

平成21年 5月27日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390437

研究課題名（和文） 頭頸部臓器における多層構造再生技術の開発

研究課題名（英文） Technology of multi-layered tissue engineering for the head and neck organs

研究代表者 大森孝一

(OMORI KOICHI)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10233272

研究成果の概要：

本研究の目的は頭頸部臓器切除後の機能障害の回避と **Quality of Life** の向上をはかり、国民の健康に貢献することにある。頭頸部組織再生をはかるために、線維芽細胞を用いて早期に気管上皮を再生させることができた。歯肉由来線維芽細胞は上皮形成効果が高いこと、脂肪組織由来幹細胞は血管新生能があることを明らかにした。複数の細胞を導入して人工材料を作製し、これを移植し頭頸部の多層構造を同時に再生させる基盤技術を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：移植・再生医療、細胞・組織、バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

頭頸部の臓器は呼吸、嚥下、発音、構音という生命維持に必須の機能に大きく寄与している。頭頸部の口腔、咽頭、鼻腔、喉頭、気管などが癌や炎症で侵された場合、病変切除後の機能障害が大きな問題になる。従来から患者自身の皮弁組織を移植する再建方法などがあるが、複数部位、複数回の手術を要し患者への侵襲は増加し、機能障害なく再建することは難しい。本研究の目的は頭頸部臓器切除後の機能障害の回避と **Quality of Life**

の向上をはかり、国民の健康に貢献する基盤技術を開発することである。

Vacanti らは体外で組織再生をはかる手法で、鼻腔由来軟骨細胞やポリグリコール酸を用いて羊などの動物での気管再生を報告したが、気管の再生組織管を体内に移植すると吸収されるなど、再生組織の耐久性、安全性に問題があり、臨床応用には至っていない。

一方、中村らは体内で臓器再生をはかる *in situ Tissue Engineering* という新しい概念で、ポリプロピレンメッシュとコラーゲンス

ポンジからなるハイブリッド構造による自己組織再生型の人工材料を開発した。

イヌを用いた動物実験で気道上皮の再生と円筒構造の保持が得られ、安全性を確認した後、施設内倫理委員会の承認と患者への十分な説明と同意を得て、大森（研究代表者）らは 2002 年から気道の再生医療を開始し、現在までに 8 例に臨床応用が行われ良好な結果を得ている（Omori, et al. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2005）。

しかしながら、上皮化に約 2 ヶ月かかるという問題があり、術後の感染予防の観点から、上皮化の促進が課題となっている。大森（研究代表者）らは、*in vitro* でのラット気管上皮細胞、気管線維芽細胞の共培養で、線毛細胞、杯細胞、基底細胞への分化誘導の促進、正常気管の特徴である偽多列線毛上皮層の形成、水輸送分子の局在、ムチン分泌量の増加を確認した（Kobayashi, Omori, et al. *Tissue Engineering* 2006）。

線維芽細胞が機能的な上皮層の再生を促進するという予備データが得られたことから、本研究において、この手法を用いて線維芽細胞や脂肪組織由来幹細胞（Adipose-derived Stem Cells: ASC）など最適の細胞を層ごとに組み込むことで、より正常に近い頭頸部臓器の多層構造の再生が実現できるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は頭頸部臓器切除後の機能障害の回避と Quality of Life の向上をはかり、国民の健康に貢献する基盤技術を開発することである。

頭頸部組織再生をはかるため、以下の実験系を構築し、研究を遂行する。

- (1) 気管線維芽細胞の代わりに、上皮層の再生を促進し容易に採取可能な移植用線維芽細胞の供給組織を検索する。
- (2) 脂肪組織由来幹細胞移植による血管網新生を評価する。
- (3) 多種類の細胞を含む移植材料を作製して動物への移植実験を行い、頭頸部臓器切除後の欠損部に、多層構造を同時に再生させるための基盤技術を開発する。

3. 研究の方法

- (1) 採取が容易な自家移植用線維芽細胞の供給組織の検索

①異なる組織に由来する線維芽細胞の採取・培養

実験動物としてラットを使用し気管、皮膚、頬粘膜、歯肉粘膜、鼻粘膜より線維芽細胞を採取し培養する。

②線維芽細胞の増殖能、細胞外マトリックス合成、産生能の測定

一定面積の組織片から採取できる各線維芽細胞の細胞数と継代後の増殖率を、血球計算板によるカウントと BrdU 取り込み量の測定によって比較する。コラーゲンゲル内で培養した各線維芽細胞による細胞外マトリックス合成量を real-time PCR、産生量をウエスタンブロッティングで定量する。

③上皮細胞と線維芽細胞の共培養

線維芽細胞を含むコラーゲンゲル上に気管より酵素処理にて採取した上皮細胞を播種して共培養する。上皮細胞がコンフルエント到達後は、上皮細胞の分化を促進するため空気暴露する。線維芽細胞が上皮細胞の増殖、移動、構造に及ぼす効果を調べる。

④線維芽細胞が上皮細胞の増殖、移動、構造に及ぼす効果

上皮細胞層の一部を剥離し、再び上皮細胞が被覆するまでの時間、共培養した上皮細胞の増殖率を用いて上皮細胞の増殖、移動に及ぼす効果を評価する。上皮細胞層の構造に及ぼす効果を調べるために、Hematoxylin Eosin(HE)染色、および線毛細胞、杯細胞、基底細胞に特異的な抗体による免疫組織化学的手法で評価する。基底膜形成に及ぼす効果も基底膜に特異的な抗体による免疫組織化学的手法で評価する。上皮細胞の機能に及ぼす効果として水輸送、イオン輸送、タイトジャンクションにかかわるタンパク質の局在を免疫組織化学的手法で評価し、上皮細胞の発現量を real-time PCR で、ムチン分泌量は ELISA により測定する。また、走査型電子顕微鏡による上皮表面の線毛被覆面積によって、構造に及ぼす効果を評価する。

(2) 脂肪組織由来幹細胞による血管網新生の評価

ラット腹部・鼠径部から脂肪組織を採取し、コラゲナーゼによる酵素分散法にて脂肪組織を分解後、遠心し上清の成熟脂肪細胞を除去、沈殿画分をセルストレーナーで濾過して得られた細胞が stromal vascular fraction(SVF)といわれる細胞群であり、この細胞群を 3 世代の継代培養を経て ASC を得る。

m-YFP を標識した ASC を含んだマトリゲルを作製し付加させたハイブリッド人工気管モデルと、マトリゲルのみの人工気管モデルをラットに移植し比較する。

再生上皮における単位面積当たりの新生血管数について検討を行う。フルオロセインの静脈注射後の血流を蛍光顕微鏡で観察し、移植組織を抗 CD31、vWF 抗体を用いて免疫組織化学的に血管新生を評価する。m-YFP と vWF で merge させて免疫組織化学的に新生血管数を数え ASC の効果について検討する。

- (3) 最適の細胞を含む移植材料を作製し

て動物への移植実験を行う
(1)、(2)の研究結果に基づいて細胞等
を組み込んだ移植材料を作製して動物への
移植を行う。

①線維芽細胞含有ハイブリッド人工材料 の気管欠損部への移植

ラットおよびウサギを用いて、線維芽細胞
を含むコラーゲンゲルとコラーゲンスポンジ
からなるハイブリッド人工材料を作製し、
これを移植して気管を再建する。摘出
標本の HE 染色、上皮細胞層の厚さにつ
いて評価する。内視鏡、電子顕微鏡による
気管内腔面の観察を行う。

②バイオルミネッセンスイメージングを 利用した移植線維芽細胞の in vivo での 動態観察

ヒカリコメツキムシ由来ルシフェラーゼ
遺伝子およびプラストサイジン耐性遺伝子
を組み込んだレトロウイルスベクターを作
製し、ラット皮膚由来線維芽細胞に感染さ
せてこれらの遺伝子導入を図る。培養の過
程で培養液にプラストサイジンを添加し、
遺伝子導入された線維芽細胞のみを選択培
養する。発光蛋白で標識された細胞を用い
て移植片を作製し、全身麻酔下に別個体
のラットの体幹部皮下に移植片を移植する。
一定の観察期間の後、全身麻酔下に D-ルシ
フェリンを投与し、移植部位に生存してい
る細胞から発せられた蛍光を冷却型高感度
CCD (Andol, iKon-M) で観察する。

③ASC 含有ハイブリッド人工材料の作製 と移植

ラット腹部・鼠径部の脂肪組織から培養
して得られた ASC を、移植後にレシピエ
ント組織と識別するために、細胞質にレト
ロウイルスによるトランスフェクションに
よって緑色蛍光蛋白 GFP あるいは mCherry
などを発現させる。

移植用再生組織を作製するために、生体
適合性のあるコラーゲンスポンジをスキ
ャフォールドとして用い、これに蛍光標
識細胞を播種する。

ASC を得るため脂肪組織を採取したラ
ットを用い、頸部外切開の後に高周波メ
スで組織を切除・凝固することによって
気管の障害モデルを作製する。欠損部
には ASC 含有ハイブリッド人工材料を
移植する。移植細胞は自家移植となる。

一定期間経過してから組織を摘出し、
HE 染色および免疫組織化学的に ASC
の上皮形成促進効果を評価する。

④多種類の細胞を層ごとに組み込んだ人 工材料の作製および動物への移植実験

ラットを用い、移植する細胞には、レ
シピエントと識別するために、レトロウ
イルスによるトランスフェクションによ
って緑色蛍光蛋白 GFP や赤色蛍光蛋白
mRFP1 を

発現させる。線維芽細胞をコラーゲンゲ
ル中に播種し、ASC を隣接組織と線維
芽細胞層の間のコラーゲンスポンジに
含ませて、多層構造の人工材料を作製
し、気道欠損の動物モデルに移植する。
摘出後は免疫学的手法によって炎症等
の免疫反応の有無を調べ、結合組織
の ECM 再生を細胞消化処理後に走査
型電子顕微鏡観察で確認する。上皮
細胞層の構造に及ぼす効果、基底膜
形成に及ぼす効果、上皮細胞の機能
に及ぼす効果について評価するために、
免疫組織化学的手法や走査型電子顕
微鏡による形態観察を行い、上皮機
能に関わるタンパク質の発現量を
real-time PCR 法で、ムチン分泌量を
ELISA によって測定する。

4. 研究成果

(1) ラットの同一個体から気管、皮膚、
頬粘膜、歯肉粘膜、鼻粘膜より線維芽
細胞を採取し培養した。

AB-PAS で上皮の評価をすると気管由
来線維芽細胞と歯肉粘膜由来線維芽細胞
はほぼ正常気管と同形態の AB-PAS 陽
性のムチン産生細胞や線毛細胞のある
偽多列線毛上皮がみられた。

電子顕微鏡においては上皮表面の線毛
被覆率を計測し気管由来線維芽細胞と
歯肉由来線維芽細胞と鼻粘膜由来線維
芽細胞が同程度の被覆率であった。

粘液分泌について MUC5AC にて免疫
組織化学的評価を行い、ELISA でムチ
ン分泌量測定したところ、鼻粘膜由来
線維芽細胞や皮膚由来線維芽細胞では
ムチン分泌量は少なかったが、歯肉由
来線維芽細胞では気管由来線維芽細胞
と同等のムチン分泌量であった (図 1)。

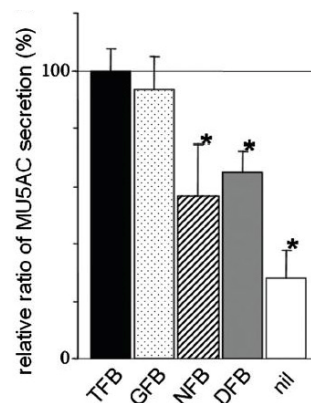


図 1 MUC5AC 分泌量の相対的な比較

TFB: 気管線維芽細胞 (100%)、GFB: 歯肉線維芽細胞、NFB: 鼻
腔線維芽細胞、DFB: 真皮線維芽細胞、nil: 線維芽細胞なし

イオンチャネル及び水輸送チャネルに
ついてはアクアポリン 3, 4 及び
Na-K-ATPase などのタンパク質発現量を

real-time PCR法で測定し気管、歯肉粘膜、鼻粘膜、皮膚由来の線維芽細胞において差はみられなかった。

これらの結果より、歯肉由来線維芽細胞が最も上皮形成を促進することが判明した。

(2) ASCによる血管網新生の評価

m-YFPを標識したASCを含んだマトリゲルを付加させたハイブリッドモデルとマトリゲルのみのモデルにおいて単位面積当たりの新生血管数について検討を行った。m-YFPとvWFでmergeさせて移植7, 14日目で観察し新生血管の数を数えた。

ASCを含んだハイブリッド人工気管モデルでは新生血管の数が7日目、14日目共に有意に多く、ASCは血管新生を促進していることが判明した。

(3) 細胞を含む移植材料を作製して動物への移植実験

①線維芽細胞を含むコラーゲンゲルを付加させたハイブリッド人工材料の気管欠損部への移植

線維芽細胞はラット及びウサギにおいて上皮化を促進していた。1週後は線維芽細胞含有モデルでは上皮形成が認められたが、非含有モデルでは上皮形成を認めなかった。標本観察及び上皮の厚さにおいて線維芽細胞は上皮形成促進していた。また、電子顕微鏡観察において線毛の成熟にも線維芽細胞は促進効果があることがわかった。

上皮形成はラットにおいてもウサギにおいても2週間で、線維芽細胞含有モデルは上皮化が完了していた(図2)。

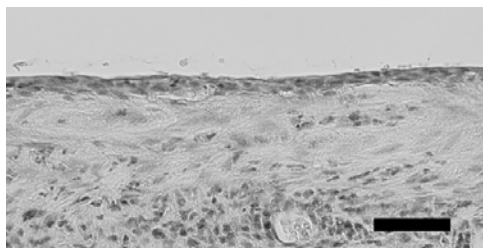


図2-1 ウサギモデル線維芽細胞非含有モデル移植14日目、重層扁平上皮。Bar=50 μm

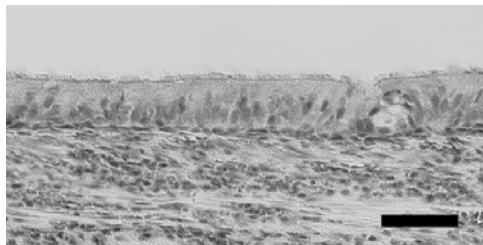


図2-2 ウサギモデル線維芽細胞含有モデル移植14日目、線毛円柱上皮。上皮化完了している。Bar=50 μm

②バイオルミネッセンスイメージングを利用した移植線維芽細胞のin vivoでの動態観察

移植後の観察では、体幹部の移植部位の発光が確認できた。D-ルシフェリンを移植片へ直接注入投与した場合には比較的強い発光が確認された。一方D-ルシフェリンを尾静脈経由で静脈内投与した場合には比較的弱い発光が確認された。本法により、移植した細胞群のin vivoでの動態を同一個体で経時的に観察可能であることを確認した。

③ASC含有ハイブリッド人工材料の移植と評価

摘出した標本をHE染色および免疫組織化学的に調べたところ、ASCを含んだハイブリッド人工気管モデルでは、移植したASCが生着し、ASCを含まないコントロールに比べて上皮化が進んでおり、線毛細胞など分化した細胞を認めた。さらに、再生上皮の厚さを計測したところ、ASCを含むモデルで有意差をもって厚い上皮が得られており、ASCは上皮形成を促進していた(図3)。

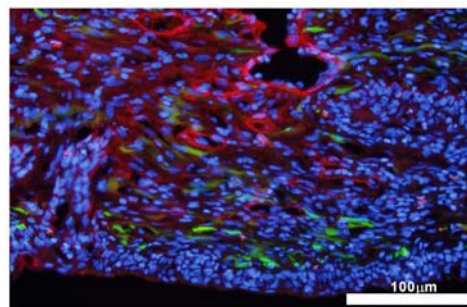


図3 ASC付加工気管の移植後の組織像
青：核(DAPI)、緑：ASC(mCherry)、赤：ラミニン

④線維芽細胞とASCを層ごとに導入した人工材料の移植

標本観察において移植7日目で線維芽細胞とASCともに含む場合、ASC単独よりもより発達した上皮形成がみられた。また、移植14日目ではASC単独、線維芽細胞単独及び両者を含む移植群で正常と同様の偽多列線毛上皮がみられた。

電子顕微鏡においても各細胞を単独で移植した群よりもASCと線維芽細胞を含む群でより密度の高い線毛上皮の形成が確認された。

多種類の細胞を導入して人工材料を作製する技術確立し、これを動物に移植し形態学および免疫組織化学的に評価したところ、組織再生に効果的に働いていた。本研究により、頭頸部の多層構造を同時に再生させるための基盤技術を開発することができた。

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 13 件)

- ① 大森孝一, 中村達雄, 多田靖宏, 野本幸男, 鈴木輝久, 金丸眞一, 安里 亮, 山下 勝, 岡野 渉: 耳鼻咽喉科臨床の進歩—喉頭・気管の再生医療—. 日本耳鼻咽喉科学会会報 112(3):104-109, 2009. (査読無)
- ② 東 恒仁, 野本幸男, 小林 謙, 大森孝一, 和田郁夫: 移植細胞の動態観察のための *in vivo* 蛍光・発光標識法. Surgery Frontier 16(1): 79-84, 2009. (査読無)
- ③ Omori K, Tada Y, Suzuki T, Nomoto Y, Matsuzuka T, Kobayashi K, Nakamura T, Kanemaru S, Yamashita M, Asato R: Clinical application of in situ tissue engineering using a scaffolding technique for reconstruction of the larynx and trachea. Ann Otol Rhinol Laryngol 117(9), 673-678, 2008. (査読有)
- ④ Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Magrufov A, Yamashita M, Shimizu Y: In situ tissue engineering of the cricoid and trachea in a canine model. Ann Otol Rhinol Laryngol 117(8), 609-613, 2008. (査読有)
- ⑤ Sato T, Nakamura T: Tissue-engineered airway replacement. Lancet 372(9655): 2023-2030, 2008. (査読有)
- ⑥ Tada Y, Takezawa Y, Suzuki T, Nomoto Y, Kobayashi K, Nakamura T, Omori K: Regeneration of tracheal epithelium utilizing a novel bi-potential collagen scaffold. Ann Otol Rhinol Laryngol 117(5), 359-365, 2008. (査読有)
- ⑦ Sato T, Tao H, Araki M, Ueda H, Omori K, Nakamura T: Replacement of the left main bronchus with a tissue-engineered prosthesis in a canine model. Ann Thoracic Surgery 86(2):422-428, 2008. (査読有)
- ⑧ Suzuki T, Kobayashi K, Tada Y, Suzuki Y, Wada I, Nakamura T, Omori K: Regeneration of the trachea using a bio-engineered scaffold with adipose-derived stem cells. Ann Otol Rhinol Laryngol 117(6):453-463, 2008. (査読有)
- ⑨ Nomoto Y, Kobayashi K, Tada Y, Wada I, Nakamura T, Omori K: Effect of fibroblasts on epithelial regeneration on the surface of a bioengineered trachea. Ann Otol Rhinol Laryngol 117(1):59-64, 2008. (査読有)

- ⑩ 大森孝一, 中村達雄, 多田靖宏, 野本幸男, 鈴木輝久, 小林 謙, 金丸眞一, 安里 亮, 山下 勝: 気道再建と再生医療. 耳鼻と臨床 54(5):271-279, 2008. (査読無)
- ⑪ 金丸眞一, 梅田裕生, 末廣 篤, 大野恒久, 木谷芳晴, 岸本 曜, 田村芳寛, 平野 滋, 大森孝一: 細胞移植による声帯再生のための細胞培養液の検討. 喉頭 20(1):1-4, 2008. (査読無)
- ⑫ Kobayashi K, Suzuki T, Nomoto Y, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Nakamura T, Omori K: Potential of heterotopic fibroblasts as autologous transplanted cells for tracheal epithelial regeneration. Tissue Engineering 13(9):2175-2184, 2007. (査読有)
- ⑬ Umeda H, Kanemaru S, Yamashita M, Kishimoto M, Tamura Y, Nakamura T, Omori K, Hirano S, Ito J: Bone regeneration of canine skull using bone marrow - derived stromal cells and β -tricalcium phosphate. Laryngoscope. 117(6): 997-1003, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 24 件)

- ① 岡野 渉, 野本幸男, 多田靖宏, 大森孝一: Tissue Engineering によるウサギ気管再生: 線維芽細胞の有用性. 第 8 回日本再生医療医学会, 東京, 2009 年 3 月 6 日.
- ② 金丸眞一, 平野 滋, 田村芳寛, 末廣 篤, 梅田裕生, 大森孝一, 伊藤壽一: [指定演題] 組織工学的的手法による気道狭窄に対する治療. 第 60 回日本気管食道科学会, 熊本, 2008 年 11 月 7 日.
- ③ 岡野 渉, 野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 中村達雄, 大森孝一: ウサギ線維芽細胞を含有した人工材料による気管の再生. 第 60 回日本気管食道科学会, 熊本, 2008 年 11 月 7 日.
- ④ Omori K: [Instruction Course] Instructor, Tissue engineering for regenerative medicine. The 2008 Annual Meeting of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Chicago, USA, September 22, 2008.
- ⑤ 岡野 渉, 野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 中村達雄, 大森孝一: ウサギ線維芽細胞を含有した人工材料による気管の再生. 第 29 回日本炎症・再生医学会, 東京, 2008 年 7 月 9 日.
- ⑥ 大森孝一: [シンポジウム] 気道領域の再生医療. 第 33 回日本外科系連合学会学術集会, 浦安市, 2008 年 6 月 12 日.
- ⑦ 大森孝一: [シンポジウム] 喉頭・気管の再生医療. 第 109 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 大阪, 2008 年 5 月 17 日.
- ⑧ Okano W, Nomoto Y, Suzuki T,

Nakamura T, Omori K: Bio-engineered scaffold with fibroblasts for tracheal regeneration in rabbit model. The 129th Annual Meeting of the American Laryngological Association, Orlando, USA, May 2, 2008.

- ⑨ Kanemaru S, Nakamura T, Yamashita M, Umeda H, Oono T, Hirano S, Ito J, Omori K: The investigation of the potentiality of the cell culture medium with autologous blood serum for cell transplantation therapy for injured vocal fold. The 88th Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological Association, Orlando, USA, May 2, 2008
- ⑩ Tada Y, Takezawa T, Suzuki T, Kobayashi K, Nakamura T, Omori K: Evaluation of bi-potential scaffold for regeneration of the trachea - in vitro and in vivo studies. The 111th Annual Meeting of the Triological Society, Orlando, USA, May 1-4, 2008.
- ⑪ Omori K, Tada Y, Nakamura T, Kanemaru S, Suzuki T, Nomoto Y, Okano W: [Mini-Symposium] Regenerative medicine for airway organs. The 15th World Congress for Bronchoesophagology, Tokyo, Japan, April 1, 2008.
- ⑫ Nomoto Y, Okano W, Kobayashi K, Tada Y, Wada I, Nakamura T, Watanabe M, Omori K: [Mini-Symposium] Bioengineered trachea with fibroblasts. The 15th World Congress for Bronchoesophagology, Tokyo, Japan, April 1, 2008.
- ⑬ Omori K: [Instruction Courses] Tissue engineering for regenerative medicine. The 2007 American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation Annual Meeting & OTO EXPO, Washington DC, USA, September 19, 2007

[図書] (計1件)

- ① 大森孝一: 耳鼻咽喉科・頭頸部外科領域の再生医療. 「今日の耳鼻咽喉科・頭頸部外科治療指針(第3版)」(森山 寛,他編), 医学書院, 東京, p.598-599, 2008.

[その他]

- ① 大森孝一: [放送] 喉頭・気管領域の再生治療. ラジオ NIKKEI 「医学講座」2007年8月1日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大森 孝一(OMORI KOICHI)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10233272

(2) 研究分担者

2007年度

- ① 挾間 章博(HAZAMA AKIHIRO)
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60218394
- ② 中村 達雄(NAKAMURA TATSUO)
京都大学・再生医学研究所・准教授
研究者番号: 70227908
- ③ 和田 郁夫(WADA IKUO)
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40182969

(3) 連携研究者

2008年度

- ① 挾間 章博(HAZAMA AKIHIRO)
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60218394
- ② 中村 達雄(NAKAMURA TATSUO)
京都大学・再生医学研究所・准教授
研究者番号: 70227908
- ③ 和田 郁夫(WADA IKUO)
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40182969