

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22959

研究課題名（和文）横隔膜ヘルニア中動物モデルを用いたエクソソーム気管内投与による新規胎児治療の開発

研究課題名（英文）Development of new fetal treatment by intra-tracheal administration of exosome using an animal model of diaphragmatic hernia

研究代表者

高山 勝平（Takayama, Shohei）

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：50883162

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000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）：The congenital diaphragmatic hernia (CDH) was to be studied for therapeutic efficacy when MSC-derived EVs administration was administered after tracheal occlusion (TO), which has already been clinically applied using a medium-sized animal (rabbit), with the ultimate goal of developing a new treatment. TO on fetal rabbits under intravenous anesthesia resulted in a stabilized success rate. On the other hand, for the MSC experiment, we used rat lung buds, which have been used for a long time, to confirm the difference in the direct and paracrine effects of MSCs before exosome extraction, but we could not proceed to exosome extraction because no significant difference was observed in the surface area and number of branches of lung buds.

研究分野：小児外科

キーワード：先天性横隔膜ヘルニア エクソソーム 間葉系幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) 先天性横隔膜ヘルニア (congenital diaphragmatic hernia: CDH) 最重症例に対し、胎児鏡により気管閉塞を行う fetoscopic endoluminal tracheal Occlusion (FETO) が施行されるようになり、生後の救命率が 24% から FETO 使用で 49% に上昇したと報告されている (Semin Fetal Neonatal Med, 2014)。しかし今後生存率の更なる向上を図る為には、FETO 施行と同時に実施可能な胎児治療法の開発を行うことが急務であると考えられる。
- (2) 一方、間葉系幹細胞 (mesenteric stem cells: MSC) は組織修復能を有し、再生医療・細胞治療におけるソースとして研究利用されているが、MSC 自体に腫瘍原性、免疫適合性、微小血管内塞栓形成といったリスクがあり、臨床応用という観点からはまだまだ課題が多い。しかし MSC から分泌されるエクソソーム/細胞外小胞 (extracellular vesicles: EVs) は、MSC の周囲組織に及ぼす作用機序の一つである paracrine 作用において重要な役割を担うとされており、MSC 投与と同様の治療効果を MSC 由来 EVs が有するとする報告もあり、さらに MSC 由来 EVs 投与は、cell-free therapy にあたり、MSC 関連合併症を回避できるメリットがある (Am. J Respir. Cell Mol. Biol, 2014)。

### 2. 研究の目的

- (1) CDH の最重症例においては、出生時既に致死的な極度肺低形成をきたしており、胎児期における治療介入が希求されている。研究者は、これまでニトロフェン誘導 CDH ラットモデルを用い、MSC を羊水腔に投与することで、CDH に伴う低形成肺を成熟させる作用があることを報告した (Takayama S, et al; Pediatr Surg Int. 35: 1353-1361, 2019)。
- (2) 本研究では、ウサギ CDH 胎仔モデルを作成し、既に臨床応用されている TO を行った上で、MSC 由来 EVs を投与し、さらなる肺成熟作用を有するかを検討する事を目的としている。

### 3. 研究の方法

- (1) MSC の細胞間作用の確認: Human Amniotic Mesenchymal Stromal Cells (hAMSC) を継代して増殖し、肺芽培養条件に応じてコラーゲン膜 (CM-24、KOKEN) の表面もしくは裏面に  $6.4 \times 10^4$  播種して 1 日培養する。妊娠 13.5 日のラット胎仔から胚芽を摘出し予め準備しておいたコラーゲン膜上におき、72 時間気液培養する。肺芽と hAMSC を共培養しない群を Control 群、hAMSC を表面で培養して肺芽を共培養する群を Co-culture 群、hAMSC を裏面で培養して肺芽と共培養する群を Separate-culture 群とする。24 時間毎に倒立位相顕微鏡で撮像し、72 時間後と培養開始時の肺芽表面積、肺芽分岐数の増加率を比較する。
- (2) MSC 由来 EVs の抽出:  $5 \times 10^6$  個の hAMSC を無処置の成熟胎児肺組織と共培養し、80-90% コンフルエントに達した時点で -MEM 培地に交換し 6 時間後、上清より EVs 抽出カラム (qEV) を用いて MSC 由来 EVs を抽出する。ナノサイト NS3000 で抽出した MSC 由来 EVs を解析する。EVs の投与量は、hAMSC  $1.0 \times 10^6$  個内に含まれる VEGF 量を測定し、タンパク量が同一となるよう濃度調整したものを使用する。
- (3) CDH-TO モデル作成と hAMSC の投与: New Zealand White rabbit の妊娠ウサギ (term 31 days) を使用する。妊娠 23 日に吸入麻酔下に開腹し CDH モデルを作成する。開腹し子宮壁に小切開をおき、胎仔を導出したのち左下位肋間を開胸し、左横隔膜に切開を加え人工的に CDH を作成する。妊娠 28 日に妊娠ウサギを再開腹し、子宮壁に切開を入れ胎仔頭頸部を露出させる。頸部正中切開で気管を露出させ、濃度調整を行った MSC 由来 EVs/300  $\mu$ l (PBS) を気管内に注入したのち閉鎖する。A 群: Normal、B 群: TO のみ、C 群: TO+MSC 由来 EVs とし、妊娠 31 日に帝王切開にて胎仔を摘出し、各群において下記の比較検討し成熟度を判断する。

### 4. 研究成果

- (1) MSC の細胞間作用の確認: コラーゲン膜上で肺芽の培養は成功したが、培養の成功率は安定化には至らなかった。培養成功群の 3 群比較をおこなった。肺芽表面積の増加率 (Surface: E13+3/E13) は Control vs Co-culture 0.65 (n=3)、Control vs Separate culture 0.13 (n=4)、Co-culture vs Separate-culture 0.75 (n=4) (Steel-Dwass 検定,  $P < 0.05$ ) と有意差認めなかった。また、肺芽分岐数の増加率 (Budding: E13+3/E13) においても Control - Co-culture 0.13 (n=3)、Control - Separate-culture 0.43 (n=4)、Co-culture - Separate-culture 0.99 (n=4) (Steel-Dwass 検定,  $P < 0.05$ ) と有意差認めなかった。(図 1, 図 2)
- (2) MSC 由来 EVs については抽出条件などの設定中である。
- (3) CDH-TO モデル作成: MSC 由来 EVs 投与前に、CDH-TO モデル作成の安定化をはかる目的で SHAM 手術を施行した。長時間手術では全例死亡につながる事から、双角子宮の左右 1 匹ずつに手術操作を加えた。また母体耳介静脈より術中補液し、イソフルランによる吸入持続

麻酔、閉創時腹腔内輸液を行う事で生存率が上昇し CDH-T0 手術完遂例は最終 32%と安定化した(図 3)。

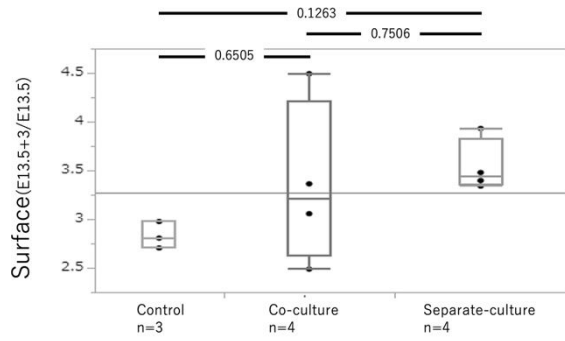


図1 胚芽表面積の増加率

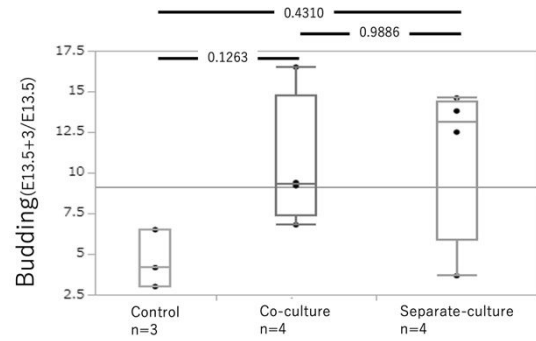


図2 肺芽分岐数の増加率

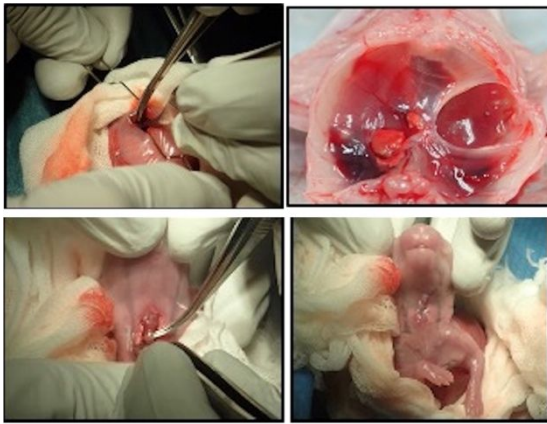


図3 ウサギ胎仔のCDH作成およびTO

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

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 無
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 -

〔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 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

1. 発表者名 高山勝平
2. 発表標題 当科における過去 10 年の急性虫垂炎治療における検討
3. 学会等名 第 82 回日本臨床外科学会総会,
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------