

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03720

研究課題名(和文) 小児気道狭窄に対する胚性幹細胞由来軟骨を用いた新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel embryonic stem cell-based cartilage for pediatric airway stenosis

研究代表者

淵本 康史 (FUCHIMOTO, Yasushi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師(非常勤)

研究者番号：40219077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：免疫不全マウスへの移植にてヒトES細胞から15x15mm大の軟骨組織の作成に成功した。腫瘍化、感染性の安全評価については問題なかった。
ヒトES由来軟骨組織の気管としての機能性評価では、ヌードラット気管へのパッチ移植では、3か月でラット軟骨とヒトES由来軟骨の再生癒合がみられた。ウサギでは気管が脆弱、手技上の問題にて呼吸不全で亡くなった。ブタ気管へのパッチ移植では、1か月で全ブタは呼吸障害を認めなかったが、無処置では拒絶で軟骨は消失、免疫不全ブタでは内腔は狭窄し、拒絶による著名な単核球浸潤ならびに肉芽組織の肥厚。高圧脱細胞ヒトES由来軟骨では、拒絶は と比較すると軽度であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性声門下狭窄症や先天性気管狭窄症、ならびに長期気管切開後に生じる小児気道狭窄患児の治療は難渋することが多い。
本研究では気道狭窄の患児ならびに気管孔閉鎖困難な患児に対してES細胞を細胞ソースとする軟骨パッチグラフトにより気道内腔を拡げることにより挿管管理・気管切開からの離脱を期待している。本研究の成果から乳幼児の気管径に応用可能なヒトES由来軟骨を作成することができた。また同種免疫原性の問題があるが、気管壁の機能を持ち得ることが示された。更に再生軟骨同士の癒合もみられ狭窄予防ならびに患児の成長に伴う気管の成長も期待できる可能性も示された。

研究成果の概要(英文)：Successfully generated 15x15mm size cartilage tissue from human ES cells by transplantation into immunocompromised mice. There were no problems in safety evaluation of tumorigenicity and infectivity.
In the evaluation of the functionality of human ES-derived cartilage tissue as trachea, patch transplantation into nude rat trachea showed regenerative fusion of rat cartilage and human ES-derived cartilage in 3 months. In rabbits, the trachea was fragile and died of respiratory failure due to procedural problems. In the case of patch transplantation into pig trachea, all pigs did not show respiratory failure at 1 month, but 1) cartilage was lost due to rejection in untreated pigs, 2) the lumen was narrowed in immunocompromised pigs, and prominent mononuclear cell infiltration and thickening of granulation tissue were observed due to rejection, and 3) In high-pressure decellularized human ES-derived cartilage, rejection was mild compared to 2).

研究分野：小児外科、小児呼吸器外科、再生医療

キーワード：先天性声門下狭窄症 先天性気管狭窄症 ES細胞 軟骨組織 医療的ケア児

1. 研究開始当初の背景

先天性気道狭窄や長期気管切開は患者の生活の質（QOL）を著しく低下させ、社会活動への参加を阻む。近年、周産期管理の進歩により、これらの医療的ケア児が増加しており、社会福祉の重要な課題である。

現在までは自家肋軟骨移植や Partial cricotracheal resection (PTCRS) が行われてきたが、肋軟骨採取の煩雑さや再狭窄、PTCRS では縫合不全などのリスクがある。また非吸収性材料による気道再建では患児の成長に伴う気管の成長が得られない。

2. 研究の目的

これらの先天性気道狭窄患児や医療ケア患児の治療を迅速に行うためにセルバンクを構築し、品質のばらつきを抑えた ES 細胞株を細胞ソースとしてヒト ES 細胞由来軟骨を作成する。ヒト ES 細胞由来軟骨を気道狭窄部にパッチ移植して気道内腔を広げることにより挿管管理・気管切開管理から離脱できる可能性を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ES 細胞 (SEES2) からの胚葉体を分化誘導し、分化細胞の剥離を行った後に NOG マウスの背部に移植し約 1 か月にて ES 由来軟骨板を形成する。

(2) ノードラットへのパッチ移植

ノードラットの気管に顕微鏡下でヒト ES 由来軟骨をパッチ移植する (図 1)。

移植後 1 か月、3 か月にサンプリングを行い病理組織学的検討を行う。



図 1. ES 由来軟骨のパッチ移植

(3) ブタ気管へのパッチ移植

①無処置ブタ

②免疫不全ブタ (脾臓・胸腺摘出+FK-506, MMF)

③高圧脱細胞化ヒト ES 由来軟骨を無処置ブタの気管にパッチ移植

以上の 3 グループに分けて 1 か月でサンプリングを行い気管支鏡ならびに病理所見を検討

4. 研究成果

(1) 最大で 20x15mm 大のヒト ES 由来軟骨を作成し、病理でも軟骨であることを確認した (未発表データ、図 2)。

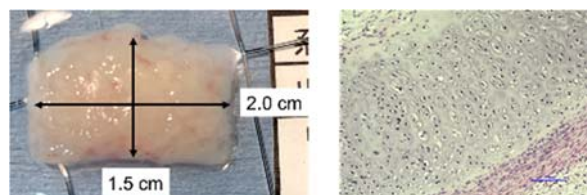


図 2. ヒト ES 細胞由来軟骨

(2) ノードラットへのパッチ移植

ヒト ES 由来再生軟骨の気管切開孔へのパッチ移植では、3 か月ではラット気管軟骨と再生軟骨が線維性組織ではなく軟骨同士で癒合していることが確認できた（未発表データ、図 3）。

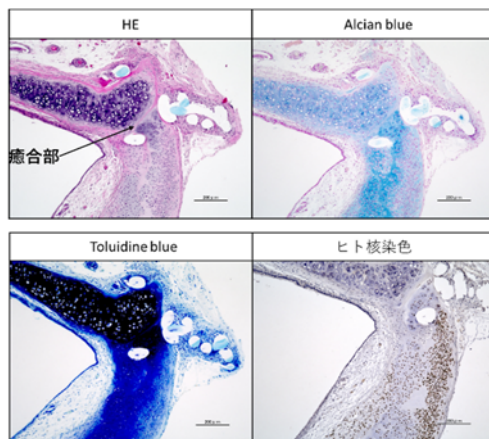


図 3. ノードラットへのパッチ移植

(3) ブタ気管へのパッチグラフト

全ブタは呼吸症状もなく 1 か月でサンプリング

- ①無処置：完全に拒絶されて焼野原状態の肥厚した肉芽
- ②OIDP：まさに拒絶されてわずかに軟骨が残っているものの非常に肥厚した肉芽となっている（未発表データ、図 4）。
- ③脱細胞化：拒絶が起こってはいるものの②に比較して軽度で軟骨も残存している。

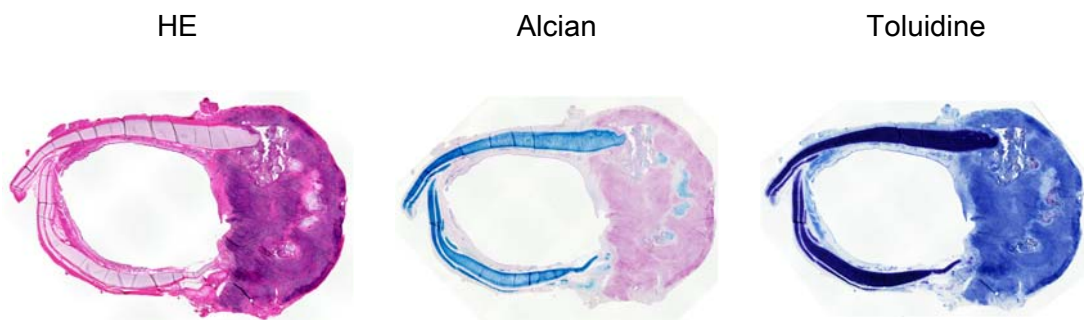


図 4. ブタ気管へのパッチグラフト

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ohno M, Fuchimoto Y, Higuchi M, Yamaoka T, Komura M, Umezawa A, Hsu HC, Enosawa S, Kuroda T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Long-term observation of airway reconstruction using decellularized tracheal allografts in micro-miniature pigs at growing stage.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 64 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-017-4138-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 川見明央, 淵本康史	4. 巻 28
2. 論文標題 小児気管疾患の再生治療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organ Biology	6. 最初と最後の頁 52-58
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 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 Fujino A, Fuchimoto Y, Baba Y, Isogawa N, Iwata T, Arai K, Abe M, Kanai N, Takagi R, Maeda M, Umezawa A.	4. 巻 13
2. 論文標題 First-in-human autologous oral mucosal epithelial sheet transplantation to prevent anastomotic re-stenosis in congenital esophageal atresia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-022-02710-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fujino A, Fuchimoto Y, Mori T, Kano M, Yamada Y, Ohno M, Baba Y, Isogawa N, Arai K, Yoshioka T, Abe M, Kanai N, Takagi R, Maeda M, Umezawa A.	4. 巻 14
2. 論文標題 Evaluation of safety and efficacy of autologous oral mucosa-derived epithelial cell sheet transplantation for prevention of anastomotic restenosis in congenital esophageal atresia and congenital esophageal stenosis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-023-03321-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 淵本 康史、絵野沢 伸、伊藤 怜、 陳 俊龍、古村 眞、黒田 達夫、梅澤 明弘
2. 発表標題 ヒト胚性幹細胞（ES細胞）由来軟骨を用いた小児気道狭窄に対する新規治療法の開発
3. 学会等名 第37回日本小児外科学会秋季シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 淵本康史、絵野澤 伸、梅澤明弘
2. 発表標題 小児気道狭窄に対する胚性幹細胞由来軟骨を用いた新規治療法の開発
3. 学会等名 第120回日本外科学会WS17
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasushi Fuchimoto, Shin Enosawa, Rei Itoh, Shoryu Chin, Makoto Komura, Akihiro Fujino, Katsuhiko Arai, Nobutaka Isogawa, Makoto Abe, Masanori Maeda, Ryo Takagi, Nobuo Kanai, Tatsuo Kuroda, Akihiro Umezawa
2. 発表標題 Regenerative medicine using human embryonic stem (ES) cell-derived tissue for pediatric surgical diseases
3. 学会等名 第122回日本外科学会WS
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	黒田 達夫 (KURODA Tatsuo) (60170130)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授 (32612)	

6. 研究組織（つづき）

	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	梅澤 明弘 (UMEZAWA Akihiro) (70213486)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・再生医療センター・再生医療センター長 (82612)	

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