

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08887

研究課題名(和文) 臍帯組織、臍帯血より抽出した細胞による人工気管作製による気道再生法の確立

研究課題名(英文) Establishment of tracheal regeneration method using cells extracted from umbilical cord tissue

研究代表者

小山 正三郎(OYAMA, Shozaburo)

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：20815972

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)：人工気管の臨床応用における問題は、大量の細胞を要すること、移植臓器への早期の血管ネットワークの構築、量的な幹細胞の供給である。これを解決する方法として、臍帯組織および臍帯血より抽出した各種の細胞(間葉系幹細胞、脂肪幹細胞、臍帯由来血管内皮細胞)を、軟骨細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞へ分化誘導し、気管様構造体として3Dバイオプリンティングで再構築するというコンセプトモデルを提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、臍帯組織から豊富に採取できる多様な再生医療用細胞を用いて、軟骨細胞、気道平滑筋細胞、血管内皮細胞を組み合わせることで気管様構造体を3Dバイオプリンティング技術で組み上げるという、人工気管の作製法を提案した。これは組織バンクの確立によって再生医療用細胞源として大きく期待される臍帯組織を用いて、細胞種の組み合わせを変えることでより機能的な気管の作製や、肺などのほかの呼吸器の再生医療への応用への第一歩となりうる。

研究成果の概要(英文)：Problems in the clinical application of artificial tracheas are the need for large numbers of cells, the early establishment of a vascular network for the transplanted organ, and the quantitative supply of stem cells. To solve these problems, we proposed a conceptual model in which various types of cells (mesenchymal stem cells, adipose stem cells, and cord-derived vascular endothelial cells) extracted from umbilical cord tissue and cord blood are induced to differentiate into cartilage cells, smooth muscle cells, and vascular endothelial cells and reconstructed as trachea-like structures by 3D bioprinting.

研究分野：医用生体工学・生体材料学

キーワード：臍帯組織 人工気管 3Dバイオプリンティング

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで我々は3Dバイオプリンターを用い、様々な種類の細胞を用いた人工気管の作製、移植を行ってきた(Taniguchi, 2018, ITCVS, Machino, 2019, Adv Healthc Mater)。しかし、大量の細胞を必要とする再生医療において細胞源の確保が重要な課題となっている。そこで、臍帯組織および臍帯血は、間葉系幹細胞、神経系細胞、血管内皮細胞などの組織再生に必要な各種の細胞を含有している点に加え、臍帯組織バンクからの豊富な細胞供給が期待できる点においても、再生医療における重要な細胞源として期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、人工気管作製における細胞源としての臍帯組織および臍帯血の有効性を評価し、臨床応用へ向けた使用法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 人工臓器内における臍帯組織、臍帯血より抽出した各細胞の血管形成、組織形成における有効性の検討:

臍帯組織、臍帯血は、長崎大学病院臨床研究倫理委員会の承認後、同意が得られた妊婦より、破棄予定の胎盤付属物から採取する。臍帯組織より、Wharton's jelly 組織、臍帯動脈、臍帯静脈を機械的に分離する。臍帯動脈はそれぞれを酵素処理にて細胞を単離し、臍帯血より骨髄由来間葉系幹細胞を採取する。免疫染色による各種細胞を評価確認する。

上記細胞を用いた人工気管を作成し、これまで作成してきた人工気管との *in vitro* での比較検討を行う。組織学的評価、各種細胞の構造体内での分布(免疫染色による血管新生、軟骨などの評価)、および機械的強度評価、グリコサミノグリカン定量試験を行う。

(2) 臍帯組織、臍帯血より抽出した各細胞による人工気管の移植による生体での評価と大口人工気管の作製:

上記で選定した細胞を用いて、まずラットでの気管移植を行っていく。3D 組織での間葉系幹細胞、Wharton's jelly 組織細胞(神経原性細胞、軟骨幹細胞、脂肪幹細胞など)の分化、分布、血管構造体形成、移植時組織適合の評価を行い、より臨床へ向けた人工臓器における臍帯組織、臍帯血の役割と重要性について明らかにする。また引き続き可能であれば、大口の人工気管を作製し大型動物(ブタ)での移植実験を試みる。

4. 研究成果

臍帯組織からの間葉系幹細胞の単離については、婦人科との協力のもと実験開始できた(図1)。臍帯組織由来の間葉系幹細胞を抽出し、培養試薬とプロトコールは市販のものを用いた。これまでの研究(Taniguchi, 2018, ITCVS, Machino, 2019, Adv Healthc Mater)の結果から、人工気管内における間葉系幹細胞の局在や軟骨細胞への分化誘導法に関する知見を有していたため、人工気管作製においてこれまで未開発であった気道平滑筋の調達を優先させた。

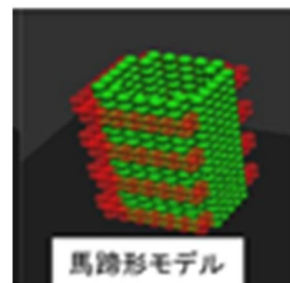
気管軟骨に気道平滑筋による膜様部様構造を併存させた馬蹄系の人工気管をコンセプトモデルとして作製する方針とした(図2)。



図1

Wharton's jelly 組織からは酵素処理によって脂肪幹細胞が単離できることが分かっている。そこで、貴重な臨床検体の胎盤組織由来 Wharton's jelly 組織から脂肪幹細胞の単離を進めると同時に、市販細胞株から入手可能な脂肪組織由来間葉系幹細胞由来の脂肪幹細胞から平滑筋細胞を分化誘導する方法の開発を行った。脂肪幹細胞から平滑筋細胞へ分化誘導する新たなプロトコールを確立し、平滑筋マーカー(SMA, Calponin, SMMHC)の免疫染色に加え、それぞれの遺伝子発現(CTA2, CNN1, MYH11)を定量PCRで調べ、機

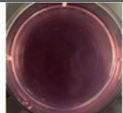
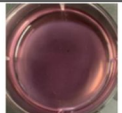
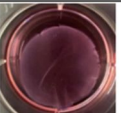




図2



馬蹄形モデル

能評価として筋収縮アッセイでプロトコルの有用性を実証した(図3)(論文執筆中のため詳細データ非呈示)。また、上記のコンセプトモデル作製へ向けてスフェロイドとし、3Dバイオプリンターで構造体の材料として応用できることを確認した(図4)。

図3

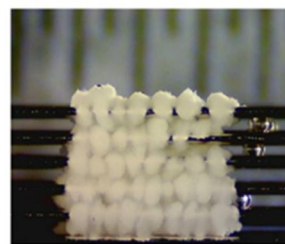
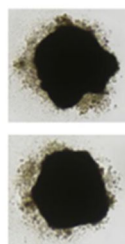
ET(+)	DMEM	TG	protocol	p-value
24h後				
CR, mean (range)				

脂肪幹細胞から平滑筋細胞への分化誘導法を、Wharton's jelly 組織から採取した脂肪幹細胞において再現する実験の途中にある。ほかに臍帯組織からは各種の細胞を単離できるため、至適な人工気管の探求のための各種細胞選定が本研究の最大の課題である。我々のこれまでの研究(Taniguchi, 2018, ITCVS)において気管作製における血管内皮細胞による血管網構築の有用性が明らかになっている。そのため、臍帯組織由来血管内皮細胞、間葉系幹細胞由来の軟骨細胞、脂肪幹細胞由来の平滑筋細胞を組み合わせることで、人工気管の作製を行っている。現在、解析段階にあり(データ不記載)同実験が完了次第、in vitroでの比較検討実験を行う予定である。

図4

rADSC spheroid
protocol day2

積層



以上より、本研究では、まだ研究段階にあるものの、豊富な細胞種を含有する臍帯組織から、人工気管作製へ必要な細胞を単離し、人工気管構造を作製できる可能性を示した。

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	松本 桂太郎 (Matsumoto Keitaro) (80404268)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・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	三浦 清徳 (Miura Kiyonori) (00363490)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	
研究分担者	朝重 耕一 (Tomoshige Koichi) (70457547)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員 (17301)	
研究分担者	町野 隆介 (Machino Ryusuke) (90728081)	長崎大学・病院(医学系)・助教 (17301)	
研究分担者	谷口 大輔 (Taniguchi Daisuke) (20773758)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員 (17301)	

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	田浦 康明 (Taura Yasuaki) (60437887)	長崎大学・病院(医学系)・助教 (17301)	
研究分担者	野中 隆 (Nonaka Takashi) (30606463)	長崎大学・病院(医学系)・准教授 (17301)	
研究分担者	岩竹 真弓 (Iwatake Mayumi) (40624614)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員 (17301)	

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