

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 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659250

研究課題名（和文） 犬 iPS 細胞を用いた新しい気道再建法の開発

研究課題名（英文） Development of canine iPS cells and new in situ Tissue Engineering for airway reconstruction

研究代表者

中村 達雄 (NAKAMURA TATSUO)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：70227908

研究成果の概要(和文):ビーグル成犬の体細胞にレトロウイルスで山中4因子を導入し種々の条件で初期化試みた。しかしサイレンシングを確認するには至らなかった。

一方、気道再建の足場として新しい人工気管の作成を行った。気管壁には吸収性バイクリルメッシュにポリプロピレンステントを入れて補強したものを作成した。ビーグル犬に於ける埋入実験において、ステントとメッシュが分離しない新たな工夫が必要であると判明したのが、大きな成果であった。

研究成果の概要（英文）: We challenged to make an iPS cell from a somatic cell of beagle dog using 4 Yamanaka factors (Oct3, Sox2, Klf4, c-Myc) that were induced by retrovirus, however constant silencing has not yet been recognized.

With regard to the regeneration scaffold for airway, new tracheal prosthesis was manufactured with bioabsorbable vicryl mesh reinforced with polypropylene stent with a diameter of 1 mm. In animal experiment in canine, it was determined that conquer of dehiscence between mesh and stent is of importance after the implantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,500,000	0	1,500,000
23 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

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：iPS 細胞、人工気管、コラーゲン、人工臓器、生体内再生、ステント、再生医学

1. 研究開始当初の背景

気管再建の標準術式としては、端々吻合があるが、長区域の切除の場合はこの術式

では対応できない。また術後長期間にわたって頸部前屈が必要な為に、患者に与える苦痛は少なくない。このように人工気管に

よる再建の適応は少なくない。

人工血管と異なり、人工気管は気道という外界と生体との接点に位置するため、感染や痰の貯留などきわめて厳しい条件下に置かれる。このため臨床に安全に使い得る人工気管は世界的にも皆無であった。我々は生体親和性の高いコラーゲンと人工材料をグラフト重合させた上にコラーゲンをコーティングしたコンポジットを用いて代用気管を作製し、2002年より京都大学医学部倫理委員会の審査を経て、現在までに18例以上の患者に使用して良好な結果を得ている (Omori, K., Nakamura, T., et al. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. 113: 623-627, 2004)。しかしながらいづれも耳鼻科領域の頸部気管の再建であり、胸部外科領域の再建で安全に使える人工気管の改良を行いたいと考えている。

気管は生命に直接関わる器官であるため、大型動物を用い長期実験が必要であり、これまでビーグル犬を用いて安全性・有効性の評価を行ってきた。その中で骨髄由来の幹細胞が人工気管の早期組織化に有効であることを確認した (J Thorac Cardiovasc Surg 138(4): 811-9, 2009, Nakamura, et al.)。

近年、ヒト iPS 細胞が樹立されるなど iPS 細胞が注目されているが、イヌの iPS 細胞は作製が困難で、これまで樹立に成功した例はなかった。そこで我々のグループはイヌ iPS 細胞の樹立に取り組み、これに世界で初めて成功した (MRD, 2009, Shimada, H., et al)。本研究はそれを呼吸器外科領域に用いる初めての試みである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、世界に先駆けて樹立したイヌ iPS 細胞を自己組織再生型人工気管に応用し、気道を再建する術式を開発することである。

既に自己組織再生型人工気管は頸部領域の気管再建に臨床応用されている。そこで本研究では臨床応用を視野に、呼吸器外科領域の縦隔内で使用出来るように、早期の組織化と内面の上皮が iPS 細胞で可能かどうか評価する。イヌ iPS 細胞を用いた組織工学による再生研究は、これまでに例がなく極めて挑戦的な研究である。

3. 研究の方法

(1) ビーグル犬 iPS 細胞の作製 (島田)

ビーグル犬の精巣、肺、消化管上皮より線維芽細胞を取り、それに遺伝子導入して iPS

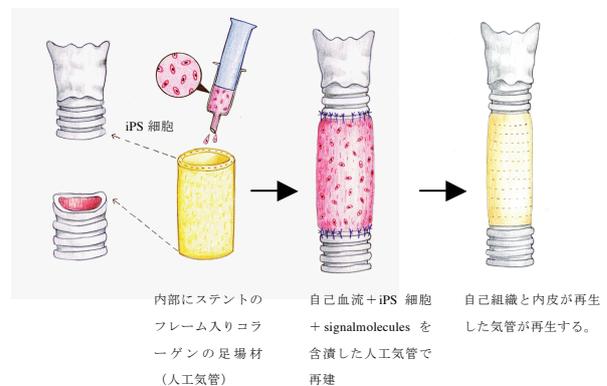
細胞を作製する (N=6)。

(2) 代用気管の設計と作成 (中村)

iPS 細胞播種用の新しいタイプの人工気管 (L=50mm) を作成して力学物性を天然の気管と比較する。圧縮試験は水平垂直長軸の3方向のデータを解析する。

(3) iPS 細胞による組織化上皮化の促進実験 (中村)

ビーグル犬の気管欠損モデルで代用気管のコラーゲンマトリックスに iPS 細胞、又は自己骨髄由来の組織幹細胞を含浸させる (N=各6)。気管支鏡、MRI、擦過細胞診で気管線毛の運動能を評価する。埋入 12 ヶ月の犬は一部を屠殺して病理学的に再生組織を検討するとともに、切除気管の力学物性を解析する。



自己組織再生型人工気管

4. 研究成果

気道の自己組織を再生させて再建気管とするために従来はマーレックスメッシュを芯にステントを複合化したものを使っていた。これは臨床でも長期にわたって確実な力学強度が維持できるという利点がある反面、異物であるメッシュが残るというマイナスの面があった。そこで iPS 細胞を用いる足場としてコラーゲンに生体内吸収性の高分子材料メッシュを複合化して素材を作製してそれを用いたビーグル犬における気道再建実験を行なった。これにより吸収性メッシュは半年できれいに吸収されるがステントが内腔に脱落することが判明した。ステント材と吸収性のメッシュの接着法を改善するか、又は非吸収性素材成分をメッシュに加えることにより、再生した気管壁とステント材が分離しないようにするなどの工夫が必要であるという問題点が明らかになった。なおコラーゲン成分に関しては本研究でも組織再生

の足場として気道で十分に機能することが確認された点が成果として意義あるものと考えられた。

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 24 件)

1. Ohno, S., Hirano, S., Kanemaru, S., Kitani, Y., Kojima, T., Ishikawa, S., Mizuta, M., Tateya, I., Nakamura, T., Ito, J.: Transforming Growth Factor β 3 for the prevention of vocal fold scarring. *Laryngoscope*. 122: 583-589 (2012), DOI10.1002/lary.22389 査読有
2. Shimada, H., Hashimoto, Y., Nakada, A., Shigeno, K., Nakamura, T.: Accelerated generation of human induced pluripotent stem cells with retroviral transduction and chemical inhibitors under physiological hypoxia. *BBRC*. 417: 659-664 (2012), DOI10.1016/j.bbrc.2011.11.111 査読有
3. Hashimoto, A., Kuwabara, M., Hirasaki, Y., Tsujimoto, H., Torii, T., Nakamura, T., Hagiwara, A.: Reduction of air leaks in a canine model of pulmonary resection with a new staple-line buttress. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 142: 366-371 (2011), DOI10.1016/j.jtcvs.2011.05.001 査読有
4. Kojima, T., Kanemaru, S., Hirano, S., Tateya, I., Suehiro, A., Kitani, Y., Kishimoto, Y., Ohno, S., Nakamura, T., Ito, J.: The protective efficacy of basic fibroblast growth factor in radiation-induced salivary gland dysfunction in mice. *Laryngoscope*. 121: 1870-1875 (2011), DOI10.1002/lary.21873 査読有
5. Kojima, T., Kanemaru, S., Hirano, S., Tateya, I., Ohno, S., Nakamura, T., Ito, J.: Regeneration of radiation damaged salivary glands with adipose-derived stromal cells. *Laryngoscope*. 121: 1864-1869 (2011), DOI10.1002/lary.22080 査読有
6. Yamamoto, K., Tomiyama, K., Mitsuoka, M.: Total cricoidectomy and laryngotracheal reconstruction for subglottic stenosis with glottic involvement. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 13:351-353 (2011), DOI10.1510/icvts.2011.274357 査読有
7. Yamamoto, K., Kojima, F., Tomiyama, K., Nakamura, T., Hayashino, Y.: Meta-analysis of therapeutic procedures for acquired subglottic stenosis in adults. *Ann Thorac Surg*. 91:1747-1753 (2011), DOI10.1016/j.athoracsur.2011.02.071 査読有
8. Ohno, S., Hirano, S., Kanemaru, S., Tateya, I., Kitani, Y., Kojima, T., Nakamura, T., Ito, J.: Prevention of buccal mucosa scarring with transforming growth factor β 3. *Laryngoscope*. 121:1404-1409 (2011), DOI10.1002/lary.21759 査読有
9. Nakamura, T., Omori, K., Kanemaru, S.: Tissue-engineered airway and "in situ tissue engineering". *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 59:91-97 (2011), DOI10.1007/s11748-010-0677-9 査読有
10. 中村達雄: 肺における再生医療. *Clinical Engineering*. 22:32-36 (2011) 査読無
11. Honda, M., Hori, Y., Nakada, A., Uji, M., Nishizawa, Y., Yamamoto, K., Kobayashi, T., Shimada, H., Kida, N., Sato, T., Nakamura, T.: Use of adipose-derived stromal cells for prevention of esophageal stricture after circumferential EMR in a canine model. *Gastrointestinal Endoscopy*. 73:777-784 (2011), DOI10.1016/j.gie.2010.11.008 査読有
12. Hirasaki, Y., Fukunaga, M., Kidokoro, A., Hashimoto, A., Nakamura, T., Tsujimoto, H., Hagiwara, A.: Development of a novel antiadhesive material, alginate flakes, ex vivo and in vivo. *Surg today*. 41: 970-977 (2011), DOI10.1007/s00595-010-4410-1 査読有
13. Yamashita, M., Kanemaru, S., Hirano, S., Umeda, H., Kitani, Y., Omori, K., Nakamura, T., Ito, J.: Glottal reconstruction with a tissue engineering technique using polypropylene mesh: a canine experiment. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 119(2): 110-117 (2010), <http://search.proquest.com/docview/217943107/fulltextPDF?accountid=11929> 査読有
14. Honda, M., Nakamura, T., Hori, Y., Shionoya, Y., Nakada, A., Sato, T., Yamamoto, K., Kobayashi, T., Shimada, H., Kida, N., Hashimoto, A., Hashimoto, Y.: Process of healing of mucosal defects in the esophagus after endoscopic mucosal resection: histological evaluation in a dog model. *Endoscopy*. 42:1092-1095 (2010) 査読有

15. Honda, M., Hori, Y., Shionoya, Y., Nakada, A., Sato, T., Kobayashi, T., Shimada, H., Kida, N., Nakamura, T.: Observation of the esophagus, pharynx and lingual root by gastrointestinal endoscopy with a percutaneous retrograde approach. *World J Gastrointest Endosc.* 16: 288-292 (2010), DOI10.4253/wjge.v2.i8.288 査読有
16. Nishizawa, Y., Saito, N., Ito, M., Sugito, M., Kobayashi, A., Nishizawa, Y.: Male sexual dysfunction after rectal cancer surgery. *Colorectal Dis.* 12:8-8 (2010) 査読有
17. Suehiro, A., Hirano, S., Kishimoto, Y., Rousseau, B., Nakamura, T., Ito, J.: Treatment of acute vocal fold scar with local injection of basic fibroblast growth factor: a canine study. *Acta Otolaryngol.* 130:844-850 (2010), DOI10.3109/00016480903426618 査読有
18. Sato, T., Araki, M., Nakajima, N., Omori, K., Nakamura, T.: Biodegradable polymer coating promotes the epithelization of tissue-engineered airway prostheses. *J Thorac Cardiovasc Surg*139:26-31 (2010), DOI10.1016/j.jtcvs.2009.04.006 査読有
19. 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.* 31: 4855-4863 (2010), DOI10.1016/j.biomaterials.2010.02.027 査読有
20. Akazawa, Y., Ishida, T., Baba, A., Hiroma, T., Nakamura, T.: Intratracheal catheter suction removes the same volume of meconium with less impact on desaturation compared with meconium aspirator in meconium aspiration syndrome. *Early Hum Dev.* 86: 499-502 (2010), DOI10.1016/j.earlhumdev.2010.06.011 査読有
21. Imaizumi, M., Nomoto, Y., Sugino, T., Miyake, M., Wada, I., Nakamura, T., Omori, K.: Potential of induced pluripotent stem cells for the regeneration of the tracheal wall. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 119:697-703 (2010), URLhttp://search.proquest.com/docview/759349417/fulltextPDF?accountid=11929 査読有
22. Kanemaru, S., Hirano, S., Umeda, H., Yamashita, M., Suehiro, A., Nakamura, T., Maetani, T., Omori, K., Ito, J.: A tissue-engineering approach for stenosis of the trachea and/or cricoid. *Acta Otolaryngol Suppl.* 130: 79-83 (2010), DOI10.3109/00016489.2010.496462 査読有
23. 中村達雄: 人工神経の基礎と臨床. *Peripheral Nerve.* 21:192-196 (2010) 査読無
24. 中村達雄、大森孝一、金丸眞一: *in situ Tissue Engineering* を用いた気管・気管支の再建. *日本気管食道科学会会報* 61: 89 (2010) 査読無
- [学会発表] (計 16 件)
1. Shimada, H., Hashimoto, Y., Nakada, A., Shigeno, K., Nakamura, T.: Investigation of optimized conditions for RNA-based cellular reprogramming. ISSCR(2011.6.15-18 Toronto(Canada))
2. Honda, M., Hori, Y., Nakada, A., Uji, M., Nishizawa, Y., Yamamoto, K., Kobayashi, T., Shimada, H., Kida, N., Sato, T., Nakamura, T.: Autologous transplantation of adipose-derived stromal cells prevent esophageal stricture after endoscopic mucosal resection in a canine model. 第 63 回日本胸部外科学会 (2010.10.26 大阪)
3. 本多通孝、中田 颯、中村達雄: 食道 ESD 後の創傷治癒過程と狭窄予防に対する再生医療の応用. シンポジウム「EMR、ESD の課題 安全確実な内視鏡医療の提供に向けて」第 18 回日本消化器関連学会週間 (2010.10.15 横浜)
4. 本多通孝、中村達雄、山本一道、堀義生、中田 颯、塩谷伊毅、小林丈士、島田英徳、木田直樹: 食道内視鏡治療後の狭窄予防にステロイド、マイトマイシン C は有効か. 第 18 回日本消化器関連学会週間 (2010.10.14 横浜) 優秀演題賞受賞
5. 塩谷伊毅、砂田勝久、中村達雄: アルコールブロック後のイヌ星状神経節の組織学的検討とホルネル徴候の変化. 第 38 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会 (ポスター) (2010.10.9 横須賀)
6. 稲田有史: 運動器疼痛疾患への外科的治療の可能性についてー適応と限界ー. 第 2 回備後運動器疼痛疾患研究会 (2010.9.25 福山)
7. Honda, M., Hori, Y., Nakada, A., Uji, M., Nishizawa, Y., Yamamoto, K., Kobayashi, T., Shimada, H., Kida, N., Sato, T., Nakamura, T.: Transplantation of adipose-derived stromal cells prevent

- esophageal stricture after endoscopic mucosal resection in canine model. European Society for Artificial Organs 37th Congress (2010. 9. 10Skopje (Macedonia))
8. 中村達雄、萩原明於、稲田有史、金丸眞一：人工神経の基礎と臨床. 第 21 回末梢神経学会学術集会 (2010. 9. 4 仙台)
 9. 本多通孝、堀 義生、中村達雄、山本一道、中田 颯、塩谷伊毅、小林丈士、島田英徳、木田直樹：脂肪由来幹細胞を用いた食道 ESD 後狭窄の予防. 第 64 回日本食道学会 (2010. 9. 1 久留米)
 10. 稲田有史：末梢神経に対する生体内再生治療. 第 40 回新潟神経学夏期セミナー (2010. 8. 5-7 新潟)
 11. 稲田有史：四肢外傷における末梢神経の再建. 第 2 回日本重度四肢外傷セミナー (2010. 7. 17-18 札幌)
 12. Kojima T, Expression of side population cells during wound healing of rat vocal folds. ICALB and ICVPB (2010. 7. 6-8 Madison(USA))
 13. Shimada, H., Nakada, A., Hashimoto, Y., Shigeno, K., Nakamura, T. : Reprogramming of canine adult somatic cells to induced pluripotent stem cells with retroviral transduction and chemical inhibitors under hypoxic conditions. ISSCR(国際幹細胞学会) (2010. 6. 16-19 San Francisco(USA))
 14. Kojima T, The Protective Efficacy of Basic Fibroblast Growth Factor in Radiation Damaged Salivary Glands of Mouse. The 113th Annual Meeting of Triological Society (2010. 4. 30-5. 1 Las Vegas(USA))
 15. 齋藤典男、杉藤正典、伊藤雅昭、小林昭広、西澤雄介、西澤祐吏、皆川のぞみ、中嶋健太郎、渡辺和宏、甲田貴丸、錦織英知、神山篤史：超低位直腸癌に対する ISR の適応に関する再検討. 第 110 回日本外科学会定期学術集会 (2010. 4. 8-10 名古屋)
 16. 皆川のぞみ、小嶋基寛、伊藤雅昭、杉藤正典、小林昭広、西澤雄介、西澤祐吏、中嶋健太郎、渡辺和宏、甲田貴丸、錦織英知、神山篤史：内肛門括約筋切除術の病理組織学的剥離面陽性例と再発の検討. 第 110 回日本外科学会定期学術集会 (2010. 4. 8-10 名古屋)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/ca04/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 達雄 (NAKAMURA TATSUO)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：70227908

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

