

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18803

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞を用いた気管軟骨再生のための基盤技術開発

研究課題名（英文）tracheal cartilage regeneration using human iPS cells

研究代表者

樋渡 直（Hiwatashi, Nao）

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：10808778

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒトiPS細胞から神経堤細胞(NCC)を介して間葉系幹細胞(MSC)へと分化させたものを、免疫不全ラットの甲状軟骨欠損部に移植した。移植後、一カ月後と二か月後に甲状軟骨を採取し、移植部に移植細胞と再生硝子軟骨組織を認めることをHE染色と免疫組織化学で確認した。本研究結果は、上気道臓器における革新的な軟骨組織再生技術の確立へとつながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上気道臓器の軟骨は、気道の枠組みとして重要な働きを担う。そのため、上気道の軟骨に大きな欠損が生じた場合には、他臓器より採取した組織や、合成材料を用いた枠組みの再建が必要となる。しかしながら前者では患者の負担が大きく、後者においても確立されたものはなかった。本研究の結果は、上気道臓器の軟骨再建はもとより、他臓器における軟骨組織再生にも応用が可能であり、革新的な治療法開発へとつながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, mesenchymal stem cells (MSC) differentiated from human iPS cells via neural crest cells (NCC) were transplanted into the thyroid cartilage of immunodeficient rats. Thyroid cartilages were collected one month and two months after the transplantation, and the survival of the transplanted cells and regenerated hyaline cartilage tissues were observed at the transplanted site. These results will contribute to the establishment of innovative cartilage tissue regeneration technologies in upper airway organs.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：軟骨 再生 iPS細胞 喉頭 気管

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

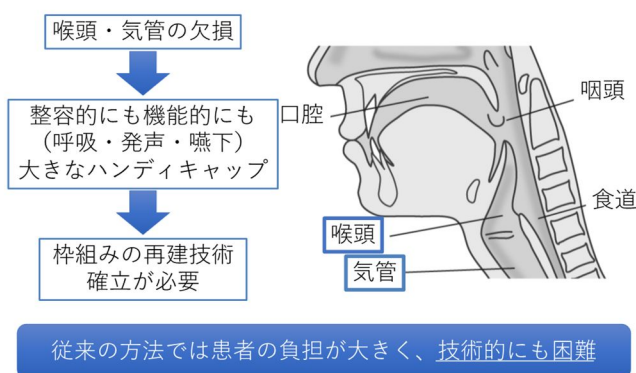
### 1. 研究開始当初の背景

喉頭・気管は呼吸の他、発声、嚥下に関わり、生命維持のみならずヒトが社会生活を送る上で非常に重要な臓器といえる。しかしながら、外傷により喉頭・気管に欠損が生じたり、悪性腫瘍や炎症性疾患などで切除を余儀なくされたりすることがあり、その場合、患者は整容的にも機能的にも大きなハンディキャップを負うこととなる。

従来これらの喉頭・気管欠損の再建には自己組織が用いられてきた。すなわち、小さな欠損に対しては皮膚を用いた局所皮弁再建が、大きな欠損では肋軟骨、耳介軟骨や鼻中隔軟骨を用いた硬性再建が行われてきた。大きな欠損の場合には、皮膚などの軟組織では気道としての枠組みを維持することが困難となるため硬性再建が必要となるが、この場合他部位からの組織片の採取が必要となり、複数部位に複数回の外科的処置が必要となる。更に、採取した組織片は適切な形状や強度を有するわけではないため、時として再建に難渋し、欠損部位が閉鎖できず残存することもあった。

そのため、これまで世界中で合成材料を足場とした気管再建が試みられてきたが、その多くは非吸収性素材であり成長過程の小児には用いることができないという限界があった。また、吸収性素材を用いたもので臨床応用に至っているものはなく、種々の細胞を用いた細胞移植も安定した成績は示せていない。

近年、様々な疾患に対して iPS 細胞を用いた移植治療の効果が示され、臨床応用されるようになってきており、軟骨再生においてもその応用が期待されている。そこで、本研究では、ヒト iPS 細胞から分化させた細胞を喉頭・気管軟骨に移植することにより、安全かつ確実な生着が得られ、軟骨組織再生の基盤技術を開発できるかどうかについて検証したい。



### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト iPS 細胞を用いて喉頭・気管軟骨再生に関する基盤技術を確認し、気道の立体的枠組み構造再建技術開発の礎とすることである。この技術が確立されれば、将来的に3次元組織構造再現技術を応用し他の組織、細胞と組み合わせることにより、機能的かつ立体的な気道構造の再生につながる

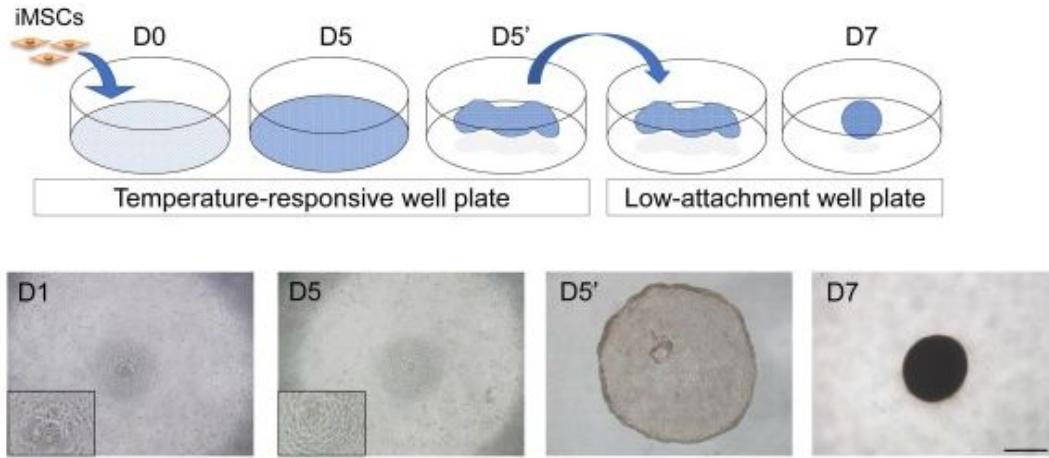
### 3. 研究の方法

#### 1. ヒト iPS 細胞から MSC への分化誘導

ヒト iPS 細胞を iMatrix-511 (Nippi, Tokyo, Japan)-coated cell culture plate に播種し、StemFit Basic03 に SB431542 (SB) と CHIR99021 (CHIR) を添加した培地を用いて、神経堤細胞 (Neural Crest Cell: NCC) を分化誘導した。NCC は p75 (CD271) に対する抗体を用いて Sorting し、回収した。

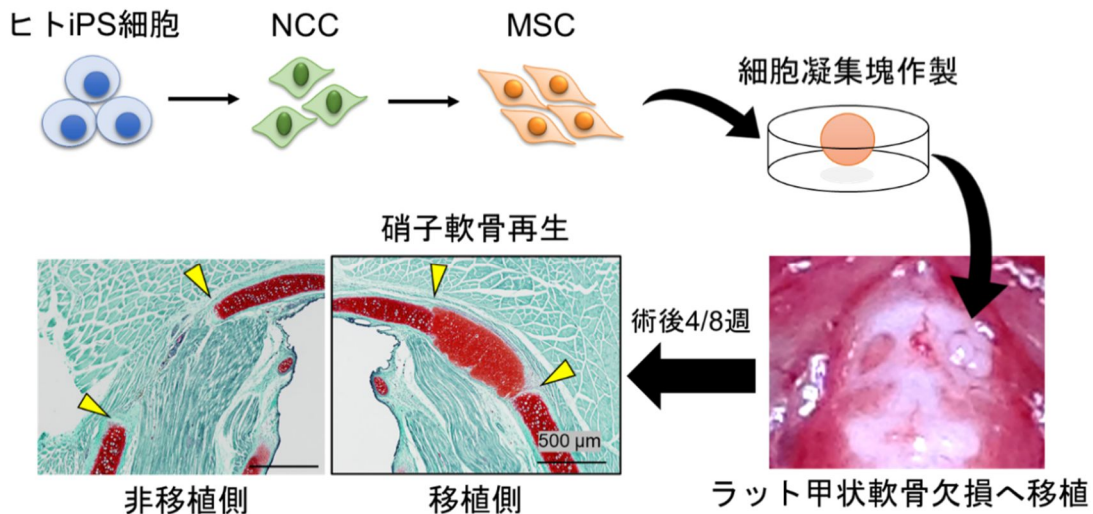
分離回収した NCC を Fibronectin-coated cell culture plate へ播種し、MSC medium で培養し、MSC へ分化させた。

温度感受性 plate 上に MSC を播種し、7日間培養した後にシート状に細胞を剥離し、球形の細胞集塊 (Sphere) を形成させた。



甲状軟骨欠損部モデルの作製およびヒト iPS 細胞由来 MSC の移植  
 免疫不全ラットの甲状軟骨に生検用パンチを用いて欠損（径 1mm）を作製した。  
 作製した欠損部位に で分化誘導した MSC の細胞塊を移植した。

移植後細胞生着確認および軟骨組織再生効果の検討  
 移植 4 週間後および 8 週間後に甲状軟骨を採取し、下記の評価を行った。  
 移植細胞の生着：抗ヒト核抗体を用いた免疫組織化学で確認した。  
 軟骨組織再生の有無：硝子軟骨組織再生効果を Alcian Blue 染色、サフラニン O 染色などで確認した

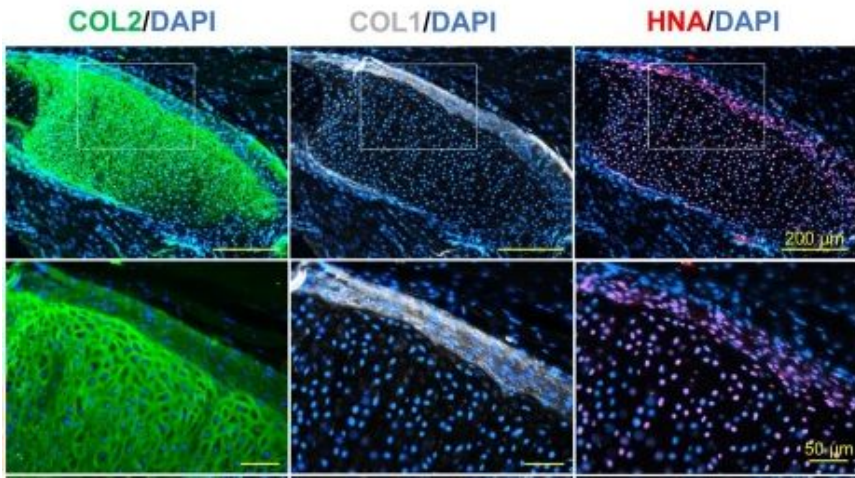


#### 4. 研究成果

移植した 14 匹全例で移植部位に一致してヒト核抗原陽性細胞を認め、移植細胞の良好な生着が確認された。

術後 4 週で 7 例中 5 例、8 週で 7 例中 5 例において HE 染色で正常軟骨に特徴的な小腔形成を示す軟骨様組織再生を認めた。軟骨様組織再生部位はサフラニン O 染色陽性、II 型コラーゲン抗体陽性を示した。

これらの結果は、移植したヒト iPS 細胞由来 MSC が軟骨細胞系統へ組織内で分化し、硝子軟骨再生に寄与した可能性を示唆している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masayoshi Yoshimatsu, Hiroe Ohnishi, Chengzhu Zhao, Yasuyuki Hayashi, Fumihiko Kuwata, Shinji Kaba, Hideaki Okuyama, Yoshitaka Kawai, Nao Hiwatashi, Yo Kishimoto, Tatsunori Sakamoto, Makoto Ikeya, Koichi Omori	4. 巻 52
2. 論文標題 In vivo regeneration of rat laryngeal cartilage with mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells via neural crest cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2021.102233.	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------