

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08776

研究課題名(和文) ティッシュエンジニアリングを応用した人工胸膜の開発

研究課題名(英文) A Producing of artificial pleura based on tissue engineering

研究代表者

木村 大輔 (Kimura, Daisuke)

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70396406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの肺癆モデルに中皮細胞を用いた人工胸膜を移植し、有効性を評価した。コラーゲンコーティングPGAナノファイバーシート上で線維芽細胞4層による積層培養および中皮1層の人工胸膜と中皮1層のみの2種類の人工胸膜を作成し、5日間培養した。走査電子顕微鏡での観察では胸膜中皮細胞1層+肺線維芽細胞4層からなる人工胸膜は、胸膜中皮細胞1層のみで作成した人工胸膜と比較して、細胞間が強固であり敷石状に配列し、表面に多数の微絨毛が観察された。ラット胸膜欠損モデルに人工胸膜を移植し摘出し生着状況を観察した。免疫染色では移植部の菲薄化および中皮細胞の生着を認め、作成した人工胸膜は胸膜欠損モデルに有効であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

呼吸器外科手術患者において、肺切除後の肺癆は入院期間延長のみならず、膿胸などの合併症を引き起こす可能性がある。慢性閉塞性肺疾患や間質性肺炎などの患者は肺癆遷延を引き起こしやすく、今後も肺癆の発生数は増加することが予想される。また、移植肺の代替となるような人工肺の開発研究が将来進めば、それを被覆する人工胸膜も必要となると考える。本研究においては移植部の菲薄化とそれに伴う中皮細胞の生着を認め、作成した人工胸膜は胸膜欠損部の修復に有効であり、将来的に人工胸膜移植が胸膜欠損の一手段となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The efficacy of mesothelial cell-based pleural prostheses was evaluated in a rat with pleural diffect. Two types of pleural prostheses, one with a single layer of mesothelium and the other with only one layer of mesothelium, were prepared on collagen-coated PGA nanofiber sheets with four layers of fibroblasts and cultured for 5 days. Scanning electron microscopy revealed that the pleura consisting of one layer of pleural mesothelial cells plus four layers of pulmonary fibroblasts had tighter intercellular contacts and a more cobblestone-like arrangement of cells and more microvilli on the surface than the pleura made of only one layer of pleural mesothelial cells. The artificial pleura was transplanted into a rat pleural defect model, and the graft was harvested and observed for viability. Immunostaining showed thinning of the transplanted area and mesothelial cell growth, indicating that the artificial pleura was effective in the pleural defect model.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：再生医療 ティッシュエンジニアリング 中皮細胞 人工胸膜 積層培養 肺癆 PGAナノファイバー

1. 研究開始当初の背景

呼吸器外科手術患者において、肺切除後の肺瘻は入院期間延長のみならず、膿胸などの合併症を引き起こす可能性がある。慢性閉塞性肺疾患や間質性肺炎などの患者は肺瘻遷延を引き起こしやすく、今後も肺瘻の発生数は増加することが予想される。また、移植肺の代替となるような人工肺の開発研究が将来進めば、それを被覆する人工胸膜も必要となると考える。

ポリグリコール酸 (PGA) シートは、呼吸器外科領域で胸膜欠損部の被覆に頻用される吸収性補強材であり、最終的には水と二酸化炭素に分解される。肺瘻防止としては、現状としてPGAシートとフィブリン糊による補強が一般的であるが、胸膜再生までに時間がかかるという欠点がある。近年、PGA ナノファイバーシートが開発され、従来のものと比べると線維が細く、線維間の空隙が小さい、加水分解のスピードが速いといった特徴を有する。

臓側胸膜は、生体では胸膜中皮と弾性線維からなり、肺実質を支持している。胸膜中皮細胞には肺の呼吸運動の干渉や、炎症反応・免疫応答に関わり、組織修復に寄与するとされている。胸膜損傷部での胸膜中皮細胞増殖が、肺瘻防止に有効と考える。

2. 研究の目的

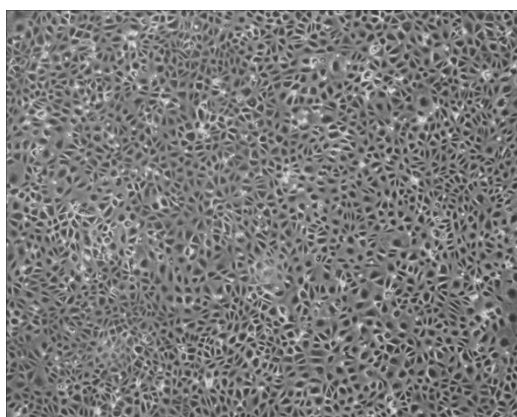
本研究ではティッシュエンジニアリングの技術を応用して、PGA シート上で胸膜中皮細胞を培養し、人工胸膜を作成する。ラットの肺瘻モデルに中皮細胞を用いた人工胸膜を移植し、その有効性を評価することを目的とする。

3. 研究の方法

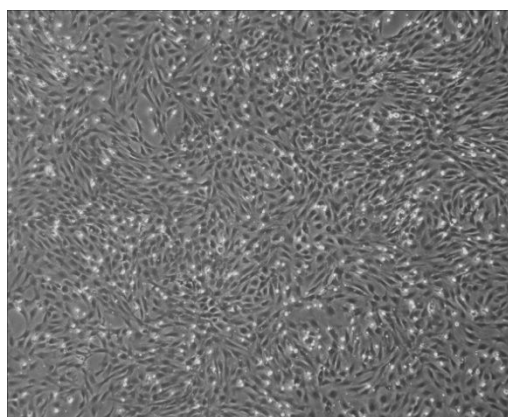
(1) 胸膜中皮細胞および肺線維芽細胞の培養

10週齢 Wistar ラットにイソフルラン吸入麻酔を行い、犠牲死させ肺を採取する。採取した肺をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で3回洗浄後、0.05%トリプシン-EDTA 10ml 中で37℃、40分間処理する。肺の表面を擦過し、細胞懸濁液を回収し、30mL DMEM (低グルコース) 培地を添加する。混合した細胞懸濁液を1,500rpmで5分間遠心分離する。DMEM培地で細胞を再懸濁し、100mmの培養皿に細胞を播種する。これが胸膜中皮細胞となる。

胸膜中皮細胞採取後の肺組織を3×3mm大の切片とし、0.15%コラゲナーゼタイプVで90分間処理する。細胞懸濁液を回収し、1,500rpmで5分間遠心分離する。MEM培地で細胞を再懸濁し、100mm培養皿に播種する。これが肺線維芽細胞となる。胸膜中皮細胞、肺線維芽細胞ともに1週間培養し、コンフルエントにする。



胸膜中皮細胞



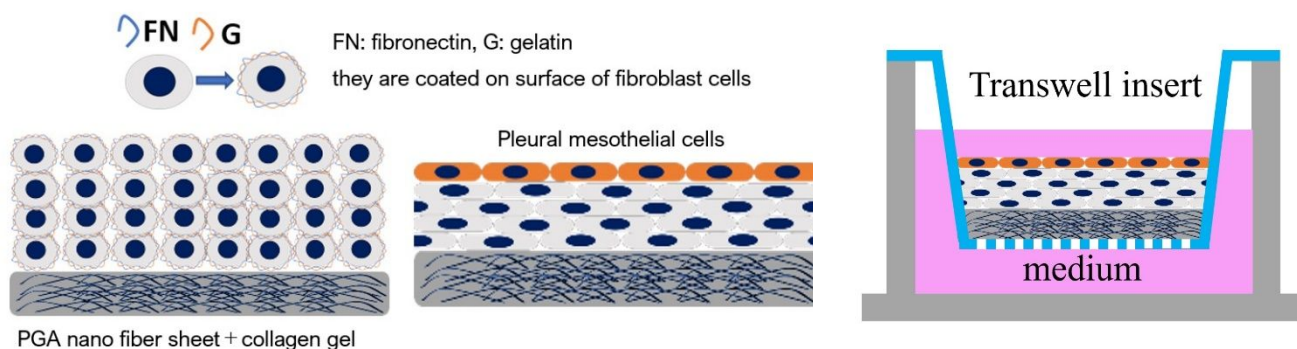
肺線維芽細胞

(2) 人工胸膜の作成

PGA ナノファイバーシート (Neoveil nano™、グンゼメディカル株式会社、京都、日本) および Transwell™ インサート (ポリカーボネート製メンブレン、24 ウェル、ポアサイズ: 0.4 μm) (Corning、ニューヨーク、米国) を使用する。直径6mmの円形に切ったPGA ナノファイバーシートを Transwell™ インサート上に置き、コラゲン溶液 (Cellmatrix™ Type I-A、新田ゼラチン株式会社、大阪府) で37℃、10分間コーティングする。

レイヤーバイレイヤーによる細胞集積法 (Asano Y, et al. Construction of artificial

human peritoneal tissue by cell-accumulation technique and its application for visualizing morphological dynamics of cancer peritoneal metastasis. Biochem Biophys Res Commun.2017; 494:213-219.) を用いて、肺線維芽細胞を用いた多層三次元組織を以下のように構築する。まず、培養した肺線維芽細胞を、pH7.4 の 50mM トリス-塩酸緩衝液中で、0.04mg/mL ウシ血漿由来フィブロネクチンを添加し、懸濁する。50 mM トリス-塩酸緩衝液で洗浄した後、50 mM トリス-塩酸緩衝液中で 0.04 mg/mL ゼラチンを添加し、懸濁する。フィブロネクチンとゼラチンで交互に 9 回処理し、各細胞にフィブロネクチン-ゼラチンナノフィルムをコーティングする。コーティングされた肺線維芽細胞を DMEM 培地で懸濁し、Transwell™ インサートに播種し、培養する。翌日、培地のみを吸引し、肺線維芽細胞の上に胸膜中皮細胞を播種する。このようにして、コラーゲンコートした PGA ナノファイバーシート上に、肺線維芽細胞を 4 層、胸膜中皮細胞を 1 層積層し、さらに 5 日間培養し、人工胸膜を作成する。



対照群として、肺線維芽細胞を含まない人工胸膜（コラーゲンコート PGA ナノファイバーシート上に胸膜中皮細胞を 1 層のみ）を作成する。

(3) 人工胸膜の観察

走査電子顕微鏡を用いて、作成した人工胸膜の表面を観察する。

(4) 人工胸膜の移植

10 週齢 Wistar ラットに三種混合麻酔薬（塩酸メドミジン 0.75mg/kg, ミダゾラム 4.0mg/kg, 酒石酸ブトルファノール 5.0mg/kg）を腹腔内投与し、気管挿管後、人工呼吸器に接続する（呼吸数 60 回/分、一回換気量 0.01ml/g）。左第 5 肋間開胸を行い、左肺表面に剪刀で長さ 5mm、深さ 3mm 程度の切開をおき、胸膜欠損モデルを作成する。胸膜欠損部にコラーゲン溶液（Cellmartix™ Type I-A）を塗布し、人工胸膜を移植する。閉胸後、アチパメゾール 1.5mg/kg を腹腔内投与し、自発呼吸が出たところで抜管する。免疫抑制のため、移植 1 週間前より、シクロスポリンを飲料水に添加し（100mg/L）飼育する。

(5) 人工胸膜移植部の組織学的評価および免疫組織化学的解析

イソフルラン吸入麻酔下での放血により安楽死させ、左肺を摘出し、HE 染色での組織学的評価および免疫組織化学的解析を行う。

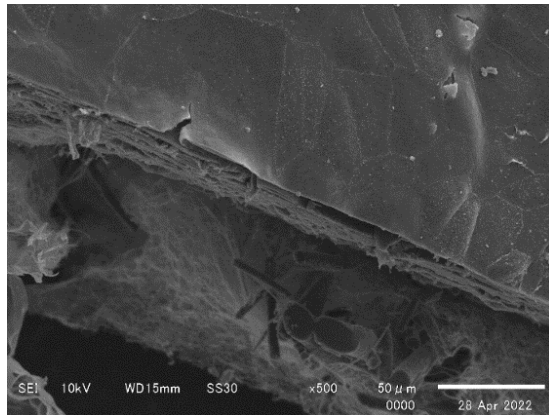
すべての手技は、弘前大学動物実験委員会の承認を得て、弘前大学動物実験に関する規程に従って実施した。

4. 研究成果

(1) 人工胸膜の評価 (走査電子顕微鏡)

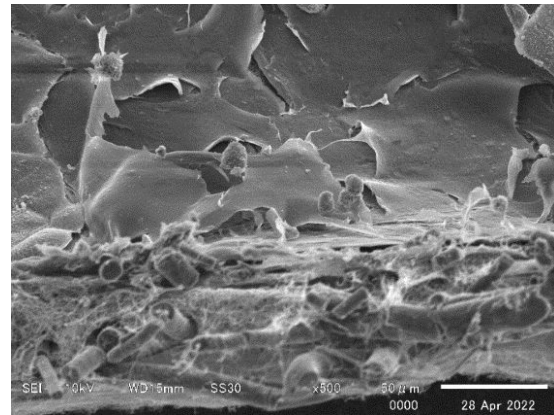
胸膜中皮細胞 1 層+肺線維芽細胞 4 層からなる人工胸膜は、胸膜中皮細胞 1 層のみで作成した人工胸膜と比較して、細胞間が強固に接着し、個々の構造を保つことができた。敷石状に配列し、表面に多数の微絨毛が観察される中皮細胞の特徴を捉えていた。

左：胸膜中皮細胞 1 層+肺線維芽細胞 4 層



500 倍

右：胸膜中皮細胞 1 層

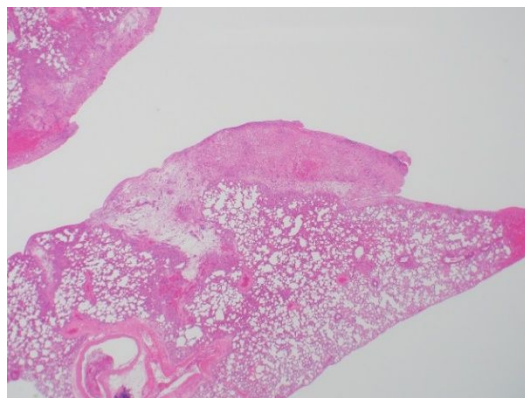


500 倍

(2) 人工胸膜移植部の組織学的評価 (HE 染色)

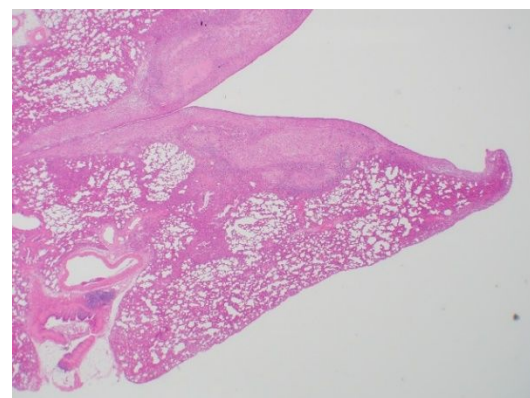
胸膜中皮細胞 1 層+肺線維芽細胞 4 層からなる人工胸膜、胸膜中皮細胞 1 層のみ的人工胸膜いずれも、胸膜欠損部を被覆している。時間経過とともに、移植部の菲薄化がみられる。組織が正常化に向かってしていると推測できる。

左：胸膜中皮細胞 1 層+肺線維芽細胞 4 層

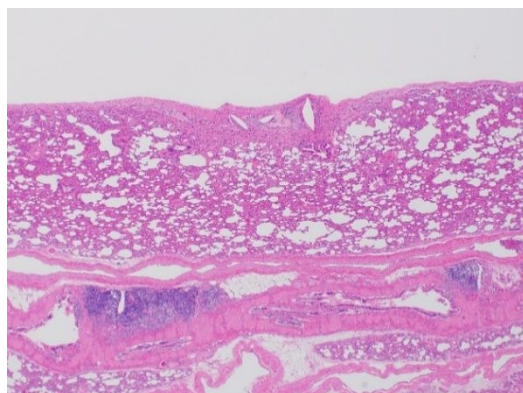


移植 2 週後

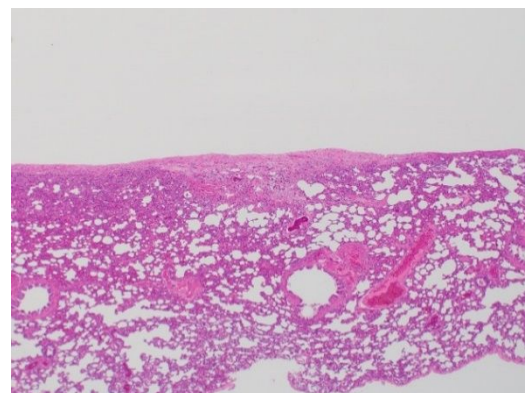
右：胸膜中皮細胞 1 層



移植 2 週後



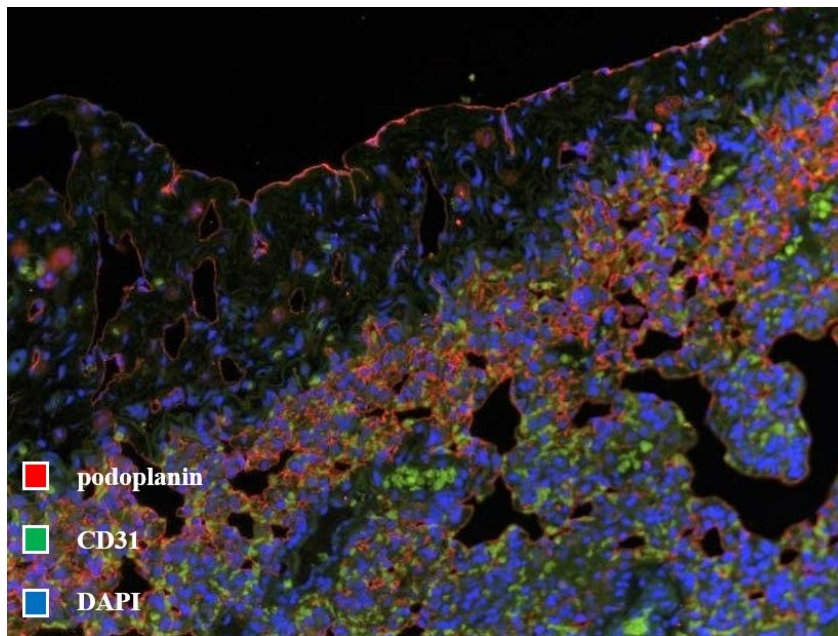
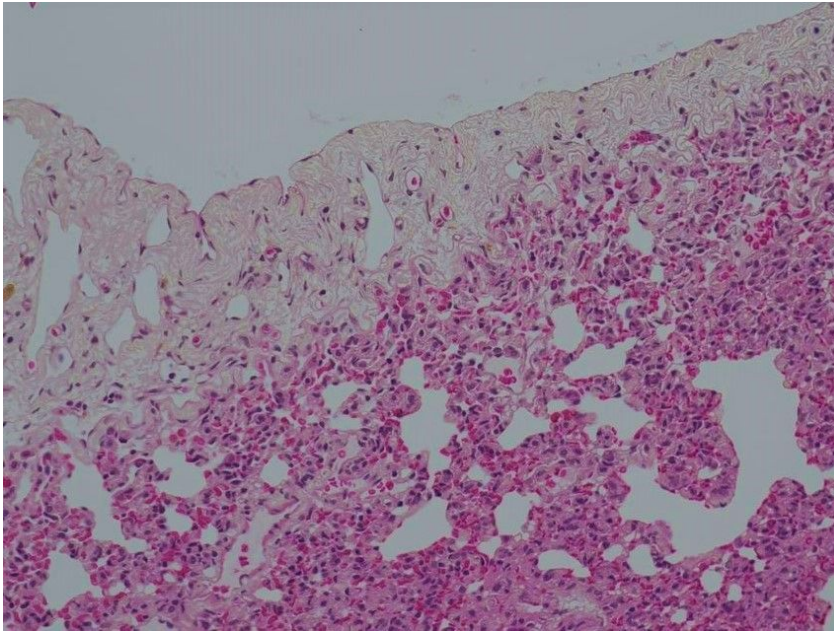
移植 12 週後



移植 12 週後

(3) 人工胸膜移植部の免疫組織化学的解析

強拡大では、人工胸膜表面に扁平な 1 層の細胞を認める。免疫組織化学的解析を行うと、同細胞はポドプラニン陽性を示し、中皮細胞である(胸膜中皮細胞 1 層+肺線維芽細胞 4 層、移植 8 週後)。



結論：電子顕微鏡の観察では、コラーゲンコーティング PGA シート上で作成した人工胸膜は中皮細胞 1 層 + 線維芽細胞 4 層のほうが中皮細胞 1 層のものに比べ中皮細胞が敷石状となり、形態を保っていた。

線維芽細胞作成した人工胸膜は中皮細胞 1 層 + 線維芽細胞 4 層および中皮細胞 1 層のみのいずれにおいても胸膜欠損モデルへの移植により中皮細胞の生着を認めた。作成した人工胸膜は胸膜再生に有効であると考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宋成洋、木村大輔
2. 発表標題 細胞積層化技術を用いたポリグリコール酸ナノファイバー人工胸膜シート作成の試み
3. 学会等名 日本呼吸器外科学会
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------