

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 2 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591827

研究課題名（和文） 細胞シート工学による気漏閉鎖に用いる新規組織修復材の開発

研究課題名（英文） Development of a novel sealant material for lung air leaks by the cell sheet engineering

研究代表者

神崎 正人（KANZAKI MASATO）

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：80277136

研究成果の概要（和文）：

皮膚線維芽細胞シートは、温度応答性培養皿にて1週間で低温処理のみで回収した。細胞シートを、F-344ヌードラットに移植し、気漏閉鎖をした。4週間後に細胞シート移植左肺を摘出し、組織学的評価を行なった。再開胸時、移植部位に癒着はなく、シート周辺には小血管を認め、シート表面には単層の扁平な細胞を認め、胸膜中皮細胞であった。電子顕微鏡では、シート表面には幼弱な微絨毛、シート内部は細胞外マトリックスで肥厚していた。細胞シートは、線維芽細胞増殖因子、血管内皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子を産生していた。

研究成果の概要（英文）：

After 1 week, skin fibroblasts cultured on the temperature-responsive surfaces were then transferred at 20 °C for non-invasive cell sheet harvest. For cell sheet transplantation, F-344 athymic rats were performed a left-lateral thoracotomy. An incision was set in left lung. Air leakages were confirmed and closed with the transplantation of cell sheets. After 4 weeks, re-thoracotomy was performed and the transplanted area was observed. Fibroblast sheets adhered to the lung surface without leural adhesion. Neovascular structure was present around the transplanted fibroblast sheet. On the outer surface, host mesothelial cells had migrated to cover the transplanted fibroblast sheet. In transmission electron microscopy, mesothelial cells had short immature microvilli and transplanted fibroblast sheets had present abundant extracellular matrix. Fibroblast sheets had secreted basic-FGF, VEGF, and HGF.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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・胸部外科学

キーワード：呼吸器外科、肺気漏、細胞シート、組織工学、組織修復材

1. 研究開始当初の背景

肺癌、自然気胸などに対する外科手術において、肺切除にともなう肺気漏には、術中に縫合閉鎖、筋肉弁被覆、壁側胸膜被覆などの様々な手技、フィブリン糊などの組織修復接着剤、人工補強材による対策がとられてきた。肺気漏閉鎖などの手術操作にもかかわらず術後に遷延性する気漏には、抗生剤、抗がん剤、自己血等により炎症を惹起し、胸壁と肺の間を癒着させ、気漏を閉鎖する方法がおこなわれている。しかし、手術手技は外科医の技量に左右されること、残存肺組織の肺機能の維持、癒着にともなう肺機能の低下や疼痛、修復接着剤・補強材の脱落といった問題がある。また、フィブリン糊は血液製剤でドナー血由来のヒト凝固因子、血清アルブミン、トロンビン、牛肺抽出物が含まれ、感染症の可能性を完全に否定できない。さらに、気漏が遷延し、胸腔ドレーン留置期間の延長で入院期間が延長し、患者の精神的、経済的負担が増す。加えて、遷延性気漏が重症肺炎、膿胸、呼吸不全等の重篤な合併症に移行することもある。理想的な気漏閉鎖を実現する術中組織修復材には、呼吸にともない伸縮する肺に追従する強力な接着力、柔軟性が要求される。

2. 研究の目的

本申請では、術中気漏閉鎖のための新規技術創成を目的として、細胞シートを用いて肺気漏を閉鎖する再生医療的治療を提案する。

3. 研究の方法

動物モデルとしてはラットを用いる。全身麻酔下にルシフェラーゼトランスジェニックラットおよびGFPラットの新生仔ラット皮膚を採取し、皮膚を細片化し、ディスペーゼにて酵素処理を施し表皮を除去し、真皮のみとする。真皮をさらにコラゲナーゼにて酵素処理にて線維芽細胞を単離し、培養に供する。また、無処理の細片化した皮膚を組織片培養する。初代培養後4日目頃に細胞が培養皿上に増殖したこと確認し、温度応答性培養皿にて培養し、皮膚線維芽細胞シートとして脱着・回収する。ラットを気管内挿管、全身麻酔下に、左開胸し、左肺を約5mm切除し、肺からの空気漏れを確認し、回収した細胞シートをあらかじめ2枚重ねた状態としておき、空気漏れ箇所貼付し、気漏を閉鎖する。術後4週間飼育し、再開胸し、移植した細胞シートを観察する。この観察には、胸壁と肺との癒着、細胞シートの生着、シート移植部における胸膜面の肥厚、胸水の有無、感染の有

無などを行う予定である。さらに、移植前の回収した細胞シートの生化学的評価を行い、成長因子などを測定し、細胞シートを移植した肺を摘出し、組織学的、免疫組織学的な評価および超微細構造の評価を行う。

4. 研究成果

新規の気漏閉鎖法の臨床応用に向けた皮膚線維芽細胞シートの最適化の検討をした。予備的検討では、移植可能な細胞シート作製には、小動物で約1週間、大動物では約2週間要した。今回、ルシフェラーゼトランスジェニックラットおよびGFPラットの新生仔ラット皮膚から線維芽細胞シートを作製、回収までの期間は約1週間であった。作製・回収した細胞シートの構成細胞は、蛍光抗体によるフローサイトメトリーで99%程度の純度で線維芽細胞を検出した。

細胞シートの機能的評価として、移植実験を行った。細胞シートによる気漏閉鎖実験では、免疫系を抑制されたF-344ヌードラットを用い、上記の細胞シート移植をした。細胞シート移植直後より、肺気漏は消失し、細胞シートは人工呼吸器による肺の呼吸運動に追従し、滑脱することなく伸縮を繰り返した。細胞シートの生体内での動向を、ルシフェラーゼ陽性細胞から作製した細胞シートを用いて主として血流の有無により評価した。ルシフェラーゼ陽性細胞から作製した細胞シートを移植したF-344ヌードラットでは、移植後1日目、3日目、5日目、1週間後、9日目、12日目、2週間後、4週間後までルシフェリンを静脈内注射し、*in vivo* bioluminescence imagingを用いて移植した細胞シートの発光を確認でき、ホストドナー間で新生血管ができていた。4週間後に細胞シートを移植した左肺を摘出し、組織学的評価を行なったところ、気漏部位に移植した細胞シートを確認した。シート周辺には小血管を認めた。シート表面には単層の扁平な細胞を認め、胸膜中皮細胞と考えられた。また、GFP陽性細胞シート移植後は、4週間目での観察では、再開胸時、細胞シート移植部位は癒着を認めず、シート移植部位に青色光を照射すると、シート表面で緑色に蛍光し、シート表面はルシフェラーゼ陽性細胞シートと同様に、単層の扁平な細胞を認め、胸膜中皮細胞のシート上への進展を認めた。細胞シート移植部では、胸膜面は肥厚しており、組織・免疫組織学的検討では、シート内部は自身の産生したコラーゲン、エラスチンなどの細胞外マトリックスにより肥厚していた。超

微細構造は、走査型・透過型電子顕微鏡により評価した。シート表面には、中皮細胞と比較し、台形の大型細胞で置換されていた。この細胞の確認のため、あえて細胞シート移植後の飼育期間を3ヶ月まで延長した。移植後3ヶ月でのシート表面の観察では、表面は小型の胸膜細胞により占められていた。また、移植後4週では、幼弱な微絨毛を認めていたが、移植後3ヶ月では、nativeの胸膜中皮細胞と遜色のない微絨毛に覆われていた。シート内部では、膠原線維を中心とした細胞外マトリックスにより肥厚していた。

また、機能的評価として成長因子の有無を酵素免疫測定法に行った。皮膚線維芽細胞シートが産生する成長因子の確認では、線維芽細胞増殖因子、血管内皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子を認めた。低温処理し回収した細胞シートでは、血管内皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子に比べ、線維芽細胞増殖因子の産生は少量であった。さらに、実臨床を考慮し、細胞シートの凍結を行った。通常の凍結では、簡易キットを用い、細胞のダメージを最小限に留める方法が用いられているが、従来の一般的な凍結方法よりダメージを軽減するために、10%ジメチルスルホキシドの培養液内に細胞シートを封入し、冷却しながら磁場環境の中で微弱なエネルギーを与え、過冷却状態を保ち、その後、瞬時に冷凍させ細胞シートを凍結した。保存はマイナス176度の液体窒素内で1か月行い、その後凍結融解し、細胞シートの評価を行った。凍結融解した細胞シートは、未凍結の細胞シートと比べ、ややソフトであった。成長因子は同様に、線維芽細胞増殖因子、血管内皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子を測定した。凍結融解細胞シートでは、未凍結細胞シートに比べ、多量の線維芽細胞増殖因子を分泌していた。成長因子の分泌・産生により、皮膚線維芽細胞シートを移植することで、創傷治癒は促進されると考えられた。

凍結融解細胞シートの機能的評価を、細胞シートの接着性により行った。F-344 スードラットに肺気漏を作製し、空気漏れのある部分に細胞シートを貼付した。凍結融解細胞シートも容易に肺、胸膜面に接着し、肺気漏を閉鎖した。移植後4週間での再開胸時の肉眼的観察では、未凍結細胞シート移植部の所見とは異なり、移植部の拘縮はなく、わずかに肺、胸膜損傷部の陥凹を認めるも、呼吸に伴い、柔軟に収縮を繰り返した。移植部の拘縮が少なかったことは、前記の多量の線維芽細胞増殖因子分泌が寄与している可能性が示唆された。

一方、細胞シートを肺気漏モデルに移植し、移植後4週間での移植部の拘縮に着目し、肺胞壁の破壊に伴い肺のコンプライアンスの増大し換気が障害される肺気腫の治療にも

応用できる可能性が示唆され、線維芽細胞が産生する膠原線維の伸縮力を利用し細胞治療により弾性ネットワークを作製し、肺コンプライアンスを減少させる試みを行った。実験方法は気漏を作製せず、単に細胞シートを臓側胸膜表面に移植する方法を選択した。再開胸時シートと胸壁には癒着はなかった。移植後4週間での再開胸時、シート移植部に一致し肺表面は収縮を認めた。組織学的には細胞シートは肺胸膜面に強固に接着し生着していた。線維芽細胞により産生された膠原線維をシート内部に確認した。細胞シート移植により肺を切除することなく肺コンプライアンスを低下させ、弾性を増加させる可能性が示唆された。

培養2週間の時点での回収した細胞数の検討では、組織片培養では単位組織あたりの回収細胞数は 5.1×10^3 個に対して、酵素処理による通常培養により回収した細胞数は 3.3×10^3 個と組織片培養が多く細胞を回収可能であった。さらに、組織片培養を行った深皮結合組織を上皮側と脂肪組織側に分けて、培養組織片数、細胞の這い出し組織数、平均這い出し率を比較した。培養組織片数は上皮側183個に対し、脂肪組織側70個で、細胞が這い出した組織片数は上皮側84個、脂肪組織側6個で、平均細胞這い出し率はそれぞれ $51 \pm 15\%$ 、 $8 \pm 3\%$ で、上皮側の深皮結合組織がより効率良く細胞を回収できた。

シート作製には単離した線維芽細胞の播種数、採取組織片の量に依存しており、ヒト臨床応用では、当然ながら可能な限り採取する組織は少量であることが望ましく、今後は、大動物等で、培養期間の最適化に加え、採取組織量の最適化の検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

①Kanzaki M, Yamato M, Takagi R (他4名, 1番目), Controlled collagen crosslinking process in tissue-engineered fibroblast sheets for preventing scar contracture on the surface of lungs, *J Tissue Eng Regen Med.*, in press, , doi: 10.1002/term.533, 2012, 査読有

②小山邦広、大貫恭正、神崎正人 (他6名, 3番目), 50歳以上の中高齢者気胸に対する胸腔鏡補助手術例の検討, *胸部外科*, 64巻, 275-279, 2011, 査読有

③宮路博子, 神崎正人, 宮本有正 (他1名, 2番目), フィブリン糊の胸膜癒着効果、臓側胸膜肥厚に関する実験的検討, *日呼外会誌*, 25巻, 13-20, 2011, 査読有

④井坂珠子, 神崎正人, 吉川拓磨 (他3名, 2番目), 生分解性ポリマーを用いた気漏閉鎖

の実験的検討, 日本気胸・嚢胞性肺疾患学会雑誌, 10 巻, 88-91, 2010, 査読有

⑤神崎正人, 大貫恭正 (1 番目), 肺の再生医療, 治療学, 43 巻, 631-636, 2009, 査読無

⑥神崎正人, 大貫恭正, 岡野光夫 (1 番目), 細胞シート工学の再生医療への応用, THE LUNG perspectives, 17 巻, 407-413, 2009, 査読無

〔学会発表〕(計 12 件)

①神崎正人, (1 番目), 組織工学によるアロジェニック代用胸膜, 第 5 回東京女子医科大学・早稲田大学 TWIns ジョイントシンポジウム, 2011. 12. 10, 東京

②神崎正人, 大和雅之, (他 11 名, 1 番目), 組織工学によるアロジェニック代用胸膜の生体内動向, 第 64 回日本胸部外科学会定期学術集会, 2011. 10. 11, 名古屋

③Isaka T, Kanzaki M, (他 10 名, 2 番目), Lung Tissue Engineering Using Mesothelial Cell-Sheets For Pleural Injury, Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society Asia Pacific Meeting 2011, 2011. 8. 3, シンガポール

④井坂珠子, 神崎正人, (他 5 名, 2 番目), 肺気漏閉鎖に用いる細胞シートについての検討, 第 28 回日本呼吸器外科学会, 2011. 5. 14, 大分

⑤神崎正人, 大和雅之, (他 6 名, 1 番目), ヒト皮膚線維芽細胞培養法の検討, 第 28 回日本呼吸器外科学会, 2011. 5. 13, 大分

⑥神崎正人, 大和雅之, (他 6 名, 1 番目), 代用胸膜による胸膜損傷に対する創傷治癒効果, 第 10 回再生医療学会, 2011. 3. 1, 東京

⑦井坂珠子, 神崎正人, (他 4 名, 2 番目), 皮下脂肪組織由来細胞シートによる肺胸膜修復についての検討, 第 10 回再生医療学会, 2011. 3. 1, 東京

⑧神崎正人, 大和雅之, (他 5 名, 1 番目), 気漏閉鎖に用いる細胞シートの磁場環境下凍結の検討, 第 10 回日本内視鏡外科学会, 2010. 10. 18, 横浜

⑨神崎正人, 大和雅之, (他 8 名, 1 番目), 細胞治療による肺コンプライアンスを減少させる実験的検討, 第 27 回日本呼吸器外科学会, 2010. 5. 14, 仙台

⑩神崎正人, 大貫恭正, (1 番目), 呼吸器外科手術における細胞シートの可能性, 第 3 回東京女子医科大学・早稲田大学 TWIns ジョイントシンポジウム, 2010. 1. 16, 東京

⑪神崎正人, 大和雅之, (他 10 名, 1 番目), 細胞シート移植後の同一個体内移植片の経時的観察による検討, 第 62 回日本胸部外科学会定期学術集会, 2009. 10. 12, 横浜

⑫Kanzaki M, Yamato M, (他 6 名, 1 番目), Off-the-shelf cell sheets for closure of

visceral pleural injuries, Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society Asia Pacific Meeting 2009, 2009. 9. 1, ソウル

〔図書〕(計 1 件)

①神崎正人, 大貫恭正, 分担 (1 番目), 難治性気胸に対するの細胞シートによる治療について, EBM 呼吸器疾患の治療 2011-2012, 永井厚志, 大田 健, 江口研二, 橋本 修編集, 中外医学社, 2011, p491-496

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神崎 正人 (KANZAKI MASATO)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号: 80277136