

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19446

研究課題名(和文) 生体由来気管スキャフォールドとiPS細胞を用いた気管再生技術の研究開発

研究課題名(英文) Trachea regeneration using bio trachea scaffold and iPS cells

研究代表者

周 ケイリョウ (ZHOU, Qiliang)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：10770232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はオリジナルの3回固定遠心法を用いて各種細胞を円筒状の3次元構造物である気管スキャフォールドへ効率よく均一に生着させることに成功した。ラット気管上皮細胞及び内胚葉へ分化したマウスiPS細胞をラット気管スキャフォールドに移植し気管再生を行った。再生した気管をラットに気管移植を行い、最長5週間以上の生存を確認した。未分化iPS細胞のクローニー状増殖と軟骨欠失による気管狭窄が移植後死亡の一因と組織染色で示した。iPS細胞で再生した気管を移植した場合に繊毛上皮細胞の再生を確認した。遠心法を用いた脱細胞した気管スキャフォールドとiPS細胞による気管再生及び気管移植する方法を確立した。

研究成果の概要(英文)：We successfully established a centrifugation method that can transplant cells onto the luminal surface of the decellularized rat trachea scaffold circumferentially. Mouse iPS cells were differentiated into definitive endoderm cells and transplanted onto the luminal surface of the decellularized tracheal matrix scaffold using this centrifugation method. F344/NJc1-rnu/rnu rats transplanted with rat trachea regenerated using mouse iPS cells survived for up to 5 weeks. Histological analysis indicated the cause of death was airway stenosis due to clonal cellular proliferation of undifferentiated iPS cells. Rats transplanted with no-cell scaffold survived for 1 month, although airway stenosis was also observed due to deficiency of tracheal cartilage. Re-epithelialization with numerous ciliated epithelial cells was observed in one of the rats transplanted with trachea bioengineered using iPS cells.

研究分野：tissue engineering

キーワード：trachea engineering trachea scaffold iPS cell Centrifugation Method

1. 研究開始当初の背景

(1) 先天性気道狭窄症、悪性腫瘍浸潤例、慢性炎症や癒痕による気道狭窄例では、気管移植が必要な患者が存在する。

(2) 生体由来気管は、構造から理想的であり、近年洗浄剤 酵素処置法で気管スキャフォールド作製の研究が進んでいる。脱細胞した気管スキャフォールドは抗原成分が完全に除去され、かつ主な細胞外基質構造や十分な機械強度が保たれて、気管再生に適切な足場になると考えられる (Plast Reconstr Surg,130:532-40, 2012)。実際にヒト気管スキャフォールドに、患児の骨髄由来間葉系幹細胞を生着させ移植した報告がある (Lancet,380(9846):994-1000,2012)。この報告では上皮細胞を使用せず、気管の上皮再生が行われていない。また脱細胞したラット気管スキャフォールドをヌードマウスの傍脊柱筋に移植し、気管軟骨細胞再生に成功した報告がある (Surg Today, 45:1040-1048, 2015)。本申請課題のような生体由来気管スキャフォールドと iPS 細胞を用いた軟骨細胞や上皮細胞を含む完全な気管再生は報告されていない。

(3) 多能性幹細胞である iPS 細胞から肺胞上皮への分化誘導が報告され (Cell Stem Cell 10:385-397, 2012; Stem Cell Reports 3:1-10, 2014) また、肺胞上皮細胞だけでなく、線毛細胞や線毛柱上皮を含む気道上皮細胞への分化誘導法も報告され (Nature Biotech 32:84-91, 2014; PNAS 111:1723-1730) 肺上皮細胞の分化誘導系はほぼ確立しつつある。

2. 研究の目的

慢性的なドナー不足を克服し、肺機能改善のための気管移植を行うには、気管再生技術の開発が必須である。ヒトへの臨床応用を見据え、マウス iPS 細胞を用い、気管再生技術基盤の確立のため以下の3項目を本研究課題の目的とする。

(1) 生体由来気管スキャフォールドへの効率的細胞生着法の開発

(2) iPS 細胞を含む異なる細胞種の気管再生の開発

(3) 再生気管移植による移植後気管の解析

3. 研究の方法

本研究は脱細胞したラット気管スキャフォールドに、気道上皮細胞および軟骨細胞、線維芽細胞へと分化させた iPS 細胞を生着させ、ヌードラットに移植を行い、気管再生への基盤となる技術開発研究を行う。

(1) まず、ラット気管を洗浄剤 酵素処置法で細胞成分を完全に除去し、ラット気管ス

キャフォールドを作成する。

(2) 気道上皮細胞および軟骨細胞、線維芽細胞へと分化させた iPS 細胞を気管スキャフォールドに生着させ気管を再生する。

(3) この再生気管を、ラットの気管に移植し、経時的に移植した人工気管を取り出して、解析を行う。

このように再生気管を作成する技術を開発し、その生体での変化を確認し臨床応用を目指して更なる改善点を探る。

4. 研究成果

(1) オリジナルの3回固定遠心法を用いて各種細胞 (線維芽細胞 BLKCL4、マウス肺胞上皮細胞 MLE-12、ラット気管上皮細胞 EGV-4T 及びマウス iPS 細胞) を円筒状の3次元構造物であるラット気管スキャフォールドの内腔へ効率よく均一に生着させることに成功した (図1)。

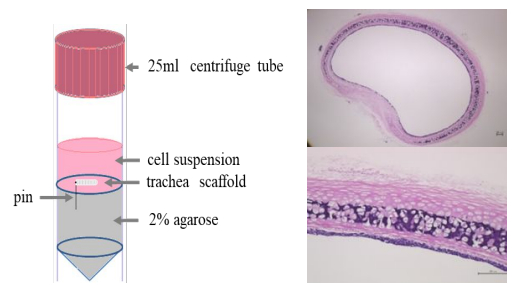


図1. 遠心装置及び気管スキャフォールドへの細胞生着

(2) 未分化 iPS 細胞を気管スキャフォールドに移植して内胚葉へ分化させる方法と内胚葉へ分化した iPS 細胞を気管スキャフォールドに移植する方法を確認したところ、内胚葉へ分化した iPS 細胞を気管スキャフォールドに移植する方法がより多くの内胚葉マーカー SOX-17 の発現が確認された。(図2)

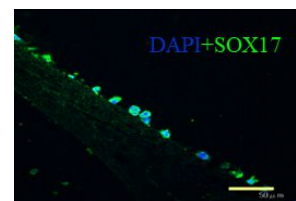


図2. 分化した iPS 細胞の気管スキャフォールドへの移植

(3) ラット気管上皮細胞 EGV-4T 及び内胚葉へ分化したマウス iPS 細胞をラット気管スキャフォールド内腔に移植し気管再生を行い、気管挿管持続吸入麻酔下でラットに気管移植を行った。EGV-4T 細胞及び内胚葉へ分化させたマウス iPS 細胞で再生した気管をラットに移植したところ、最長5週間以上の生存を確

認した(表 1)。

Sample No.	Group	wheeze	airway stenosis	colonic cellular proliferation	Survive period
No.1	Normal trachea	(-)	(-)	(-)	56 days (sacrificed)
No.2		(-)	(-)	(-)	56 days (sacrificed)
No.3	No-cell scaffold	(+)	(+)	(-)	37 days (sacrificed)
No.4		(+)	(+)	(-)	37 days (sacrificed)
No.5		(+)	(+)	(-)	31 days (died)
No.6	EGV-4T scaffold	(+)	(+)	(-)	37 days (sacrificed)
No.7		(+)	(+)	(-)	30 days (died)
No.8	miPS cell scaffold (APS0004)	(+)	(+)	(+)	28 days (died)
No.9		(+)	(+)	(+)	28 days (sacrificed)
No.10	miPS cell scaffold (APS0007)	(+)	(+)	(+)	15 days (died)
No.11		(+)	(+)	(+)	33 days (died)
No.12		(+)	(+)	(-)	40 days (sacrificed)

表 1.再生気管のラットへの移植

組織染色で検討したところ、未分化 iPS 細胞のクローニー状増殖と軟骨欠失による気管狭窄が移植後死亡の一因と推測された。(図 3)

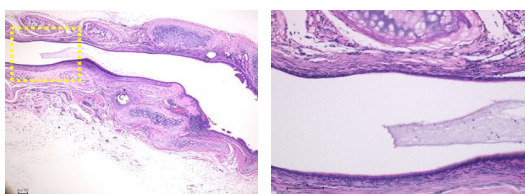


図 3. iPS 細胞で再生した気管の移植

iPS 細胞で再生した気管を移植した場合に繊毛上皮細胞の再生を確認した。(図 4)

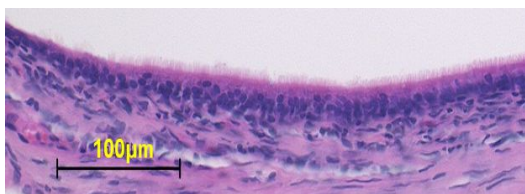


図 4. 繊毛上皮の再生

(4) iPS 細胞の分化プロトコ - ルの改良及び軟骨細胞(図 5)移植による気管狭窄のレスキューが必要かもしれないが、遠心法を用いた脱細胞した気管スキャフォールドと iPS 細胞による気管再生及び気管移植する方法を確立した。

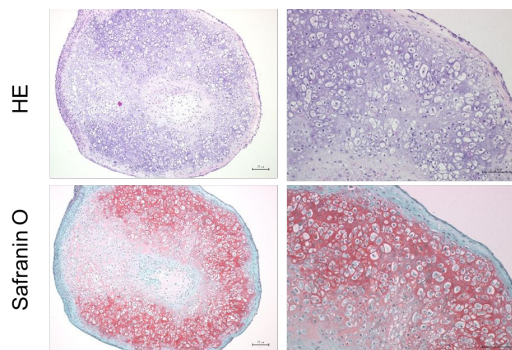


図 5. iPS 細胞から分化した軟骨細胞

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 2 件)

(1) 生体由来気管スキャフォールドと iPS 細胞を用いた気管再生の試み. 周啓亮、叶許緑、松本吉史、森山雅人、味岡洋一、西條康夫. 第 15 回日本再生医療学会総会. 2016 大阪.

(2) Regeneration of rat trachea using decellularized trachea scaffold and mouse ips cells for in vivo application. Qiliang Zhou, Xulu Ye, Akihiko Kitahara, Yoshifumi Matsumoto, Masato Moriyama, Yoichi Ajioka, and Yasuo Saijo. International Society for Stem Cell Research. 2017 Boston.

〔図書〕(計 1 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

周 ケイリョウ (ZHOU Qiliang)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：10770232

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()