

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08904

研究課題名(和文)他家積層線維芽細胞シート移植が術後気管支断端にもたらす血流増強効果の検討

研究課題名(英文) Effects of transplantation of allogeneic multilayered fibroblast sheet on blood flow augmentation in the postoperative bronchial stump.

研究代表者

田中 俊樹 (Tanaka, Toshiki)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50457305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：積層線維芽細胞シートはVEGF、HGF、TGF- β 、Angiopoietin-1、Angiopoietin-2、MCO-1などの創傷治癒に関わる因子を多く分泌することが判明した。血管内皮細胞やHUVECを用いたTube formationアッセイではシート培養上清で有意に血管構造が形成され、積層線維芽細胞シート移植による血管新生の促進効果が示された。また積層線維芽細胞シート移植1週間後の気管支断端は肉眼的に新生組織が形成され、CD31抗体陽性の血管構造を多く認めた。積層線維芽細胞シート移植後の血管新生が促進され、その血流増強効果が気管支断端瘻の発生に関与する虚血を回避できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞シート移植によって肺切除後の気管支断端瘻を予防できれば、日本ならびに世界への普及が期待できる。気管支断端瘻治療に苦しむ患者や悩む医療者を激減させ、長期にわたる医療コストをも削減することができる。また呼吸器外科手術における気管-気管や気管支-気管支吻合における縫合不全の予防、既に発症した気管支断端瘻に対する治療への適応拡大も見込まれる。さらに申請者らが最終的に目指す積層線維芽細胞シートの他家移植が可能となれば、自己の細胞・組織採取が不要な新規バイオマテリアルとして、外科他領域における術後合併症(術後出血、腸管縫合不全、術後臍液漏、胆汁漏、髄液漏、神経損傷など)の予防への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Multilayered fibroblast sheets produce high levels of substances that help with wound healing, such as VEGF, HGF, TGF- β , Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, and MCO-1. When tested with vascular endothelial cells and HUVECs, the fluid from the sheet culture significantly promoted the formation of blood vessel structures. This suggests that transplanting these fibroblast sheets can stimulate the growth of new blood vessels. After one week of transplanting these fibroblast sheets, there was visible growth of new tissue in the lung's airways, and many blood vessels were observed. These results indicate that transplanting these fibroblast sheets can stimulate the growth of new blood vessels and improve blood flow, which can help avoid complications like ischemia that lead to the development of bronchial fistulas.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：気管支断端瘻の予防 線維芽細胞シート 組織修復

1. 研究開始当初の背景

【気管支断端瘻について】

肺癌に対する手術は、病変が存在する肺葉を切除する肺葉切除、または病変側の肺を全て切除する肺全摘が一般的である。その際に切離された気管支は縫合閉鎖され気管支断端となる。この気管支断端の閉鎖が術後に何らかの原因で破綻した病態が気管支断端瘻である。その発生率は肺葉切除で1%、肺全摘で4.5%である(Ann Thorac Surg. 1991)。国内での肺癌に対する肺葉切除は年間3万件を超えており(Gen Thorac Cardiovasc Surg. 2019)、年間300件以上の気管支断端瘻が発生している計算となる。気管支断端瘻が発生した場合、呼吸不全に加えて胸腔や残存肺の感染も生じるため、重症化し、時に致死的となる。更に治療に難渋し、完治には数カ月から1年程度の時間を要するため、患者と医療者の負担は非常に大きい。

【気管支断端瘻のリスク因子と予防について】

低栄養、糖尿病、喫煙、ステロイド治療、放射線治療、化学療法といった一般的に創傷治癒遅延に関わる因子に加え、気管支断端が長いこと、徹底したリンパ節郭清によって気管支周囲の組織が過度に除去されることが気管支断端瘻のリスク因子として報告されていることから、気管支断端の血流不足が気管支断端瘻の原因である可能性が高い。実臨床では、前述のリスク因子を持つ患者に対しては、肋間筋や大網などの自己組織を血流が保たれた状態で採取し、気管支断端へ縫着する手技が普及している。気管支断端への血流供給を企図した手技であるが、肋間筋を用いる場合は胸郭の変形を伴い、大網を用いる場合は開腹操作を要するために患者の負担が大きいことに加え、気管支断端瘻の発生を回避したいという外科医の強い思いから経験的に行われている側面が強く、前向き試験や十分な基礎研究は行われていないため、実際の有効性は不明である。そのため、気管支断端瘻に対する真に有効な予防法の開発は呼吸器外科医にとって急務である。

【積層線維芽細胞シートについて】

線維芽細胞はコラーゲンを産生し、血管新生を促進させる成長因子である VEGF、HGF を分泌することで創傷治癒の過程で重要な役割を果たすことが広く知られている。また再生医療に用いる細胞として、皮膚や口腔内組織から簡単に単離、培養できる点で骨髄幹細胞や脂肪幹細胞と比較して優れている。これらの観点から、申請者の研究室では、難治性皮膚潰瘍に対する線維芽細胞を用いた再生医療の研究を行ってきた。その研究過程で、独自の方法で線維芽細胞を積層化させた積層線維芽細胞シートを開発した。多数の細胞を、細胞外マトリックスを保持したままの丈夫なシートの形態で回収できることで、移植操作が容易で、組織への接着性が良好となった。この細胞シートが、マウス皮膚潰瘍モデルやウサギ下肢虚血モデルでの動物実験において血管新生促進効果により創傷治癒を促進させることを証明している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肺切除後の気管支断端における積層線維芽細胞シートの移植による血流増強効果を調べることである。

申請者の研究室では、難治性皮膚潰瘍に対する線維芽細胞を用いた再生医療の研究過程で、取り扱い性能の向上、細胞数増加による治療効果の増強を目指して積層線維芽細胞シートを開発した。気管支断端瘻の発生には気管支断端の血流不足が関与しているという点から、この細胞シートが持つ血管新生促進作用により、気管支断端の血流が増加することで気管支断端瘻の予防になるのではないかと考えた。本研究は、致死的な術後合併症である気管支断端瘻を、その発生原因をターゲットとした理論的で簡便な予防法の確立を目指したものであり、肺切除を受ける患者や外科医に大きな恩恵をもたらすことが期待される。

3. 研究の方法

(1)積層線維芽細胞シートの血管新生促進能の評価

ラット口腔粘膜組織より線維芽細胞を単離し、積層線維芽細胞シートを作製する。

全身麻酔、気管挿管下にラット(Wistar/ST、8週齢、オス)の口腔粘膜組織を採取する。

コラゲナーゼ 18.5mg を DMEM 培地 (FBS10%) に溶解し、コラゲナーゼ添加培地を作製する。

口腔粘膜組織を細断し、コラゲナーゼ添加培地を用いて 37℃、5%CO₂ で 12 時間培養する。

攪拌後に遠心分離 (24℃、12000rpm、2 分間) し、上清を除去する。沈殿物を DMEM 培地 (FBS 10%) で播種する。37℃、5%CO₂ で 48 時間培養し、線維芽細胞の増殖を確認する。

トリプシンを用いて回収し、40µm フィルターを用いて組織片を除去し、線維芽細胞を単離する。遠心分離 (24℃、12000rpm、2 分間) し、上清を除去し、DMEM 培地 (FBS10%) で線維芽細胞を培養する。

線維芽細胞の増殖を確認後、トリプシンを用いて回収する。DMEM 培地 (FBS10%) で 5.0×10^5

個/2mL に調整した線維芽細胞を、24 well plate の 1 ウェルに 2 mL 播種し、37 °C、5%CO₂ で 24 時間培養する。

培養液を除去し、AIM-V、HFDM-1(+)の混合培地 (FBS5%) 2mL を添加し、更に 48 時間培養する。

完成した細胞シートは 200 μL チップを用いて回収する。

またこの細胞シートによる組織修復の機序を検証するため、細胞シートの培養液を用いて、細胞シートが分泌する創傷治癒に関わる成長因子、サイトカインを ELISA 法で測定した。

さらに同培養液を用いて、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell : HUVEC) での血管形成アッセイを行った。

(2) 積層線維芽細胞シートの移植による気管支断端の血管新生、血流変化の評価

細胞シートを移植して 1、2、4 週間後に気管支断端を摘出してパラフィン切片を作製する。抗 CD31 抗体での免疫組織染色を行い、気管支断端における血管構造を評価する。血管の数、大きさ、密度を画像解析ソフト (ImageJ) で測定し、細胞シートを移植していない標本と比較することで、細胞シートの移植による血管新生の程度を評価する。

(3) 積層線維芽細胞シートの移植後変化の評価

移植後の積層線維芽細胞シートの残存期間を検証するために、GFP 陽性積層線維芽細胞シートをラット気管支断端モデルに移植した。

4 . 研究成果

(1) ラットの口腔粘膜組織より積層線維芽細胞シートを作製できた。測定対象は VEGF、HGF、TGF-β、Angiopoietin-1、Angiopoietin-2、MCO-1 とし、細胞シートが完成した際の培養液上清に含まれる濃度を、新鮮培地と比較することで解析したところ、いずれの因子も有意に高値であった。よって積層線維芽細胞シートは創傷治癒に関わる成長因子、サイトカインを分泌する能力があることが判明した。Tube formation assay はヒト血管内皮細胞をゲルコーティングした培養皿で培養することで、ヒト血管内皮細胞に培養皿上で管構造を形成させ、この管構造を血管形成の指標として評価する方法である。本研究では、培養開始 6 時間後に位相差顕微鏡で写真を撮影し、Angiogenesis Analyzer (ImageJ) で解析したところ、細胞シート培養液はコントロール培地と比較して、有意に管構造を多く認めた。この結果から、細胞シートから分泌された何らかの因子によって、血管形成が促進されたことが示唆された。

(2) ラットの気管支断端に細胞シートを移植し、術後 1、2、4 週間目に標本を摘出した。摘出した気管支断端は肉眼的には気管支断端を十分に覆う程度に新生組織が形成されていて、補強効果があるものと思われた。パラフィン切片を作製し、HE 染色、Azan 染色、抗 CD31 抗体での免疫染色を行ったところ、細胞シートを移植した気管支断端の周囲に新生された結合組織には多くの血管構造が含まれていることが判明した。これにより、細胞シートの移植により、気管支断端への血流が増加し、気管支断端瘻の発生原因である虚血が回避できる可能性が示された。血管構造の数は、細胞シートの移植後の時間経過では大きな変化はなく、術後 1 週間程度で血管新生は落ち着くのではないかと考えられた。気管支断端瘻の好発時期が、術後 10 日目程度との報告もあることから、それまでに血管新生が促進されているとの結果は、非常に有意義なものと考えている。この結果からは実際に気管支断端への血流自体が増加したとは示すことまではできないが、概ね想定していた結果を得ることができた。しかし、その次の段階として血流評価を計画していたが、2 次元レーザー血流評価装置 (OMEGAZONE) を用いて気管支断端の血流を定量的に測定しようと試みたが、心拍による振動の影響で測定が困難であった。そのため、評価方法を工夫する必要があり、現在も模索中である。

(3) GFP 陽性積層線維芽細胞シートをラット気管支断端モデルに移植したところ、移植 3 日後では、GFP 陽性細胞が観察されたが、移植 7 日後以降では、GFP 陽性細胞は観察されなかった。この結果は、移植された積層線維芽細胞シートは、移植直後に、血管新生および組織再生に必要な因子を分泌した後、移植された細胞は消失していくことが示唆された。

以上から積層線維芽細胞シート移植後の血管新生が促進され、その血流増強効果で気管支断端瘻の発生に関与する虚血を回避できる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yanagihara Masashi, Matsuno Yutaro, Ueno Koji, Kurazumi Hiroshi, Suzuki Ryo, Tanaka Toshiki, Hamano Kimikazu	4. 巻 35
2. 論文標題 Fibroblasts are the most suitable cell source for regenerative medicine due to their high intracellular fibroblast growth factor 2 content	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101510 ~ 101510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2023.101510	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto N, Ueno K, Yanagihara M, Kurazumi H, Tanaka Y, Oga A, Shimokawa M, Harada E, Tanaka T, Hamano K.	4. 巻 15
2. 論文標題 Allogenic multilayered fibroblast sheets promote anastomotic site healing in a rat model of esophageal reconstruction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Translational Research	6. 最初と最後の頁 3217-3228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimine Sota, Tanaka Toshiki, Murakami Junichi, Yamamoto Naohiro, Ueno Koji, Kurazumi Hiroshi, Ikeda Eiji, Hamano Kimikazu	4. 巻 63
2. 論文標題 Postoperative changes in a bronchial stump following covering with free fat tissue in a rat model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Cardio-Thoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 ezad154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ejcts/ezad154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Junichi, Tanaka Toshiki, Hoshii Yoshinobu, Hamano Kimikazu	4. 巻 18
2. 論文標題 Microscopic feature of lymph node anthracosilicosis adherent with pulmonary artery: a case report	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cardiothoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13019-023-02348-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Toshiki, Murakami Junichi, Yoshimine Sota, Yamamoto Naohiro, Ueda Kazuhiro, Suzuki Ryo, Kurazumi Hiroshi, Hamano Kimikazu	4. 巻 296
2. 論文標題 Effectiveness of Stitch With Pledget to Prevent Prolonged Air Leak in Thoracoscopic Lung Resection	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Research	6. 最初と最後の頁 589 ~ 596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jss.2024.01.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山本直宗、吉峯宗太、田中裕也、村上順一、竹本圭宏、原田栄二郎、田中俊樹、濱野公一
2. 発表標題 他家積層線維芽細胞シートを用いたラットの食道縫合部の補強
3. 学会等名 第123回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中俊樹、村上順一、吉峯宗大、山本直宗、今村信宏、濱野公一
2. 発表標題 臨床病期 I 期肺癌における充実部分臓側胸膜接触の意義
3. 学会等名 第40回日本呼吸器外科学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村上順一、田中俊樹、山本直宗、今村信宏、濱野公一
2. 発表標題 甲状腺癌の気管浸潤例、甲状腺と気管の同時性重複癌例に対する耳鼻咽喉科との合同手術
3. 学会等名 第40回日本呼吸器外科学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉峯宗大、田中俊樹、村上順一、山本直宗、今村信宏、上野耕司、濱野公一
2. 発表標題 遊離脂肪組織での気管支断端の被覆は有効か？ ラットモデルでの検証
3. 学会等名 第76回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2023年

〔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	村上 順一 (Murakami Junichi) (10725683)	山口大学・医学部附属病院・助教 (15501)	

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