

令和元年6月2日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11359

研究課題名(和文)インプラント型自己細胞再生軟骨を用いた小児気道再建に関する研究

研究課題名(英文) Study on pediatric airway reconstruction using implant autologous cell regeneration cartilage

研究代表者

淵本 康史 (FUCHIMOTO, YASUSHI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任教授

研究者番号：40219077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ブタ耳介軟骨から採取した軟骨細胞を培養し、ポリ乳酸多孔体(PLLA)を足場としてブタの皮下に移植すると、数週間でインプラント型再生軟骨の作成に成功した。この際に耳介皮下よりも腹部皮下に移植した方が良いこと、ならびに移植時にbFGFを注入することにより軟骨形成が促進されることが確認された。

ブタの気管1/2周径を切除し、インプラント型軟骨をパッチグラフトとして移植を行った。移植後11週の気管支鏡ではパッチ部の内腔の狭小化を認め、病理組織では散在性に小軟骨を認めるも炎症性細胞浸潤ならびに癒痕形成を認めた。以上の所見は足場に使用したPLLAに対して異物反応が惹起され癒痕線維化が起こったと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長期気管内挿管や気管切開後に生じる抜管困難症や先天性声門下狭窄症に対して、再生軟骨のパッチ移植は有効であると思われる。当該研究では軟骨細胞を吸収性素材のポリ乳酸多孔体(PLLA)を足場とした組織工学手法を利用して小児の成長に即応したインプラント型再生軟骨を形成することが確認された。しかし、インプラント型再生軟骨を気管孔にパッチ移植するとPLLAに対する反応性から気管内腔の狭窄をきたした。反応性の少ない足場素材を開発すれば、患児の成長とともに大きくなる再生気管軟骨を作成することができる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Chondrocytes collected from porcine auricular cartilage were cultured, and implanted in the subcutaneous of pig using PLLA as a scaffold, we succeeded in creating an implanted regenerated cartilage in several weeks. At this time, it was confirmed that it is better to implant subcutaneously in the abdomen than in the auricle, and that injection of bFGF at the time of transplantation promotes implanted chondrogenesis. Half of tracheal circumference diameter was excised and transplanted an implant type cartilage as a patch graft. After 11 weeks of transplantation, bronchoscopy revealed a narrowing of the lumen around the patch area, and in the pathological tissue, scattered cartilage and small cartilage were found, but inflammatory cell infiltration and scar formation were also observed. The above findings suggest that foreign body reaction was induced to PLLA used for scaffolding and scar fibrosis occurred.

研究分野：小児外科、再生医療、腫瘍免疫

キーワード：気管再生 組織工学 軟骨細胞 PLLA インプラント型 ブタ FGF

## 1. 研究開始当初の背景

近年、重症新生児疾患に対して積極的に人工呼吸管理が行われるようになり、長期気管内挿管の合併症として声門下狭窄症が問題となってきた。また気管切開を行なった後に病状が安定し、閉鎖しようとしても気管狭窄の恐れがあるために、閉鎖に踏み切れずそのままの状態が維持され、著しくQOLが低下している症例も少なくない。更には声門下狭窄症に対して自己肋軟骨パッチ移植が行われているが、大きさの制限などもあり、再狭窄を起こしやすいことが問題となっている。

このような症例に対し、近年研究の進展がめざましい組織工学気管の応用はきわめて期待のできる治療と考えられる。具体的には動物実験の結果を踏まえてポリプロピレンメッシュとコラーゲンスポンジを組み合わせた足場を用いた再生気管のパッチグラフトを、甲状腺がん患者へ臨床応用している (Omori K et al. Ann Otol Rhinol Laryngol 2005)。また2008年には、死体からの気管を酵素により脱細胞化し、それに自己間葉系細胞と気管粘膜上皮を bioreactor にてシーディングして作成した気管を成人に移植している (Macchiarini P et al. Lancet 2008, Lancet 2014)。しかしながら、まだその有効性は十分には証明されていないのが現状である。更に小児気管の欠損修復の場合、発育に伴う気管の成長を十分に勘案する必要があるが、これらの治療法は成長に伴う大きさの変化がないなどの問題がある。そのため本研究は小児の成長とともに大きくなる再生気管軟骨を作成し、気道再建を行うことである。

## 2. 研究の目的

長期気管内挿管や気管切開後に生じる抜管困難症や先天性声門下狭窄症に対して、非吸収性素材や脱細胞化同種気管が足場素材として使用されているが、吸収、感染とともに小児の場合、再生気管の成長が見られないことが問題となる。当該研究では軟骨細胞をアテロコラーゲンハイドロゲルと混和し、吸収性素材のポリ乳酸 (PLLA) 多孔体を足場とした組織工学手法を利用して小児の成長に即応したインプラント型再生軟骨を形成し、患児の成長とともに大きくなる再生気管軟骨を作成し、気道再建を行うことが目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) ブタインプラント型再生軟骨の作製 (目的1)

幼若ブタの耳介のから少量 (5-10 mm) の軟骨を採取して軟骨細胞を取り出す。この軟骨細胞を培養し、細胞を数にして約 200 ~ 1000 倍にまで増やす。その細胞を、アテロコラーゲンハイドロゲルとポリ乳酸多孔体によって構成される再生医療用の特殊な素材 (足場素材) に注入した後、軟骨細胞を採取したブタの皮下、大網などに移植し、移植後 4 週、8 週で摘出してインプラント型再生軟骨の作製を評価する。この際に以下の点を考慮してインプラント型再生軟骨作成のための最適条件を決定する。

軟骨形成促進物質である FGF、TGF- $\beta$ 、IGF、BMP2 の投与での比較

軟骨細胞の培養増加率 (培養期間) による再生軟骨作成量の評価

足場 + 培養軟骨細胞の移植部位: 腹部皮下、耳介部皮下、大網内などの比較

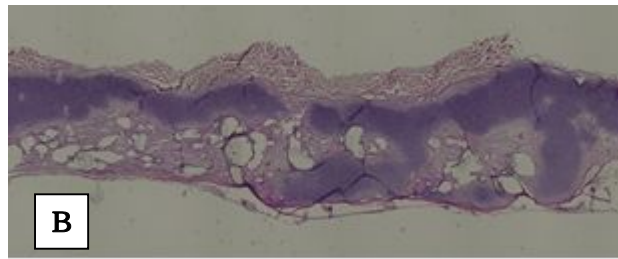
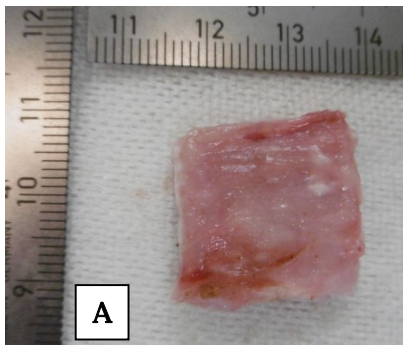
摘出された再生軟骨は組織学的検討 (H&E 染色、SafraninO 染色、ToluidineBlue 染色) を行う。

### (2) インプラント型再生気管パッチグラフト移植実験 (目的2)

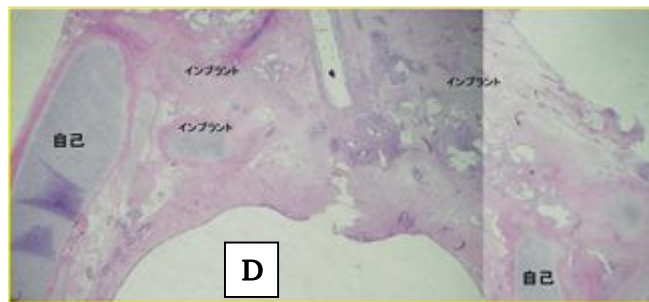
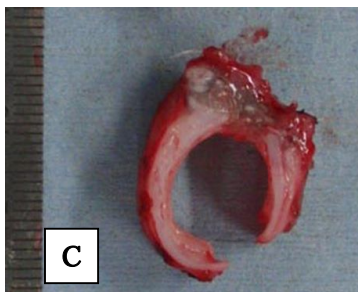
耳介軟骨から作成したインプラント型再生気管を軟骨細胞採取したブタを用いて、全身麻酔下に移植する。具体的には気管を 1/2 ~ 2/3 周を切除し、切除した気管の孔をインプラント型再生軟骨のパッチグラフトとして 4-OPDS 縫合糸を使用して縫合し塞ぐ手術を行う。再生軟骨を気管孔にパッチとして縫合し、移植後の気道の開存状態について確認する。移植後、全身麻酔下で気管挿管を行い 3.2mm の気管支鏡 (マチダ製) にて内腔の状態を移植後 1, 2, 3 週に経時的に評価する。移植後 4 週で気道を摘出して、気管の内径を解剖学的に確認し、パッチ部位の粘膜上皮の再生について組織学的に確認する。また、気管軟骨と再生軟骨の癒合について組織学的に検討する。

## 4. 研究成果

ブタの耳介軟骨から分離した軟骨細胞は培養により急激に増殖すること、ならびにその培養細胞を poly-L-lactic acid (PLLA) を足場としてヌードラットの皮下に移植してインプラント型の軟骨細胞を作成することができることを確認している。ブタのインプラント型気管軟骨の作成のために、耳介軟骨から採取した軟骨細胞を培養し、それを PLLA を足場としてブタ皮下移植を行いインプラント型再生軟骨を作成した。この際に耳介皮下よりも腹部皮下に移植した方が良いこと、ならびに移植時に bFGF を注入することによりインプラント型軟骨形成が促進されることが確認できた (図 A)。組織学的にも十分な軟骨形成が確認された (図 B)。



前述で作成した耳介から軟骨細胞を採取したブタの気管 1/3～1/2 周径を切除し、パッチグラフトを行った。移植後 5 週で挿管後に気管支鏡検査、犠牲死後に病理組織検査を行った (N=3)。気管支鏡検査では内腔の狭小化を認め、病理組織では散在性に小軟骨をみとめるも炎症性の細胞浸潤ならびに癒痕 (線維化) の形成を認めた。以上の所見は PLLA(2 社) に対して異物反応、炎症が惹起され癒痕線維化が起こり、内腔が狭窄したと思われた。更に 11 週では気管支鏡検査にて 5 週時よりも内腔の狭小化がみられ (図 C)、病理組織では 5 週と同様に PLLA に対して異物反応による炎症性細胞浸潤ならびに癒痕 (線維化) の形成を認めた (図 D)。



現時点で使用している PLLA を足場としたインプラント軟骨は IN VIVO の移植で気管狭窄を回避することは困難なことが予想された。

他社の PLLA を使用して同様の実験の施行を考慮していたが、同時並行して他家高圧脱細胞気管グラフトによるパッチ移植の研究を行ったが、他家脱細胞気管グラフトは他家非脱細胞気管グラフトと比較して移植後 6 か月においても移植グラフトは保たれ、内腔の狭小化も軽微でグラフトの内側層に自己軟骨が再生して ring 状になっている所見が得られた。そのため、最終年度はパッチグラフトとしてインプラント型自己軟骨を使用するよりも、他家脱細胞気管を使用する研究に重点を置いて行った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. 瀧本 康史. 人工臓器 最近の進歩 気管の再生医療. 人工臓器 査読なし 47 巻 2018 年 207-210.
2. 瀧本 康史. 同種脱細胞気管を用いた気道再成長期のブタを用いた非臨床研究から. 日本小児呼吸器学会雑誌 査読あり 29 巻 2018 年 71-77
3. Ohno M, Fuchimoto Y, Hsu HC, Higuchi M, Komura M, Yamaoka T, Umezawa A, Enosawa S, Kuroda T. Airway reconstruction using decellularized tracheal allografts in a porcine model. Pediatric Surgery International. 査読あり、33 巻 2017 年 1065-1071. doi: 10.1007/s00383-017-4138-8

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Yasushi Fuchimoto. Acellular scaffolds by High hydrostatic pressure (HHP) for airway reconstruction in porcine model findings of a long-term observation. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society 2018 (国際学会). 2018 年
2. 瀧本 康史. 同種脱細胞気管を用いた気道再建 ブタを用いた非臨床研究から. 日本外科学会 2018.

3 .淵本 康史。同種高圧脱細胞気管を用いた軟骨再生による気道再建 プタを用いた非臨床研究の長期観察から。日本再生医療学会 2018

4 .淵本康史。Preclinical research of the tissue-engineered trachea using a juvenile porcine model。第 53 回日本小児外科学会 2016 年

5 .淵本康史。幼若プタを用いた組織工学気管の前臨床研究。PSJM 小児呼吸器外科研究会。2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：黒田 達夫

ローマ字氏名：KURODA, Tatsuo

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：60170130

研究分担者氏名：古村 眞

ローマ字氏名：KOMURA, Makoto

所属研究機関名：埼玉医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：10422289

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：絵野沢 伸

ローマ字氏名：ENOSAWA, Shin

研究協力者氏名：大野 通暢

ローマ字氏名：OHNO, Michinobu

研究協力者氏名：樋口 昌孝

ローマ字氏名：HIGUCHI, Masataka

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、研究者個人に帰属されます。