

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08892

研究課題名(和文) 自己細胞を用いた気管の再生

研究課題名(英文) Autologous Tissue Engineered Engineered Trachea

研究代表者

小島 宏司 (KOJI, KOJIMA)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：40288155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、80歳以上の患者から採取した気管支軟骨組織からでも軟骨細胞の培養が可能であることを立証した。また培養条件の設定や2回の細胞継代でバイオ軟骨を作製するための細胞数が確保でき、ヌードマウスの移植モデルで作製できた。次に実験モデルとしたウサギでも気管から採取した組織で軟骨細胞の培養が可能であることを確認した。ウサギの鼻中隔より採取した散骨細胞でも、ヌードマウスの背部皮下に埋植し、ヒツジやヒトと同じような白色のバイオ軟骨を作製することに成功した。また、全身麻酔下でウサギの気管再建の実験も成功し、技術的にウサギの自己細胞を用いたバイオ気管の移植が可能であることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、自己組織から採取して得られた培養細胞を、簡便で誰もが容易に培養できる方法を完成させることができた。軟骨培養細胞も2回の継代にて安定した細胞数を得られるようになった。またヌードマウスモデルではnativeの気管軟骨と硬度においても遜色がないことを証明できた。この研究成果は、現時点で気管移に関してドナー不足や免疫抑制剤を一生使用しなければならないことを考えれば、将来移植にとって代わる可能性を秘めており社会的意義は大変高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to evaluate the ability of autologous tissue engineered trachea. Cell-polymer constructs formed de novo cartilage in the shape of cylinders in rabbit model. This study demonstrated the feasibility of recreating the cartilage with autologous tissue harvested from nasal septum procedure. In addition, nasal septum provides a simultaneous source of epithelial cells. The gross appearance of the tissue engineered trachea looked very similar to native tracheal cartilage. This study also demonstrated the ability of direct anastomosis in each trachea after resected 1 cm in length in the rabbit model.

研究分野：呼吸器、再生医療

キーワード：再生気管 バイオ気管 生分解性ポリマー 気道再建 気管移植 培養細胞

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは 2003 年に羊の鼻中隔から軟骨を採取し、培養軟骨細胞と生分解性高分子(足場)とのマトリックスを、胸腺の劣化、欠損した免疫不全マウス(以下ヌードマウス)に埋植して作製した再生気管 (Kojima et.al.Faseb 2003)を世界に先駆けて報告した。また同じ培養細胞を羊の頸部気管に移植した報告 (Kojima et.al.J Thoracic Cardiovasc Surg 2002)も国内新聞において世界初として報道された。以来 20 年間この研究に取り組んでいるが、大動物実験において一ヶ月以上の長期生存例はいない。その問題として、ヌードマウスの皮下に羊の培養軟骨細胞を埋植して作製された軟骨組織は、臨床応用可能な硬度であるが、同じ培養軟骨細胞を、羊の頸部皮下に埋植した場合は、自己の細胞であるにもかかわらず、ヌードマウスで作製されたものほど硬度のあるものではない。その上、移植後 10-14 日で再生軟骨が脆弱し、やがては軟性化して、呼吸困難で犠牲死を余儀なくされる結果であった。これまでに、細胞ソースを骨髄細胞 (Kojima et al. J Thorac Cardiovasc Surg 2004)としたり、足場となる材料を変更して試してきた(Kojima et al.Regenerative Research. 2012)が、いまだ臨床応用に耐えうる、満足のいく再生気管は作製されていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究は、なぜ再生気管軟骨が軟性化してしまうのかの解明を目指す。まず、移植前段階において、体内に埋植した培養軟骨細胞が、移植可能な硬度を持った再生気管になるための条件を追求(免疫抑制剤の使用など)する。次に、吻合部を含む再生気管全周を自己細胞シートで外側から覆う。これは気管壁外を覆ったシート内の細胞が、気管内側の上皮にシグナルを伝達することによって上皮化を促進させ、再生気管の早期生着を促すと期待される。

## 3. 研究の方法

手術室にて摘出肺より気管支断端を採取し、すぐに外科研究室に搬送後、酵素処理をして軟骨細胞を獲得する。トリプシン処理にて回収した、培養軟骨細胞を、PGA シート(すでに臨床応用されている吸収性縫合糸を同じ材質:ネオベールシート)に撒き、さらに 5-7 日間培養する。培養軟骨細胞/PGA シートのマトリックスを直径 10mm のシリコンステントに覆い、ヌードマウスの背部皮下に埋植する。免疫組織学的染色、生化学検査を行った。イヌの実験モデルでは、鼻中隔及び頸部気管から採取した軟骨組織の培養を試みたが、バイオ気管を作成できるだけ

の細胞数を確保する事ができなかつたため、ウサギ(N=4)を実験モデルとして用いることとした。

最終年度はウサギのみの実験を行った鼻中隔軟骨からの採取した 2-3 ミリ程度の軟骨組織から培養を開始した。2 回の継代でウサギのバイオ気管(直径 5 ミリ、長さ 10 ミリ)を作製する事ができた。ウサギの帰還移植が可能かどうかの実験を開始した。全身麻酔下で、頸部気管を 1 cm 長切除し、気管の淡々吻合をした。術後の期間狭窄、呼吸困難、感染などが生じた場合は直ちに犠牲死させる。検体は全て組織学的検討を行う。

#### 4 . 研究成果

再生気管に関する研究は 2018 年 4 月より開始された。それまでの研究実績は 80 歳以上の患者から採取した気管支軟骨からでも軟骨細胞の培養が可能となり、培養条件や培養期間も 2 回の継代にてバイオ軟骨を作製することがヌードマウスのモデルで可能となった。イヌでの軟骨細胞の培養が可能であることも報告したが、バイオ気管を作製するための細胞数がなかなか得られず、培養中に細胞の形態が変化し安定した培養細胞が得られなかった。そこで、2021 年 10 月に実験動物の変更を決断した。このことは、イヌを用いた実験モデルは倫理的にも動物愛護という観点からも考慮すると、ウサギへのモデル変更は適切であると考えた。ウサギの頸部気管からの軟骨を採取して培養を開始した。2022 年 12 月までの研究成果として、ウサギの頸部気管からの軟骨を採取し安定した細胞が得られるようになった。また、2 回の継代においても細胞の形態は変化しなかった。生分解性ポリマーに塗布した軟骨細胞をヌードマウスの背部皮下に埋植し、ヒツジやヒトと同じような白色のバイオ軟骨を作製することに成功した。最終年度はウサギの鼻中隔より軟骨を採取し、培養することに成功した。また、全身麻酔下でウサギの気管再建の実験も成功し、技術的にウサギの自己細胞を用いたバイオ気管の移植が可能であることが示唆された。イヌの実験で予定をしていた免疫抑制剤の使用に関してはウサギのモデルに変更したため十分な研究ができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	丸島 秀樹  (Marushima Hideki)  (30338941)	聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授   (32713)	
研究分担者	木村 祐之  (Kimura Hiroyuki)  (50740859)	聖マリアンナ医科大学・医学部・助教   (32713)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関