

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591818

研究課題名（和文） 自己組織を利用した欠損組織修復と血流回復を目指した新規新生児外科治療戦略

研究課題名（英文） New therapeutic strategy of pediatric surgical treatment for repair of tissue deficits and revascularization using autologous tissue grafting

研究代表者

久保田 俊郎（KUBOTA TOSHIRO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50126223

研究成果の概要（和文）：

臍帯血より分離培養した血管内皮前駆細胞と臍帯ワルトンゼリーより採取した間葉系幹細胞を使用し、フォトリソグラフィーの技術を用いて、羊膜上で毛細血管網を作成した。作成した毛細血管付き羊膜シートをマウスの下肢虚血部位に移植したところ、血流の改善を認めた。この生体外で作成した毛細血管付き羊膜シートはすべて胎児にとって自己由来成分であり、新生児外科治療に有用な可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We established amnion sheets with capillary network by use of lithographic technique using outgrowth endothelial progenitor cells from umbilical cord blood and mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in umbilical cord. Implantation of the amnion sheet with capillary network into the ischemic hind limbs of mice increased reperfusion compared with controls. Implantation of a capillary network engineered ex vivo from autologous cells may have therapeutic potential for the treatment of pediatric surgery.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、産婦人科学

キーワード：産科学、再生医療

1. 研究開始当初の背景

周産期・新生児医療の進歩により新生児死亡率が漸減する中、原因別では先天奇形による新生児死亡の割合が増加している。新生児奇形に対する手術療法において、腹壁破裂や臍帯ヘルニアなど欠損組織が大きい場合に

は、人工材料による修復が必要であるが、異物に対する炎症反応や血流不全による組織虚血による合併症は未だ解決出来ていない問題である。近年の再生医療分野における飛躍的な進展により、虚血組織に対する再生治療は高齢者の心血管障害で実際に臨床応用

されているが、出世前診断で発見された先天性疾患に対する新生児外科治療時に利用できる自己生体材料の開発についての検討はあまりなされていないのが現状である。

2. 研究の目的

我々はこれまでにウシ血管内皮細胞を用いた生体外での血管網作成について研究を積み重ね、毛細血管を生体外にて作成することに成功しているが、この技術を先天性奇形疾患の手術における欠損組織の修復と、切離縫合により血流が遮断された虚血組織の血流回復に応用しようというのがこの研究の目的である。すなわち、人工材料に起因する手術合併症の減少のため、新生児にとって自己組織である羊膜と自己血である臍帯血より採取した血管内皮前駆細胞を利用した自己生体材料の開発を目的として基礎的な検討を行うことが本研究の主眼である。

3. 研究の方法

(1) ヒト臍帯血由来血管内皮前駆細胞 (Outgrowth endothelial progenitor cells: OEC) と胎盤付属物由来間葉系幹細胞の効率的な分離と増幅方法の検討：臍帯血は本学大学病院にて分娩を行った患者のうち、文書にて本人の承諾が得られた患者の胎盤娩出後の臍帯より採取した。得られた臍帯血より単核球を分離し、播種細胞密度、表面抗原による分離、培地の種類/添加因子、細胞凍結の有無について比較検討を行い、より高率に OEC を採取できる条件を探索した。また、壁細胞として胎盤付属物由来間葉系幹細胞を使用することとし、臍帯ワルトンゼリーと羊膜から、酵素法、アウトグロース法を用いて、間葉系幹細胞を採取する方法を検討した。それぞれ単離した OEC と間葉系幹細胞はフローサイトメトリー解析と免疫染色を行った。

(2) 毛細血管付き羊膜シートの作成：我々は移植に耐えうる、より強固で安定した毛細血管を得るため、胎盤付属物から分離培養した間葉系幹細胞と血管内皮前駆細胞の共培養を行い、血管内皮細胞の外周に壁細胞として間葉系幹細胞を付着させた形の血管網を作成した。まず、親水・疎水性パターンのみで制御したガラス基板上で毛細血管パターンを形成し、パターン化された細胞を細胞外マトリクスである羊膜とマトリゲルに転写した。転写した細胞はインキュベーションの後、羊膜またはマトリゲル上での管腔形成の有無を、位相差顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡にて確認した。間葉系幹細胞が壁細胞と同じ性質を示しているかについての確認は、胎盤付属物由来間葉系幹細胞のかわりに市販ヒトペリサイトを用いてコントロール実験を行った。

(3) 創傷モデルマウスに対する毛細血管網付き羊膜シートの移植と治療評価：まず欠損組織モデルマウスとして皮膚欠損マウスの作成を試みたが、安定した欠損部位の作成に至らなかったため、血流回復を確認するためのモデルとして下肢虚血モデルマウスへモデル変更を行った。ここに羊膜シートのみ、壁細胞を欠いた毛細血管付き羊膜シート、壁細胞付きの毛細血管が付着した羊膜シートの三種類を移植し、それぞれの下肢の血流回復についてカラードプラー法にて評価した。また、移植を行った下肢については病理学的評価を行った。

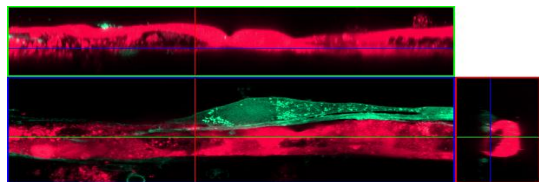
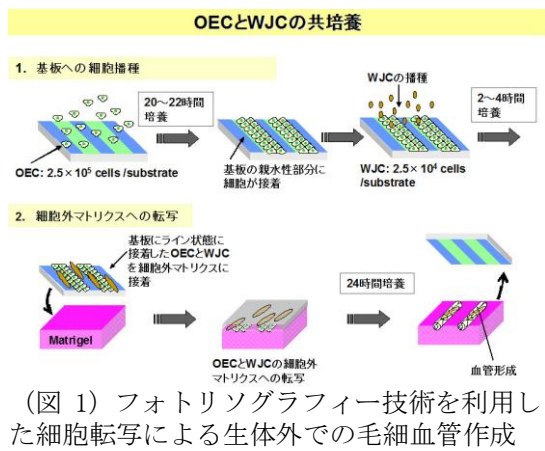
4. 研究成果

(1) ①OEC の効率的な採取法：培養皿はフィブロネクチンコート 6 well プレートを使用し、培地交換は 2-3 日に 1 回行った。まず播種細胞密度と分画分離の必要性について検討を行ったところ、CD45 陰性単核球を播種した時の 1 well あたりのコロニー形成率 (OEC-Colony Forming Rate: OEC-CFR) は $0.250 \text{ colony}/5 \times 10^7 \text{ cells}$ であり、播種細胞密度に比例していた。一方、総単核球を播種した時の OEC-CFR は $0.347 \text{ colony}/5 \times 10^7 \text{ cells}$ であった。この結果により、OEC が含まれていることが知られている CD45 陰性単核球の分離が必ずしも必要ではないことが判明した ($p = 0.8095$)。次に培地について検討を行ったところ、内皮基礎培地に Microvascular endothelial growth medium (EGM-2-MV) supplements を添加することにより、EGM-2 (Endothelial growth medium) supplement を添加した時と比較して有意に OEC-CFR の増加を認めたと ($p = 0.0018$)。さらに、総単核球分画を分離後、凍結保存した後、解凍し OEC の培養を試みたが、OEC-CFR は新鮮細胞からの採取率より低値ではあったものの、各サンプルから 1 つ以上のコロニーを得ることができた。得られた OEC についてフローサイトメトリー解析と免疫染色を行ったところ、CD31、CD34、CD73、CD146、CD144、および CD309 が陽性であった。

②胎盤付属物由来間葉系幹細胞の採取：臍帯ワルトンゼリーと羊膜より、アウトグロース法、酵素法を使用して、間葉系幹細胞を採取したが、経膈分娩時に採取した羊膜はコンタミネーションを起こしてしまう確率が高く、経膈・帝王切開いずれにしてもコンタミネーションを起こしにくい臍帯ワルトンゼリー由来の間葉系幹細胞を使用することが臨床応用に向けて有用であると考えられた。また、酵素法、アウトグロース法のいずれの方法でも細胞を得ることが出来るため、より操作が少なく、使用薬剤の少ないアウトグロース法のほうが、安全性が高いと判断し採用した。培地は 10%FBS 添加 α MEM を使用し、培地交

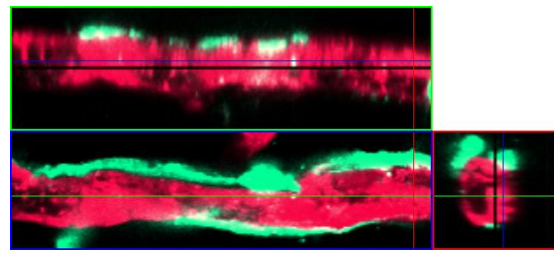
換は2-3日に1回行った。以上の方法にて採取したワルトンゼリー由来間葉系幹細胞 (Wharton's jelly derived mesenchymal stem cell: WJC) に対してフローサイトメトリ解析と免疫染色を行ったところ、CD34とCD146が陰性、CD73、CD44、NG2、CD90、CD325、NG2および α SMAが陽性を示した。また、分化誘導実験において、骨・軟骨・脂肪に分化することが確認された。

(2) 基板に細胞を播種し、細胞外マトリクス(羊膜・マトリゲル)に基板を接着させて細胞転写をおこなったところ(図1)、OECによって形成された管腔の周りにワルトンゼリー由来間葉系細胞が付着している像が確認された(図2)。



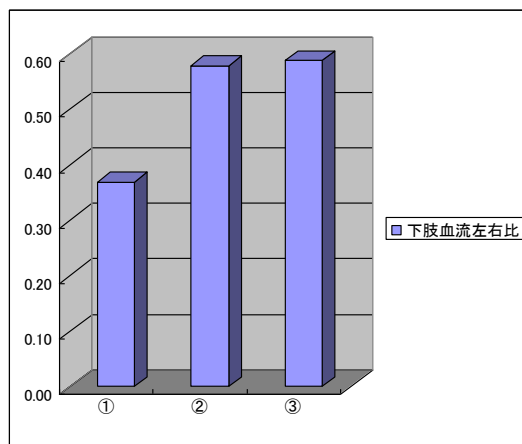
(図2) OECとワルトンゼリー由来間葉系幹細胞からなる毛細血管(赤: OEC 緑: ワルトンゼリー由来間葉系細胞)

また、図3に示すようにワルトンゼリー由来間葉系幹細胞をヒトペリサイト置き換えて行った実験においてもワルトンゼリー由来間葉系幹細胞と同様の構造を示し、OECによって形成された管腔の周りにワルトンゼリー由来間葉系幹細胞が付着している像が認められた。



(図3) OECとヒトペリサイトからなる毛細血管(赤: OEC 緑: ヒトペリサイト)

(3) 下肢虚血マウスへ、①羊膜シートのみ ②OECのみで形成された血管網付き羊膜シート ③OECとワルトンゼリー由来間葉系幹細胞で形成された血管網付き羊膜シートの三種類の移植を行った結果、①と比較して②③で虚血下肢の血流が回復する傾向が認められた(図4)。



(図4) 移植後14日目の虚血下肢(左側)と虚血下肢に移植を行った下肢(右側)の血流比の比較

病理学的な検討においては、移植した血管網と既存の血管の結合部位を認めるに至らなかった。

以上の結果により、臍帯血と臍帯由来の二種類の細胞より、安定した毛細血管を得ることができ、なおかつ、羊膜をスキャホールドして使用するという、すべて新生児にとって自己細胞・組織を用いた移植用毛細血管シートを作成することができた。これは、新生児外科治療に有用な可能性があると考えられる。今回の研究においては、虚血組織の血流回復の確認のみにとどまっているが、現在、組織の多層化において問題となっている組織内虚血と組織内血管導入に対して本手法が利用できる可能性があり、今後、他組織との同時移植による3D組織再生について検討していきたい。

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1件)

1. Noriko Oshima-Sudo, Qin Li, Yuko Hoshino, Ken-ichi Nakahama, Toshiro Kubota, Ikuo Morita: Optimized method for culturing outgrowth endothelial progenitor cells. Inflammation and Regeneration. 31:219-227, 2011 査読有り
http://www.jsir.gr.jp/journal/Vol31No2/pdf/12_01_219.pdf

[学会発表] (計9件)

1. Oshima-Sudo N, Hoshino Y, Komaki M, Nakahama K, Kubota T, Abe M, Morita I. Optimized method for culturing outgrowth endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood. 17th International Vascular Biology Meeting, Wiesbaden, Germany, Jun 5, 2012

2. Oshima-Sudo N, Yoshida T, Hoshino Y, Komaki M, Nakahama K, Kubota T, Abe M, Morita I: Vascular regeneration using cell-printing system: The First Asia-Pacific Vascular Biology Meeting, Tokyo, Dec 10, 2011

3. 須藤乃里子、尾林聰、寺内公一、宮坂尚幸、久保田俊郎、森田育男: 臍帯血と臍帯由来細胞を利用した生体外における毛細血管の作成. 第63回日本産科婦人科学会学術講演会、大阪、2011.8.30

4. 須藤乃里子: 分娩廃棄物を利用した再生医療—臨床から基礎研究へ、そして臨床応用に向けて. 第63回日本産科婦人科学会学術講演会、大阪、2011.8.30

5. Oshima-Sudo N, Yoshida T, Hoshino Y, Komaki M, Nakahama K, Kubota T, Abe M, Morita I: Tissue engineered capillary vessels for regenerative medicine. The 9th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology, Busan, Korea, Aug 26, 2011

6. 須藤乃里子、尾林聰、寺内公一、久保田俊郎、森田育男: 血行再建ツールとしての毛細血管網の生体外での作成. 第25回日本更年期医学会、鹿児島、2010.10.3.

7. 須藤乃里子、吉田朋子、星野優子、小牧基浩、中浜健一、久保田俊郎、安部まゆみ、森田育男: 生体外で作成した血管網を用いた血管再生療法. 第31回日本炎症再生医学会、東京、2010.8.5.

8. Oshima-Sudo N, Yoshida T, Hoshino Y, Komaki M, Nakahama K, Kubota T, Abe M, Morita I. Tissue engineered capillary

vessels for regenerative medicine. 16th The International Vascular Biology Meeting, Los Angeles, USA, Jun 21, 2010.

9. 大島乃里子、尾林聰、寺内公一、若林晶、谷口義実、宮坂尚幸、久保田俊郎、森田育男: 臍帯血からの血管内皮前駆細胞採取法の確立および転写技術を応用した毛細血管の作成. 第62回日本産科婦人科学会学術講演会、東京、2010.4.24

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 俊郎 (KUBOTA TOSHIRO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 50126223

(2) 研究分担者

森田 育男 (IKUO MORITA)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 60100129

尾林 聰 (SATOSHI OBAYASHI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号: 10262180

須藤 乃里子 (NORIKO SUDO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 30611058

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: