

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K12784

研究課題名（和文）大型自己細胞パッチによる新規先天性横隔膜ヘルニア根治術の開発

研究課題名（英文）Development of a novel method for repairing congenital diaphragmatic hernia using large autologous cell patches

研究代表者

張 秀英 (ZHANG, Xiu-Ying)

九州大学・医学研究院・学術研究員

研究者番号：50914173

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、国の難病指定を受けている先天性横隔膜ヘルニアに対する横隔膜修復法として、臍帯由来間葉系幹細胞を用いた細胞パッチにより自己横隔膜を再生させる新たな治療法の開発を最終的な目的とし、発生学的視点から、再生医学的手法により横隔膜の構築のメカニズムを追究するものである。

本研究では、臍帯由来間葉系幹細胞（hUCMSC）の細胞移植療法への適用性を検討し、*in vitro*解析により幹細胞特性を評価した。hUCMSCは幹細胞マーカー陽性であり、多分化能を示した。さらに、hUCMSCを用いて三次元組織構造を作製した構造体に科学的刺激を与え、5週間の循環培養による適切な強度を得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天奇形を伴う難治性疾患をもつ患児では、遺伝性疾患ではない場合の治療法の確立は非常に困難である。先天性横隔膜ヘルニア（CDH）は、胎児期早期の横隔膜欠損に由来する先天奇形でありながら、原因遺伝子は特定されておらず、現状では根治的治療法がない。

今回の横隔膜再生療法の開発研究では、皮膚や臍帯、羊水から得られる細胞をソースとすることで先天奇形の根治治療を目指す事が可能となる。破棄されてきた貴重な生体試料を用いることで、再生医療製品の開発が可能となり、医療現場に新たな価値をもたらす研究となる。さらに、我々のパッチは人工的素材を使用せず細胞だけで作製されるため、独自性、創造性の高い研究と確信する。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to develop a new treatment for congenital diaphragmatic hernia that regenerates the autologous diaphragm using a cell patch made of fibroblasts. From an embryological perspective, we will elucidate the mechanism of diaphragm construction using a cell patch made with a bio 3D printer. In this study, we investigated the applicability of umbilical cord-derived mesenchymal cells (hUCMSCs) to cell transplantation therapy and evaluated their stem cell properties by *in vitro* analysis. hUCMSCs were positive for stem cell markers and showed multi-differentiation potential. Furthermore, we used them to create a three-dimensional tissue structure and developed a diaphragm regeneration therapy.

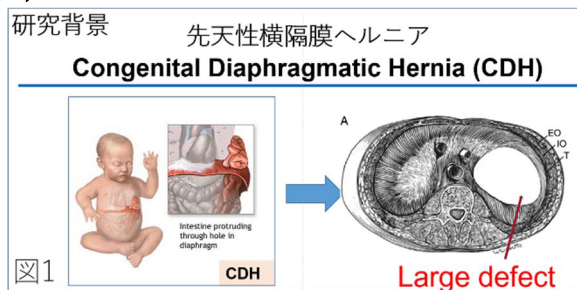
研究分野：生体医工学関連

キーワード：組織工学 バイオ3Dプリンター 臍帯由来間葉系幹細胞 先天性横隔膜ヘルニア 移植・再生医療  
横隔膜再生 人工臓器 羊水由来幹細胞

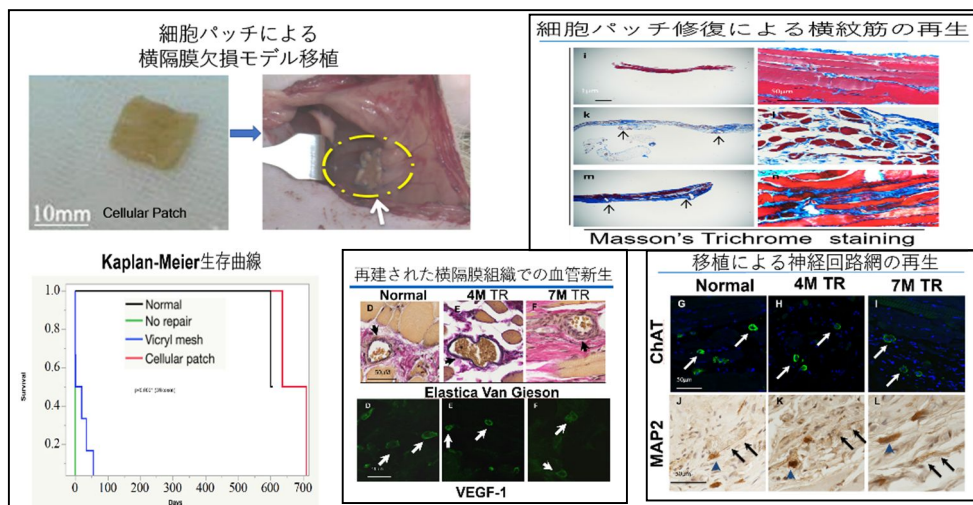
### 1. 研究開始当初の背景

先天性横隔膜ヘルニア (CDH) の発生頻度は 2,000~5,000 出生に対して 1 例で、国内の最新調査では年間発症数は約 200 例と報告されている。欠損孔が大きい症例に対しては人工布を用いて欠損孔閉鎖を行うが、人工布は収縮力がないことや体の成長に応じて大きくなるため、術後再発、胸郭変形、横隔膜の運動不良、胃食道逆流などの合併症が生じるため、人工布 (Gore-Tex) によらない新たな治療法が必要である。(図 1)

横隔膜は胎生期の発生において、まず PPFs (pleuroperitoneal folds) から線維芽細胞が遊走して支持組織となる膜を形成し、そこに筋芽細胞が侵入して筋肉組織を形成し、さらに血管や神経ネットワークが構築されることが近年報告された (Merrell AJ, et al., Nature genetics, 2015; Sefton EM, et al., Developmental biology, 2018)。そこで、我々はヒトの皮膚線維芽細胞 (少量血管内皮細胞を含む) を用いて細胞パッチをバイオ 3D プリンターで作製し、パッチをラットの横隔膜欠損部に移植することで、パッチに誘導されてラットの骨格筋組織および毛細血管、末梢神経が伸長して横隔膜が再生されることを確認し、このラットは長期 (710 日間) 生存することが可能であることを報告した (Zhang XY, et al., Biomaterials, 2018)。(図 2)



先天性横隔膜ヘルニアの横隔膜原基となる PPF には、間葉系細胞と筋衛星細胞が含まれる事は勿論、横隔神経も派生するため、単一細胞のみでは強度や機能の面で劣る事が想定される。そこで、横隔膜の先天性欠損を補填するためには、複数の幹細胞を採取し、組み合わせる事で欠損孔を閉鎖する方法が必要と考えた。母体の皮膚、羊水、臍帯などの母体からの周産期付属物に



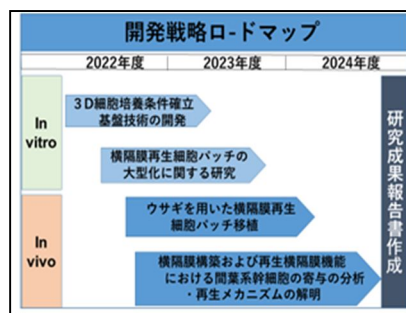
は、間葉系幹細胞 (MSC) などの幹細胞が大量に含まれる事が知られているが、児の疾患に対する細胞治療のソースとして用いられた事はない。近年の研究から、臍帯からは神経幹細胞や血管内皮細胞の採取が可能であり、羊水は間葉系幹細胞に富む事が知られている。我々の先行研究からは間葉系幹細胞の起源は筋衛星細胞と発生学的には同一である事を発見しており、横隔膜を再生する事が可能と考える。

### 2. 研究の目的

羊水や臍帯に多く含まれる胎児幹細胞は、免疫寛容に富み、増殖能力に優れ、高い治療能力を持つといわれている。先天奇形を伴う難治性疾患をもつ患児では、遺伝性疾患ではない場合の治療法の確立は非常に困難である。また、出生直後の患児から生体試料を採取することも倫理的に困難であるため、疾患原因の特定が困難である事が多く、疾患原因の探索的研究や新規治療法の開発も困難である事が多い。先天性横隔膜ヘルニア (CDH) は、胎児期早期の横隔膜欠損に由来する先天奇形でありながら、原因遺伝子は特定されておらず、現状では根治的治療法がない。今回の横隔膜再生では、皮膚や臍帯、羊水から得られる細胞をソースとすることで先天奇形の根治治療を目指す事が可能となる。破棄されてきた貴重な生体試料を用いることで、再生医療製品の開発が可能となり、医療現場に新たな価値をもたらす研究となる。さらに、我々のパッチは人工の素材を使用せず細胞だけで作製されるため、独自性、創造性の高い研究と確信する。

### 3. 研究の方法

先行研究で皮膚線維芽細胞より作製した細胞パッチにあらかじめ神経細胞を導入することで、横隔膜の構築における神経の寄与を、再生医学的手法により追究するとともに、CDH に対する細胞パッチを用いた再生医療の実現に向けて、パッチが体の成長に追従することができるかなど生体内での長期的挙動を検証する。その上では、新生児と同等の体格で、体が成長する中動物での検証が必要なため、パッチの大型化も追及する。(図3)

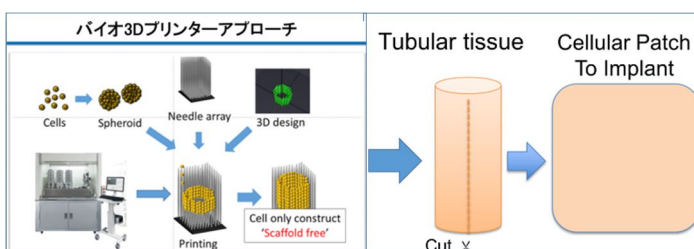


1) 母体の皮膚、臍帯、羊水の採取：母体の皮膚、臍帯、CDH 患者の羊水を採取し、研究室において各々の細胞を遊離する。

2) Scaffold free 細胞パッチの作成：現在用いている

細胞パッチ作製方法は、細胞 3 次元培養して、大量にスフェロイド(細胞凝集塊)を作製し、これをバイオ 3D プリンター用いて剣山状の支柱に固定して培養し、立体的細胞構造体を作る手法である。細胞パッチの作製は、まずチューブ状の細胞構造体を作製し、循環培養することで強度および組織的に成熟させ、最終的に支柱より取り出して、細胞のみで構築されたチューブ状の構造体を切り開いて、パッチ状にする方法である(図4)。現在 1.5x1.5cm のパッチを作製し、正常なラット横隔膜組織と同等の引張強度を持つパッチを作製できるに至っている。

Scaffold Free 細胞パッチの作製法



a) 基盤技術開発：上記方法でパッチサイズを大きくするには、剣山状の支柱を大型化する方法と細胞のみで構築された構造体同士を接続させる方法がある。本研究では、の最適な方法を確立する。すなわちでは最適な剣山の長さや形状を追及し、では最適な連結方法や連結に要する期間を検証する。いずれかあるいは両者を組み合わせることで 5cmx5cm の細胞パッチを作製することを目標とする。

b) 培養条件確立：検討項目として線維芽細胞と血管内皮細胞(+神経細胞)の混合比率、培地に加える成長因子や添加化合物、培養法：循環培養の方法や条件、強度を増すための伸展刺激、培養期間、などである。評価項目としては、生細胞数、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの産生量を定量し、ウサギ正常横隔膜組織と同等の引張強度を有する細胞パッチを作製することを目標とする。

3) ウサギを用いた横隔膜再生細胞パッチ移植：

- ・妊娠ウサギより飼育し、出産後新生ウサギより皮膚線維芽細胞を臍帯より血管内皮細胞を分離・採取し、培養する。神経細胞を用いる場合には、間葉系幹細胞から神経細胞を分化誘導して用いる。これらの細胞の入手が困難な場合には、ヒトの細胞を用いて実験を行い、術後は免疫抑制剤の投与を行う。

- ・ヒトの新生児と同等の約 2~3kg に成長したウサギを移植実験に用いる。CDH の 80% 以上は左側であるため、欠損孔を作製する横隔膜は左側とする。

- ・全身麻酔、人工呼吸管理下に開腹し、外科的切除によって横隔膜欠損孔を作製する。欠損孔をバイオ 3D プリンターで作製した細胞パッチを用いて修復する。この際、胸腔側は強度補強のため、手術用吸収性メッシュで補強する。対象群は臨床で用いられている GORE-TEX シートで修復した群とする。症例数は各群 6 羽とする。以下は評価項目：

- ・臨床評価項目：生存率、SpO2、体重。横隔膜の形態分析：再発や弛緩の有無を 1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、9 ヶ月、12 ヶ月時に CT を用いて行う(臨床では 1 年以内に再発をみることがあるため)。各群 6 ヶ月時に 3 羽、12 ヶ月時に 3 羽ずつ犠牲死。横隔膜修復部の形態分析(裂傷や弛緩の有無、成長に伴う組織の大きさ(面積の計測)の変化など)、横隔膜修復部の強度分析を行う。

- ・組織学的検討：各群 6 ヶ月時に 3 羽、12 ヶ月時に 3 羽ずつ犠牲死。横隔膜修復部の横紋筋・血管・神経の再生を組織学的に解析する。横隔膜構築における神経の寄与の分析：再生横隔膜の神経伝達、ティッシュオーガニスムによる電気生理学(EN)解析、筋電図解析する。癒着など副反応についても評価する。

4) 細胞パッチにおける横隔膜筋肉再生メカニズムの解明：

本研究において鍵を握る細胞は、PPF に存在する間葉系幹細胞である。間葉系幹細胞には 2 つの分子 PDGFR と VEGFR が存在し、これらの 2 つの分子の組み合わせにおいて、分化の方向性が決定されることが知られている。PDGFR 陽性、VEGFR2 陰性分画が筋肉細胞へ誘導されると言われているが、臍帯や羊水からも同様に分化されるのかを検証する。

横隔膜の原基となる PPF は、細胞膜に tcf4 陽性細胞を大量に含み、この細胞は PDGFR を細胞膜に発現している事がわかっている。tcf4 陽性細胞の活性化には Wnt、-catenin シグナル伝達が必要と言われているが、間葉系幹細胞と隣り合わせて存在する Pax7 陽性の筋衛星細胞

胞との間にどのような互換関係が存在するかはわからない。本研究では、次の 2 点に焦点をおいて間葉系幹細胞の機能解析を行う。

**a) 羊水由来の間葉系幹細胞から筋芽細胞への分化誘導：**

羊水由来の間葉系幹細胞が PDGFR、VEGFR2 の発現を調整される事で筋細胞へ分化するという仮説をたてて、間葉系幹細胞の誘導実験を行う。

**b) 羊水由来の間葉系幹細胞と筋衛星細胞の共培養：**

pdgfr 陽性間葉系幹細胞は、Wnt、 $\beta$ -catenin 経路を介して筋衛星細胞の活性化を促進するという仮説をたてて、間葉系幹細胞のみ培養する群と間葉系幹細胞と筋衛星細胞を共培養する群を比較して、筋芽細胞や筋間細胞への分化の度合いを検証する。再生メカニズムを解明する事で、細胞の分化誘導を促す事が出来れば、実際に母体から採取された再生医療製品が、児に使用されるまでの時間が短縮されるものと思われる。

#### 4. 研究成果

当初の研究計画通り、まず臍帯由来間葉系幹細胞は移植療法に応用可能な細胞ソースであることの検討を行った。in vitro 解析において、細胞形態、細胞の増殖能、表面抗原および多分化能等の間葉系幹細胞特性を評価した。In vitro 解析において、hUCMSC は間葉系幹細胞マーカーが陽性で、多分可能を有していた。

細胞ソースの検討と適切な 3 次元構造体の検討により 5cmx5cm の細胞パッチを作製することの目標を達成した。また、in vitro において hUCMSC から神経分化誘導能の検討を行った。hUCMSC を分化誘導培地に 2 週間培養により神経様細胞を得た。これら神経様細胞は、免疫蛍光染色にて HuC/D、MAP2 の Neuron 陽性を認めた。先行する幹細胞研究等参考にし、筋芽細胞の効率的分化、大量培養、目的細胞の純化等の条件検討によりデータを蓄積された。hUCMSC より立体的構造体を作成するためのスフェロイド作成の最適化を行い、その結果をもとに、バイオ 3D プリンターで作製した構造体に科学的刺激を与え、5 週間の循環培養による適切な強度を得られた。

先天奇形を伴う難治性疾患をもつ患児では、出生直後の患児から生体試料を採取することも倫理的に困難であるため、疾患原因の特定が困難である事が多く、疾患原因の探索的研究や新規治療法の開発も困難である事が多い。今回の横隔膜再生では、臍帯、羊水から得られる細胞をソースとすることで先天奇形の根治治療を目指す事が可能となる。破棄されてきた貴重な生体試料を用いることで、再生医療製品の開発が可能となり、医療現場に新たな価値をもたらす研究となる。

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 Yoshimaru Koichiro, Matsuura Toshiharu, Uchida Yasuyuki, Sonoda Soichiro, Maeda Shohei, Kajihara Keisuke, Kawano Yuki, Shirai Takeshi, Toriigahara Yukihiro, Kalim Alvin Santoso, Zhang Xiu-Ying, Takahashi Yoshiaki, Kawakubo Naonori, Nagata Kouji, Yamaza Haruyoshi, Yamaza Takayoshi, Taguchi Tomoaki, Tajiri Tatsuro	4. 巻 5
2. 論文標題 Cutting-edge regenerative therapy for Hirschsprung disease and its allied disorders	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-023-02741-6	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Alvin Santoso Kalim, Kouji Nagata*, Yukihiro Toriigahara, Takeshi Shirai, Kosuke Kirino, Zhang Xiu-Ying, Takuya Kondo, Naonori Kawakubo, Junko Miyata, Toshiharu Matsuura, Tatsuro Tajiri
2. 発表標題 Zebrafish model of Allied disorders of Hirschsprung 's disease using CRISPR/Cas9 "
3. 学会等名 The 4th International Symposium on Congenital Anomaly and Developmental Biology (ISCADB 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023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	永田 公二  (NAGATA Kouji)  (20419568)	九州大学・大学病院・講師   (17102)	
研究分担者	田尻 達郎  (TAJIRI Tatsuro)  (80304806)	九州大学・医学研究院・教授   (17102)	

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	河野 淳  (KONO Jun)  (90758418)	九州大学・大学病院・助教    (17102)	

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