

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08991

研究課題名(和文) 生体内組織形成術を応用した多能性再生幹細胞含有ゲルによる新たな筋肉再生技術の開発

研究課題名(英文) Establishment of a new technique for engineering of muscular tissue using pluripotent-stem-cell containing gel developed from in-body tissue architecture

研究代表者

鈴木 啓介 (Suzuki, Keisuke)

埼玉医科大学・医学部・客員講師

研究者番号：50724887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体内組織形成術により生体に非吸収性の鋳型を埋入して作成されるbiosheetは、横紋筋や平滑筋の再生が可能である。本研究ではbiosheetの細胞・タンパク質を含むゲルを作成し、注入療法による筋肉再生を目指した。

まずマウスのbiosheetの細胞やタンパク質を解析し、間葉系幹細胞(MSC)や肝細胞増殖因子の増多を確認した。次にbiosheetの細胞を生分解性ゲルに懸濁し、MSCを含む多能性再生幹細胞含有ゲルを作成した。これをマウス腹直筋損傷に局注したが損傷14日後までに筋再生効果は認めなかった。biosheetのMSCを単離・懸濁したゲル、タンパク質を含むゲルの開発など改良が必要と考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

biosheetの細胞を含む多能性再生幹細胞含有ゲルは、本研究ではその筋肉再生効果を実証できなかった。しかし、ゲルの開発過程でbiosheetの細胞やタンパク質を解析し、間葉系幹細胞や肝細胞増殖因子など組織再生に関与する因子の存在を確認した。今後は本研究で得られた知見をもとに、これらの因子を精製し濃度を高めたゲルを作成することで、筋肉再生能を有するゲルの開発を目指している。biosheet由来成分を含むゲルによる筋肉再生が可能となれば、胃食道逆流症や鎖肛術後の便失禁など筋肉の低形成・機能不全を有する小児外科疾患に対し、注入療法による筋肉再生という新しい低侵襲な治療法を提供することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Biosheets fabricated using in-body tissue architecture are reported to be able to induce regeneration of striated muscle and smooth muscle. The purpose of this study is to develop an injectable gel which contains cells and proteins of biosheets and to induce regeneration of muscular tissue.

First, we analyzed cells and proteins in biosheets and detected increase of factors which are related to tissue regeneration such as mesenchymal stem cells (MSCs) and hepatocyte growth factor. Next, cells were isolated from biosheets and were suspended in biodegradable gel. The gel was injected to injured rectus abdominis muscles of mice generated by injection of cardiotoxin. However, accelerated reconstitution of muscular tissue could not be achieved until 14 days after injury. It was suggested that development of gels which have more MSCs or proteins extracted from biosheets are required to achieve engineering of muscular tissue.

研究分野：再生医療

キーワード：生体内組織形成術 biosheet 多能性再生幹細胞含有ゲル 筋肉再生 再生医療

### 1. 研究開始当初の背景

直腸肛門奇形では新生児期・乳児期に肛門形成術が施行されるが、先天的に外肛門括約筋が低形成であるため、直腸内に便を十分に保持できず、術後患者の70-80%に便汚染を、半数に便失禁を伴うとされる。浣腸や洗腸による排便コントロールが困難な場合は肛門括約筋形成術が行われるが高難易度で侵襲も大きく確実な効果が得られない<sup>1)</sup>。胃食道逆流症は、重症心身障害児にしばしば合併し、重症例では逆流性食道炎による出血や誤嚥性肺炎を繰り返す。下部食道括約筋が機能障害を有するため異常な一過性弛緩を起こし、胃内容が逆流すると考えられている。外科的に噴門形成術が行われるが、重症心身障害児には侵襲が大きく、術後の再発も10-20%と高い<sup>2)</sup>。

生体内組織形成術 (in-body tissue architecture, iBTA) は生体内で異物を被覆する線維性組織体を形成させる技術である<sup>3)</sup> (図1a)。形状により biosheet, biotube などと呼ばれる。これらを血管、血管弁、気管、横隔膜、角膜などの目的の臓器に移植すると、各々の外・内・中胚葉組織が自律再生することが実証されており、筋組織についても血管の平滑筋<sup>4)</sup>や横隔膜の横紋筋の再生が確認されている<sup>5)</sup>。我々は、この線維性組織体が組織再生に必要な幹細胞やサイトカインを含んでいるのではないかと考えた。

本研究ではバイオシートを処理してその細胞・成長因子を含有し組織再生能を持った注入可能なゲル (以下、多能性再生幹細胞含有ゲル) を開発し、これを低形成や機能不全を有する筋組織に選択的に局所注射して移植することで、移植部の筋肉の修復・再生を誘導することを考案した (図1b)。これにより、鎖肛術後便失禁や胃食道逆流症等の小児外科疾患に対する低侵襲で繰り返し施行可能な再生医療による治療法を開発することを目指した。

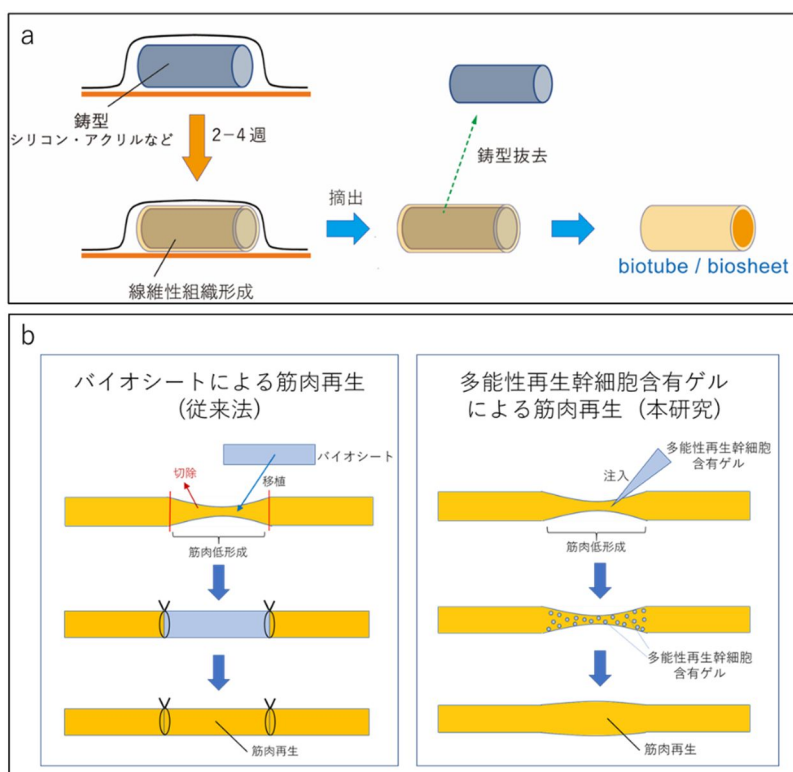


図1 生体内組織形成術と本研究の多能性幹細胞含有ゲル

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、iBTA で作成した biosheet を処理して注入可能な組織再生能を有する多能性再生幹細胞含有ゲルを作成し、注入療法による筋肉再生を確立することである

本研究ではまず、biosheet に含まれる細胞、タンパク質を解析し、biosheet が組織再生に必要な幹細胞や増殖因子を有しているかを検討した。さらに、biosheet から細胞を単離して Puramatrix™ に懸濁したゲルを作成し、マウスの腹直筋損傷モデルに局所注射して筋肉再生能を検討した。

### 3. 研究の方法

(1) biosheet の作成：全身麻酔下にシリコンの板状の鋳型をマウス (C57BL/6J, 6 週齢, 雌) の背部皮下に埋入し、2 週、4 週後に周囲に形成される biosheet を採取し、それぞれ 2w-biosheet, 4w-biosheet とした。また biosheet の比較対照として鋳型埋入前の皮下組織 fascia を採取した。

(2) biosheet の細胞の解析：biosheet, fascia を細切、0.1%コラゲナーゼで処理し細胞を単離した。中胚葉系の細胞への多分化能を有する幹細胞である間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem/stromal cell, MSC) をターゲットに細胞表面マーカーに対する蛍光標識抗体で多重染色し、フローサイトメトリーで解析した。

(3) biosheet のタンパク質の解析：biosheet, fascia よりタンパク質を抽出し、DIA (Data independent acquisition 法) によるプロテオーム解析 (タンパク質の網羅的解析) を行い、fascia と比較して biosheet で増加している組織再生に関与しうるタンパク質を検索した。

(4) マウス腹直筋損傷モデルの作成：マウス (C57BL/6J, 6 週齢, 雌) を仰臥位で腹部皮膚を剥離し、腹直筋に Cardiotoxin (10 mM) 30  $\mu$ l を局所注射した。day2 に局所注射した腹壁を摘出し、筋損傷を組織学的に評価した。

(5) 多能性再生幹細胞含有ゲルの作成と腹直筋損傷モデルに対する筋再生効果の検討 PuraMatrix™ は生分解性であり、生理学的条件下でゲル化し、細胞やタンパク質の担体として使用されている。GFP マウス (C57BL/6-Tg(CAG-EGFP), 6 週齢, 雌) で作成した 2w-biosheet より細胞を単離して PuraMatrix™ に  $3.3 \times 10^7$  cells/ml に懸濁し、多能性再生幹細胞含有ゲルを作成した。(4)で作成した腹直筋損傷モデルの Cardiotoxin 投与 2 日後 (day 2) に同部位に同ゲル ( $1.0 \times 10^6$  cells/30  $\mu$ l) を局所注射した。day7, day14 に腹壁の筋損傷部を摘出し、筋修復・再生について評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) biosheet の細胞の解析

2w-biosheet, 4w-biosheet, fascia より細胞を単離し、MSC の細胞表面マーカーについてフローサイトメトリー解析を行い比較した。まず、4w-biosheet の細胞を用いて CD31、CD45 に共に陰性の細胞集団を間質細胞とし、MSC で報告されている Sca-1、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD146 を陽性マーカーとして間質細胞中の発現率を計測した。その結果、Sca-1 が 83.5%、CD90 82.5%、CD29 91.4%、CD44 38.0%と陽性の細胞集団を認めたのに対し、CD73 2.4%、CD105 2.7%、CD146 0%であり陽性細胞は少数であった。さらに、陽性の細胞集団を認めた Sca-1、CD90、CD29、CD44 の抗体で多重染色し、2w-biosheet の細胞でフローサイトメトリー解析を行ったところ、間質細胞中にこの 4 マーカーに共陽性示す細胞集団の存在を認めた (図 2a)。この細胞集団を quadruple-positive cells と呼称し、MSC の候補の細胞集団と考え、fascia と biosheet で間質細胞中の存在比率を比較すると、2w-biosheet, 4w-biosheet で fascia より有意に増加していた (図 2b)。以上より biosheet に MSC が存在することが示唆された。

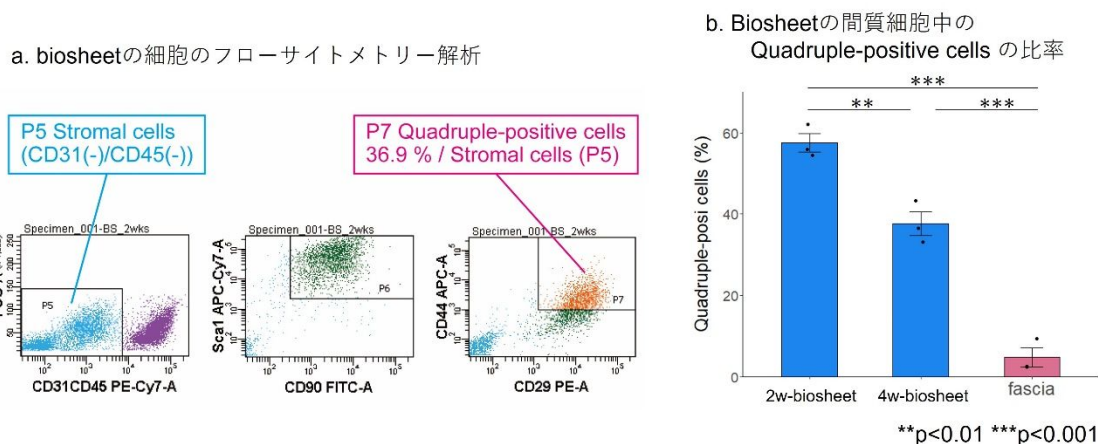


図2 biosheetの細胞表面マーカーの解析とMSC

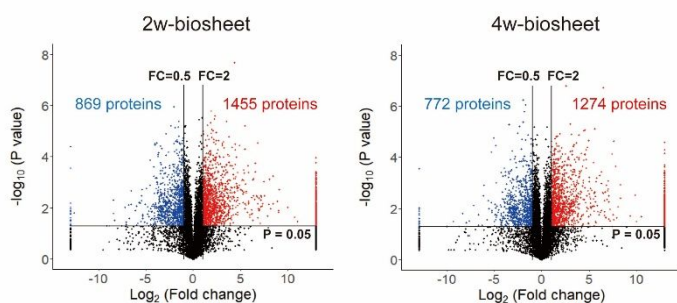
#### (2) biosheet のタンパク質の解析

2w-biosheet, 4w-biosheet, fascia のプロテオーム解析を行い比較した。計 9,048 種類のタンパク質が同定された。fascia と比較して biosheet での定量値が fold change > 2 かつ p < 0.05 のタンパク質を上昇、fold change < 0.5 かつ p < 0.05 のタンパク質を低下していると定義する



と、2w-biosheet では 1,455 種類のタンパク質が上昇、869 種類のタンパク質が低下し、4w-biosheet では 1,274 種類が上昇、772 種類が低下していた (図 3a)。biosheet で上昇していたタンパク質群の遺伝子について KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway を用いてパスウェイ解析を行ったところ、Hepatocellular carcinoma や Renal cell carcinoma などの悪性腫瘍のパスウェイに有意差が認められ、biosheet の組織再生と関与を疑った。これらのパスウェイに含まれ biosheet で上昇していたタンパク質の遺伝子を確認したところ、代表的な増殖因子であり再生医療にも応用されている HGF (肝細胞増殖因子、hepatocyte growth factor) が含まれていた。ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) 法により biosheet 中の HGF の定量解析を行ったところ、2w-biosheet, 4w-biosheet で約 10 倍の差を持って fascia より有意に増加していた (図 3b)。

a. biosheetとfasciaのプロテオーム解析の比較



b. ELISAによるHGFの定量

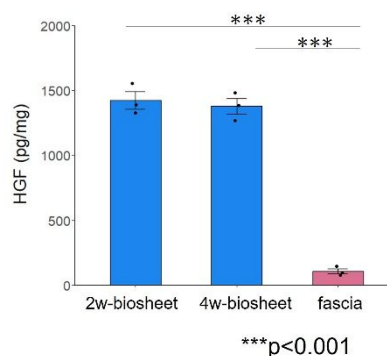
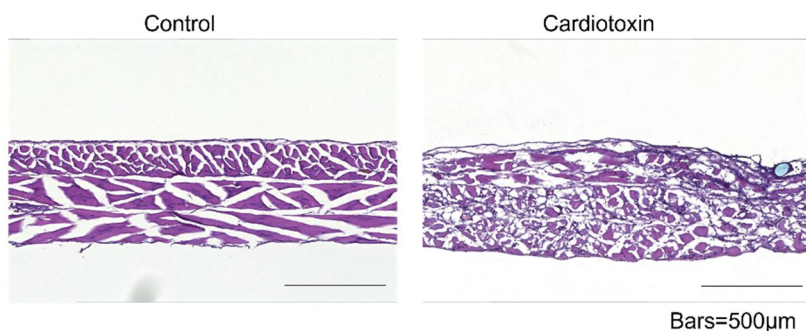


図3 biosheetのプロテオーム解析とHGFの定量

### (3) マウス腹直筋損傷モデルへの多能性再生幹細胞含有ゲルの局所注射と筋肉再生能の評価

(1)(2)より biosheet に MSC や HGF が多く含まれることが示唆され、biosheet の細胞やタンパク質を含むゲルが、筋肉などの組織再生能を有すると推察した。本研究ではまず、biosheet の細胞を PuraMatrix™ に懸濁し、MSC を含有する多能性再生幹細胞含有ゲルを作成し、筋肉再生能を検討した。

マウスの腹直筋に Cardiotoxin を局所注射し、day2 に組織学的評価を行ったところ筋線維の萎縮と線維性組織の増生を認め、腹壁筋損傷モデルとした (図 4)。



Bars=500μm

図4 Cardiotoxinによる腹壁筋肉損傷モデル

GFP 陽性の biosheet から単離した細胞を PuraMatrix™ に懸濁した多能性再生幹細胞含有ゲルを day2 の腹直筋損傷モデルに投与し day7, day14 に筋肉再生を組織学的に評価した。day7 (図 5a), day14 (図 5b) とともに損傷部の腹直筋内に GFP 陽性のゲル由来の細胞を認めたが、筋線維の萎縮や線維性組織の増生は細胞を含まないゲルを局所注射した Control と明らかな差はなく、多能性再生幹細胞含有ゲルの筋肉再生効果は確認できなかった。

本実験では、ゲル中の細胞に含まれる MSC の比率が少なく、筋再生効果を発揮できなかったと推察され、biosheet の MSC より特異的細胞表面マーカーを用いて MSC を単離し、MSC の純度の高いゲルを作成することが必要と考えられた。またその他にも、HGF などの biosheet 由来のタンパク質を含むゲル、biosheet の細胞とタンパク質を組み合わせたゲルなど、ゲルの調製方法を検討し、筋肉再生能を有する多能性再生幹細胞含有ゲルを開発することを引き続き計画している。

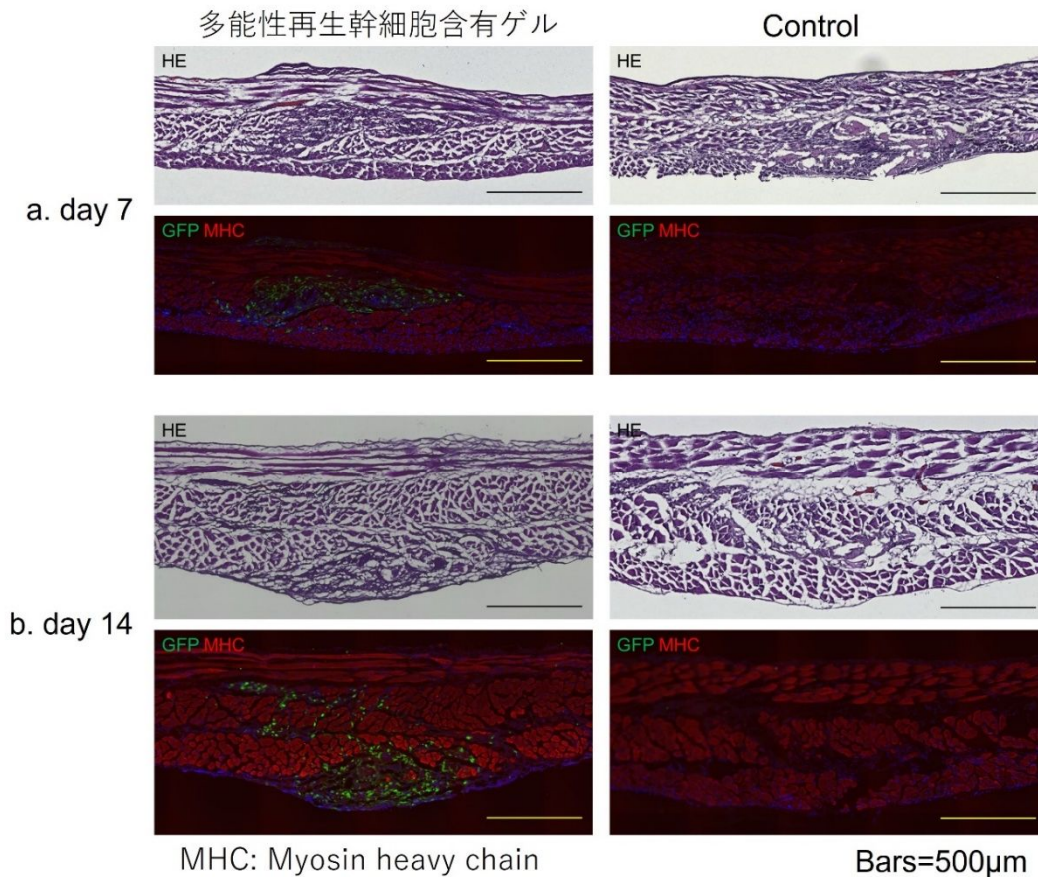


図5 腹壁筋損傷モデルへの多能性幹細胞含有ゲルの投与実験

<引用文献>

- 1) Kyrklund K, Pakarinen MP, Rintala RJ. Long-term bowel function, quality of life and sexual function in patients with anorectal malformations treated during the PSARP era. *Semin Pediatr Surg* 26, 2017,336–342.
- 2) Knatten CK, Kvello M, Fyhn TJ, et al. Nissen fundoplication in children with and without neurological impairment: A prospective cohort study, *J Pediatr Surg*, 51, 2016, 1115–1121.
- 3) Nakayama Y I-UH, Takamizawa K. In Vivo Tissue-Engineered Small-Caliber Arterial Graft Prosthesis Consisting of Autologous Tissue (Biotube). *Cell Transplant* 13, 2004, 439-449.
- 4) Watanabe T, Kanda K, Nakayama Y, et al. Autologous small-caliber "biotube" vascular grafts with argatroban loading: a histomorphological examination after implantation to rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 92, 2010, 236-242.
- 5) Suzuki K, Komura M, Nakayama Y, et al. Engineering and repair of diaphragm using biosheet (a collagenous connective tissue membrane) in rabbits. *J Pediatr Surg* 53, 2018, 330-334.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木啓介, 藤代準, 吉田真理子, 高澤慎也, 古村浩子, 浅輪幸世, 金澤三四朗, 中山泰秀, 古村眞
2. 発表標題 生体内組織形成術iBTAの発展とbiosheet/biotubeによる臓器再生の小児外科疾患への応用の未来
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木啓介, 古村浩子, 紺野亮, 川島祐介, 渡辺栄一郎, 高澤慎也, 吉田真理子, 藤代準, 中山泰秀, 古村眞
2. 発表標題 biosheetを用いた臓器再生の小児外科疾患への応用と再生メカニズムの解析
3. 学会等名 第60回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2023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	古村 眞  (Komura Makoto)  (10422289)	東京大学・医学部附属病院・特任教授   (12601)	
研究分担者	中山 泰秀  (Nakayama Yasuhide)  (50250262)	東京大学・医学部附属病院・客員研究員   (12601)	

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	足田 温彦  (Hikita Atsuhiko)  (60443397)	東京大学・医学部附属病院・特任教授    (12601)	
研究分担者	藤代 準  (Fujishiro Jun)  (60528438)	東京大学・医学部附属病院・教授    (12601)	

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