

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：92605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860855

研究課題名(和文)病態の進行抑制を目的とした、脆弱組織への細胞シート移植

研究課題名(英文)Cell Sheet Transplantation in Utero: Using a Fetal Rats to Approach New Fetal Therapy

研究代表者

柿本 隆志(Kakimoto, Takashi)

清水建設株式会社技術研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：70566687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胎児疾患に対する治療法として、細胞シート工学を用いた新たな治療の可能性について検討した。胎児期治療は、欧米・欧州を中心として、死産の危険性がある先天性疾患や、出生直後に重篤化する疾患に対して治療が行われている。一方の細胞シート工学を応用した再生治療は角膜・心臓・食道をはじめとして、様々な臓器において報告されている。今回我々は、胎児期治療へ細胞シート工学が応用可能であるか検討した。実験は、ラット口腔粘膜細胞シートをラット胎仔へ移植した。移植72時間後のラット胎仔において、細胞シートの生着が確認された。

今回の結果から、細胞シート工学を応用した、新たな胎児期治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Summary We have developed cell sheet (CS) based regenerative medicine and successfully applied it to clinical settings for reconstructing various tissues. In this study, we present the possibility of CS transplantation for fetal therapy. Methods Allogenic epithelial cell sheets were fabricated from oral mucosal epithelial cells isolated from adult GFP transgenic rats and cultivated on temperature-responsive culture inserts, transplanted to the ulcer sites of each rats' fetus (E17) in utero. Three days later, fetuses were sacrificed to examine macroscopically and histologically. Results The transplanted CS sealed up the ulcer, while skin damage was only observed in sham controls. Immunohistochemical observations revealed that transplanted CSs were stably adhered without suture or sealing and epidermal regeneration occurred at the transplanted sites. Conclusion Our results suggest cell sheet in utero transplantation to fetus is possible, which is applicable to fetal therapy.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 胎児期治療 細胞シート

1. 研究開始当初の背景

(1) 二分脊椎症

二分脊椎症は神経管閉鎖障害であり、神経外胚葉と皮膚外胚葉の未分離により発生する。神経管下部に閉鎖障害が発生すると二分脊椎症と呼ばれ、腰仙部に好発する。日本における二分脊椎症の発生率は出生2,000人当たり1人とその発生頻度は高い。二分脊椎症には閉鎖性のものと、開放性の病態があり、後者のほうがより重症度が高い。開放性二分脊椎は、椎弓の形成不全により本来神経管内にあるはずの脊髄が露出し、閉塞されない。そのため、露出した胎児脊髄は母体子宮との物理的接触・長期間の羊水への暴露により損傷を受け、出生後は下肢運動機能障害・膀胱機能障害の発症や、合併症として水頭症・キアリ奇形などを併発し、生涯にわたるケアを必要とする。

(2) 現行治療

現在、わが国では重症開放性二分脊椎症患児は、出生後24～48時間以内に脳神経科により縫合閉鎖術を受ける。同時に、合併症に対しても手術が行われるが、出生後の治療では必ずしも合併症(キアリ奇形)病態の改善に繋がらないとの報告がある。

二分脊椎症の発生時期は、胎生第4週といわれ、それ以降は開放した胎児脊髄が損傷を受け病態が進行し続けることを考えれば、出生後ではなく、胎児期での早期の治療が求められる。

そのため、欧米・欧州などでは開放性二分脊椎症に対する、胎児期外科治療が行われている。この胎児期外科治療は、妊娠19～25週に行われる。手術は、母体全身麻酔下で子宮壁を露出させる。胎児をエコー下で操作し、病変部位を術野となる位置に固定する。その後、解剖学的に異常となった部位を、正常位置として閉鎖・縫合を行う。この胎児期外科治療は、下肢運動機能障害・合併症である水頭症・キアリ奇形に対する治療効果が確認されている。

(3) 現行治療の課題

開放性二分脊椎症に対する胎児期閉鎖術は妊娠19～25週で行われる。その理由として、19週以前では胎児皮膚が脆弱なため縫合を伴う手術が困難なため、25週以降の手術では出生後の治療との優位性が確認されていないためである。しかし、上記のように病態の発生時期は胎生第4週と極めて初期である。病態発症後は手術が行われる妊娠25週前後まで、露出した神経や脊髄は子宮との接触・羊水への曝露により損傷を受け続ける。つまり、現行の治療は胎生25週以降の病態の進行を防ぐもので、治療以前に受けた障害を治療するものではない。

2. 研究の目的

本研究では、二分脊椎症発症時から現行治療までの間の患部を細胞シート移植により保護し、病態の進行を予防することを目的としている。具体的には、露出した脊髄が胎生早期より障害を受け続ける開放性二分脊椎症に対して、現在の外科治療(縫合による閉鎖)が行えない脆弱な胎児組織に、移植時に縫合の必要がない細胞シートを移植することで、胎児に侵襲を与えることなく、患部を保護し、病態の進行を防ぐ。

3. 研究の方法

実験は、ラット胎仔上皮剥離モデルを、縫合が不可能な早期胎仔脆弱組織として用い、細胞シート移植が可能であるか、また細胞シート移植による患部保護効果・治療効果について検討した。

(1) ラット口腔上皮粘膜細胞シートの作製

10週令GFP発現成獣ラット(オス)から口腔粘膜を採取した。採取した組織から口腔粘膜上皮を分離するため、DMEM+1%P/Sに溶解したdispaseと16時間反応させた。翌日、口腔粘膜から分離した口腔粘膜上皮を、0.5%Trypsin-EDTA下で細かく刻み、細胞を細分化した。細胞と不要組織をセルストレイナー(40 μ)を用いて分離し、1100rpm, 4, 5minで遠心した。得られた口腔粘膜上皮細胞をKeratinocyte Culture Medium(KCM)へ懸濁し、6well plateへセットした温度応答性培養皿(35mm 6well insert)に4 \times 10⁴/cm²の濃度で播種した。培養3,5,(それ以降は毎日)日目に培地交換を行った。11日目に細胞をPBSで洗ったのち、培養皿を20 \times へ移動し、口腔粘膜上皮細胞シートを回収した。

(2) ラット胎仔への細胞シート移植

母獣ラット(妊娠17日目)をイソフルラン麻酔下で開腹し、子宮を露出させる(図1,A)。ラット胎仔の腰仙部を中心として、子宮に円状に糸(5-0)を掛ける(図1,B)。メスを用いて円の中心部の子宮・羊膜を直径約5mm切開し、胎児腰仙部を露出させる(図1,C)。露出した胎仔皮膚上皮を鉸により約3mm剥離し、剥離部位を止血する。剥離部位へ口腔粘膜上皮細胞シートを移植し、10分間静置する(図1,D)。10分後、胎仔を子宮内に戻し、円状に掛けた糸を結紮し子宮を閉じた。子宮を母獣へ戻し、閉腹する。母獣の覚醒を確認したのち、通常飼育を行った。細胞シート移植後72時間で母体を犠牲させ、ラット胎仔をサンプリングした。

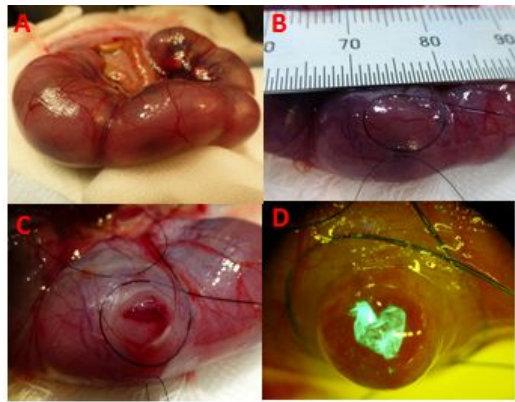


図1 ラット胎児への細胞シート移植方法

(3) 組織観察

サンプリングした胎仔から、パラフィン切片を作成した。

HE染色・免疫染色(GFP・Pan-Cytokeratin)を行い、細胞シートの生着を観察した。

4. 研究成果

(1) GFP発現ラット口腔粘膜上皮細胞シート

培養したラット口腔粘膜上皮細胞は、シート状に回収されたことをHE染色により確認した(図2、A)。免疫染色の結果からGFPの発現を確認した(図2、B)。作成した細胞シートは、GFP発現ラット由来の口腔粘膜上皮細胞シートであることを確認した。

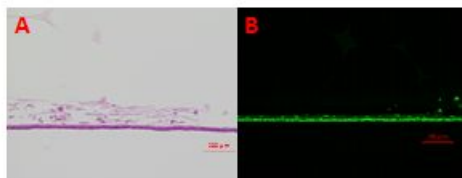


図2 GFP発現ラット口腔粘膜上皮細胞シート

(2) 蛍光実体顕微鏡観察

蛍光実体顕微鏡を用いて、胎仔を観察した。明視野観察では、剥離部を覆う細胞が観察された(図3、A)。蛍光観察により、GFP陽性細胞が確認された(図3、B)。

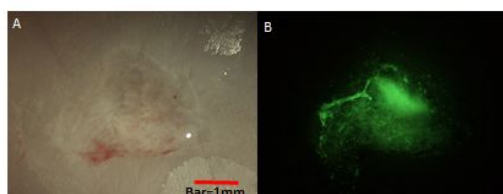


図3 細胞シートを移植したラット胎仔(実体蛍光顕微鏡観察)

ラット口腔粘膜上皮細胞シート移植を行

った胎仔57匹のうち、9匹においてGFP陽性細胞が確認された。

細胞シート移植を行わなかったサンプルにおいては、すべてのサンプルにおいて陽性細胞は確認されなかった。

(3) HE染色、免疫染色観察

GFPラット口腔粘膜上皮細胞シートを移植した胎仔のうち、陽性細胞が確認されたサンプルのHE染色を行った。サンプルからは、剥離部位の上皮組織が再生している様子が観察された(図4)。

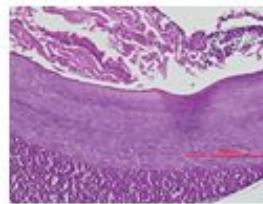


図4 細胞シートを移植したラット胎仔(HE染色)

抗GFP抗体を用いた染色では、移植部位に陽性細胞が確認された(図5、A)。抗Pan-Cytokeratin抗体を用いた染色では、移植を行ったサンプルにおいて、陽性細胞が確認された(図5、B)。

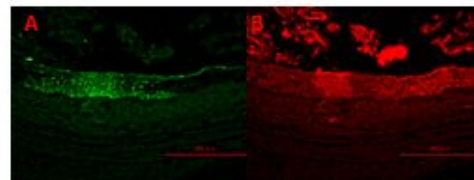


図5、細胞シートを移植したラット胎仔(免疫染色)

(4) 今後の展望

ラット胎仔に移植した、GFP陽性ラット口腔粘膜上皮細胞シートの生着を確認した。胎児の置かれる環境下においても、細胞シート移植が可能であることが確認された。

移植治療においては、移植細胞・組織の免疫拒絶の問題を考慮すると、自己移植が理想的である。しかし、胎児治療においては、母体・胎児への侵襲性及び倫理面から、自己細胞による移植は非常に困難であると考えられる。そこで、本研究ではラット胎仔に対して、他家移植となるアダルトラット由来の細胞シートを用いた。実験の結果、他家移植である細胞シートの生着が確認された。今後、長期的な免疫拒絶を検討する必要があるが、この結果は、胎児への細胞シート移植において、細胞ソースの選択性を大きく広げる可能性を示すものである。母子の低侵襲性が求め

られる胎児期治療において他家移植が可能となれば、非常に意味を持つと考える。

今回の実験結果から、細胞シート移植による、新たな胎児期治療の可能性が示された。

<引用文献>

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 件)

[学会発表](計4件)

柿本隆志(代表)、藏本吾郎、大和雅之、岡野光夫、「細胞シート工学を用いた胎児期治療」、第13回再生医療学会総会 2014.3.4 京都国際会議場「京都府京都市」

柿本隆志(代表)、藏本吾郎、大和雅之、岡野光夫、「細胞シートを用いた胎児期治療」第12回日本胎児治療学会学術集会 2014.11.29-30 久留米大学医学部筑水会館「福岡県久留米市」

柿本隆志(代表)、藏本吾郎、大和雅之、岡野光夫、「胎児期治療への細胞シート応用」、第14回再生医療学会総会 2015.3.20 パシフィコ横浜「神奈川県横浜市」

柿本隆志(代表)、藏本吾郎、大和雅之、岡野光夫、「脊髄髄膜留に対する細胞シート移植」、第13回日本胎児治療学会学術 2015.11.21 横浜情報文化センター「神奈川県横浜市」

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

柿本 隆志(KAKIMOTO, Takashi)

清水建設株式会社技術研究所・その他部

局等・研究員

研究者番号:70566687

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()