様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 30 年　 6 月 13 日現在

機関番号：17102
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2015～2017
課題番号：15K19657

研究課題名（和文）羊水由来間葉系幹細胞の脱細胞化気管への投与による広範気管再生医療

研究課題名（英文）regenerative medicine of extensive trachea using a decellularization trachea administrated amniotic fluid-derived mesenchymal stem cell

研究代表者
和田　桃子（Wada, Momoko）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：30741219

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）：マウス気管に対する脱細胞化プロトコールを作成し、脱細胞化気管を作成した。細胞遺残はなかったが、気管の強度が保たれず、プロトコールを改定し再度作成したところ、細胞の遺残をほぼ認めず、強度の保たれた脱細胞化気管を作成することに成功し、再生気管作成の足場となりえると思われた。
再生気管作成の細胞ソースとして間葉系幹細胞を設定し、donor間で軟骨分化能の差を認めた。その原因としてEpigeneticsに焦点を当てて検討したところ、クロマチン構造の差を認め、軟骨分化能の差の原因である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：A decellularization protocol for the trachea of the mouse was prepared according to the past papers and we made decellularized trachea. Although there was no cell remnant observed, the strength of the trachea was not preserved. That is why we revised the protocol and rebuilt decellularized trachea. It was succeeded in creating a decellularized trachea with strength maintained almost without observing the residual of the cell. We could create a minimum acceptable protocol and it can be a foothold for regeneration trachea creation.
Mesenchymal stem cells were set as a cell source for regenerating trachea, and a difference in cartilage differentiation ability was observed between donors. As a result of examination focusing on Epigenetics, we found a difference in chromatin structure, suggesting the possibility of being the cause of the difference in cartilage differentiation potential.

研究分野：小児外科

キーワード：気管再生　脱細胞化　scaffold　間葉系幹細胞

１．研究開始当初の背景
新生児医療の進歩により、新生児外科疾患死亡率は低下している。しかし、50000 人に１人の発生率である先天性気管無形成においては依然予後不良である。
食道気管瘻のみが唯一の気道であり、食道挿管による気道確保、換気ができなければ生後数日で換気不全により死亡する。長期生存を目指し、従来は食道を代用気管とし、喪失した食道に空腸や結腸などの代用食道として再建する代用手術が試みられてきたが、長期生存が得られている症例は極めて少ない状況である。約 75%に羊水過多を認め、胎児 MRI にて出生前診断を得る症例もあることから、出生後の根本的な治療法が確立されれば予後改善が見込まれる疾患である。
２．研究の目的
上記背景の通り、先天性気管無形性生野予後は非常に悪く、根本的治療法として気管の移植手術が求められる、生体や成人をドナーとした気管移植は困難であることから、人工的に気管を作成する必要がある。
気管の脱細胞化による scaffold 作成技術や、間葉系幹細胞と組織工学を用いた再生医療の有用性が認められており、本研究の目的は、これらの技術を応用することで間葉系幹細胞から再生気管を作成することである。

３．研究の方法
（１）10 週齢 B6 マウスを安楽死せしめ、胸骨正中切開にて開胸し、周囲組織を剥離し、愛護的に甲状軟骨から気管分岐部までの気管を摘出する。摘出した気管は抗菌薬、抗真菌薬入り PBS に浸漬し、脱細胞化プロトコールに従って脱細胞化を行う。プロトコール終了後 10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、プレパラートを作成し脱細胞化の評価を行う。
（２）気管再生において、気管軟骨再生が課題の一つであり、共培養前に間葉系幹細胞から軟骨への分化能を、cell line 間で比較する。間葉系幹細胞として本実験では脱落乳歯歯髄幹細胞（SHED）を用い、10 検体で軟骨組織への分化誘導を行う。分化誘導を行った後に、qPCR にて SOX9 に代表される軟骨分化のマーカーを評価する。Cell line 間の差を認める場合、epigenetic な原因検索を行い、共培養に用いる cell line の選択を行う。

４．研究成果
（１）マウス気管の脱細胞化
既報の論文 1)を参考に以下のプロトコールを作成し、脱細胞化気管を得た。（図１）
●気管を摘出、周囲の脂肪織や結合織は可能な限り除去。1%ペニシリン、ストレプトマイシン、1%ファンギゾン入りの PBS（PSF-PBS）４℃、１０分浸漬。新しい PSF-PBS に組織を回収し、４℃で移送。PBS で洗浄し、2%トリプシン（TS)、0.04%EDTA 溶液に２時間浸漬。蒸留水で洗浄し 2%TritonX-100 に１時間浸漬。蒸留水で３０分洗浄し 38℃、1%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）に２時間浸漬。PBS で２時間洗浄。

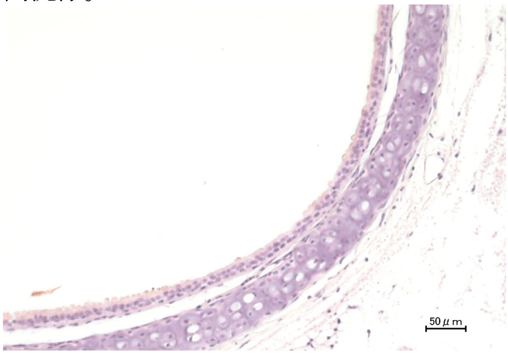


図 1-1　摘出時固定

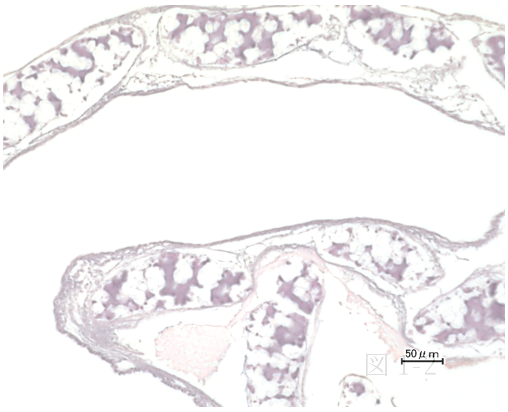


図 1-2　脱細胞化

コントロール（図 1-1）と比較して、脱細胞化後(図 1-2)では細胞核の消失を認めたが、同時に切片作成時に内腔を保てない程度の強度劣化を認めた。そのため、以下の通りプロトコールを改訂し、再度脱細胞化気管を得た（図２）
●EDTA 浸漬時間を１時間に短縮。SDS 浸漬時間を段階的に短縮。

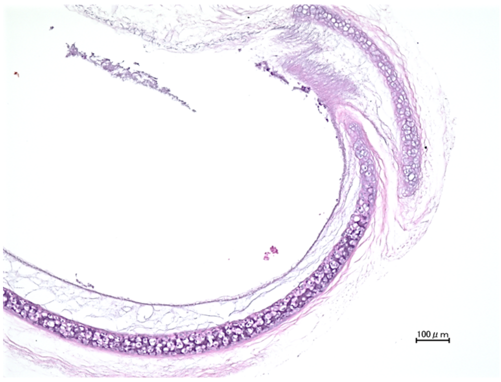


図 2-1　SDS60 分浸漬

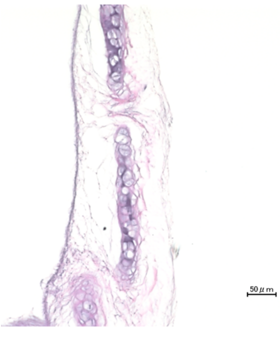
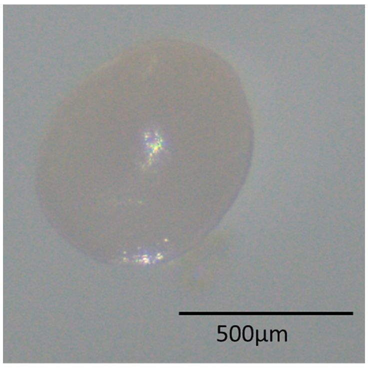


図 2-2 SDS60 分浸漬

一部細胞が残存しているように見える部分を認めることや、物理的な耐久性の評価などは行えておらず、上記プロトコールで作成した脱細胞化気管が再細胞化に使用できるかどうかは不明であるが、内腔を担保できる強度を保ち、細胞もほぼ脱落させた気管を作成できたことは一定の成果と考えられた。

（２）間葉系幹細胞を用い、気管再生時に問題となる気管軟骨作成を見据え、軟骨組織への分化誘導の実験を行った。今回は間葉系幹細胞(MSC)として脱落乳歯歯髄幹細胞(SHED)を用いることとした。MSC の採取場所ではなく、donor 間に差があるとの仮説を立て、実験を開始した。本実験での培養では。一貫して Xeno-free の培地を用いた。
SHED の培養を 80%confluent まで行い、細胞を剥離回収したのちに、1.0×105 個の細胞を用いて、20 個/line 播種しスフェロイドの形成を待った。播種後１週間で軟骨分化培地に交換し、２回/週の培地交換を４週間継続し、軟骨スフェロイドの作製を行った。(図 3)



<u>図 3　作成、回収した軟骨スフェロイド</u>
作成したスフェロイドを回収し、mRNA を抽出し、RT-qPCR にて軟骨分化に関与するといわれる SOX9、RUNX2、ACAN、COL10 の評価を行った。
その結果、特定の cell line において、上記マーカーの特異的な上昇を認め、cell line 間において、軟骨分化能力の差がある可能性が示された。
病理学的評価のため、同様の方法で、1.0×106 個の細胞を用いて 10 個/line のスフェロイドを作成することとし、同じく１週間程度スフェロイドの形成を待ち、軟骨分化培地に変更後、2 回/週の培地交換を行いながら４週間培養を行った。半分の cell line において播種後にスフェロイドの形成が不十分あるいは形成されなかった line を認め、すべての軟骨スフェロイド作成には至らなかった。細胞数が多い場合には分化誘導に障害が出る可能性も示唆されるが、詳細な原因は不明である。
また、上記に示された、cell line 間の軟骨分化能の差の原因として、epigenetics な検討を行うこととし、軟骨分化誘導前の細胞において、SOX9 プロモーター領域の methylation の変化を検討したが、line 間で明らかな差を認めることはできなかった。
さらに、分化誘導前のクロマチン構造の検討を同様の領域に対して行ったところ、こちらは cell line 間で構造に差がある結果となっていたため、その一部を示す（図 4)。
ただし、軟骨分化後の RT-qPCR の結果と単純にリンクする結果とはならなかったが、クロマチン構造変化のある部位によって、抑制的にあるいは促進的に作用する可能性が推察されることから、本クロマチン構造の変化が軟骨分化能に影響を与えている可能性は十分にあり得ると思われる。

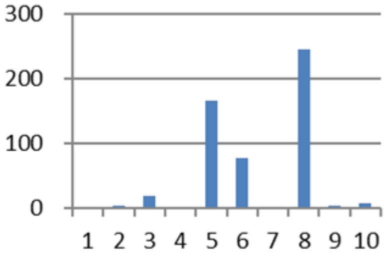


図 4-1 クロマチン構造解析の結果（一部）

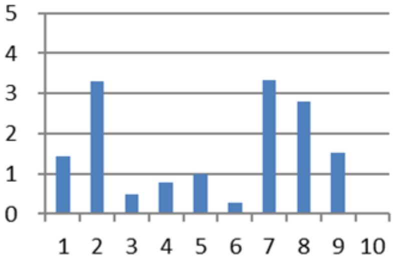


図 4-2 クロマチン構造解析の結果（一部）

＜引用文献＞
1) Kajbafzadeh AM et al. Surg Today. 2015 Aug;45(8):1040-8.

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　０件）

〔学会発表〕（計　０件）

〔図書〕（計　０件）

〔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
　和田　桃子（WADA, Momoko）
　九州大学・医学研究院・共同研究員
　研究者番号：３０７４１２１９

(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
　　　　　　　(　　　)