様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月 １４ 日現在

機関番号：３７１０４
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2016～2019
課題番号：１６Ｋ２０２８５

研究課題名（和文）移植後安定性を考慮した馬蹄形軟骨再生による気管再建法の確立

研究課題名（英文）Preferable tracheal reconstruction with the use of horseshoe-shaped regenerated cartilage

研究代表者

末吉　慎太郎（Sueyoshi, Shintaro）

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：６０５６９３５９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　1,800,000円

研究成果の概要（和文）：先天性、外傷性気道狭窄や癌の気管浸潤に対して気管切除を行った場合、気管全長の半分以上の欠損では一期縫縮は困難であるため、気管欠損部の硬性再建が必要になる。しかし、確立した気管の再建法はなく、現状では永久気管孔を作製することによるQOLの低下が避けられない。本研究では自家軟骨培養細胞よ培養常備細胞による積層培養組織を生体外で作製することで、より安定した移植を行うことに成功した。更に移植片を馬蹄形に形成することで、気管の形状に似た気管を形成することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
癌の気管浸潤や、先天的、医原性気管狭窄は、気管孔を開存したままの生活を強いられるため患者のQOLを著しく低下させる。これまでも気管孔の閉鎖を目指し、様々な気管の再建が行われてきた。気管の再建においては、移植後の軟骨細胞の脱分化や気管の内圧の変動が問題になっており、なかかな臨床応用が進んでいない。本研究はより安全で確実に気管の移植を行うための手法になり得ると考える。

研究成果の概要（英文）：In tracheal regeneration, the slow process of epithelialization is often a barrier to the stability and safety of the transplanted trachea. We succeeded in achieving stabile and safe implantation with canine surgery using organotipic tissue consist of chondrocytes and epithelial cells covering on horseshoe-shaped silicon block.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：自家軟骨細胞培養　気管移植　馬蹄形気管軟骨

※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。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

先天性、外傷性気道狭窄や癌の気管浸潤に対して気管長あるいは気管周の半分以上の気管切除を行った場合、一期的縫縮ができないため気管欠損部の硬性再建が必要になる。しかし、現状では確実な気管再建法はなく、その後の発声障害や永久気管孔を作製することによる QOL の低下が避けられない。また、縦隔気管や気管支などの気管孔を作製できない部位の病変においては、欠損の範囲に関わらず、切除すら断念せざるを得ない症例もある。気管再生の研究として、自家細胞や細胞増殖の足場を気管欠損部に移植し生体内で気管構造を再構築する組織工学的手法を用いた報告があるが [1)2)]、移植後に軟骨基質が産生し、強度をもった気管が再生するには数ヶ月を要するため安定的な組織生着が難しい。また外界からのバリアとしての上皮化にも数ヵ月を要するといわれており、感染により移植組織は脱落しやすい。つまり生着するまでの間、移植した組織は変動する気道内圧と気管内腔の汚染にさらされながら、気管の形状を維持しなければならないため、移植を成功させるためには、より速やかな生着が望まれる。そこで本研究では、in vitro で軟骨細胞と上皮細胞を培養し、培養細胞を用い馬蹄形に移植片を形成することで、より速やかで安全な移植が可能になると考えた。

２．研究の目的

イヌ培養軟骨細胞と上皮細胞を用い、馬蹄形の移植片を形成し自家移植することで、速やかで安全な気管の再建を行う。

３．研究の方法

<u>培養軟骨組織、上皮細胞シートの作製と組織学的・形態学的検証</u>

＜培養軟骨組織、上皮細胞シートの作製＞

1. 組織の採取：仔犬（ビーグル）の口腔粘膜から組織を 3×3mm、耳介軟骨 5×5mm 切除する。口腔粘膜は粘膜上皮組織層を分離しておく。
2. コラーゲンゲル包埋軟骨細胞培養法による気管軟骨層の作成：骨組織を細切し、Trypsin-EDTA で 20 分間、コラゲナーゼで 8 時間反応させ軟骨細胞を分離する。60 ㎜ディッシュ底面に均等に付着させる。DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)と 10%FBS (Fetal Bovine Serum)に抗菌剤を含んだ溶液を入れ、軟骨細胞を約 3 週間培養する。1×10^7 個/mL の高濃度の軟骨細胞を 10 倍濃度 DMEM、10%FBS、Transforming growth factor β1、Ascorbin ascid、L-proline を含んだ 3%アテロコラーゲン液(KOKEN)内に包埋し、Cell Culture Insert (Becton Dickinson)で立体培養を行う。軟骨基質を産生すると考えられる期間（約 2 週間）培養を行い、培養気管組織を作製する。
3. 粘膜上皮細胞の回収：粘膜上皮組織を Dispase 溶液で反応（37℃、1 時間）させ、粘膜上皮層を余分な固有層から剥がし分離する。Trypsin-EDTA で 7 分間反応させ、実体顕微鏡下に粘膜上皮細胞を分散させ single cell にする。遠心分離し上皮細胞を回収する。
4. 回収した上皮細胞を温度応答性培養皿に播種し 2 週間培養し、上皮細胞シートを作製する。上皮細胞の培養液には、DMEM/F12、EGF (Epidermal Growth Factor)、FBS、抗菌剤などを含む溶液を用いる。

＜組織学的・形態学的検証（正常気管との比較）＞

1. HE (Hematoxylin-Eosin)染色、サフラニン O 染色：標本を 10%ホルマリン固定し、パラフィン包埋した上で 5μm 切片を作成する。各染色を行い、顕微鏡下に培養軟骨組織の細胞と細胞外マトリックスを観察する。軟骨細胞による軟骨基質産生を証明する。

分化した形態と機能を有した軟骨細胞培養

軟骨細胞は培養すると脱分化しやすく、移植後の組織再生の遷延化の原因になる。分化状態を維持するため、上記の如く高密度 3 次元軟骨細胞培養を行った。コントロールとして 1×10^6 個/mL の低密度で培養を行い、高密度、低密度培養における軟骨細胞の形態と機能を比較する。軟骨細胞の形態は位相差顕微鏡とコラーゲンゲルの組織学的検討(H-E 染色)で行い、軟骨基質産生の証明はサフラニン染色で行う。

馬蹄形の上皮・軟骨混合組織の皮下への移植

上皮・軟骨混合組織を皮下へ移植し、生体内で馬蹄形の軟骨組織を作製する。

＜上皮細胞シートと移植担体の固定＞

1. 移植担体としてシリコンブロックと PGA シートを用いる。
2. シリコンブロックを馬蹄形に形成し、馬蹄形の彎曲に合わせて軟骨細胞を包埋したコラーゲンゲルを置き、コラーゲンゲルを PGA シートで押さえるように敷いた。
3. シリコンブロックの平面部に上皮細胞シートを敷き、吸収糸で固定する。

＜腹部皮下への移植＞

1. 動物実験室内で、ビーグル犬に対して全身麻酔（メデトミジン 0.02mg/kg、ミダゾラム 0.3mg/kg の筋注後にペントバルビタール 20-30mg/kg を静注し、約 1MAC のセボフルランを使用する）を行う。
2. 臍下部正中に 4cm 皮膚切開を行い、皮下にポケットを作製し、上記で作成したシリコンブロックを移植する。

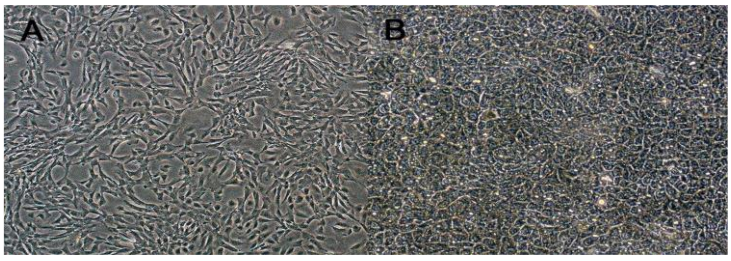
＜摘出した移植片の組織切片作成による形態学的検証＞

1. 移植後 1 カ月をおいて気管を摘出する。
2. 各種染色：摘出気管組織を 10%ホルマリンに固定し、脱水、パラフィン包埋した後に、HE 染色を行う。

４．研究成果

〈培養細胞〉

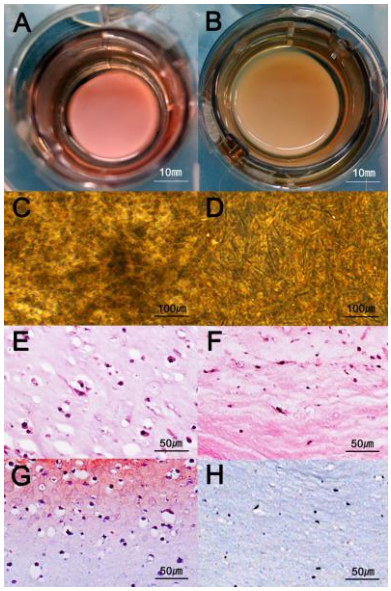
位相差顕微鏡所見（下）：紡錘型の軟骨細胞（A）と類円型(B)の上皮細胞を分離培養した。



〈3 次元高密度軟骨細胞培養〉

A, C, E, G は高密度軟骨細胞培養の所見で、B, D, F, G は低密度軟骨細胞培養の所見である。

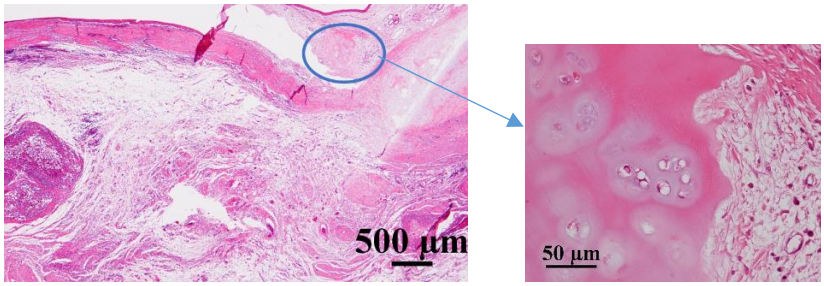
高密度培養を行うと軟骨細胞を包埋したコラーゲンゲルは収縮した(A, B)。位相差顕微鏡(C, D)では低密租軟骨細胞は紡錘形の繊維芽細胞様の細胞に脱分化しているに対し、高密度培養では類円型の形態を維持していた。組織学的には高密度培養では類円型の細胞の周囲に軟骨小腔様の構造を認め(E)、基質はサフラニン染色で良く染色され軟骨基質の存在が示唆された（G)。



〈移植片の摘出と組織学的検討〉

移植した１ヵ月後に移植片を採取した。摘出した移植片は瘢痕様の組織であった。

移植片のほとんどは線維性の組織に置き換わっており、軟骨細胞は一部しか認めなかった。



５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1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 Shintaro Sueyoshi	４．巻 128
２．論文標題 Stable tracheal regeneration using organotypically cultured tissue composed of autologous chondrocytes and epithelial cells in beagles	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Annals of otology, rhinology and laryngology	６．最初と最後の頁 585-594
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0003489419834313	査読の有無 有
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
研究協力者	千年　俊一 (Chitose Shunichi)		
研究協力者	深堀　光緒子 (Fukahori Mioko)		
研究協力者	佐藤　公則 (Satou Kiminori)		
研究協力者	栗田　卓 (Kurita Takashi)		

6．研究組織（つづき）

	氏名 （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	梅野　博仁 (Umeno Hirohito)		