

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02869

研究課題名(和文) 生体内組織形成術による管状自己組織を足場とした気管再生技術の開発

研究課題名(英文) Tracheal regeneration using an in-body-tissue-engineered collagenous tube: A novel tracheal scaffold

研究代表者

奥山 宏臣 (Okuyama, Hiroomi)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30252670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,020,000円

研究成果の概要(和文)：独自開発の生体内組織形成技術を用いて、動物モデルで組織再生を行った。食道では、ビーグル犬でBiosheetを作成して全層欠損部に移植し、Biosheetを足場に重層扁平上皮や筋組織が再生した。気管では、ポリ乳酸製ステント内包Biotubeを作成してビーグル犬で気管置換術を実施し、移植片の内腔は保持され、これを足場に血管や気管上皮、軟骨等が再生した。続いてBiotubeと自家軟骨細胞由来の軟骨リングを連結し、Hybrid-Biotubeを作製した。独自開発のHybrid-Biotubeを用いた気管置換術をラットに実施し、気管上皮の再生や軟骨構造の維持を認めた。今後、詳細な組織再生過程を解析する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性の食道狭窄や気管狭窄において、とくに広範な気管狭窄の場合は、致命的でありながら治療法が確立されていない。現行の標準手術では、術後に肉芽等による狭窄を発症し治療経過に難渋する 경우가少なくなく、気管や食道を対象とした臓器移植も臨床応用に至っていない。本研究では自己組織を利用した生体組織形成技術にて、移植可能な人工組織を作成でき、移植臓器内で組織再生を促進することが確認された。我々が開発したBiotube、Biosheet、Hybrid-Biotubeは、現行の標準治療や臓器移植医療に替わり、治療困難な先天疾患に対する新規の治療法となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel scaffold using our unique in-body-tissue-architecture technology (iBTA) and implanted it into the trachea and esophagus in animal models. In the esophageal regeneration model, Biosheet, which consisted of collagen, promoted the regeneration of the stratified squamous epithelium and muscular layer of the esophagus. In the tracheal regeneration model, a tracheal-like tissue including polylactic acid stent was generated and implanted in a tracheal defect. The regeneration of blood vessels, tracheal epithelium, and cartilage were confirmed on the scaffold. Then, we developed "Hybrid-Biotube" which consisted of an engineered cartilage ring derived from autologous costal chondrocytes and connective tissue in a Lewis rat model. The regeneration of tracheal epithelium and cartilage rings was confirmed after orthotopic circumferential transplantation. To investigate the tissue regeneration process in detail, we will analyze the tissue regeneration.

研究分野：小児外科、再生医療

キーワード：食道再生 気管再生 組織工学 ポリ乳酸 生体内組織形成術 コラーゲン組織 培養軟骨輪

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

広範囲型先天性気管狭窄症や気管無形成など、小児における気管・気管支の先天異常は時に極めて重篤な呼吸困難を呈し、しばしば死に至る。病変が広範囲に及ぶこれらの先天性疾患に対して、「気管移植」が研究されてきたにもかかわらず、気管の解剖学的な特性や免疫学的な特性の問題から、いまだ臨床応用されるに至っていない。そこで、小児呼吸器外科領域においても気管・気管支に関する再生医療の発展が期待されてきた。

成人における気管の再生医療に関する分野では、非分解性素材や脱細胞化したヒト気管を足場とし、軟骨細胞や上皮細胞を播種して再生した気管を用いた臨床応用例がすでに報告されている。しかし、小児における気管の再生は、必要とされる範囲が非常に長く、患児の成長に伴って径や長さが成長する必要があるため、生体非分解性素材の足場を利用せずに広範囲の気管を再生させることが要件と考えられてきた。近年、生体内に異物を挿入した際に、異物周囲に形成される結合組織を足場とした実験報告がなされている (BIOTUBE)。この技術の特性として、さまざまな形や大きさの足場を作成することが出来ること、多大な費用や気管を要する細胞培養などの技術を必要としないことなどが挙げられる。すでに本技術は動物実験において、血管グラフトや心臓弁グラフトなどに使用され、良好な結果が報告されている (M Yamanami et al. J Artif Organ 2013 16:59-65, S Kishimoto et al. J Artif Organ 2015 18(2):185-190)。

### 2. 研究の目的

上述の研究動向を踏まえて、実験動物において Biotube を作製し、気管足場として使用する実験研究を実施することが目的である。

### 3. 研究の方法

#### (実験1) ビーグルにおける Biosheet を使用した食道形成術

ビーグル犬の背側皮下に鋳型基材を 4-8 週間ほど埋入し、コラーゲンからなる Biosheet を作製する。頸部食道に 1×2cm の欠損孔をつくり、欠損孔を十分被覆できる大きさに Biosheet をトリミングして食道形成術にて閉鎖する。術後 4 週および 12 週、各期間 2 例ずつ安楽死させて、組織学的評価を行う。組織染色は、HE 染色で構造を確認する。

#### (実験2) ビーグルにおける、ポリ乳酸(PLA)内包 Biotube による気管置換術

網目状の PLA を円筒型に形成した長さ 20 mm の足場を、鋳型基材と組み合わせてビーグル犬の背側皮下に 4-8 週間埋入し、完成した Biotube は凍結乾燥させて物性強度を高める。作製した Biotube を利用して、頸部気管の置換術を実施する。術後は、必要に応じて全身麻酔下に気管支鏡検査を実施し、内腔狭窄時は適宜バルーン拡張術を実施して内腔を確保する。3-7 か月後の気管内腔の開存性と組織学的評価を行う。組織学的検討、物性強度の評価については以下の通りとする。

組織学的検討：HE 染色、サフラニン-O 染色、型および型コラーゲン免疫組織化学染色、電子顕微鏡

物性強度：レオメーター (Compac-100, Sun Scientific 社製)を用いて、圧縮強度およびヤング率を測定

#### (実験3) ラットにおける、Hybrid-Biotube を使用した気管置換術、気管形成術

Lewis ラットを安楽死させて肋軟骨を採取し、肋軟骨細胞を採取・培養する。独自開発の細胞自己凝集化技術を用いて軟骨輪を作製する。この軟骨輪を、鋳型基材に 3 つ装着し、Lewis ラットの背側皮下に 4-8 週の間、埋入させることで、軟骨輪が結合組織で連結された Hybrid-Biotube を作製する。これを利用し、頸部気管の置換術を実施する。組織学的検討、物性強度の評価については以下の通りとする。

組織学的検討：HE 染色、サフラニン-O 染色、アルシアンブルー染色、型および型コラーゲン免疫組織化学染色、抗 CD31 抗体免疫組織化学染色、電子顕微鏡

物性強度：レオメーター (Compac-100, Sun Scientific 社製)を用いて、圧縮強度およびヤング率を測定

#### 4. 研究成果

(実験1) ビーグルにおける Biosheet を使用した食道形成術

ビーグル犬の背側皮下に鋳型基材を4-8週間ほど埋入して Biosheet を作製した(図1)。さらに、Biosheet をトリミングし、食道に作成しておいた欠損孔を十分覆うようにして形成術を実施した(図2)。

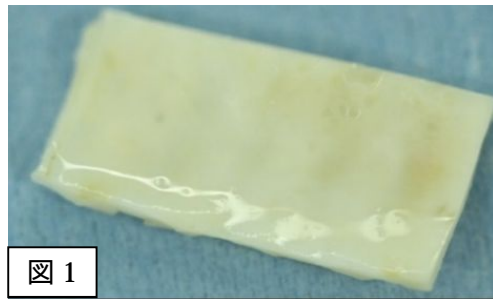


図1



図2

術後4週および12週のHE染色像にて、重層扁平上皮(図3A 黒矢印)および食道筋の再生が確認された(図3B 黒矢頭)。

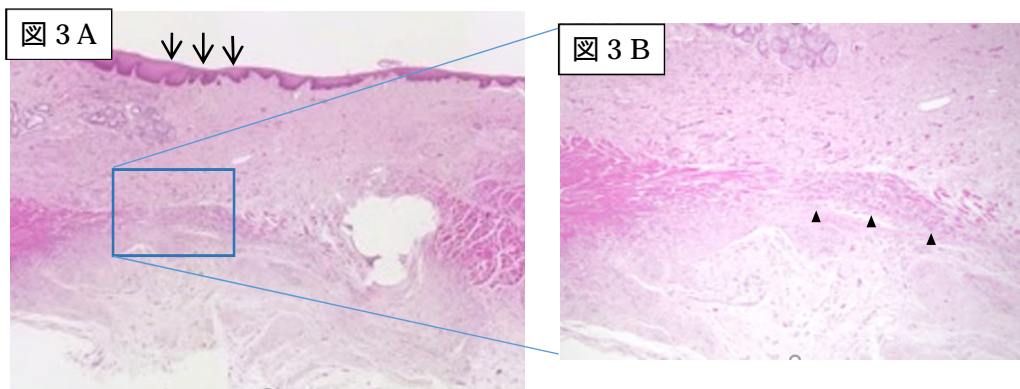


図3A

図3B

(実験2) ビーグルにおける、PLA内包Biotubeによる気管置換術

PLA内包Biotubeを作製し(図4)、強度に関して、生体気管と同等であることが確認できた。このPLA内包Biotubeを利用して気管置換術を実施した(図5)

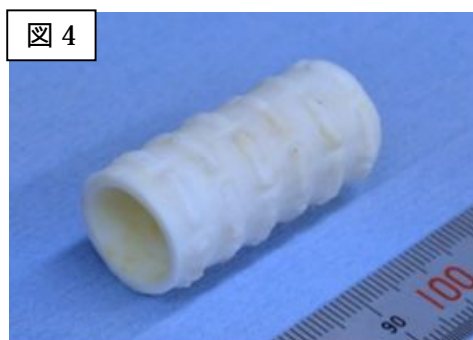


図4

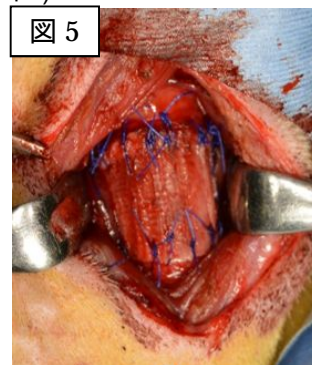


図5

術後、Biotube内に肉芽形成が見られたため(図6)、バルーン拡張術を適宜実施し、4例が長期生存し、気管上皮(黄色矢印)や血管(黄色矢頭)、杯細胞の再生(青矢印)を確認した。(図7A, B)。



図6

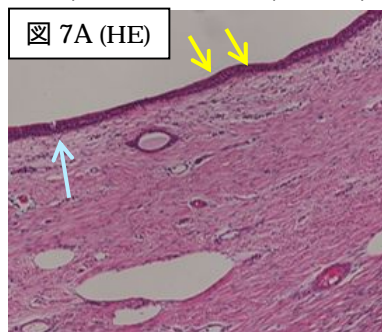


図7A (HE)

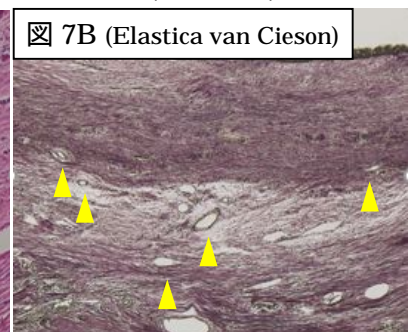


図7B (Elastica van Gieson)



(実験3) ラットにおける、Hybrid-Biotubeを使用した気管置換術、気管形成術  
Hybrid-Biotube を作製し(図8)、強度に関して、生体気管と同等であることが確認できた。



図8

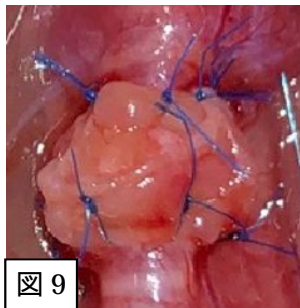


図9

この Hybrid-Biotube を用いて、気管置換術を実施し(図9)、長期生存を得られたのは2例(6週、32週)。気管上皮(図10A 黒矢印)、気管腺(図10A 黒矢頭)の再生や軟骨組織の維持(図10B)が確認できた。生存率は低く、死因を検討したところ、内腔の狭窄は中程度であり、喀痰排出不良による気管内腔の閉塞が死因と考えた。ただ、死亡後の喀痰閉塞を確認できてはならず、死因と断定することはできなかった。

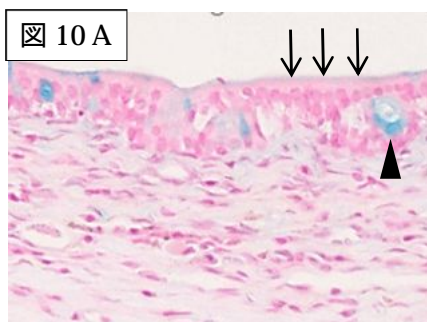


図10A

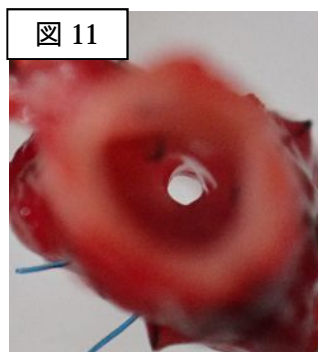


図11

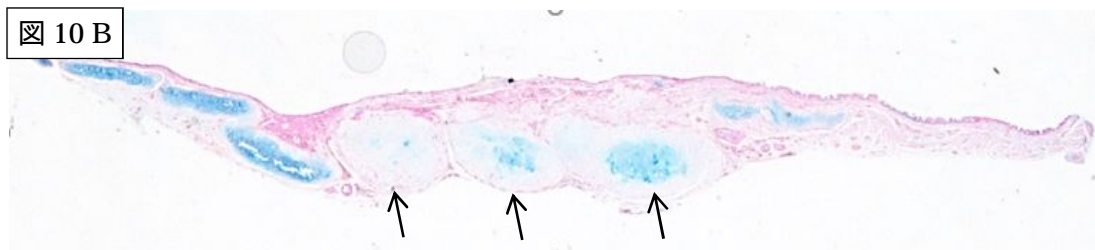


図10B

そこで、生存率が高い気管形成術モデルを実施し、詳細な組織学的検討を行って原因究明する方針とした。

ラットの気管腹側において幅2mm、長さ4-5mm(3気管軟骨輪分)の長方形型に開窓し(図12A)、作製した Hybrid-Biotube をトリミングしたものを移植片として、開窓部を被覆するように縫合固定した(図12B)。1週間/1か月/3か月/6か月、各期間3例、合計12例を実験モデルとした。また、比較対照として、生体気管腹側を2×4-5mm(3気管軟骨輪)の長方形型に開窓し、同部の生体組織をそのまま用いて同部に縫合固定する(図13) 生体気管腹側を2×4-5mm(3気管軟骨輪)の長方形型に開窓し、PLAシートをトリミングして、開窓部を被覆できるように縫合固定(図14)の2モデルについて、同期間・同数を作製した。死亡例は1例、はなかった。今後、上述の設定した気管が経過した後にラットを安楽死させて手術範囲の気管を採取し、画像・組織解析を実施する予定である。

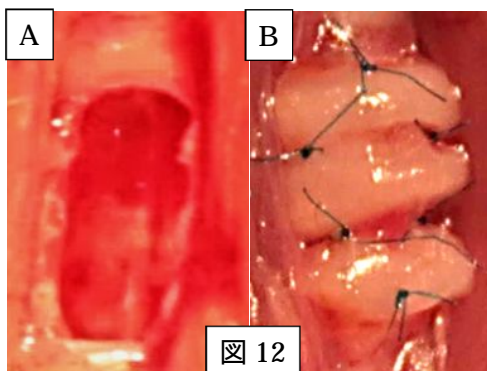


図12



図13



図14

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4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 Umeda S, Nakayama Y, Terazawa T, Iwai R, Hiwatashi S, Nakahata K, Takama Y, Okuyama H.	4. 巻 49
2. 論文標題 Long-term outcomes of patch tracheoplasty using collagenous tissue membranes (biosheets) produced by in-body tissue architecture in a beagle model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surg Today	6. 最初と最後の頁 958-964
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-019-01818-5.	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 -
1. 著者名 Hiwatashi S, Nakayama Y, Umeda S, Takama Y, Terazawa T, Okuyama H.	4. 巻 29
2. 論文標題 Tracheal Replacement Using an In-Body Tissue-Engineered Collagenous Tube "BIOTUBE" with a Biodegradable Stent in a Beagle Model: A Preliminary Report on a New Technique.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Pediatr Surg.	6. 最初と最後の頁 90-96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0038-1673709	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 -
1. 著者名 Okuyama H, Umeda S, Takama Y, Terasawa T, Nakayama Y.	4. 巻 53
2. 論文標題 Patch esophagoplasty using an in-body-tissue-engineered collagenous connective tissue membrane.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Surgery	6. 最初と最後の頁 223-226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpedsurg.2017.11.004.	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 -
1. 著者名 Narumi Y, Iwai R, Takagi M	4. 巻 4
2. 論文標題 Recovery of human mesenchymal stem cells grown on novel microfarrier coated with thermoresponsive polymer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Artif organs.	6. 最初と最後の頁 358-364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10047-020-011865-9	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 -

1. 著者名 Teng L, Nakagiri R, Kimata Y, Iwai R	4. 巻 2
2. 論文標題 Preparation of mesh-shaped cell aggregated constructs using cell self-aggregation induction technology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Okayama Univ. of Sci	6. 最初と最後の頁 31-35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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10件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Okuyama H, Hiwatashi S, Umeda S, Takama Y, Terazawa T, Nakayama Y
2. 発表標題 In-body-tissue-engineered collagenous connective tissue tube, "Biotube", as a novel esophageal and tracheal scaffold.
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥山宏臣
2. 発表標題 生体内組織形成術により作成したBiotubeを足場とした気管・食道の再生医療
3. 学会等名 名古屋大学大学院 基盤医学特論 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okuyama H.
2. 発表標題 Regeneration of esophagus and trachea: long-term experimental results
3. 学会等名 International symposium on congenital anomaly and developmental biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiwatashi S, Nakayama Y, Umeda S, Takama Y, Terazawa T, Okuyama H.
2. 発表標題 Tracheal replacement using an In-Body-Engineered Collagenous Tube "Biotube2 with a biodegradable stent in a beagle model: a novel tracheal scaffold.
3. 学会等名 19th European Congress of Pediatric Surgery (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥山宏臣、梅田聡、樋渡勝平、高間勇一、巽英介、中山泰秀
2. 発表標題 生体内組織形成術を用いた気管・食道形成術—大動物モデルの長期観察結果より—
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 樋渡勝平、中山泰秀、高間勇一、梅田聡、奥山宏臣
2. 発表標題 管状自家結合組織(biotube)と生分解性ステントを一体化したhybrid-biotubeによる気管・消化管再生の試み
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 樋渡勝平、中山泰秀、岩井良輔、奥山宏臣
2. 発表標題 生体内組織形成術による気管再生の試み
3. 学会等名 第120回日本外科学会的学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩井良輔
2. 発表標題 荷電高分子で細胞の接着力を制御し凝集化させる ～接着細胞の自己凝集化誘導技術の開発と組織工学への応用展開～
3. 学会等名 生物工学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本真悟、杉山晶彦、岩井良輔
2. 発表標題 細胞自己凝集化技術と培養チャンバー設計によるファイバー状組織体の作製と血管内皮毛細管の配向化検討
3. 学会等名 第57回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤魯鵬、中桐僚子、木股敬裕、岩井良輔
2. 発表標題 西郷自己凝集化技術を用いた網目状細胞凝集体"CELL MESH" の作製
3. 学会等名 第57回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 窪田昭男、奥山宏臣	4. 発行年 2019年
2. 出版社 パーソン書房	5. 総ページ数 310 (110-113)
3. 書名 最新新生児外科学：呼吸器・胸部の疾患 3. 気管無形成、喉頭閉鎖症	

〔出願〕 計0件



〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 管状補強体及び管状人工臓器	発明者 奥山宏臣、他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、K20180332	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

ホームページ等
---------

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	出口 幸一 (deguchi koichi) (00747082)	大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)  (14401)	
研究分担者	中山 泰秀 (nakayama yasuhide) (50250262)	東京大学・医学部附属病院・客員研究員  (12601)	
研究分担者	岩井 良輔 (iwai ryousuke) (60611481)	岡山理科大学・フロンティア理工学研究所・講師  (35302)	
研究分担者	樋渡 勝平 (hiwatashi syouhei) (10789259)	大阪大学・医学部附属病院・医員  (14401)	

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	高間 勇一  (takama yuichi)  (50467560)	大阪大学・医学系研究科・助教    (14401)	
研究分担者	梅田 聡  (umeda satoshi)  (60715176)	大阪大学・医学系研究科・助教    (14401)	

	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	岩崎 駿  (iwasaki shun)  (40882254)	大阪大学・医学部附属病院・医員    (14401)	

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