

平成 22 年 6 月 24 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008 年度 ～ 2009 年度

課題番号：20890181

研究課題名（和文） ティッシュエンジニアリングによる培養気管開発に関する研究

研究課題名（英文） Tissue Engineering for Bio-engineered Trachea

研究代表者

野本 幸男（NOMOTO YUKIO）

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70508811

研究成果の概要（和文）：気管・喉頭の再建材料として臨床応用された組織再生型人工材料について、再建後の気道内腔面の上皮化促進を目的に細胞成分を付加した培養気管の開発に関する研究を行った。気管上皮細胞及び、気管由来線維芽細胞よりも cell source として利用しやすい真皮由来線維芽細胞を用いて培養気管を作製した。ラットの気管・喉頭の欠損部を再建したところより早期に上皮の成熟、分化が得られた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to search the way to accelerate epithelization on surface of inner lumen of an artificial trachea, which had been clinically applied to surgical reconstructions of trachea or larynx. In this study, we developed several kind of bio-engineered trachea consist of fibroblasts, epithelial cells and the artificial trachea. Heterotopic dermal fibroblasts were useful for those accessibility compared to tracheal fibroblasts. After reconstruction of defects of rats' trachea and larynx with bio-engineered trachea, rapid maturity and differentiation of epithelium were observed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,250,000	375,000	1,625,000
2009 年度	1,040,000	312,000	1,352,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,290,000	687,000	2,977,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：再生、気管、ティッシュエンジニアリング

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ティッシュエンジニアリングを駆使した各種臓器再生に関する研究が急速に進んでおり、いくつかの領域ですでに臨床応用まで到達している。気管の再生に関して、我々の研究グループは骨格として汎用プラ

スティックであるポリプロピレンからなるメッシュ及びリングを円筒状に加工し、この骨格の内側面及び外側面に細胞の足場となるコラーゲンスポンジを付加した自己再生型人工気管を開発した。ビーグル犬を用いた動物実験で良好な結果が得られたことを踏

まえ、我々は京都大学倫理委員会の承認を得て 2002 年より臨床応用を開始した。その後福島県立医科大学倫理委員会の承認を得、この 2 施設において症例が重ねられた。2008 年 3 月までに 8 例の臨床例を経験し、概ね良好な結果を得ている。一方で、初回症例において気管内腔面の完全な上皮化に約 2 ヶ月を要した。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、免疫機能や気道浄化機能に深く関与しており、上皮化の遅延はこれらの機能回復の遅延を意味する。我々は自己再生型人工気管内腔面の上皮化促進を大きな目的と位置づけて、この人工気管に気管由来気管上皮細胞<sup>3)</sup>、もしくは気管由来線維芽細胞<sup>4)</sup>を付加する培養気管の研究を進めてきた。基礎研究の段階ではあるがこれらの細胞付加が人工気管内腔面の上皮化に対して促進的な効果を有することが明らかになった。

培養気管の臨床応用を意識した際に、気管上皮細胞及び線維芽細胞に関しては、現在臨床使用が可能な cell line が存在しないこと、気管の自己由来細胞の術前採取は現実的には困難と考えられこと、などから気管以外の cell source の探索は重要な課題である。また血管系の早期構築は、他の多くの臓器・組織再生と同様に、気管再生においても重要な課題である。

## 2. 研究の目的

in vivo での気管再生において気管由来の細胞が有する効果と遜色ない効果を発揮できる cell source の探索、および線維芽細胞を用いた培養気管のウサギを用いたより大きな気道欠損での評価を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

SD 系ラットの頸部皮膚、足底側の趾皮膚、口腔粘膜を採取し D-MEM 中で組織片培養を行い、各線維芽細胞の採取・培養を試みた。さらに移植片作製用に市販のラット真皮由来線維芽細胞 (CELL APPLICATIONS, INC.) を用意した。

### (2) 培養気管移植片の作製・移植 (ラット)

組織再生誘導型人工気管と同じ構造をもった板状の人工材料を □□ □□PP 程度の大きさに切り取った。一定の細胞濃度でラット真皮由来線維芽細胞を I 型コラーゲン溶液に混合し、混合液 200 μL を人工材料に重層・浸透させ、さらにゲル化させた。さらにその表層にラット気管上皮細胞を播種し上皮細胞層を形成させた。この上皮細胞及び線維芽細胞含有モデルに対しコントロールとして、線

維芽細胞含有 (かつ上皮細胞非含有) モデル及び人工材料のみのモデルを用意した。別個体のラットに対して全身麻酔下に頸部気管・喉頭を露出させ、□□□ □□□PP 程度の気管・喉頭欠損部を作製した。先に作製した □□□□ 種類の移植片を欠損部にそれぞれ移植した。術後所定の観察期間の後に気管を摘出、標本作製し、組織学的に観察評価した (図 1)。

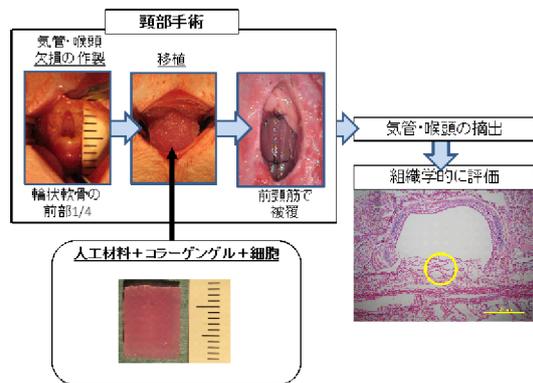


図 1

(3) 培養気管移植片の作製・移植 (ウサギ)  
日本白色種の気管を採取し、組織片培養により気管由来線維芽細胞を採取した。移植片として、ウサギに気管の大きさに合わせ円筒状に加工した組織再生誘導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・ゲル化させて培養気管を作製した。コントロールモデ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、□□□ □□□PP 程度の気管欠損部を作製した。

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、標本作製し、組織学的に観察評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞培養

ラット頸部皮膚及び足底側の趾皮膚を組織片培養したところ、紡錘形を呈した線維芽細胞を得ることが出来た。これを継代培養することで培養気管を作製するのに十分な細胞数を確保できることが確認出来た。口腔粘膜は組織片培養の際に紡錘形を呈した線維芽細胞の群と、敷石状を呈した上皮細胞群とが混在しており、今後利用を考慮した際には細胞の選別・純化が必要と考えられた。

### (2) 培養気管移植片の作製・移植 (ラット)

① 上皮下層： 移植片移植 1 週後の組織像を

比較したところ、上皮細胞及び線維芽細胞含有モデルでコラーゲン繊維がもっとも緻密であり、人工材料のみのモデルではもっとも疎な構造であった。2週後では1週後に比べ各モデルともより緻密な構造となっていたが、緻密さを比較したところ、1週後と同様に上皮細胞及び線維芽細胞含有モデルでコラーゲン繊維がもっとも緻密であり、スポンジのみのモデルではもっとも疎な構造であった。上皮層以下の層構造に関する上皮細胞及び線維芽細胞含有モデルで層構造がもっとも明瞭であり、スポンジのみのモデルではもっとも不明瞭であった。血管形成は2週後ですべてのモデルで確認された。コラーゲンスポンジ片のみのモデルではその他の2つのモデルに比べ新生血管が脆弱であった。以上より上皮下層の成熟は上皮細胞及び線維芽細胞含有モデルで層構造がもっとも進行しており、スポンジのみのモデルではもっとも遅かった。(図2、図3)

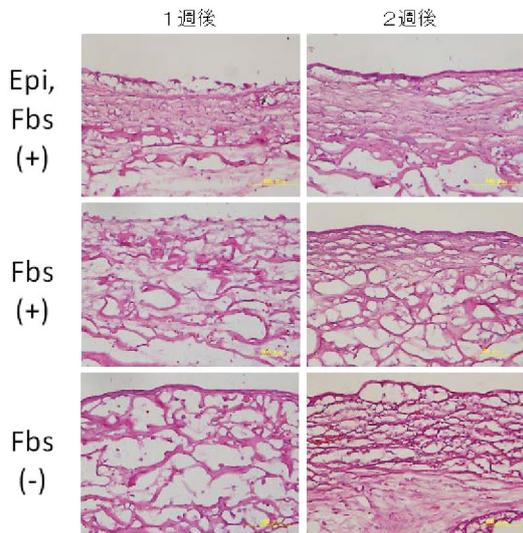
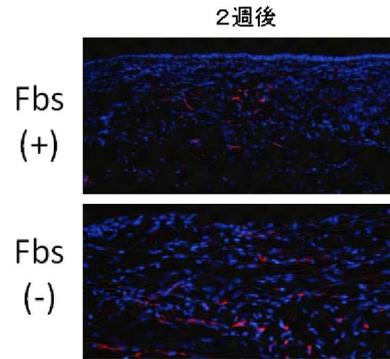


図2 欠損部中央の組織像 Epi, Fbs(+): 上皮細胞及び線維芽細胞含有モデル Fbs(+): 線維芽細胞含有モデル Fbs(-): 細胞非含有モデル

②上皮層: 移植片移植2週後の組織像を比較したところ、上皮細胞及び線維芽細胞含有モデルで立方～円柱上皮を認めた。線維芽細胞のみのモデルでは重層扁平上皮様の上皮を認めた。スポンジのみのモデルでは単層扁平上皮様の上皮形成を認めた。以上より上皮層の分化は上皮細胞及び線維芽細胞含有モデルで層構造が最も進行しており、スポンジのみのモデルでは最も遅かった。(図4)

①及び②の結果より、線維芽細胞や上皮細胞の付加による上皮化の促進効果が示唆された。



(赤: von Willebrand因子 青: 核)

図3 欠損部中央の免疫組織像 Fbs(+): 線維芽細胞含有モデル Fbs(-): 細胞非含有モデル

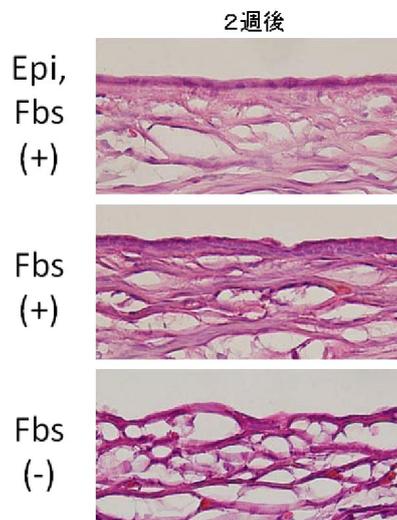


図4 欠損部中央の組織像(拡大像) Epi, Fbs(+): 上皮細胞及び線維芽細胞含有モデル Fbs(+): 線維芽細胞含有モデル Fbs(-): 細胞非含有モデル

### (3) 培養気管移植片の作製・移植(ウサギ)

移植片移植1週後では線維芽細胞含有モデルでは上皮形成、上皮細胞の重層化が認められた。スポンジのみのモデルでは上皮形成は認められなかった。

移植片移植2週後では線維芽細胞含有モデルでは線毛円柱上皮が形成されていた。スポンジのみのモデルでは上皮形成、上皮細胞の重層化にとどまっていた。

以上の結果より、ウサギを用いたより大きな気管欠損に対しても、培養気管移植後の上皮に関して、線維芽細胞含有モデルでは気管上皮形成が進んでいたと考えられた。(図5)

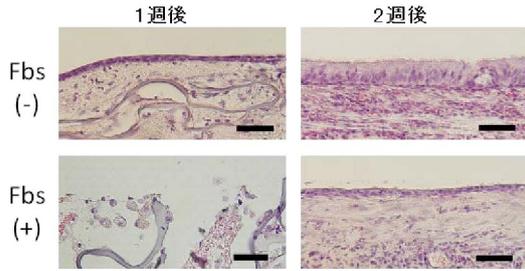


図5 欠損部中央の免疫組織像 (ウサギ)  
Fbs(+):線維芽細胞含有モデル Fbs(-):細胞非含有モデル

## 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5件)

①Okano W, Nomoto Y, et al. Bio-engineered scaffold with fibroblasts for tracheal re-generation in a Rabbit Model, Inflammation and Regeneration. 査読なし, 30巻, 34-39頁, 2009年

②Okano W, Nomoto Y, et al. Bioengineered Trachea With Fibroblasts in a Rabbit Model. Annals of Otology, Rhinology & Laryngology, 査読有り, 118巻, 796-804頁, 2009年

③Omori K, Nomoto Y, et al. Clinical application of in situ tissue engineering using a scaffolding technique for re-construction of the larynx and trachea. Annals of Otology, Rhinology & Laryngology. 査読有り, 117巻, 673-678頁, 2008年

④Tada Y, Nomoto Y, et al. Regeneration of tracheal epithelium utilizing a novel bi-potential collagen scaffold. Annals of Otology, Rhinology & Laryngology, 査読有り, 117巻, 359-365頁, 2008年

⑤Nomoto Y, et al. Effect of fibroblasts on epithelial regeneration on the surface of a bioengineered trachea. Annals of Otology, Rhinology & Laryngology. 査読あり, 117巻, 59-64頁, 2008年

[学会発表] (計4件)

①野本 幸男, 喉頭・気管の組織再生と修復機構—ハイブリッド人工材料を用いて— 第22回日本喉頭科学会, 2010年3月5日, 下関市

②岡野 渉, 野本幸男, 他. 線維芽細胞を用いた Tissue Engineering によるウサギ気管再生. 第21回日本喉頭科学会. 平成21年3月26日, 前橋市

③岡野 渉, 野本幸男, 他, Tissue Engineering によるウサギ気管再生:線維芽細胞の有用性. 第8回日本再生医療学会. 平成21年3月6日, 東京

④岡野 渉, 野本幸男, 他. 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. 平成20年11月6日~7日, 熊本市

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

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:

(2) 研究分担者

なし

連携研究者

なし