

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20K08983
研究課題名（和文）脱細胞・再細胞による再生医療と異種移植によるハイブリッド気道移植モデルの開発

研究課題名（英文）Developing of hybrid tracheal transplantation utilizing regenerative medicine and xenotransplantation

研究代表者
渡邊 洋之助（Watanabe, Hironosuke）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・客員研究員

研究者番号：30457551
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）：まず、脂肪幹細胞単回投与群において拒絶の減弱と気道上皮再生の傾向が認められた。このため、さらなる効果が得られることを目的として、複数回の脂肪幹細胞投与を行うこととした。この結果、脂肪幹細胞投与群において、細径気管支鏡による観察から、気道上皮の再生およびブタ由来グラフトがサル気管内において生着・癒合していることが確認され、病理学的検査により、上皮化が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブタ・サル間の大動物移植モデルにおいて脱細胞化されたブタ臓器骨格をレシピエントのサル由来のADMSCと上皮細胞で再細胞化し、さらにADMSCとを全身投与することで、超急性・急性拒絶を抑制し、かつ気道の再生を促すことにより生着期間が延長されることが確認されたことにより、移植臓器不足の解消につながる異種移植と再生医療分野における新たな治療戦略としての臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In the pilot study, we found that single administration of ADMSC attenuated the rejection of decellularized trachea. Next, utilizing multiple administration of ADMSC, we found that the rejection was attenuated further and the graft showed re-epithelialization by the bronchoscopic examination. In addition, the pathological examination showed the same results, suggesting the graft was accepted.

研究分野：移植免疫学

キーワード：異種移植 再生医療 脱細胞 脂肪幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ドナー不足を解決する手段として臓器再生の可能性が注目されているが、我々は臓器を脱細胞・再細胞化する臓器再生手法に脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADMSC) を加えることで、脱細胞後の再細胞化を促進することを報告した (Doi R ら、2017)。さらに ADMSC を肺移植後に全身投与することで、拒絶抑制にも重要な働きを果たしていることも示した (Watanabe H ら、2018)。

再細胞化による再生医療ではブタの脱細胞組織骨格をヒトに使用することが想定されるが、ブタ脱細胞組織骨格に対するブタをドナーとする異種移植はドナー不足を解決する実践的治療法として世界的に研究が推進されている。しかし、肺や気管などの呼吸器系の異種移植研究は、心臓や腎臓と比し生存日数が短く、殆どが数日である。この理由として呼吸器系臓器の抗原性が高いこと、ブタ気道の毛細血管網が脆弱で既存抗体によりグラフトが短時間で廃絶されることが示されている。一方で、異種移植の超急性・急性拒絶においてはレシピエントマクロファージの細胞膜上の SIRP と、ドナー細胞側のリガンドである CD47 の動物種間での不一致から惹起されるマクロファージの貪食能活性化が重要とされている (Ide ら 2007)。我々のこれまでの研究により、上記経路の活性化を抑制することによりレシピエントマクロファージの活性化が抑制され、異種肺移植の生着日数を 14 日まで延長することに成功した (Watanabe H ら、2019)。今回、これらの研究結果を統合し、ブタ・サル間の大動物異種肺・気管移植モデルにおいて脱細胞化されたブタ臓器骨格をレシピエントのサル由来の ADMSC と上皮細胞で再細胞化し、さらに ADMSC と SIRP 分子薬を全身投与することで、超急性・急性拒絶を抑制しかつ肺の再生を促すことにより生着期間が延長されることが期待され、異種肺移植と肺再生分野における新たな治療戦略としての臨床応用が期待される。

2. 研究の目的

本研究においては、霊長類等の大動物におけるブタ脱細胞骨格の抗原性をまず確認する。

また、ブタ脱細胞骨格を用いた再生気管を霊長類等の大動物に対して同所性に異種移植を行った際の、脱細胞グラフトを長期機能保全・生着させる新たな戦略として、ADMSC 等のグラフト生着増強効果を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

ミニブタの気管を SDS 溶液で 4 週間振盪培養することで脱細胞する。全身麻酔下に、レシピエントサルの鼠径・腰背部の皮下脂肪組織から ADMSC を無菌的に採取し、単離・培養する (移植 28 日前)。十分な量の細胞が培養されていることを確認したうえで、レシピエントサルにおいて、全身麻酔下に気管を露出し、気管欠損部を作成する。気管欠損部に対して、ミニブタ由来脱細胞気管骨格を同所性にサルに移植する (右図)。移植直後に予め培養された ADMSC を経静脈的に投与する。なお、我々の先行実験から脱細胞気管は軟骨を保持しており、再細胞せずとも移植後速やかにレシピエント気管上皮由来粘膜で被覆されることが判明している。今回、SIRP 分子薬については、入手困難であったため、まず、ADMSC による拒絶抑制効果や気道再生効果を検証するために、ADMSC の投与量・回数について、検討を行うこととした。ADMSC の投与回数については、培養細胞量、培養期間から調整を行い、移植前日、当日、術後 1 週目、2 週目、4 週目、6 週目の投与とした。

免疫抑制療法については、MMF 経口投与、FK506 筋肉注射、ステロイド筋肉注射により行った。

術後 56 日目にレシピエントを犠牲死させ、移植された気管グラフトを採取し、病理学的検査を行う。また、レシピエント血清やリンパ球を採取し、血清中のサイトカインや抗ブタ抗体を測定する。



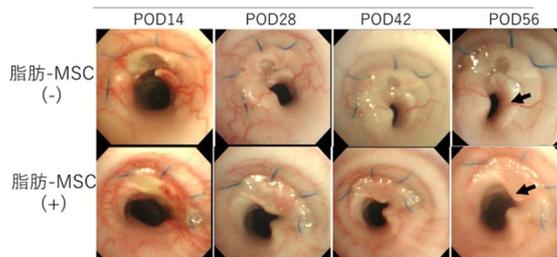
- 1.5 × 1.3cm の脱細胞化 (2% SDS) ブタ気管を移植
- ブタ；クラウン系医用ミニブタ

4. 研究成果

まず、ミニブタ由来の脱細胞気管を同所性にミニブタに移植するパイロット実験においては、拒絶反応は認められず、生着が認められた。

次に、ミニブタ由来脱細胞気管グラフトを同所性に移植し、移植直後に脂肪幹細胞を単回投与した群において、拒絶の減弱と気道上皮再生の傾向が認められた一方、ADMSC 非投与群においては、内腔の狭窄が認められた (右図)。

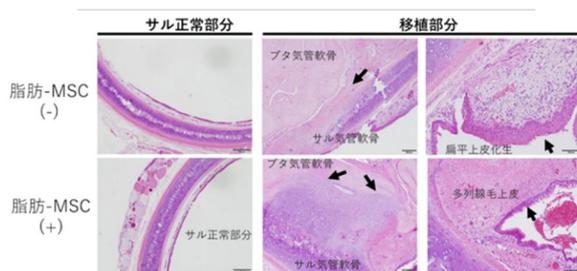
また病理学的検査からはリンパ球の浸潤等



の拒絶反応が認められた（右図）。

このため、さらなる効果が得られることを目的として、複数回の投与を行うこととした。ADMSC 複数回投与群においては、小児用細径気管支鏡を用いた気管内腔の観察により、脂肪幹細胞投与群において、気道上皮の再生およびブタ由来グラフトがサル気管内において生着・癒合していることを確認した。

現在、IL-10 をはじめとした、免疫応答・気道再生にかかるサイトカイン等の測定実験中であり、今後、論文作成予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	土谷 智史 (Tsuchiya Tomoshi) (30437884)	富山大学・学術研究部医学系・特命教授 (17301)	
研究分担者	永安 武 (Nagayasu Takeshi) (80284686)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	
研究分担者	佐原 寿史 (Sahara Hisashi) (90452333)	鹿児島大学・総合科学域総合研究学系・准教授 (17701)	

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