

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18390474

研究課題名（和文） 組織工学的気管軟骨壁を使用した気管形成術の開発

研究課題名（英文） Development of tracheoplasty using tissue engineered tracheal cartilage

研究代表者

古村 眞(KOMURA MAKOTO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10422289

研究成果の概要：声門下腔狭窄症を target disease として、組織工学的気管軟骨壁の臨床応用に向けた治療方法を開発することとした。板状の組織工学的気管軟骨壁を軟骨細胞より作成し、気管軟骨壁の欠損モデルに移植することを行った。

ニュージーランド白色家兎の耳介軟骨から最も細胞増殖能の高い分離培養法を開発した。さらに、ヒト気管軟骨から軟骨細胞の分離培養が可能であり、再生軟骨の細胞ソースとなりうることを確認した。生体内で、吸収性足場素材と軟骨細胞による再生軟骨の硬さ（弾性）の経時的变化について検討した。ニュージーランド白色家兎の軟骨細胞をポリグリコール酸メッシュに播種させ、無胸腺マウスの皮下に移植し、移植後 6 週で家兎気管軟骨とほぼ同等の硬さ（機能）再生軟骨が得られた。機能的軟骨が再生されるまで、気道を確保することの可能な composite scaffold（コラーゲンシート、ポリグリコール酸メッシュ、L 乳酸とカプロラク톤の重合体）を設計した。この足場に分離培養した耳介軟骨細胞を播種させ、家兎の気管前壁 4x8mm 大の欠損孔に移植した。この足場には、移植後 1 ヶ月で上皮化がなされ、6 ヶ月に一層の再生軟骨が得られることが確認された。また、移植片に b-FGF（basic fibroblastic growth factor）の徐放製剤を用いることで軟骨再生が促進されることを確認した。

本研究により、1/3 週の気道軟骨の再生が気道上で確認された。この技術は、声門下狭窄症などの、短い気管狭窄に対して有効な治療法となり得るものと考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2007 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2008 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科

キーワード：再生医療

1. 研究開始当初の背景

小児の気管狭窄症に対する手術は、肋軟骨移植による狭窄部の拡張が比較的多く行われてきた。近年、長い気管・気管支狭窄症に対しても効果の期待できるスライド気管形成術が行われてきている。スライド気管形成術の問題点として、術後の縫合部の肉芽形成、気管軟化症が指摘されている。気管狭窄症の治療は、気管狭窄部を切除し、気管端々吻合あるいは端側吻合をする手術方法が理想とされている。成人の気管狭窄症に対しては、人工気管、自己組織での代用、気管移植による気管形成が行われている。人工気管は、粘膜上皮細胞が再生しない為、機能的な問題が発生する。代用組織では、組織の可塑性がない為、気道閉塞する可能性が高く、移植するには絶対的なドナーの不足がある。さらに、小児では、体の成長に伴った人工気管の成長が必要になるが、従来の人工気管では不可能である。また、成長期にある小児に対し、長期にわたる免疫抑制剤の投与は避けるべきである。現状では、どの治療法も問題点を認める。近年組織工学、再生医療の研究発展が目覚しく、各科での臨床応用が報告されている。小児の気管狭窄症に対しては、シリンダー型の組織工学的気管軟骨による治療が理想的である。in vitro でシリンダー型の気管形成は可能である。しかし、気管軟骨壁に必要とされる弾性と可塑性を移植直後から in vivo で再現、持続させるためには、scaffold を改善する必要がある。また、術直後からの移植 graft への栄養供給を十分に全周性に行う方法を開発する必要があり、長期的展望に立ち、技術開発が必要である。

2. 研究の目的

科学研究費を交付されるこの3年間に、声門下腔狭窄症を target disease として、組織工学的気管軟骨壁の臨床応用に向けた治療方法を開発することとした。板状の組織工学的気管軟骨壁を軟骨細胞より作成し、気管軟骨壁の欠損モデルに移植することを行った。

3. 研究の方法

軟骨細胞の分離培養法の検討

ニュージーランド白色家兎耳介軟骨を採取し、37℃ 0.3% コラゲナーゼタイプ2 溶液にて、2時間、3時間、6時間酵素処理を行い、細胞増殖能を比較した。

生体内での軟骨再生の経時的変化

ニュージーランド白色家兎耳介軟骨から軟骨細胞を分離し、poly glycolic acid(PGA) メッシュによる足場素材に分離直後の細胞を播種させ、無胸腺マウスの皮下に移植した。移植後1,2,3,4,6,8週で摘出し、組織学的検討、蛋白定量(グリコサミノグリカン)、ヤング率

の測定を行った。

足場設計

生体内での軟骨再生の経時的な再生過程を基に、PGA メッシュを主体とする気道再生に適した吸収性足場を連携研究者らと設計した。

微小重力環境による軟骨再生

微小重力環境(Rotating Wall Vessel)にて軟骨基質産生の増加を確認した。アテロコラゲンゲルを用いて、ヒト耳介軟骨細胞 10⁷ 個/ml の懸濁溶液を作成し、微小重力環境である Rotating Wall Vessel(RWV)内で4週間培養する。一方、同様の construct を、4週間平面培養皿にて培養し、construct の蛋白定量、ヤング率を測定した。

ヒト気管軟骨から軟骨細胞の分離培養

当科にて喉頭気管分離術をする際に、余剰気管軟骨をインフォームドコンセント下に提供を受けた。この気管軟骨を酵素処理にて分離培養した。分離培養し経代した軟骨細胞から RNA を抽出し、COL1、COL2 遺伝子について検討した。また、passage 4 の軟骨細胞を PGA メッシュに播種させ、無胸腺マウスに移植し、移植後8週で摘出した。この移植片を組織学的検索、蛋白定量、ヤング率の測定を行い、ヒト気管軟骨と比較検討した。

気管欠損孔への再生軟骨片の移植

ニュージーランド白色家兎耳介軟骨を採取し、軟骨細胞を分離培養し、必要数まで増殖させた。開発した気道用の吸収性足場素材に、軟骨細胞を播種させた。頸部気管に4x8mm 大の欠損孔を作成し、この欠損孔に足場素材を移植した。この移植片に FGF の徐放製剤を投与する群と投与しない群を組織学的に比較した。

4. 研究成果

軟骨細胞の分離法の検討

コラゲナーゼ処理時間3時間によって分離された細胞が、最も増殖能が高く、約10日間で100倍に増殖することが確認された。

生体内での軟骨再生の経時的変化

経時的に軟骨再生されており、移植後2週より島状に軟骨基質の産生がトルイジンブルー染色、サフラニンO染色に確認された。移植後6週では、ほぼ全域に軟骨基質が確認された。また、蛋白定量にて、グリコサミノグリカンは、移植後経時的に増加し、移植後6週からニュージーランド家兎気管軟骨と有意差のないグリコサミノグリカン量となることが判明した。ヤング率測定では、移植4週よりニュージーランド白色家兎気管軟骨

との有意差を認めなくなった。

足場設計

poly glycolic acid(PGA)メッシュを中間層として、内側にコラーゲンシートを貼り、外側にカプロラクトンと乳酸の重合体による格子を接着させた三層の足場を作製した。コラーゲンコートは、気道粘膜上皮の遊走を促進させるために導入した。また、PGAメッシュ内に、軟骨細胞を播種させ、軟骨再生を行うコンセプトとした。吸収性で硬いカプロラクトンと乳酸の重合体による格子を接着することで、軟骨再生が得られるまで、気道内腔を確保することを可能とした。(本足場に関連する特許出願 2008-029025)

微小重力環境による軟骨再生

平面培養皿に比較して、微小重力環境(Rotating Wall Vessel)にて軟骨基質産生の増加することが確認された。また、ヤング率の増加も確認された。

ヒト気管軟骨から軟骨細胞の分離培養

ヒト気管軟骨から軟骨細胞の分離培養に成功した。最低 26mg の軟骨片から軟骨細胞の分離が可能であった。経代することで、COL1 の発現が増強し、COL2 発現の減弱が認められ、脱分化することが確認された。この脱分化した気管軟骨細胞を生体内に移植することで、軟骨が再生されることを初めて確認した。また、移植後 8 週でヒト気管軟骨と有意差のないグリコサミノグリカン量、ヤング率を有する再生軟骨が得られる事を確認した。

気管欠損孔への再生軟骨片の移植

生存率は、82%であり、気道用の足場素材が気道を確保する上で有用であることを示した。内腔の変形は、有意な所見を認めなかった。粘膜上皮の再生は、移植後 1 ヶ月後には確認された。移植後 3 ヶ月後には、FGF 徐放製剤を使用するほうが、軟骨再生に遊離であることが確認された。また、移植 6 ヶ月後には、骨化する部分も認められるが、粘膜下に一層の軟骨再生を確認した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Komura M, Komura H, Kanamori Y, Tanaka Y, Suzuki K, Sugiyama M, Nakahara S, Kawashima H, Hatanaka A, Hoshi K, Ikada Y, Tabata Y, Iwanaka T. An animal model study for tissue-engineered trachea

fabricated from a biodegradable scaffold using chondrocytes to augment repair of tracheal stenosis. J Pediatr Surg. 2008 Dec;43(12):2141-6. 査読有

2. Komura M, Komura H, Tanaka Y, Kanamori Y, Sugiyama M, Nakahara S, Kawashima H, Suzuki K, Hoshi K, Iwanaka T. Human tracheal chondrocytes as a cell source for augmenting stenotic tracheal segments: the first feasibility study in an in vivo culture system. Pediatr Surg Int. 2008 Oct;24(10):1117-21. 査読有

[学会発表](計 8 件)

1. 古村 眞、古村浩子、大谷祐之、石丸哲也、田中裕次郎、小高哲郎、杉山正彦、金森 豊、星 和人、田畑泰彦、岩中 督。軟骨再生の新規足場としてのゼラチンと -T C P 複合体による有用性の検討。第 8 回再生医療学会、東京 (2008, 3, 6)
2. Komura M, Komura H, Tanaka Y, Kanamori Y, Sugiyama M, Nakahara S, Kawashima H, Suzuki K, Hoshi K, Iwanaka T. A preliminary study assessing the clinical potential of engineered trachea in augmenting a stenotic tracheal segment 第 45 回日本小児外科学会 つくば (2008, 5, 29)
3. 古村 眞、古村浩子、星 和人、岩中 督、金森 豊、杉山正彦、中原さおり、川嶋 寛、畑中 玲 再生気管軟骨に用いる吸収性足場素材の物理学的特性設計のための基礎的研究 第 7 回日本再生医療学会、名古屋 (2008, 3, 13-14)
4. 古村 眞、古村浩子、星 和人、岩中 督、金森 豊、杉山正彦、中原さおり、川嶋 寛、畑中 玲 再生気管軟骨に用いる吸収性足場素材の物理学的特性設計のための基礎的研究 第 108 回日本外科学会、長崎 (2008, 5, 16)
5. Komura M, Komura H, Kanamori Y, Tanaka Y, Suzuki K, Sugiyama M, Nakahara S, Kawashima H, Hatanaka A, Hoshi K, Ikada Y, Tabata Y, Iwanaka T. An animal model study for tissue-engineered trachea fabricated from a biodegradable scaffold using chondrocytes to augment repair of trachea stenosis. Pacific Association of Pediatric Surgeons 41st Annual Meeting Jackson Lake Lodge, Wyoming, USA (2008, 6, 30)
6. Komura M, Komura H, Iwanaka T, Kanamori Y, Sugiyama M, Nakahara S, Kawashima H, Hatanaka A, Tanaka Y.

Time Course Observation of Ecotopically Transplanted Tissue Engineered cartilage TERMIS-AP, Tokyo, Japan, (2007, 12, 3-5)

7. 古村 眞、金森 豊、中原さおり、杉山正彦、川嶋 寛、岩中 督 組織工学による気管狭窄症に対する治療の為の基礎的検討 第44回日本小児外科学会。東京(2007.5.31)
8. Komura M, Hoshi K, Yokoyama M. Tissue Engineered Trachea to augment a part of tracheal stenosis. 2nd Congress of Asian Society for Pediatric Research, Yokohama(2006, 12, 9)

〔図書〕(計1件)

1. Komura, M., D. Eberli, J. J. Yoo, A. Atala (2008) Phalanges and small Joints, in Atala A (eds): Principle of Regenerative Medicine. Burlington, MA, Academic Press.; pp1198-1205

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古村 眞(KOMURA MAKOTO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10422289

(2) 研究分担者

岩中 督(IWANAKA TADASHI)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：90193755

金森 豊(KANAMORI YUTAKA)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：20211187

杉山正彦(SUGIYAMA MASAHIKO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00270877

星 和人(HOSHI KAZUTO)
東京大学 ティッシュエンジニアリング部
研究者番号：3034451

(3) 連携研究者

筏 義人(IKADA YOSHITO)

奈良県立医大 医学部
研究者番号：00025909

田畑泰彦(TABATA YASUHIKO)
京都大学 再生医療研究所
研究者番号：50211371