

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32644  
研究種目：若手研究  
研究期間：2018～2019  
課題番号：18K16430  
研究課題名(和文) 骨格筋間質由来多能性幹細胞とスキヤフォールドを用いたハイブリッド肺組織移植  
  
研究課題名(英文) Hybrid lung tissue transplantation using skeletal muscle stroma-derived pluripotent stem cells and scaffolds  
  
研究代表者  
大岩 加奈 (OIWA, Kana)  
  
東海大学・医学部・助教  
  
研究者番号：30548045  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性進行性肺疾患に対する肺の再生医療の一つとして、肺組織移植の実現が期待されている。移植片が生着するまでの変化を詳細に検討した。マウス気管並走移植モデルでヘモグロビン小胞体を投与し、気管上皮下の血流を観察した。尾静脈からヘモグロビン小胞体溶液(Hb濃度10 g/dL) 0.3mlを投与した後、3、6、12、24時間で犠牲死させ、気管を切り出しHE染色して気管断面を観察した。術後、3時間後までにヘモグロビン小胞体と考えられる微粒子を上皮下血管内に認めるようになり、再灌流を確認した。電子顕微鏡による観察で微粒子がヘモグロビン小胞体であることを確認した。6時間経過すると赤血球の再灌流が観察出来た。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

人工多機能幹細胞(iPS細胞)、或いは胚性幹細胞(ES細胞)を分化誘導させることにより、将来、肺を含む様々な組織、臓器の再生が可能となることが期待されている。in vitroで幹細胞を分化誘導させた後は、組織や細胞を各臓器に移植して生着させる必要がある。本研究により、生着率の高い肺組織移植法を確立できることが期待される。移植片中の細胞の詳しい動態が明らかになり、肺組織移植に関する基礎データの蓄積に貢献するであろう。将来、臨床応用につながる可能性もあり、肺移植以外の従来の方法では治療が困難であった慢性進行性肺疾患の新しい治療法に発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The realization of lung tissue transplantation is expected as one of the lung regenerative medicines for chronic progressive lung disease. The changes in graft were examined in detail. Hemoglobin vesicle was intravenously administered in a mouse tracheal parallel transplantation model, and the blood flow under the tracheal epithelium was observed. 0.3 ml of hemoglobin vesicle solution (Hb concentration: 10 g/dL) was administered via the tail vein, and then sacrificed at 3, 6, 12, and 24 hours, the trachea was cut out, and HE staining was performed to observe the tracheal cross section. Fine particles considered to be hemoglobin vesicles became visible in the subepithelial blood vessels by 3 hours after the operation, and reperfusion was confirmed. It was confirmed by observation with an electron microscope that the fine particles were hemoglobin vesicles. After 6 hours, reperfusion of red blood cells could be observed.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：再生医療 肺組織移植 組織再灌流

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

肺気腫や特発性肺線維症など、慢性進行性で正常肺組織が不可逆的に破壊される肺疾患に対する根治的治療は、現在では肺移植に限られている。しかしながら、解剖学的特徴による易感染性や高い抗原性のため、他臓器の移植と比較して成績は良くない。その上ドナーは不足している。新しい治療法の1つとして肺の再生医療が期待されるが、その研究は他臓器と比較して遅れている。肺は 気管上皮 肺胞上皮 血管内皮など多岐にわたる細胞を有し分化誘導が困難なこと、

様々な成長因子が関与している可能性があり調整が困難なこと、肺胞の構造は細胞外器質が乏しく移植片の生着が困難なことなどにより再生が難しい。

傷害された肺組織の再生手段として、傷害された肺に正常な肺組織を移植する肺組織移植は、有効な手段であると考えられる。ドナーの肺組織がレシピエントの肺に生着し、機能するのである。ラットを用いた胎仔肺組織移植の作製実験は本邦から報告があり (Kenzaki, Cardiothorac Transplant. 2006) 胎仔肺の生着が確認されているが、成果は限定的である。外科的に胸膜を切開して肺内に肺組織を埋め込む方法では、出血し、空気もれが生じるので、胸膜を縫合閉鎖してそれを防がなければならない。移植できる組織量はごくわずかである。細切した組織や細胞を培養液などに混ぜて肺実質に注入する方法では、その多くは気道を通じて肺外に排出されてしまうことが、予備実験により分かっている。そこで、研究代表者らは体外ではゾル状で肺実質内に注入するとゲル化する、生体適合性物質が組織移植に有用であることを見出した。組織や細胞を混じて肺内に注入することによって、気道から移植片が排出されてしまうことを防ぎ、ゲルが胸膜の欠損部を閉鎖するため、胸膜を修復する必要がない。レシピエント肺の複数力所に多くの移植片を注入することが可能である。細胞外基質の乏しい肺においてゲル化物質が scaffold(足場)となり、生着率の上昇も期待出来る。

一方、研究代表者らの本研究グループではマウス或いはヒトの骨格筋、血管、神経細胞への分化が可能な2種類の骨格筋間質由来の幹細胞 (Sk-34 細胞; skeletal muscle-derived CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cells, Sk-DN 細胞: skeletal muscle-derived CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> cells) を同定し、これらの骨格筋間質由来多能性幹細胞 (Sk-MSC; skeletal muscle-derived multipotent stem cell) と総称して、組織・臓器再生実験を行ってきた。本細胞群が中胚葉由来の骨格筋系 (筋芽細胞)、血管系 (血管内皮細胞、周皮細胞、血管平滑筋)、さらに外胚葉由来の神経系 (シュワン細胞、神経周膜) への細胞分化して、筋・神経・血管をユニットとして再構築する能力を有することを見出し、骨格筋・腱の再生のみならず、傷害された神経や尿管などの他組織や臓器の再生や修復に有用であることを報告した (Nakajima, Transplantation. 2017; Tamaki, PloS One. 2016)。呼吸器外科領域では吸収性ポリグリコール酸 (PGA) フェルトのハイブリッド移植を用いて、移植細胞群を定着させることが極めて困難な気管欠損部や気管支断端に神経・血管を3次元的に再構築させて修復することに世界で初めて成功した (Nakazato, J Regen Med 2015)。PGA フェルトが移植細胞の拡散防止に有効だったのである。

肺組織を細片化したPGAとフィブリンのりなどのゲル化物質を混じて肺内に注入することで、気道から移植片が排出されてしまうことを防ぎ、ゲルが胸膜の欠損部を閉鎖するため、胸膜を修復する必要がなくなる。レシピエント肺の複数力所に多くの移植片を注入することも可能である。細胞外基質の乏しい肺において scaffold(足場) が形成され、生着率の上昇も期待出来る。

## 2. 研究の目的

最終目的は細片化した吸収性ポリグリコール酸 (PGA) と種々の生体適合性ゲル化物質を scaffold(足場) として使い、肺組織を骨格筋間質由来多能性幹細胞 (Sk-MSC) とともに肺内に注入

し、生着率の高い肺組織移植の技術を確立することである。本研究期間では臓器移植後の虚血再灌流障害に注目した。虚血再灌流障害は、依然として術後臓器不全の重要な原因である。移植臓器の再灌流が始まるまでの温虚血時間を短くすることで、虚血再灌流障害を軽減できる可能性がある。ヘモグロビン小胞体 (HbV) は、濃縮ヘモグロビンを含むリポソームの形で人工酸素運搬体として開発された。HbV の粒子サイズは RBC よりも小さいため、虚血組織の微小循環の改善が期待される。

### 3 . 研究の方法

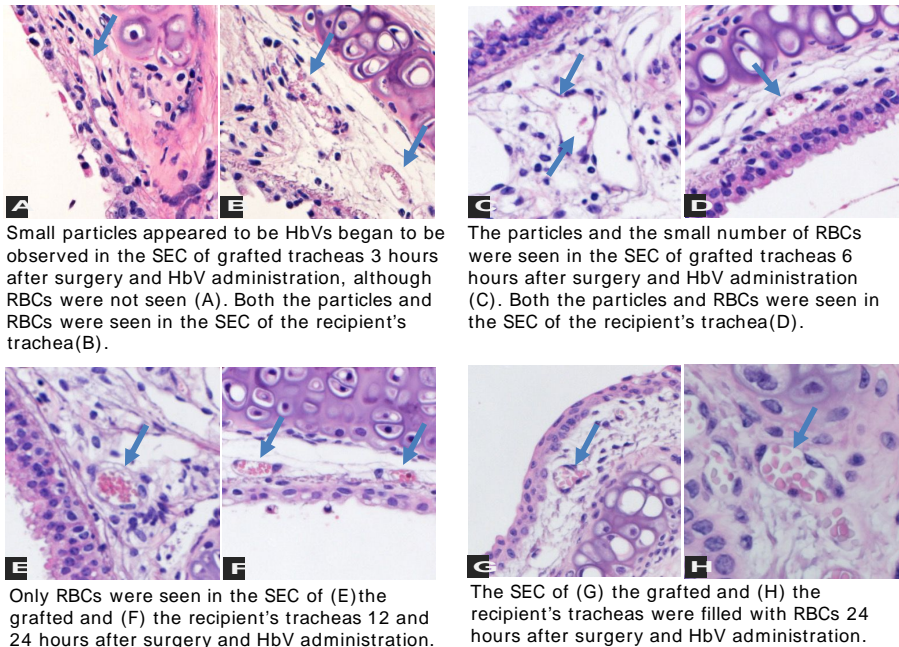
移植片が生着するまでの変化を詳細に検討した。マウス気管並走移植モデルでヘモグロビン小胞体を投与し、気管上皮下の血流を観察した。近交系、6週齢のオスのC57BL6Jマウスをドナーおよびレシピエントとして使用した。ドナーの輪状軟骨下から分岐部までの気管を摘出し、手術用顕微鏡下で、ドナーの気管グラフトをレシピエントの気管の遠位側と近位側に2カ所で端側吻合した。尾静脈からヘモグロビン小胞体溶液 (Hb濃度 10 g/dL) 0.3ml を投与した後、3、6、12、24時間で犠牲死させ、気管を切り出しHE染色して気管断面を観察した。

### 4 . 研究成果

光学顕微鏡による観察で、3 時間後までにヘモグロビン小胞体と考えられる微粒子を移植気管の気管上皮下血管内に認めるようになり、再灌流を確認した。この時、赤血球の灌流は認められなかった。一方、ヘモグロビン小胞体と赤血球の両方がレシピエント気管の上皮下血管内で確認された。ヘモグロビン小胞体と少数の赤血球を、手術と HbV 投与の 6 時間後に移植された気管の上皮下血管内に

確認した。ヘモグロビン小胞体と赤血球の両方がレシピエント気管の上皮下血管内で確認された。手術および HbV 投与の 12 時間後および 24 時間後の移植された気管の上皮下血管内では赤血球のみが観察された。24 時間後では赤血球で満たされていた。

#### Optical microscopic images of grafted tracheas



電子顕微鏡による観察では、ヘモグロビン小胞体粒子が、移植された気管の上皮下血管内で確認できた。粒子サイズは約 200 nm であった。移植後の 3 時間の時点では、HbV 粒子のみが確認された。6 時間では、ヘモグロビン小胞体粒子と赤血球の両方が認められた。

粒径が小さい HbV は、再吻合された血管をより早く流れると考えられ、その結果、虚血組織の酸素化を改善し、移植臓器の生存率を高める可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>小野沢博登、橋本 諒、大岩加奈、中川知己、河野光智、増田良太、渡辺真純、堀之内宏久、酒井宏水、小林紘一、岩崎正之 |
| 2. 発表標題<br>マウス気管移植後の上皮下血管の再灌流とヘモグロビン小胞体投与について                       |
| 3. 学会等名<br>第35回日本肺および心肺移植研究会  |
| 4. 発表年<br>2018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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|