

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08803

研究課題名(和文)自己細胞を用いた再生気管の臨床応用に向けて

研究課題名(英文)Autologous tissue-engineered trachea for clinical application

研究代表者

小島 宏司(KOJIMA, KOJI)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40288155

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):80歳以上の患者の気管支軟骨からの細胞でも培養可能となった。また培養軟骨細胞/生分解性高分子でなるマトリックスシートを作製する際に、1立方センチメートルあたり軟骨細胞数が最低どのくらい必要なのかも検討でき、8人の患者からの気管支軟骨を培養し、ヌードマウスの背部皮下に移植した。白色の固い培養軟骨を作製することができた。イヌの軟骨細胞の培養条件を検討し頸部皮下に埋植した培養軟骨細胞は、一部は軟骨に成長したが、気道を保つための硬度のあるバイオ気管軟骨の作製に至らなかった。この問題を解決するために、犬のT細胞を一時的に抑制し、免疫不全状態で培養軟骨を作製することを検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己細胞を用いた再生気管の移植実験で国内外から高い評価を受けてきた研究代表者らは、本研究において65歳以上の患者の摘出肺の気管支断端より軟骨を採取し、酵素処理にて単離した軟骨細胞の培養条件を明らかにした。肺癌術後の高齢者からの軟骨細胞を用いて再生軟骨が作製されたことは、多くの患者を救える可能性があり、その社会的意義は以上に高いと考えられる。イヌを用いた実験では、PGAシートに自己軟骨細胞が生着し、ヌードマウスモデルにおいて硬度のある再生軟骨が作製できた。このことは、移植時の条件を改善すれば、すでに使用されているPGAシートを用いることによって、臨床応用への承認時間の短縮に繋がる。

研究成果の概要(英文):We demonstrated the feasibility of creating the cartilage of he trachea using over 80 year-old human chondrocyte (8 patients) in nude mouse model. Dog study was designed to evaluate the ability on autologous tissue-engineered trachea shaped in a helix to form the structural component of he functional trachea replacement. In the result, the gross morphology of the tissue-engineered trachea was white, shiny and hard tissue. However, cartilage content of the tissue was less than 10% of the tissue-engineered trachea. In future study, we will investigate the use of immunosuppressive therapy.

研究分野：呼吸器外科、再生医療、組織工学

キーワード：再生気管 バイオ気管 気道再建 気管移植 培養軟骨 生分解性ポリマー 組織工学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは2003年に、羊の鼻中隔から軟骨を採取し、培養軟骨細胞と生分解性高分子(足場)とのマトリックスを、胸腺の劣化、欠損した免疫不全マウス(以下ヌードマウス)に埋植して作製した再生気管(Kojima et al. FASEB 2003)を世界に先駆けて報告してきた。また同じ培養軟骨細胞を羊の頸部気管に移植した報告(Kojima et al. J Thorac Cardiovasc Surg 2002)も、国内新聞において世界発として報道された。以来10年以上この研究に取り組んでいるが、一ヶ月以上長期生存例はなかった。その問題として、ヌードマウスの皮下に埋植して作製された硬い白色の軟骨組織は、臨床には十分応用可能であるが、同じ培養軟骨細胞を、羊の頸部皮下に埋植した場合は、自己の細胞であるにも関わらず、ヌードマウスで作製されたものほど硬度のあるものではなかった。その上、移植後10日から14日で再生気管軟骨が脆弱し、やがては軟性化して、呼吸困難で犠牲死を余儀なくされる結果であった。それまで、細胞ソースを骨髄細胞(Kojima et al. J Thorac Cardiovasc Surg 2004)にしたり、足場となる材料を変更して試してきた(Kojima et al. Regenerative Research. 2012)が、臨床応用に耐えうる、満足のいく再生気管は作製できていないのが現状であった。本研究はまず、移植前段階の培養軟骨細胞が、どのように正常に近い軟骨に再生していくかを追求し、次に、体内に埋植して作製した再生気管を、正常気管との間に移植した後、脆弱せずして軟性化せず、確実に生着させる方法を考案し、臨床応用への足がかりとした。そのためにまず、ヒトの気管支軟骨より採取した軟骨細胞が肺癌患者のような高齢者からの軟骨で作製可能であるかなどの検討を必要とした。次に、犬を用いた自己細胞が硬度のある再生気管軟骨を作製できるのかを検討する必要があった。

2. 研究の目的

研究代表者らはこれまでの一連の研究において、自己細胞を用いた再生気管の移植実験で国内外から高い評価を受けてきた。しかし移植後に再生気管軟骨が脆弱化し呼吸困難となるため、1ヶ月以上の長期生存例を得られていない。本研究では移植後の気管軟化の問題点の解決を目指した。具体的な研究項目は、65歳以上の高齢者から採取した軟骨組織から、臨床応用が可能な再生軟骨が作製可能なのかを検討した。また、イヌのモデルにおいては、移植前段階において体内に埋植した細胞が、早期に軟骨を形成する手技の検討や、移植時に、吻合部を含む再生気管全周を自己細胞で作製した細胞シートで、外側から覆う意義の証明を企てた。これは気管壁外のシート内細胞が、内側の上皮にシグナルを伝達し、上皮化を促進させることで、再生気管の早期生着を促すと期待した。

3. 研究の方法

人臨床を視野に入れ、学内倫理委員会の許可を得て培養細胞は肺癌患者で肺葉切除される52歳以上の患者の摘出肺を使用した。摘出された肺の気管支断端より採取した軟骨(5mm大)を採取し、酵素処理後、軟骨細胞を6-8週間培養した。トリプシン処理にて回収した培養軟骨細胞を、生分解性高分子(すでに臨床応用されている吸収性縫合糸と同じ材料)に撒き、さらに5-7日間培養した。培養軟骨細胞/生分解性高分子でなるマトリックスシートを、直径10mmのシリ

コンスメントに覆い、ヌードマウスの背部皮下に埋植した。8週間後に摘出した再生気管軟骨の評価を免疫組織学的染色や生化学検査でヒトの Native 気管を比較検討した。

ビーグル犬の頸部気管より 2 気管軟骨輪を摘出した。気管軟骨組織より軟骨細胞を単離し培養した。生分解性高分子製足場に培養軟骨細胞を塗布し、インキュベータで 5-7 日間培養した。自作の直径 20mm(5cm 長) の螺旋状に作製したシリコンチューブの溝に、生分解性高分子の足場と培養軟骨細胞がマトリックスを作製したものを、また細胞の撒かれていない生分解性高分子のシートで全体を覆い、頸部気管の側方に植埋した。全周を覆ったシートの役目は、軟骨輪と軟骨輪との間を、ビーグル犬自身の結合組織で連結させることを目的とした。これは、再生気管軟骨の栄養血管も、ビーグル犬自体の血管で供給されることになる。植埋後の 12 週に再生気管を周囲組織との新生血管を温存して露出する。次に頸部気管を 10 リング長切除して、術野からの換気を行いながら、血管柄付きの再生気管を移植を予定した。

4 . 研究成果

ヒト細胞を用いた研究成果

52 歳から 82 歳までの肺癌患者で、全例肺葉切除を施行された。内訳は男性 4 人、女性 4 人、腺癌 5 例、扁平上皮癌 3 例の 8 症例。摘出後に手術室ですぐに気管支断端を切離し、抗生剤入りの F 12 培養液が入った 50ml の滅菌チューブに入れ、実験室に運んだ。手術室で切離された気管支断端で、まだステイプラーがあり (写真 1)、これを軟骨だけに切除した (写真 2)、コラゲナーゼを用いて酵素処理し、バラバラになった気管支軟骨細胞を T175 の培養フラスコに入れ、4-6 週間 37 度、5%CO2 のインキュベータで細胞培養した。2 回の継代を経て、トリプシン処理にて集められた細胞を PGA シートに播種。約 1 週間、インキュベータで培養し、ネオバールシートを直径 7mm のシリコンチューブに巻き付けた (写真 3)、巻き付けて 2-3 分以内にヌードマウスの背部皮下に埋植した。8 週後に摘出したバイオ気管は、白色を呈した十分に硬度のなる軟膏であった (写真 4a-c)。サフラン染色では、ヒト気管支軟骨と同様に、プロテオグリカンが染まった。ヒト気管支軟骨と同程度に II 型後ラーゲンが染色された (写真 5a, b)。

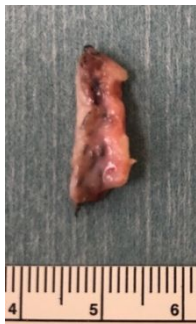


写真 1



写真 2



写真 3

ゼを用いて酵素処理し、バラバラになった気管支軟骨細胞を T175 の培養フラスコに入れ、4-6 週間 37 度、5%CO2 のインキュベータで細胞培養した。2 回の継代を経て、トリプシン

処理にて集められた細胞を PGA シートに播種。約 1 週間、インキュベータで培養し、ネオバールシートを直径 7mm の



写真 4a

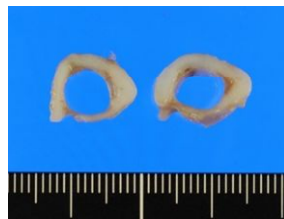


写真 4b

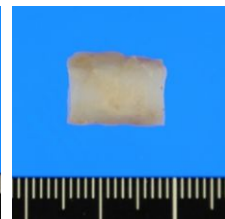


写真 4c

シリコンチューブに巻き付けた (写真 3)、巻き付けて 2-3 分以内にヌードマウスの背部皮下に埋植した。

8 週後に摘出したバイオ気管は、白色を呈した十分に硬度のなる軟膏であっ

た (写真 4a-c)。サフラン染色では、ヒト気管支軟骨と同様に、プロテオグリカンが染まった。ヒト気管支軟骨と同程度に II 型後ラーゲンが染色された (写真 5a, b)。

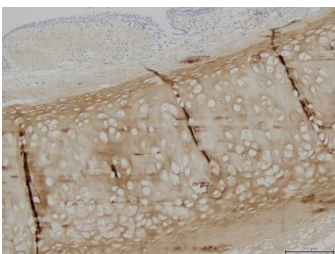


写真 5a Native 気管



写真 5b バイオ気管

ビーグル犬を用いた研究成果

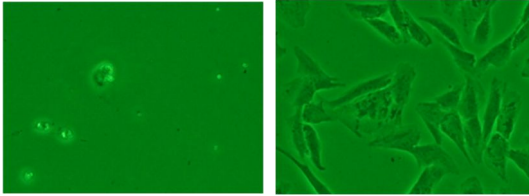


写真 6a (0.3% 6hrs) 写真 6b (0.3% 12hrs)

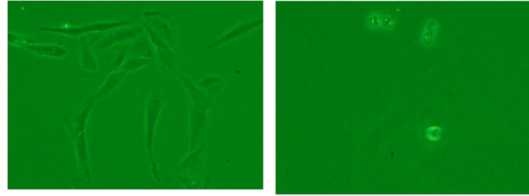


写真 6c (1.5% 6hrs) 写真 6d (1.5% 12hrs)

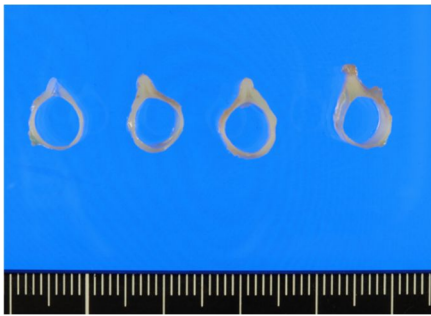


写真 7

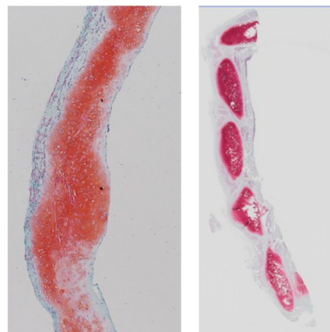


写真 8a

写真 8b

検体を酵素処理にて軟骨細胞を単離したが、ビーグル犬のコラーゲンタイプ II の酵素処理時間や濃度が検索した限りなく、今まで人や羊、ウサギなどで行われた処理方法を用いて、4つのグループを作り検討した。その結果、0.3%濃度で約 12 時間と 1.5%で 6 時間の digestion を行ったグループにおいて、十分な細胞が単離可能であった(写真 6a-d)。本研究では、0.3%で 12 時間の digestion を選択した。2回の継代を経て、4-6 週間かけて、37 度、5%CO₂のインキュベーターで細胞培養後、トリプシン処理にて集められた細胞をネオバールシートに播種した。

ヒト細胞と同様に 1 週間、インキュベーターで培養し、直径 7mm のシリコンチューブに巻いて、ヌードマウスの背中の皮下に埋植した。約 12 週間後に摘出したバイオ気管は白色を呈し、イヌの Native に類似していた(写真 7)。ヘマトキシエオジン染色及びサフラニン染色では、Native と同様にバイオ再生軟骨もプロテオグリカンが染まっているのが確認できた(写真 8a,b)。写真 8a がバイオ気管で写真 8b がイヌ

の native 気管である。

同様に、トリプシン処理にて集められた細胞をネオバールシートに播種し、インキュベーターで培養後、自作の直径 20mm(5cm 長)の螺旋状に作製したシリコンチューブの溝に、生分解性高分子の足場と培養軟骨細胞がマトリックスを作製したものを、また細胞の撒かれていない生分解性高分子のシートで全体を覆い、頸部気管の側方に植埋した。12 週後に摘出した再生気管軟骨は、チューブの形を示し、軟骨組織も認められた

が、この再生気管軟骨を用いた気道再建は脆弱すぎたため、犠牲死させる結果となった。今後は、免疫抑制剤を用いたイヌモデルの研究を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	丸島 秀樹 (Marushima Hideki) (30338941)	聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授 (32713)	

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