

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591983

研究課題名（和文） ティッシュエンジニアリングによる気管再生誘導技術の開発

研究課題名（英文） Technology of tissue engineering for regeneration of trachea

研究代表者 渡邊 睦

(WATANABE MUTSUMI)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：90305376

研究成果の概要：

近年、組織工学的手法を用いた臓器再生に関する研究が数多く報告され、一部では臨床応用の域にまで到達した。気管に関して我々の研究グループは組織再生型人工気管を開発し、複数の臨床応用を経験し良好な結果を得ている。本研究では、移植後の人工気管内腔面の上皮化促進を図る工夫として、人工気管に線維芽細胞を付加したモデル、人工気管内腔面にコラーゲン薄膜（ビトリゲル）を付加したモデルを作製し、in vivo での評価を行った。その結果両者とも上皮化促進の効果が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007	2,100,000	630,000	2,730,000
2008	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：気管、再生、気管上皮、線維芽細胞、ビトリゲル

1. 研究開始当初の背景

甲状腺癌など気管浸潤をきたしうる悪性腫瘍や、気管カニューレ抜去困難症のように気管狭窄をきたしうる非腫瘍性疾患に対して、根治術として気管切除を考慮することがある。気管切除後の気管再建に関して、安全かつ確実な再建を可能にする人工気管の必要性は高かったにもかかわらず、普及に至ったものは存在しなかった。近年組織工学的手法を用いた各種組織の再生に関する研究が

活発に行われており、一部の領域ではすでに臨床応用の域にまで到達している。気管の再生に関して我々の研究グループでは、骨格としてポリプロピレン製メッシュを用い、この骨格の両面に細胞の足場となるコラーゲンスポンジを付加した組織再生型人工気管を開発した。動物実験で良好な結果が得られたことをふまえて、我々は京都大学倫理委員会および福島県立医科大学倫理委員会の承認を得、これまで複数の臨床例を経験し概

ね良好な結果を得ている。一方、初回臨床応用例の報告の中で人工気管内腔面の完全な上皮化に約2ヶ月を要したことが指摘された。気管上皮は、気道と生体組織の間の物理的な隔壁であるとともに、気道浄化作用や免疫機能を有しており、上皮化の遅延はこれらの機能回復の遅延を意味していた。症例が増えた場合に、瘻孔形成、感染巣の形成、気管内腔面の肉芽形成などの原因になってくる可能性も考えられた。組織再生型人工気管内腔面の上皮化促進を図る工夫が必要と考えられた。

2. 研究の目的

組織工学的手法を用いて、気管再建後の自己再生型人工気管内腔面の上皮化促進に寄与しうる技術の開発が目的であり、以下の2つの方法の有効性について検討した。

(1) 組織再生型人工気管への細胞成分の付加

(2) 組織再生型人工気管表面へのコラーゲン薄膜であるビトリゲルの付加

3. 研究の方法

(1) 細胞成分付加モデル

①ラットを用いた実験:SD系ラットの気管を採取し、酵素処理及び組織片培養によって気管由来線維芽細胞を採取した。レトロウイルスを用いた遺伝子導入技術を用いて、気管由来線維芽細胞に蛍光蛋白遺伝子を導入した。移植片として、蛍光蛋白で標識された気管由来線維芽細胞をI型コラーゲン溶液に一定濃度で混合し、組織再生型人工気管に用いられているものと同等のコラーゲンスポンジ片上に重層・ゲル化させたものを作製した。コントロールとして、I型コラーゲン溶液のみをコラーゲンスポンジ片上に重層・ゲル化させたモデルと、コラーゲンスポンジ片のみのモデルの2種類を用意した。別個体のラットに対して全身麻酔下に頸部気管を露出させ、1.5×3.0mm程度の気管欠損部を作製した。

(図1左)先に作製した3種類の移植片

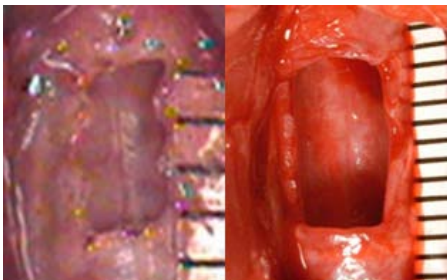


図1 ラットおよびウサギの気管欠損部

左: ラット 右: ウサギ

を欠損部にそれぞれ移植した。術後一定の観察期間の後に気管を摘出、標本を作製し、組織学的に観察評価した。

②ウサギを用いた実験:日本白色腫の気管を採取し、ラットの場合と同様の方法で気管由来線維芽細胞を採取した。移植片として、ウサギ用に円筒状に加工した組織再生型人工気管の一部を切り取りその内腔側に一定濃度の気管由来線維芽細胞を含んだI型コラーゲン溶液を重層・ゲル化させて作製した。コントロールとして組織再生型人工気管そのものを用意した。別個体のウサギに対して全身麻酔下に頸部気管を露出させ、4.0×9.0mm程度の気管欠損部を作製した。(図1右)先に作製した2種類の移植片を欠損部にそれぞれ移植した。術後一定の観察期間の後に気管を摘出、標本を作製し、組織学的に観察評価した。

(2) ビトリゲル付加モデル

コラーゲンスポンジを2.0×3.0cm程度の大きさに切り取り、可溶性I型コラーゲンと細胞培養液を等量混合し、培養皿に移し、その上にコラーゲンスポンジ片を静置して2時間放置し混合液をゲル化させた。その後、温度10°C、湿度40%下の恒温恒湿器内で乾燥させた。室温で保存してガラス化を進行させた。これによりコラーゲンスポンジ表面にビトリゲル薄膜を形成させることができた。使用する前に、PBSを浸して培養皿より剥離し回収した。SD系ラットの気管に約2.0×4.0mmの欠損を作り、欠損部をビトリゲル付きコラーゲンスポンジで閉鎖した。コントロールとしてコラーゲンスポンジのみで気管欠損部を閉鎖したモデルを用意した。術後一定の観察期間の後に気管を摘出、標本を作製し、組織学的に観察評価した。

4. 研究成果

(1) 細胞成分付加モデル

①ラットを用いた実験:線維芽細胞含有モデルでは移植後3日目では単層の扁平上皮が、7日目では重層扁平上皮が、14日目では広範囲に線毛円柱上皮がそれぞれ観察された。(図2)移植した線維芽細胞は7日目には上皮層直下に配列し、

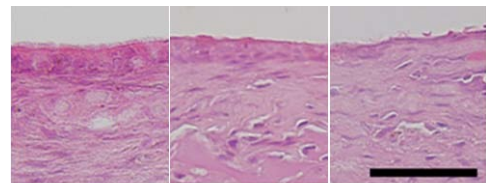


図2 ラット気管欠損部閉鎖後14日目の組織像

右: 気管由来線維芽細胞付加モデル、中央: ゲルのみ重層したモデル
左: スポンジのみのモデル、Bar = 50 μm

14日目にはほぼ消失した。I型コラーゲンのみ重層したモデルでは3日目では単層の扁平上皮が、7日目では重層扁平上皮が、14日目では重層扁平上皮および部分的に線毛上皮がそれぞれ観察された。コラーゲンスポンジ片のみのモデルでは移植後3日目ではスポンジの露出が、7日目では単層の扁平上皮が、14日目には重層扁平上皮がそれぞれ観察された。気管欠損部中央における気管上皮細胞密度を比較したところ線維芽細胞含有モデルではコントロールモデルと比較し有意差をもって増加していた。

②ウサギを用いた実験：線維芽細胞含有モデルでは7日目では未分化な上皮が、14日目では線毛円柱上皮がそれぞれ観察された。コラーゲンスポンジ片のみのモデルでは移植後7日目ではスポンジの露出があり、14日目には未分化な上皮がそれぞれ観察された。

以上のラットおよびウサギを用いた実験結果より、線維芽細胞含有する人工気管は線維芽細胞を含まない人工気管に比べて気管上皮細胞の増殖・分化が進んでいることが示された。組織再生型人工気管を用いた気管再建術後の人工気管内腔面上皮化促進に対して、線維芽細胞導入の有用性が示唆される結果と考えられた。

(2) ビトリゲル付加モデル

顕微鏡下の観察では、従来のコラーゲンスポンジは表面不整であったが、ビトリゲル付きコラーゲンスポンジの表面は平滑であった。ラット気管欠損モデルへの移植実験では、ビトリゲルモデルでは移植後14日目では上皮層に細胞の重層化と基底細胞層の形成をみとめた。28日目では、線毛上皮細胞をみとめた(図3)。コントロールモデルでは移植後14日目では上皮は単層であった。

以上の結果よりコラーゲンスポンジへのビトリゲル付加は移植後の気管内腔の上皮再生促進に有効であると考えられた。表面を平滑にすることで周囲からの上皮細胞の導入が容易となり上皮再生促進に寄与したと考えられた。

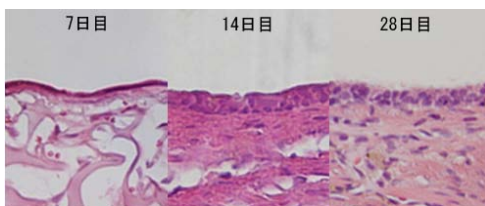


図3 ビトリゲル付加コラーゲンスポンジで閉鎖した気管欠損部の経時的変化

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8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. 査読なし
- 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. 査読なし
- ③Omori 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. 査読あり
- ④Tada 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. 査読あり
- ⑤Suzuki 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. 査読あり
- ⑥Nomoto 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. 査読あり
- ⑦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. 査読なし
- ⑧Kobayashi 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. 査読あり

[学会発表] (計12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 岡野 涉，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。
 - ③ 岡野 涉，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。
 - ④ 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.
 - ⑤ 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.
 - ⑥ 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.
 - ⑦ Nomoto Y, Okano W, Kobayashi K, Tada Y, Wada I, Nakamura T, Watanabe M, Omori K: [Mini-Symposium] Bio-engineered trachea with fibroblasts. The 15th World Congress for Bronchoesophagology, Tokyo, Japan, April 1, 2008.
 - ⑧ 岡野 涉，野本幸男，多田靖宏，他：線維芽細胞を付加したウサギ人工気管の作製。第7回日本再生医療学会，名古屋，2008年3月14日
 - ⑨ 野本幸男，岡野 涉，多田靖宏，他：線維芽細胞を付加したBioengineered Trachea。第10回日本組織工学会，東京，2007年11月9日
 - ⑩ 岡野 涉，野本幸男，多田靖宏，他：線維芽細胞を付加した人工気管の作製。第59回日本気管食道科学会総会，前橋，2007年11月2日
 - ⑪ 野本幸男，多田靖宏，岡野 涉，他：細胞成分を付加したハイブリッド型人工気管モデルの試作。第56回日本耳鼻咽喉科学会東北連合学術講演会，盛岡，2007年7月21日
 - ⑫ 野本幸男，岡野 涉，多田靖宏，他：Tissue engineering for regeneration of the tracheal epithelium. 日本耳鼻咽喉科学会福島県地方部会，福島，2007年4月8日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 睦(WATANABE MUTSUMI)
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号：90305376

(2) 研究分担者

2007年度

① 多田 靖宏(TADA YASUHIRO)
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：70363760

② 横山 秀二(YOKOYAMA SHUJI)
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：80381408

③ 竹澤 俊明(TAKEZAWA TOSHIAKI)
独立行政法人農業生物資源研究所・遺伝子組換え家畜研究センター・主任研究員
研究者番号：50301297

2008年度

① 多田 靖宏(TADA YASUHIRO)
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：70363760

② 野本 幸男(NOMOTO YUKIO)
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：70508811

③ 竹澤 俊明(TAKEZAWA TOSHIAKI)
独立行政法人農業生物資源研究所・遺伝子組換え家畜研究センター・主任研究員
研究者番号：50301297

(3) 連携研究者

2008年度

横山 秀二(YOKOYAMA SHUJI)
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：80381408