

機関番号：211601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20592024

研究課題名 (和文) 組織工学的手法を用いた新たな人工気管の開発と気管再生における上皮化機序の解明

研究課題名 (英文) Tissue engineering for development of new artificial trachea, and elucidation of mechanism on tracheal epithelial regeneration.

研究代表者

多田 靖宏 (TADA YASUHIRO)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70363760

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、ビトリゲルに線維芽細胞増殖因子 (b-FGF) を添加した人工材料を作製し、上皮形成促進効果を評価した。b-FGF なしのビトリゲルをコントロールとし、b-FGF10ng と 100ng を添加したビトリゲルの計 3 種類を評価した。コントロールに比較し、b-FGF 導入モデルは線毛細胞が早期より確認され、上皮化促進効果が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Our technique for tracheal reconstruction using vitrigel collagen-sponge scaffolds with b-FGF application affords a feasible approach for accelerating regeneration of the intra-luminal surface and subepithelial layer of the regenerated tracheal tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

キーワード：気管食道学

1. 研究開始当初の背景

気管の再生医療の臨床応用は、2002 年に京都大学で開始され、福島医大では 2003 年より行われている。移植材料の内腔面上皮化には約 2 カ月を要するが、術後感染の観点からは更なる上皮化の促進が必要と考えられている。

2. 研究の目的

従来の人工気管に、ビトリゲルを付加することで、表面強度は増し平滑になるために上皮化の促進効果が得られることは先の研究にて判っている。ビトリゲルに b-FGF を混入することで、徐放効果が得られ更なる機能的な上皮化の促進効果が得られるかを解明する。

3. 研究の方法

(1) コラーゲンスポンジは適当なサイズにハサミで切断、分割する。4℃でI型コラーゲンと culture medium を等量混合し (ゾル)、dish に 2ml 加える。このゾルの上に切断したコラーゲンスポンジを 1 個ずつ置く。2 時間経過した時点で dish の蓋を開け、温度 10℃、湿度 40% 下の恒温恒湿器内で 48 時間乾燥させる。PBS を 1 dish あたり 2ml ずつ加え 10 分放置後除去する。これを 3 回行う。コラーゲンスポンジよりはみ出したゲルは、メスでトリミングし除去する。再び 10℃40% の条件下で 48 時間乾燥させた後に、室温で保存してガラス化を進行させる。これを、使用する 30 分前に PBS を加え水和させることでコラーゲンスポンジ付きビトリゲルを形成させる。

(2) 作製された bi-potential scaffold の vitrigel 重層面の表面形態を光学顕微鏡と走査電子顕微鏡にて評価する。

(3) ラットやウサギに対しネンブタール静脈投与による麻酔下に頸部気管を露出させる。電気メスにて気管前壁を非管状に切除し、適当なサイズに開窓する。vitrigel を重層した側を内腔面に向け、パッチ状に気管欠損部に縫合する。縫合後閉創する。

(4) 観察期間 (移植後 3 日、7 日、14 日、28 日) の後にネンブタール過剰投与により安楽死させた後、気管を摘出する。

(5) 凍結切片及びパラフィン切片の双方を作製。必要に応じ各種染色 (免疫染色を含む) を行う。また走査電顕用の標本も作製する。

(6) I 型コラーゲンと culture medium 混合液に、更に b-FGF を混合してゾルを作製する。その後の工程は bi-potential scaffold 作製工程に準ずる。

(7) ネンブタール静脈投与による麻酔下に

頸部気管を露出させる。電気メスにて気管前壁を非管状に切除し、開窓する。作製した bi-potential scaffold の b-FGF 含有 vitrigel 面を内腔に向け、パッチ状に気管欠損部に縫合する。縫合後閉創する。

(8) 観察期間 (移植後 3 日、7 日、14 日、30 日) の後にネンブタール過剰投与により安楽死させた後、気管を摘出する。

(9) 凍結切片及びパラフィン切片の双方を作製。必要に応じ各種染色 (免疫染色を含む) を行う。また走査電顕用の標本も作製する。

(10) 通常の光学顕微鏡のほか、蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡、走査型電子顕微鏡を用いて各実験モデルについて経時的に組織を観察・評価する。

4. 研究成果

ビトリゲルに線維芽細胞増殖因子 (b-FGF) を添加した人工材料を作製し、上皮形成促進効果を評価した。b-FGF なしのビトリゲルをコントロールとし、b-FGF10ng と 100ng を添加したビトリゲルの計 3 種類を評価した。

全身麻酔下に SD ラットの気管を露出し 2 × 4mm の気管欠損を作製した。それぞれの人工材料で気管欠損部を多い、前頸筋を縫合することで固定した。3 日、5 日、7 日、14 日の経過観察後に喉頭気管の摘出を行った。標本は 10%ホルマリンによる固定、パラフィン包埋し、気管欠損部の中央が観察できるよう水平断の標本作製し hematoxylin & eosin 染色を行った。

移植後 3 日ではいずれの人工材料でも上皮形成は確認されなかった。移植後 5 日では b-FGF なし群では上皮形成は認めず、b-FGF10ng で単層の上皮形成、b-FGF100ng で重層の上皮形成を認めた。移植後 7 日では b-FGF なし群でも単層の上皮形成を認め、b-FGF10ng, 100ng 群では一部線毛細胞も確認

できるようになった。b-FGF10ng 群では上皮下層の炎症細胞侵入、b-FGF100ng 群では線維芽細胞侵入も確認され厚みのある上皮下層が形成されていた。移植後 14 日では全ての人工材料において多列上皮を認めるようになり、線毛細胞も確認された。b-FGF10ng、100ng 群では上皮下層に血管新生が確認された。

b-FGF による上皮形成および上皮下層の形成促進が確認され、濃度を変化させることで形成が助長されることも確認された。上皮および上皮下層の早期形成は外的刺激や感染防御につながり、結果的には気管再建術後の良好な経過を得るための一つの対策になる可能性があると思われた。

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 34 件)

- ① Kobayashi K, Suzuki T, Nomoto Y, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Wada I, Nakamura T, Omori K: A tissue-engineered trachea derived from a framed collagen scaffold, gingival fibroblasts and adipose-derived stem cells.: *Biomaterials*, 査読有り, 31(18), 4855-4863, 2010
- ② Okano W, Nomoto Y, Kobayashi K, Miyake M, Suzuki T, Tada Y, Nakamura T, Watanabe M, Omori K: Bio-engineered scaffold with fibroblast for tracheal regeneration in a rabbit model.: *Inflammation and Regeneration* 査読有り, 30, 34-39, 2010
- ③ Tanaka A, Itoh F, Nishiyama K, Takezawa T, Kurihara H, Itoh S, Kato

M :Inhibition of endothelial cell activation by bHLH protein E2-2 and its impairment of angiogenesis. *Blood* 査読有り, 115(20):4138-4147, 2010

- ④ Tada Yasuhiro, Suzuki Teruhisa, Takezawa Toshiaki, Nomoto Yukio, Kobayashi Ken, Nakamura Tatu, Omori Koichi: Regeneration of Tracheal Epithelium Utilizing a Novel Bi-potential Collagen Scaffold.: *Ann Otol Rhinol Laryngol* 査読有り, 177(5) 359-365, 2008

[学会発表] (計50件)

- ① 竹澤俊明、山口宏之: コラーゲンビトリゲル薄膜を培養担体に用いた培養角膜モデルの開発状況とその特徴, 日本動物実験代替法学会 2010年12月, 東京
- ② Tada Yasuhiro, et.al.: Quantitative Assessment of Regenerated Tracheal Epithelium by Collagen Vitrigel Scaffold.: 18th Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological Association, 2010年4月29日, アメリカ(ラスベガス)
- ③ 多田 靖宏: ビトリゲルとスポンジのハイブリッド型コラーゲン材料を用いた気管の再生: 公開シンポジウム:3次元培養担体として利用が進むコラーゲンビトリゲル研究の現状と展望, 2009年11月20日, 東京
- ④ Tada Yasuhiro, Takezawa Toshiaki, Suzuki Teruhisa, Kobayashi Ken, Nakamura Tatsuo, Omori Koichi: Evaluation of Bi-potential scaffold for regeneration of the trachea: In vitro and In vivo studies. : 111th The Triological Society, 2008

年5月2日, アメリカ (オーランド)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田 靖宏 (TADA YASUHIRO)
福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70363760

(2) 研究分担者

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

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

三浦 智広 (MIURA TOMOHIRO)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00423806

(3) 連携研究者

なし