される。この点の今後の解析が期待される。

## E. 結論

薬剤誘導性肝障害モデルマウスに対する乳歯幹細胞を用いた細胞療法の有効性を病理学的および生化学的に示した。ヒルシュスプルング病およびその類縁疾患の長期生存者に対する肝障害の治療ならびに予防に乳歯幹細胞治療の可能性が考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Ratih Yuniartha, Fatima Safira Alatas, Kouji Nagata, Masaaki Kuda, Yusuke Yanagi, Genshiro Esumi, Takayoshi Yamaza, Yoshiaki Kinoshita, Tomoaki Taguchi. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell transplantation in a nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia rat model. *Pediatric Surgery International*,2014;9:907-914.

### 2. 学会発表

- (1) 山座孝義：口腔幹細胞とトランスレーショナルメディシン. 第68回日本口腔科学学会シンポジウム 1 「口腔組織に由来する幹細胞の医科への応用」. 2014年5月.
- (2) 柳佑典, Alatas, Fastima Safira, 吉丸耕一朗, 林田真, 大賀正一, 山座治義, 山座孝義, 田口智章：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. 第51回日本小児外科学会. 2014年5月.
- (3) 山座孝義：乳歯幹細胞とトランスレーショナルメディシン. 九州大学母子総合研究リサーチカンファレンス. 2014年6月.
- (4) 山座孝義：間葉系幹細胞移植におけるレシピエントの組織・細胞の反応. 第56回歯科基礎医学会. サテライトシンポジウム7「間葉系幹細胞の直接的・間接的な組織再生への関与を考える」. 2014年9月.
- (5) 星野慶弘, 山座孝義, 馬蘭, 友田恵利佳, 山座治義, 野中和明：ビリルビン影響下におけるヒト歯髄幹細胞の機能回復. 第56回歯科基礎医学会. 2014年9月.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 間葉系幹細胞を用いたWilson病治療の基礎研究

担当責任者： 山座 孝義 九州大学歯学研究院・分子口腔解剖学分野 講師  
山座 治義 九州大学歯学研究院・口腔保健推進学講座小児口腔医学 講師  
野中 和明 九州大学歯学研究院・口腔保健推進学講座小児口腔医学 教授  
井原 健二 大分大学医学部・小児科学講座 教授  
大賀 正一 山口大学大学院医学系研究科・小児科学 教授  
田口 智章 九州大学医学研究院・小児外科学分野 教授

### 【研究要旨】

先天性銅代謝異常症であるウィルソン病は、しばしば小児急性肝不全の基礎疾患となる。本研究では、ウィルソン病モデルラットの肝障害に対する間葉系幹細胞療法の基礎研究を行った。生存率、生化学的および病理学的解析の結果、急性期に十分な効果を確認した。この結果は本療法が単なる補填療法ではなく、抗炎症作用や免疫寛容作用などの間葉系幹細胞に特徴的な機能を生かした細胞療法であることを示唆した。ヒルシュスプルング病のような先天性疾患に対してもその有効性と安全性が期待される。

### 研究協力者

藤吉 順子 (九州大学大学院医学研究院  
成長発達医学分野 大学院生)

WDモデルラットにおいて、ヒト乳歯歯髄由来間葉系幹細胞を脾内に投与した。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およびヒト細胞定着に関する解析を行った。

### (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ている。

全てのラットは標準的な飼育環境下(室温23±2℃、湿度55±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。

### A. 研究目的

間葉系幹細胞を用いた細胞療法について、ヒルシュスプルング病のような先天性疾患を対象とした研究報告は多くない。本研究では、ATB7B遺伝子変異により先天性に発症するウィルソン病(WD)に注目した。本症の根治療法は同種肝移植のみとされている。WDに対する間葉系幹細胞による細胞治療の開発を目指し、モデルラットを用いた基礎研究を行う。

### B. 研究方法

4週齢よりWDモデルラットに銅負荷飼料を与え、WD肝障害の劇症化を図った。6週齢

### C. 研究結果

無治療群と比較し、細胞投与群では有意に高い生存率を示した。生化学的解析により肝機能の有意な改善効果を確認した。病理学的解析では、細胞投与群に炎症細胞浸潤と銅沈着が少なかった。肝組織の炎症性サイトカインと酸化ストレスのmRNA発現も低かった。

細胞投与4週後のラット血清にヒトアルブミンは検出されたが、病理組織の免疫染色ではヒト細胞を確認することができなかった。

### D. 考察

細胞投与4週後にヒト細胞の定着は確認できず、解析方法を再検討することが必要である。しかし、細胞投与が劇症肝炎/肝不全に有効であることは、生化学的及び病理学的解析から明らかであった。これは、移入した間葉系幹細胞の肝細胞分化あるいは分化促進効果というより、この間葉系幹細胞に由来する抗炎症作用あるいは抗酸化作用を有する何らかの液性因子により発揮されている可能性が考えられた。

### E. 結論

WDモデルラットの肝不全に対する間葉系幹細胞を用いた細胞療法の有効性を病理学および生化学的に示した。その効果のメカニズムの一部には間葉系幹細胞が産生する液性因子が関与している可能性が考えられた。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Maeba S, Hasegawa S, Shimomura M, Ichimura T, Takahashi K, Motoyama M,

Fukunaga S, Ito Y, Ichiyama T, Ohga S: Successful treatment of corticosteroid with antiviral therapy for a neonatal liver failure with disseminated herpes simplex virus infection. Am J Perinatol 2015 (in press)

- 2) Ochiai M, Kinjo T, Takahata Y, Iwayama M, Ihara K, Ohga S, Kotaro F, Wake N, Taguchi T, Hara T. Survival and neurodevelopmental outcome of preterm infants born at 22-24 weeks of gestational age. Neonatology 105(2):79-84, 2014

#### 2. 学会発表

- 1) Ochiai M, Matsushita Y, Kusuda T, Ichiyama M, Kitajima J, Inoue H, Tanaka K, Ihara K, Ohga S, Hara T. PAS and ASPR Joint Meeting 2014. May 3-6, 2014, Vancouver, British Columbia, USA
- 2) 落合正行, 金城唯宗, 高畑靖, 岩山真理子, 安部猛, 井原健二, 大賀正一, 福嶋恒太郎, 加藤聖子, 田口智章, 原 寿郎. 第67回九州小児科学会 2014.11.22-23 大分市

### H. 知的財産権の出願・登録状況

#### 1. 特許取得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

## 乳歯幹細胞ならびに乳歯幹細胞由来肝細胞の安全性に関する研究

担当責任者：山座 孝義 九州大学歯学研究院・分子口腔解剖学分野 講師  
山座 治義 九州大学歯学研究院・小児口腔医学分野 講師  
野中 和明 九州大学歯学研究院・小児口腔医学分野 教授

### 【研究要旨】

ヒルシユスプルング病ならびその類縁疾患では、その根治療法である小腸移植は、強い拒絶反応等に起因する生着率の低さから、適応例が非常に少ない。新規治療法として、乳歯幹細胞の細胞移植による腸管蠕動運動不全の改善を目指している。従って、ドナー細胞の安全性を検討するとは、治療効果の検討とともに重要なことである。本研究では、移植細胞としての乳歯幹細胞の分化誘導細胞である乳歯幹細胞由来肝細胞に関する造腫瘍性について検討した。

### A. 研究目的

ヒルシユスプルング病およびその類縁疾患では、根治療法である小腸移植は、生着率の低さから、適応例が非常に少ない。現状の治療法は、蠕動不全部腸管の切除による腸管減圧および静脈栄養による延命である。長期生存例では、静脈栄養により肝障害を合併するなど、治療上改善が残されている。従って、蠕動運動改善に対する新規治療法の確立とともに、肝障害に対する治療法が必要と考えられる。

本研究では、ヒルシユスプルング病およびその類縁疾患における肝障害に対し、乳歯幹細胞治療法を確立するために、そのドナー細胞の安全性を確保する必要がある。本研究では、乳歯幹細胞の分化誘導細胞である乳歯幹細胞由来肝細胞の造腫瘍性について解析した。

### B. 研究方法

#### ①肝細胞誘導培養

ヒト乳歯幹細胞を増殖させ、無血清条件下の EGF, FGF2, HGF, Oncostain M,

Dexamethasone刺激下において4週間培養し、ヒト乳歯幹細胞から肝細胞を分化誘導した。

#### ②免疫不全マウス移植実験

未分化乳歯幹細胞ならびに乳歯幹細胞由来肝細胞(各々 $10 \times 10^6$ 個)、10週齢雄性免疫不全マウスBalb/c nu/nuマウスの皮下ならびに精巣へ注入移植を施した。移植後8週目まで、移植部位の異常増殖や炎症状態などの局所観察とともに、体重減少等の全身状態の観察を毎朝行った。

#### ③四塩化炭素誘導性慢性肝障害モデルマウス移植実験

10週齢雄性C57BL/6マウスに四塩化炭素(0.5mL/kg)を週2回4週間腹腔内投与し、慢性肝障害モデルを作製した。未分化乳歯幹細胞ならびに乳歯幹細胞由来肝細胞(各々 $10 \times 10^6$ 個)を脾臓内に注入移植を施した。移植後も四塩化炭素の投与を継続した。未分化乳歯幹細胞ならびに乳歯幹細胞由来肝細胞の移植4週間後、末梢血ならびに肝組織を採取し、病理組織学的解析を行った。さらに、未分化乳歯幹細胞ならびに

乳歯幹細胞由来肝細胞からゲノムDNAを抽出し、Comparative Genomic Hybridization (CGH)解析を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト脱落乳歯の採取は、九州大学倫理委員会での承認形式に基づき、研究対象者が未成年のため代諾者の同意を得、九州大学病院小児科で行われた。動物実験については、九州大学動物実験委員会での承認形式に基づき、動物愛護を充分考慮し、施行された。

### C. 研究結果

#### ①免疫不全マウス移植実験

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。

#### ②四塩化炭素誘導性慢性肝障害モデルマウス移植実験

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を作製した。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。

#### ③乳歯幹細胞と乳歯幹細胞由来肝細胞とのCGH解析

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。

### D. 考察

免疫不全マウスならびに薬剤誘導性肝障害マウスへの乳歯幹細胞および乳歯幹細胞由来肝細胞の移植実験により、レシピエント生体内におけるドナー細胞（乳歯幹細胞および乳歯幹細胞由来肝細胞）ならびにレシピエント細胞の腫瘍化は認められなかった。また、乳歯幹細胞を肝細胞様細胞へと分化誘導する我々の培養方法においては、ゲノムDNAの異常が認められなかったことから、腫瘍化を誘導しない安全な肝細胞分化培養方法である事が示唆された。

今後は、培養乳歯幹細胞ならびに乳歯幹細胞由来肝細胞様細胞の増殖能力の検討、テロメラーゼ活性の解析、癌遺伝子の発現、Gバンド等の染色体解析を行い、培養乳歯幹細胞ならびに乳歯幹細胞由来肝細胞様細胞の造腫瘍能力について検討する必要がある。

### E. 結論

乳歯幹細胞ならびに乳歯幹細胞由来肝細胞が腫瘍化するリスクが少ない事が判明し、ドナー細胞としての安全性の一部が示された。ヒルシュスプルング病およびその類縁疾患などの再生医療において、乳歯幹細胞ならびに乳歯幹細胞由来肝細胞が安全な細胞ソースである事が示唆された。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) Ratih Yuniartha, Fatima Safira Alatas, Kouji Nagata, Masaaki Kuda, Yusuke Yanagi, Genshiro Esumi, Takayoshi Yamaza, Yoshiaki