

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15646

研究課題名(和文)横隔膜全欠損に対する臍帯由来幹細胞を用いた横隔膜再生医療の開発

研究課題名(英文)Diaphragmatic regeneration using umbilical cord blood derived stem cells for diaphragmatic agenesis

研究代表者

田尻 達郎(Tajiri, Tatsuro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80304806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：横隔膜全欠損に対する横隔膜研究として、機能的骨格筋シートの作成を試みた。臍帯血由来幹細胞による着目した。異種三細胞による共培養で筋細胞スフィア形成を行ったが、十分な大きさまでのスフィアの結合が困難であったため、ヒト線維芽細胞からのdirect conversionを行ったところ、MyoD1とL-myc遺伝子の共導入により、高効率に多核筋細胞の形成が得られた。今後、機能的骨格筋シート作成につなげていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Diaphragmatic regeneration using umbilical cord blood derived stem cells for diaphragmatic agenesis was attempted using 3 types of different stem cells. Connection of small muscle sphere was not observed. Therefore, we attempted direct conversion from human fibroblast into myoblast using MyoD1 and L-myc gene trasfection as next step. Finally, we obtained multinucleated muscle cells with high efficiency. we perspective function myosheet using this novel technique.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生医学 小児外科 先天性横隔膜ヘルニア 骨格筋 臍帯血

1. 研究開始当初の背景

先天性横隔膜ヘルニア (CDH) は、肺低形成と遷延性肺高血圧症を本態とした新生児外科疾患であり、その高い致死率から、これまで救命のためにさまざまな努力がなされてきた。そして、高頻度振動換気、体外膜型人工肺、一酸化窒素吸入療法などの新たな治療手段の導入により、近年著しく救命率の向上が得られてきた。当施設においても、gentle ventilation を主体とした呼吸循環管理を導入し、待機手術を施行することで、他の合併症がない isolated CDH では 90%以上もの生存率が得られるようになってきた (Kimura O, et al. *Pediatr Surg Int*, 2012)。

これら CDH survivor の中で、とくに横隔膜全欠損に代表される、横隔膜欠損孔が大きく補填のために人工膜パッチが必要となる症例では、肺低形成も重度となることが多く、術後短期的な呼吸器合併症のみならず、長期的には横隔膜伸縮運動がないことから心肺機能の低下や換気障害、さらに患児の成長に伴う人工膜のサイズミスマッチが生じ、漏斗胸などの胸郭変形、側彎などの脊椎変形、再ヘルニアなどの合併症につながる。当院での成績では、過去 10 年間に 25 例の CDH 救命例があり、そのうち実に 32% がパッチ症例で、パッチ症例の 7 割に体幹変形を認めた。したがって、重症 CDH の治療成績が改善してきた現在、より QOL の高い術後生活を得るには、肺低形成治療に加えて、成長し運動機能を持つ自己由来組織による横隔膜の開発が重要な課題となってくる。

再生医学を用いた横隔膜再生に関する研究は、これまで筋芽細胞や羊水由来幹細胞などさまざまな cell source を用いた報告がされているが (Dario D, et al. *Semin Pediatr Surg*, 2014)、完全な横紋筋組織の再生は困難で、腱組織などの隔壁構造を

模倣するものであった。それでも比較的欠損孔の小さい症例などで遺残筋組織が残存している症例においては十分に期待できる補填材料となり得るが、横隔膜全欠損型においては成長性・伸縮性のある組織を用いなければ先に述べた合併症はほぼ必発となる。翻って、出生前あるいは術前から全欠損の診断やパッチの必要性を決定することは不可能であり、全例に胎児期からグラフトの準備をするのは時間・コストの面から現実的ではない。そこで我々は出生時に得られる潤沢な幹細胞ソースとしての臍帯および臍帯血に着目した。さらに、組織構築技術に関しては、Takebe らの血管網を有する 3 次元ヒト組織構成手法を用いての、機能的骨格筋シート作成を目的とした (Takebe T, et al. *Nature*, 2013)。

2. 研究の目的

iPS 細胞からの筋芽細胞誘導 (MyoD-hiPS)、臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) 培養、間葉系幹細胞 (hMSC) 培養を行い、これら 3 種の異種細胞を共培養することで、機能的なヒト血管網を有する骨格筋スフィアを作成し、これらを吸収性細胞培養基材上に複数個配置して、免疫不全マウス皮下に移植することで、血液灌流させた骨格筋シートを作成することを最終目標としている。

3. 研究の方法

研究計画に沿って、当初は、

MyoD 遺伝子強制発現プラスミドベクターを作成し、ヒト iPS 細胞にリポフェクション法で導入し、ドキシサイクリンを添加し、筋芽細胞に分化誘導する。ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) およびヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を入手・培養・増殖させる。

筋芽細胞、hMSC および HUVEC を培養し、それぞれコンフルエントな状態にしたう

えで、これら異種三細胞を一定の割合で混合し、1 ウェルにすべて播種する。三種細胞の共培養を 14 日間行い、直径 2 mm 大の骨格筋スフィアを作成する。

複数作成したスフィアを、3 次元細胞培養用吸収性基材に配置し、ヌードマウスの大腿皮下に移植する。7 日後に大腿ごと摘出し、周囲組織との関係および血管網の有無を検討する。

以上のような方法論で研究を開始した。しかし、異種三細胞共培養を行い、骨格筋スフィアを形成することは可能であったが、それ以上の組織塊を形成することは困難であり、新血管増生もみられなかった。

そこで、線維芽細胞への遺伝子導入による direct conversion により、筋細胞転化の効率化を図ることとした。具体的には以下の手順を行った。

ヒト線維芽細胞に、MyoD1 とリプログラミング関連転写因子 (Oct3/4、Klf4、c-Myc、L-myc 等) の遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターを、種々の組み合わせで感染させた。

14 日間培養した後、Myogenin、筋型クレアチンキナーゼ (CKM) 等の筋芽細胞マーカーの発現を定量 RT-PCR で解析した。また免疫染色を行い、CKM、Myogenin、desmin タンパクの発現を解析した。多核細胞の比率を DAPI 染色で計測し、ERK5 阻害剤の添加による影響も解析した。遺伝子導入後 7 日目の細胞を NOG/SCID マウスに皮下移植し、7 日後に摘出して免疫染色を行った。

4. 研究成果

結果として、CKM と Myogenin の発現は、MyoD1 単独ではわずかに上昇したに過ぎなかったが、L-Myc 遺伝子を共導

入すると著明に上昇した。MyoD1 と L-myc 遺伝子を線維芽細胞に共導入すると、約 90% の細胞を筋芽細胞にコンヴァートさせることができた。得られた directly converted myoblasts (dMB) には多核のシンシチウムが多数確認でき、約 40% の細胞が 4 つ以上の核を有していた。一部の細胞は多核で細胞質の大きな形態を呈していた。培養中に ERK5 阻害剤 XMD8-92 を添加すると、多核細胞の比率は有意に低下した。マウスへの移植実験では、多核の筋繊維様の組織が in vivo で形成されることが確認された。

このように、ヒト線維芽細胞から骨格筋細胞への高効率なダイレクトコンバージョンが可能であることを明らかにし、横隔膜ヘルニアをはじめとする先天性筋疾患に対しての新規治療法としての可能性を示すことができた。

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 11 件) 全て査読あり

- 1 Fumino S, Sakai K, Higashi M, Aoi S, Furukawa T, Yamagishi M, Inoue M, Iehara T, Hosoi H, Tajiri T.: Advanced surgical strategy for giant mediastinal germ cell tumor in children. J Ped Surg Case Reports 27: 51-55, 2017
- 2 Inoue M, Aoi S, Taniguchi A, Sakai K, Higashi M, Fumino S, Furukawa T, Tajiri T.: Laparoscopic intraperitoneal onlay mesh for pediatric incisional hernia - a case report. Surgical Case Reports 3: 122, 2017
- 3 Wakao J, Kishida T, Fumino S, Kimura K, Yamamoto K, Kotani S, Mizushima K, Naito Y, Yoshikawa T, Tajiri T, Mazda

- 0.: Efficient direct conversion of human fibroblasts into myogenic lineage induced by co-transduction with MYCL and MYOD1. *Biochem Biophys Res Commun.* 488(2):368-373, 2017.
- 4 田尻達郎、【小児固形がんの最新トピックス】神経芽腫のトピックス. *小児外科* 48: 1185-1191、2016
 - 5 田口智章、宗崎良太、木下義晶、田尻達郎、外科治療の役割と考え方 *小児外科* 48 : 1160-1168、2016
 - 6 Iehara T, Yagyu S, Tsuchiya K, Kuwahara Y, Miyachi M, Tajiri T, Sugimoto T, Sawad T, Hosoi H: Residual tumor in cases of intermediate-risk neuroblastoma did not influence the prognosis. *Japanese Journal of Clinical Oncology*: 1-6 2016. doi: 10.1093/jjco/hyw050
 - 7 Fumino F, Maniwa J, Takeuchi Y, Sakai K, Higashi M, Aoi S, Furukawa T, Kimura O, Tajiri T. Surgical intervention and perioperative risk factors of retroperitoneal teratomas in children: a single institution experience. *Pediatric Surgery International*, 32,909-914 1-6 2016. DOI 10.1007/s00383-016-3938-6
 - 8 Tanaka T, Higashi M, Kimura K, Wakao J, Fumino S, Iehara T, Hosoi H, Sakai T, Tajiri T : .MEK inhibitors as a novel therapy for neuroblastoma: Their in vitro effects and predicting their efficacy. *J Pediatr Surg.* 2016 [Epub ahead of print]
 - 9 Fumino S, Kimura K, Iehara T, Nishimura M, Nakamura S, Souzaki R, Nishie A, Taguchi T, Hosoi H, Tajiri T: Validity of image-defined risk factors in localized neuroblastoma: A report from two centers in Western Japan. *J Pediatr Surg J Pediatr Surg* 50: 2102-2106, 2015.
 - 10 Furukawa T, Kimura O, Sakai K, Higashi M, Fumino S, Aoi S, Tajiri T: Surgical intervention strategies for pediatric congenital cystic lesions of the lungs: A 20-year single-institution experience. *J Pediatr Surg* 50: 2025-2027, 2015.
 - 11 Furukawa T, Aoi S, Sakai K, Higashi M, Fumino S, Tajiri T: Successful laparoscopic extirpation of a large omental lipoblastoma in a child. *Asian J Endosc Surg* 9: 473-476, 2015.
- [学会発表] (計 5件)
- Fumino S, Sakai K, Higashi M, Aoi S, Furukawa T, Yamagishi M, Inoue M, Iehara T, Hosoi H, Tajiri T: Advanced surgical strategy for giant mediastinal germ cell tumor in children. *J Pediatr Surg Case Rep*, 27: 51-55, 2017.
- Wakao J, Kishida T, Fumino S, Kimura K, Higashi M, Aoi S, Furukawa T, Mazda O, Tajiri T. The Direct Conversion of Human Fibroblasts Toward the Myogenic Cell Lineage: The implications of Diaphragmatic Regeneration. 50th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons, 2017 May 28-June 1; Seattle, USA.
- Tanaka T, Takeuchi Y, Higashi M, Fumino S, Iehara T, Hosoi H, Sakai T, Tajiri T. Immunohistochemical analysis of pre- and post-chemotherapeutic ERK phosphorylation in clinical

neuroblastoma samples. 3rd Asia-Pacific International Symposium of Neuroblastoma, 2017 Oct 6; Tokyo, Japan.
Takeuchi Y, Tanaka T, Higashi M, Fumino S, Iehara T, Hosoi H, Sakai T, Tajiri T. Preclinical study of novel MEK inhibitors on neuroblastoma and the biomarker for their therapeutic effects in neuroblastoma xenograft mice. 3rd Asia-Pacific International Symposium of Neuroblastoma, 2017 Oct 6; Tokyo, Japan.
Fumino S, Sakai K, Higashi M, Aoi S, Furukawa T, Yamagishi M, Inoue M, Iehara T, Hosoi H, Tajiri T: Current surgical intervention for pediatric giant mediastinal germ cell tumors. 49th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP), 2017 Oct 12-16; Washington DC, USA.

〔図書〕（計 3 件）

田尻達郎、医学書院、標準小児外科学 第 22 章 小児腫瘍 B 神経芽腫 328-334・G 悪性リンパ腫 359-360・I その他の良性腫瘍 366-367、2017
田尻達郎、メジカルビュー社、術前化学療法の影響とリスク評価 スタンダード小児がん手術 臓器別アプローチと手技のポイント 11-14、2017
田尻達郎、MEDIC MEDIA、year note INTERNAL MEDICINE&SURGERY 内科・外科編 A 消化管・腹壁・腹膜疾患/小児外科 第 26 版 152-156、2017

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 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 0 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

田尻 達郎 (TAJIRI, Tatsuro)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号：80304806

(2) 研究分担者

岸田 綱郎 (KISHIDA, Tsunao)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授
研究者番号：00370205

木村 修 (KIMURA, Osamu)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：10315963

東 真弓(HIGASHI, Mayumi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10380453

文野 誠久(FUMINO, Shigehisa)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40405254

(3)連携研究者

該当無し

(4)研究協力者

該当無し