

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 30 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592071

研究課題名(和文) 独創的な組織工学技術を用いた人工気管作成の試み

研究課題名(英文) Construction of an artificial trachea using newly developed tissue engineering technique

研究代表者

内藤 洋 (NAITO, HIROSHI)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00316069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：弾力性のあるチューブ状の組織を、虚脱に対する強度をもつリング状の組織が補強する、という本来の気管に準じた構造を持つ人工気管を作成した。チューブ状の組織は線維芽細胞から作成し、リング状の組織は間葉系幹細胞から作成した。リング状の組織は組織を作成する間に間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化誘導することによって力学的強度が上昇した。同方法で作成した人工気管をラットの気管へ移植し、移植に耐えうることを示した。

研究成果の概要(英文)：We constructed an artificial trachea, which made from soft tube-shaped tissue and hard ring-shaped tissue, which had similar structure with native trachea. Tube-shaped tissue was constructed from fibroblasts and ring-shaped tissue was constructed from mesenchymal stem cells. Mesenchymal stem cells were induced differentiation into osteoblasts during ring-shaped tissue construction, and this differentiation increased mechanical strength of the tissue. This artificial trachea was transplanted into rat trachea and which showed the potential for usage.

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：再生医療 組織工学 人工気管 骨芽細胞 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで“液状のコラーゲンと単離した細胞からなる混合液を鋳型に入れ培養することによって、目的とする形状の組織を作成する”という検討を行ってきた。この方法には鋳型の形状を変えることによって、作成する組織の形状を容易に変えることが出来るという利点がある。今回の検討ではこの利点を生かし、本来の気管に準じた構造を持つ人工気管の作成を試みる。

2. 研究の目的

これまでの検討で、チューブ状の鋳型にコラーゲンと線維芽細胞の混合液を注入し培養する事によって、コラーゲンがゲル化し、心棒の周囲に凝集することが明らかとなっていた。また、凝集した周囲に再度混合物を注入し、培養を繰り返すことによって、三層のチューブ状の組織作成には成功した。しかし、同組織をラットの気管に移植したところ、組織の強度が不十分であり、吸気時の陰圧で組織が虚脱することが明らかとなった。その組織は三層構造で約 1 mm の厚みを持つが、厚みを増すことによる酸素、栄養などの供給不足を原因とする内部の細胞の壊死を回避する為、異なった細胞腫を用いることによる組織の強度増強を今回の検討では試みることにした。

即ち、本来の気管と同様にリング状の硬度をもった組織を作成し、リング状の組織をチューブ状の組織の周囲に固定する事によって本来の気管に準じた構造、強度をもつ人工気管を作成することを目標とした。なお、弾力性を持つチューブ状の組織は前実験と同様に繊維芽細胞から作成し、硬度を持つリング状の組織は、骨髄間葉系幹細胞を骨芽細胞への分化誘導することによって作成することとした。

また、検討の過程で、コラーゲンゲル内での培養は間葉系幹細胞を骨芽細胞へ高い効率で分化誘導する可能性を見出したため、分化の割合についての詳細な検討も追加して検討することとした。即ち、これまでの報告で老ラット由来の幹細胞では骨芽細胞への分化の割合が低下すると報告されているが、コラーゲンゲル内での培養でその低下を軽減することが出来るかどうかについての検討を行った。

3. 研究の方法

前実験と同様にチューブ状の鋳型にコラーゲンと線維芽細胞の混合物を注入する。混合物が内側の鋳型の周囲に凝集し組織が形成された後にできた空間にコラーゲンと細胞の混合物を再度注入する。同様の工程を繰り返し、三層構造を持つ組織を作成する。リング状の組織は鋳型に注入する細胞とコラーゲンの

混合液の量を減少させ、同様に三層の組織を作成する。間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導には、培養液にアスコルビン酸-2-リン酸、デキサメタゾン、 β -グリセロフォスフェイトを添加する。

リング状の組織内での間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化については培養液中へのオステオカルシンの分泌と細胞へのカルシウムの沈着を測定する。続いて、チューブ状の組織とリング状の組織を組み合わせることで培養することによってそれらが結合した組織(人工気管)を作成する。その上で、チューブ状の組織、人工気管の組織の力学的特性を本来の気管組織と比較検討する。

最終的にラット気管部への移植を行う。手術は全身麻酔下で人工呼吸器による呼吸補助下に行う。ラットの頸部を切開し、5-7軟骨輪長程度の気管を切除し、同部分に人工気管を縫合する。縫合後、麻酔深度を浅くし、自発呼吸を開始し、移植への使用の可否について検討を行う。

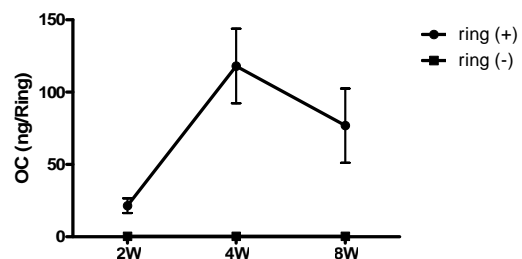
追加実験では、老ラット由来の間葉系幹細胞を培養皿上での二次元培養と、コラーゲンゲル内での三次元培養で培養し、骨芽細胞への分化の割合を細胞へのカルシウムの沈着を測定することによって検討した。

4. 研究成果

下の如く、チューブ状とリング状の組織の作成は可能であった。

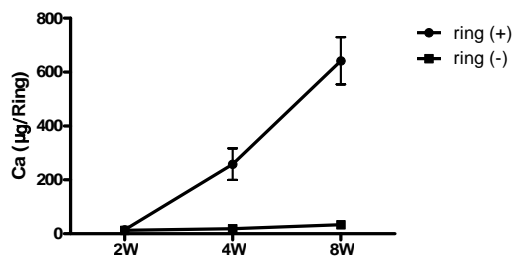


骨芽細胞への分化誘導をかけたリング状の組織ではオステオカルシン(OC)の分泌を認めた。一方、誘導をかけなかった組織では分泌は認めなかった。



誘導をかけた組織 (ring (+)) では培養期

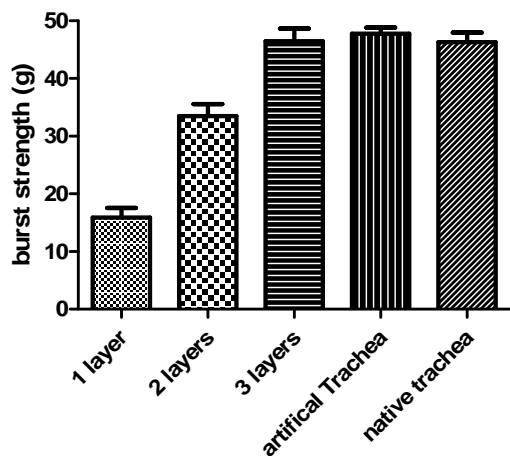
間と共にカルシウム (Ca) の沈着が増大し、細胞が成熟した骨芽細胞へ分化していることが確認された。一方、誘導をかけなかった組織 (ring (-)) では殆ど沈着を認めなかった。



それらの組織を組み合わせて培養することによって、人工気管の作成にも成功した (左が完成後、右は組み合わせたところ)。

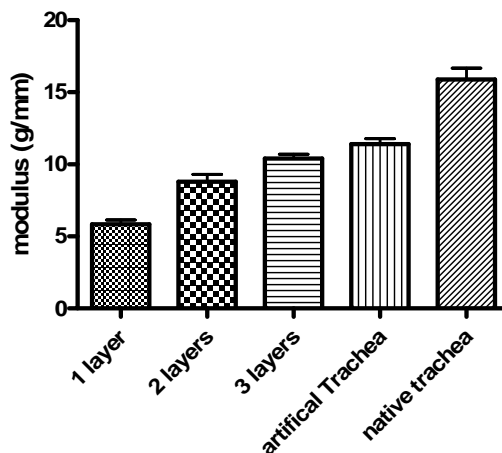


力学的特性についても、チューブ状の組織を積層化することによって破断強度は上昇することが確認された (1, 2, 3 layers : 一層、二層、三層のチューブ状の組織、artificial Trachea : 人工気管、native Trachea : 成ラットの気管)。三層のチューブ状の組織、及び、人工気管では成ラットの気管と同様に計測器の測定限界である 50g の負荷でも組織が破断しなかった。



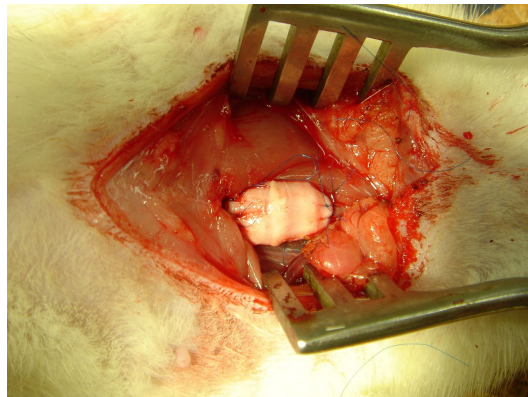
また、組織の硬度も検討したが、人工気管では本来の気管には及ばないものの、三層のチューブ状の組織よりは高い傾向の硬度を

持つことが明らかとなった。

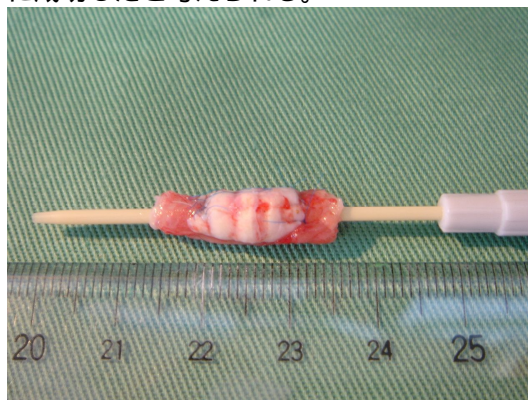


予定通り人工気管をラット気管部への移植を行った。

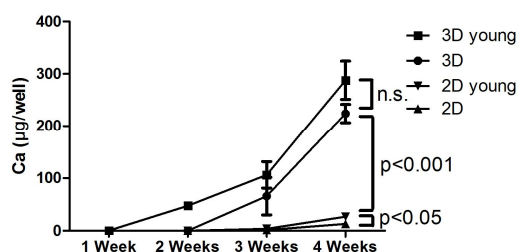
これまでの線維芽細胞のみで作成したチューブ状の組織では、三層の組織であっても、吸気時の陰圧で組織が虚脱し、形状の維持が出来ず呼吸不全の状態に陥り、犠牲死を余儀なくされていた。しかし、今回のリング状の硬い組織で補強された人工気管では自発呼吸でも組織が虚脱せず、呼吸不全の状態に陥らない事が確認された。



摘出した組織では、手技的な問題か、吻合部の狭窄を認めることがしばしばあった。しかし、大部分では内腔が維持されていることが確認でき、移植に耐える人工気管の作成に成功したと考えられる。



追加実験の結果は下に示すように、若ラット由来の細胞の三次元培養 > 老ラット由来の細胞の三次元培養 > 若ラット由来の細胞の二次元培養 > 老ラット由来の細胞の二次元培養の順で細胞へのカルシウムの沈着が大きかった。



これらの結果は老ラット由来の細胞であってもコラーゲンゲル内で三次元培養することによって若ラット由来の細胞を二次元培養で分化誘導するよりも高い割合で骨芽細胞へ分化誘導することが可能であることを示すものと考えられる。

5. 主な発表論文等

Naito H, Yoshimura M, Mizuno T, Takasawa S, Tojo T, Taniguchi S. The advantages of three-dimensional culture in a collagen hydrogel for stem cell differentiation. J Biomed Mater Res A. 2013;101A:2838-2845.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 洋 (NAITO HIROSHI)

公立大学法人 奈良県立医科大学 胸部・心臓血管外科 助教

研究者番号：00316069