

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08188

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞由来エクソソーム羊水腔投与による横隔膜ヘルニアに対する胎児治療の開発

研究課題名(英文) Development of fetal therapy of congenital diaphragmatic hernia by intra-amniotic injection of exosomes derived from mesenchymal stem cells

研究代表者

古川 泰三 (Furukawa, Taizo)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：20515291

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)：先天性横隔膜ヘルニア(CDH)は、新規治療開発を最終目標に、中動物(ウサギ)を用い既に臨床応用されているTracheal occlusion (TO)を行った上で、MSC由来EVs投与を投与した際の治療効果について研究を行う予定であった。静脈麻酔下でウサギ胎児に対するTOは、成功率の安定化が得られた。一方、MSCの実験では、以前より使用経験のあるラット肺芽を用い、エクソソーム抽出前にMSCの持つ直接作用、paracrine作用の効果の違いを確認する事にしたが、肺芽表面積および分岐数において有意差を認めず、エクソソーム抽出まで進む事ができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CDHの胎児治療において、TOは生存率は49%と救命率はまだ低く、新規胎児治療開発が急務である。今回の実験では、MSCの持つ直接作用、paracrine作用の効果の違いについては有意差は認めなかったものの、肺成熟効果を保つ事は確実であり、今後の新規治療法開発に向けて期待のできる細胞ソースであると思われた。

研究成果の概要(英文)：For congenital diaphragmatic hernia (CDH), with the ultimate goal of developing a new treatment, tracheal occlusion (TO), which has already been clinically applied using medium animals (rabbit), was performed, and MSC-derived EVs were administered. It was planned to conduct a study on treatment effects. TO on fetal rabbits under intravenous anesthesia resulted in a stable success rate. On the other hand, in the MSC experiment, we used rat lung buds, which we have used before, to confirm the difference in the effects of direct and paracrine actions of MSCs before extracting exosomes. No significant difference was observed, and it was not possible to proceed to exosome extraction.

研究分野：小児外科

キーワード：間葉系幹細胞 エクソソーム 先天性横隔膜ヘルニア 羊水腔投与 ラット

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

#### 1. 研究開始当初の背景

先天性横隔膜ヘルニア(CDH)の重度肺低形成に対する胎児治療として、Tracheal occlusion(TO)を胎児期に行う治療(FETO)が欧米を中心に臨床応用されており、FETO未施行例では生存率 24%に対し、FETO 施行例では 49%であった(Semin Fetal Neonatal Med 19: 338-48, 2014)。この救命率はまだ低く、更なる向上には、新規の胎児治療を開発する必要が急務である。近年、間葉系幹細胞(MSC)が再生医療・細胞治療におけるソースとして注目されている。MSC は間葉組織に存在する幹細胞であり、組織障害の修復能を有しており、既に動物実験レベルでは肺障害モデルや低酸素誘発性肺高血圧症モデルに対して MSC の治療効果が報告されている。我々は MSC が CDH における低形成肺の重症度を軽減することを証明してきたが、MSC の作用機序として MSC の多分化能を活かして障害組織を置き換える作用、MSC から分泌される液性因子による組織修復作用に大別される。したがって、我々は次の実験として MSC の臨床応用に向け治療効果の背景にある分子メカニズムを追求する。

#### 2. 研究の目的

臨床努力にも関わらず、依然致死率の高い先天性横隔膜ヘルニア(CDH)に対する胎児治療の可能性について検討することを目的とする。間葉系組織由来の幹細胞(MSC)には、肺成熟を促す効果が報告されており、申請者らの他研究分野における MSC の使用経験を基に CDH モデルラットを用いて、MSC の肺成熟への関与を検討する。

#### 3. 研究の方法

成熟 SD ラットを一晩交配させ、膣栓陽性であった雌ラットを妊娠 0 日とする。妊娠 SD ラットに対し妊娠 9.5 日に nitrofen100mg を Olive oil に溶解させ、イソフルランによる全身麻酔下に経口胃管を通して 1 回投与する。妊娠 13.5 日に cesarean section を施行し子宮を摘出する。cesarean section の際、ソムノペンチルを過剰投与することで苦痛を与えず犠牲死させる。摘出子宮から摘出した胎仔より肺芽を摘出し、Mesh Insert 上で肺芽を 72 時間気液界面培養し、24 時間毎に形態学的評価(肺芽表面積: Surface, 肺芽分岐数: Budding)を行う。培養後肺芽と培地を凍結保存し、標的液性因子(VEGF, FGF-10, TGF- $\beta$ )の定量評価を行う。肺培養条件によって control、MSC Co-culture、MSC Separate-culture の 3 群に分けて比較検討する。肺芽培養前日に Mesh Insert の表裏一方に human Amniotic Fluid BMSC(hAFMSC)を  $1E4/cm^2$  散布し、培養。肺芽培養面に hAFMSC を培養した群を MSC Co-culture、肺芽培養面の裏面に hAFMSC を培養した群を MSC Separate-culture、hAFMSC と共培養していない群を control とした。3 群比較は Steel-Dwass 検定( $P < 0.05$ )で行った。

#### 4. 研究成果

CDH ラットの肺芽の気液界面培養は成功したが、成功率が上昇せず、培養条件の検討が必要と考えられた(図 1)。同一母体で培養成功した Control( $n=3$ )、MSC Co-culture( $n=4$ )、MSC Separate-culture( $n=4$ )の比較では肺芽表面積の増加率は Control 2.83、MSC Co-culture 3.35、MSC Separate-culture 3.54。肺芽分岐数の増加率は Control 4.56、MSC Co-culture 8.43、MSC Separate-culture 11.14 といずれも有意差は認めなかった(図 2、3)。Mesh Insert における MSC の培養条件や培地条件も試行錯誤したが、形態学的評価では有意差を認めず、標的液性因子の定量評価には至らなかった。

図1 気液培養と肺の形態学的変化

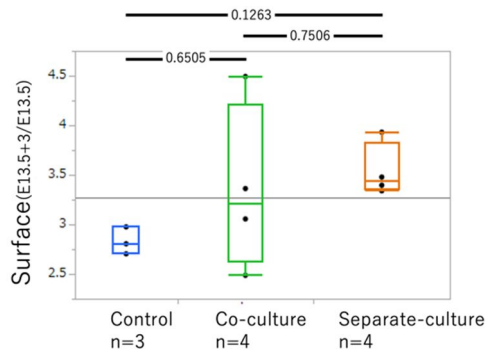
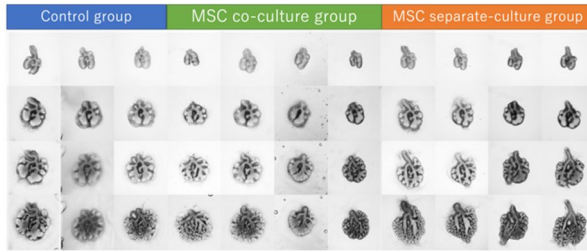


図2：肺芽表面積の増加率

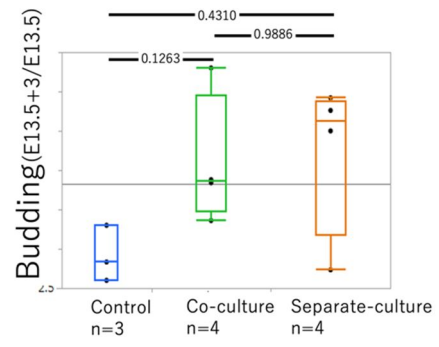


図3：肺芽分岐数の増加率

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Okawada Manabu, Ohfujii Satoko, Yamoto Masaya, Urushihara Naoto, Terui Keita, Nagata Kouji, Taguchi Tomoaki, Hayakawa Masahiro, Amari Shoichirou, Masumoto Kouji, Okazaki Tadaharu, Inamura Noboru, Toyoshima Katsuaki, Inoue Mikihiro, Furukawa Taizo	4. 巻 51
2. 論文標題 Thoracoscopic repair of congenital diaphragmatic hernia in neonates: findings of a multicenter study in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 1694 ~ 1702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-021-02278-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawanishi Yoko, Endo Masayuki, Fujii Makoto, Masuda Tatsuo, Usui Noriaki, Nagata Kouji, Terui Keita, Hayakawa Masahiro, Amari Shoichiro, Masumoto Kouji, Okazaki Tadaharu, Inamura Noboru, Urushihara Naoto, Toyoshima Katsuaki, Uchida Keiichi, Furukawa Taizo, Okawada Manabu, Yokoi Akiko, Taguchi Tomoaki, Okuyama Hiroomi	4. 巻 41
2. 論文標題 Optimal timing of delivery for pregnancies with prenatally diagnosed congenital diaphragmatic hernia: a propensity-score analysis using the inverse probability of treatment weighting	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Perinatology	6. 最初と最後の頁 1893 ~ 1900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41372-021-01118-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terui Keita, Furukawa Taizo, Nagata Kouji, Hayakawa Masahiro, Okuyama Hiroomi, Amari Shoichiro, Yokoi Akiko, Masumoto Kouji, Yamoto Masaya, Okazaki Tadaharu, Inamura Noboru, Toyoshima Katsuaki, Uchida Keiichi, Okawada Manabu, Sato Yasunori, Usui Noriaki	4. 巻 37
2. 論文標題 Best pre-ductal PaO2 prior to extracorporeal membrane oxygenation as predictor of mortality in patients with congenital diaphragmatic hernia: a retrospective analysis of a Japanese database	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1667 ~ 1673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-021-04995-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山師 幸大、古川 泰三、竹内 雄毅、坂井 宏平、東 真弓、文野 誠久、青井 重善、田尻 達郎	4. 巻 57
2. 論文標題 腹部コンパートメント症候群を合併したため緊急手術を要した慢性機能性便秘症の1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本小児外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 656 ~ 662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11164/jjsps.57.3_656	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 長野 心太、田尻 達郎、古川 泰三、竹本 正和、竹内 雄毅、坂井 宏平、東 真弓、文野 誠久、青井 重善、小西 英幸	4. 巻 57
2. 論文標題 十二指腸重複症に対するのう胞切開術後にStent-Stone Complexによる腸閉塞を発症した1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本小児外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 645 ~ 651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11164/jjsps.57.3_645	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小西 快、青井 重善、山師 幸大、長野 心太、坂井 宏平、東 真弓、文野 誠久、古川 泰三、田尻 達郎	4. 巻 57
2. 論文標題 回盲弁を温存しかつ完全に切除し得た回盲部腸管重複症の2例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本小児外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1066 ~ 1070
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11164/jjsps.57.7_1066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tando So, Sakai Kohei, Takayama Shohei, Fukunaga Kenji, Higashi Mayumi, Fumino Shigehisa, Aoi Shigeyoshi, Furukawa Taizo, Tajiri Tatsuro, Ogi Hiroshi, Itoh Kyoko	4. 巻 55
2. 論文標題 Maldevelopment of intrapulmonary bronchial cartilage in congenital diaphragmatic hernia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Pulmonology	6. 最初と最後の頁 1771 ~ 1780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ppul.24799	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 -

1. 著者名 鈴木 健斗、文野 誠久、古川 泰三、竹内 雄毅、竹本 正和、坂井 宏平、東 真弓、青井 重善、田尻 達郎	4. 巻 56
2. 論文標題 Tension gastrothoraxをきたした遅発性横隔膜ヘルニア3例の検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本小児外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1123 ~ 1127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11164/jjssps.56.7_1123	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 -

1. 著者名 Yamoto M, Ohfuji S, Urushihara N, Terui K, Nagata K, Taguchi T, Hayakawa M, Amari S, Masumoto K, Okazaki T, Inamura N, Toyoshima K, Uchida K, Furukawa T, Okawada M, Yokoi A, Kanamori Y, Usui N, Tazuke Y, Saka R, Okuyama H	4. 巻 -
2. 論文標題 Optimal timing of surgery in infants with prenatally diagnosed isolated left-sided congenital diaphragmatic hernia: a multicenter, cohort study in Japan	5. 発行年 2020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/s00595-020-02156-7	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 -

1. 著者名 Masahata Kazunori, Usui Noriaki, Nagata Kouji, Terui Keita, Hayakawa Masahiro, Amari Shoichiro, Masumoto Kouji, Okazaki Tadaharu, Inamura Noboru, Urushihara Naoto, Toyoshima Katsuaki, Uchida Keiichi, Furukawa Taizo, Okawada Manabu, Yokoi Akiko, Okuyama Hiroomi, Taguchi Tomoaki	4. 巻 36
2. 論文標題 Risk factors for pneumothorax associated with isolated congenital diaphragmatic hernia: results of a Japanese multicenter study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 669 ~ 677
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-020-04659-3	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 -

1. 著者名 Fuyuki M, Usui N, Taguchi T, Hayakawa M, Masumoto K, Kanamori Y, Amari S, Yamoto M, Urushihara N, Inamura N, Yokoi A, Okawada M, Okazaki T, Toyoshima K, Furukawa T, Terui K, Ohfuji S, Tazuke Y, Uchida K, Okuyama H	4. 巻 -
2. 論文標題 Prognosis of conventional vs. high-frequency ventilation for congenital diaphragmatic hernia: a retrospective cohort study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Perinatology	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) 10.1038/s41372-020-00833-6	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14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Fumino S, Furukawa T, Aoi S, Higashi M, Kim K, Takayma S, Tajiri T
2. 発表標題 Usefulness of navigation surgery for pediatric neoplastic diseases
3. 学会等名 The 53rd Annual Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 文野誠久, 古川泰三, 青井重善, 坂井宏平, 富樫佑一, 坂野慎哉, 浅野麻衣, 本郷文弥, 田尻達郎
2. 発表標題 小児期に診断された多発性内分泌腫瘍症MEN2Bにおける小児外科医の包括的役割と領域横断的治療戦略【外科学再興シンポジウム；遺伝性腫瘍に対する包括的な取り組みと問題点】
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高山勝平, 文野誠久, 坂井宏平, 東 真弓, 青井重善, 古川泰三, 田尻達郎
2. 発表標題 小児領域における術中イメージングとナビゲーション【シンポジウム；小児領域における術中イメージングとナビゲーション】
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古川泰三, 坂井宏平, 東 真弓, 文野誠久, 青井重善, 田尻達郎
2. 発表標題 小児外科疾患手術における他科との合同手術戦略【ワークショップ；小児領域における他診療科との合同手術】
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂井宏平, 東 真弓, 文野誠久, 青井重善, 古川泰三, 田尻達郎
2. 発表標題 当院における小児外科医と医療的ケア児(者)との関わり【パネルディスカッション; 医療の狭間を作らない; トランジション医療や医療児ケアの在り方】
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 文野誠久, 古川泰三, 青井重善, 金 聖和, 高山勝平, 杉山庸一郎, 平野 滋, 打谷円香, 田尻達郎
2. 発表標題 頸部リンパ管奇形に対する積極的外科切除と集学的治療による新たな治療戦略【シンポジウム; 頭頸部リンパ管腫の診断と治療】
3. 学会等名 第16回日本小児耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 文野誠久, 高木大輔, 高山勝平, 金 聖和, 青井重善, 古川泰三, 宮地 充, 家原知子, 相部則博, 田尻達郎
2. 発表標題 小児におけるネスキープを用いた被ばく低減外科治療の提案【シンポジウム; 体内空間可変治療(スパーサー留置治療)の現状】
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第34回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長野心太, 文野誠久, 廣畑吉昭, 高山勝平, 金 聖和, 東 真弓, 青井重善, 古川泰三, 岸田綱郎, 松田 修, 田尻達郎
2. 発表標題 biosheetとdirect reprogrammingによる誘導筋芽細胞による骨格筋シートの開発~腹壁欠損モデルマウスを用いて~【シンポジウム; 泌尿器・多能性幹細胞】
3. 学会等名 第37回日本小児外科学会秋季シンポジウム
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 青井重善, 古川泰三, 坂井宏平, 東 真弓, 文野誠久, 田尻達郎
2. 発表標題 小児外科専門医不在・不足地域での小児外科医療 地方病院との連携・京都府の場合【シンポジウム；小児外科専門医不在・不足地域での小児外科医療】
3. 学会等名 第83回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青井重善, 金 聖和, 古川泰三, 文野誠久, 高山勝平, 東 真弓, 田尻達郎
2. 発表標題 当施設における直腸肛門奇形治療・慢性期管理の要点と問題点【ディベート；直腸肛門奇形術後の排泄管理；私はこちらや管理している】
3. 学会等名 第83回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂井宏平, 東 真弓, 文野誠久, 青井重善, 古川泰三, 田尻達郎
2. 発表標題 当院における医療的ケア児（者）のトランジションの実際【パネルディスカッション；小児外科疾患のトランジションの今後】
3. 学会等名 第83回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Iguchi M, Maniwa J, Kambe K, Higashi M, Fumino S, Aoi S, Furukawa T, Yagyū S, Mazda O, Tajiri T
2. 発表標題 抗GD2抗体発現遺伝子を導入した間葉系幹細胞による神経芽腫新規細胞免疫療法の開発 in vitro結果【優秀演題セッション】
3. 学会等名 第63回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古川泰三, 高山勝平, 坂井宏平, 東 真弓, 文野誠久, 青井重善, 井上匡美, 田尻達郎
2. 発表標題 当院における先天性嚢胞性肺疾患に対する胸腔鏡下肺切除術の工夫
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高山勝平, 坂井宏平, 東 真弓, 文野誠久, 青井重善, 古川泰三, 岸田綱郎, 松田 修, 田尻達郎
2. 発表標題 先天性横隔膜ヘルニアラットモデルを用いた間葉系幹細胞羊水腔投与による胎児治療研究.
3. 学会等名 第 120 回日本外科学会定期学術集会,
4. 発表年 2020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	松田 修  (Mazda Osam)  (00271164)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授   (24303)	
研究分担者	岸田 綱郎  (Kishida Tsunao)  (00370205)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授   (24303)	
研究分担者	東 真弓  (Higashi Mayumi)  (10380453)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教   (24303)	

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	馬庭 淳之介  (Maniwa Junnosuke)  (20847222)	国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医員    (82606)	
研究分担者	坂井 宏平  (Sakai Kouhei)  (30515292)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・客員講師    (24303)	
研究分担者	田尻 達郎  (Tatsuro Tajiri)  (80304806)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・教授    (24303)	

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