

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592604

研究課題名(和文)軟骨細胞及び軟骨膜細胞を利用した気管軟骨の再生に関する研究

研究課題名(英文)regeneration of tracheal cartilage using chondrocytes and perichondrial cells

## 研究代表者

野本 幸男(Nomoto, Yukio)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70508811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々が使用している再生誘導型人工気管はすでに臨床応用が行われ良好な結果を得ているが、骨格が汎用プラスチック製であるため小児には使用されていない。本研究では骨格を担いうる気管軟骨の再生を究極的な目標とし、軟骨軟骨細胞および軟骨膜細胞を再生誘導型人工気管に付加した新規培養気管を作製し、移植実験を中心に検討を行った。新規培養気管で再建したウサギ気管欠損部には新生軟骨が確認され、気管軟骨の再生が期待される結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：The artificial prosthesis that our group successfully used clinically for tracheal regeneration has not been implanted to pediatric cases because of its polypropylene frame. The ultimate goal of our study is to regenerate cartilaginous frame of trachea. In this study, we developed a novel bioengineered prosthesis with chondrocytes and perichondrial cells for regeneration of trachea, and examined its effectiveness by implantation. Regenerated cartilage was observed in the tracheal defect of rabbit that had been reconstructed by the novel bioengineered prosthesis. The result indicated that the bioengineered trachea with chondrocytes and perichondrial cells have potential for regeneration of tracheal cartilage.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：気管軟骨 再生 軟骨膜細胞 軟骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

喉頭や気管など気道の破壊や狭窄は喉頭癌や甲状腺癌等の悪性腫瘍、炎症や外傷により引き起こされる。治療として手術による切除を選択した場合には気道の再建が必要になる。その際に再狭窄を生じることなく気道の再建を行うことは非常に重要であり、再建材料に関しては気道内腔を保持する強度を持った枠組みが不可欠である。従来の気道再建手術では、枠組みとなる硬性組織として耳介や鼻中隔等の軟骨組織あるいは骨組織が用いられてきた。これらの方法は他部位から比較的大きな組織片を採取する必要があるうえに、気管を再建する上で必ずしも最適な形状ではなく、また強度も均一とはいえない状態であった。

気道の再生治療に関して、我々はポリプロピレンを円筒状に加工して骨格とし、この内側・外側に細胞の足場となるコラーゲンスポンジを付加した組織再生誘導型人工材料を開発した。<sup>1)</sup> 2002年よりその技術を用いて気道再生医療の臨床応用を開始した。<sup>2)</sup> これまでに複数の臨床例を経験し、概ね良好な結果を得ている。われわれは人工気管内腔面上皮化促進を目的に、人工気管内腔面にあらかじめ線維芽細胞を配置した培養気管モデルを作製し、ラットおよびウサギの気管欠損部への移植を行った。<sup>3)</sup> 線維芽細胞付加が気管上皮細胞の増殖・分化に対して促進的な効果を有することが明らかになった。しかし以上の研究において気管軟骨欠損部における軟骨再生はみられなかった。

我々が扱ってきた自己組織再生型人工気管は生体親和性、代用気管としての物性など優れた性質を有している反面、骨格として用いられているポリプロピレンが非吸収性であり成長にあわせて大きくなることは無いため、小児は適応外としている。小児においては体の成長とともに再生部位の成長が必要であり、軟骨細胞で喉頭・気管の枠組みを形成することができれば小児の気道病変の治療に対しての応用が期待できる。そこで、全身麻酔下にウサギの軟骨を採取し、軟骨細胞を十分量培養したち後、ウサギ用に作製した組織再生誘導型人工材料に播種・導入し、これを気管欠損部に移植する実験を行った。自家移植のモデルにおいて気管軟骨欠損部に軟骨断端を橋状に結ぶ軟骨組織の再生を確認した。組織再生誘導型人工材料による気管再生において、自家軟骨細胞の導入は気管軟骨の再生に寄与する可能性が示唆された。<sup>4)</sup> また軟骨再生に軟骨膜が深く関与している可能性が示唆された。近年、軟骨膜には軟骨再生に関与する幹細胞が局在していると指摘されており、効率的かつ機能的な気管軟骨の再生を目指す上で軟骨膜は重要な役割を担いうと考えられる。

## 〔参考文献〕

- 1) Nakamura T, Teramachi T, Sekine T, Shimizu Y, et al. Artificial trachea and long term follow-up in carinal reconstruction in dogs. *Int J Artif Organs* 2000;23:718-724
- 2) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Shimizu Y, et al. Regenerative medicine of the trachea: the first human case. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2005;114:429-433
- 3) Nomoto Y, Kobayashi K, Nakamura T, Omori K, et al. The effect of fibroblasts upon the epithelial regeneration on the surface of the bioengineered trachea. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008;117:59-64
- 4) Mika Nomoto, Yukio Nomoto, Yasuhiro Tada, Koichi Omori, et al. Bioengineered trachea using autologous chondrocytes for regeneration of tracheal cartilage in a rabbit model. *Laryngoscope* 2013;123:2195-2201

## 2. 研究の目的

小児への適応も可能な軟骨製骨格を有する培養気管の開発を究極的な目標に掲げ、本研究では軟骨細胞および軟骨膜細胞を付加した新規培養気管を用いて気管軟骨の再生をめざす。

## 3. 研究の方法

### 〔軟骨細胞、軟骨膜細胞の採取〕

全身麻酔下に日本白色系ウサギの肋軟骨組織を摘出した(図1)。摘出する際に、気胸の原因となる壁側胸膜損傷が生じうることから、これを予防するために軟骨膜を温存した状態で肋軟骨の外側面のみ露出させ、壁側胸膜側の軟骨および軟骨膜は一部残しながら、軟骨を長軸方向で2分するように切離し摘出した。これにより壁側胸膜への侵襲的な操作を回避することが可能となった。



図1 肋軟骨組織の採取

軟骨膜細胞を採取する際にこれまでは軟骨膜の組織片培養を行ってきたが、これを軟骨細胞の採取と同様に酵素処理での採取に

変更した。軟骨膜細胞をコラゲナーゼ処理し、さらに濾過を行って細胞を採取した。これを培養液中で培養したところ付着系の細胞が得られた。形態的には組織片培養を行って得られた軟骨膜細胞と同様であった。

#### 〔細胞の蛍光標識〕

採取した細胞に遺伝子導入技術を用いて蛍光タンパク質を発現させ細胞標識とした。具体的には軟骨細胞に対しては GFP (緑色蛍光タンパク質、励起波長 395nm、蛍光波長 509nm) を、軟骨膜細胞に対しては tdTOMATO (赤色蛍光タンパク質、励起波長 554nm、蛍光波長 581nm) を細胞標識とした。In vitro にてそれぞれの蛍光が発現していることを確認した。

#### 〔培養気管の作成〕

軟骨膜細胞を付加したモデルと、軟骨細胞および軟骨膜細胞を付加したモデルを作製した。氷冷した型コラーゲン溶液を用いた細胞懸濁液を調整し、半円筒状にしたウサギ用組織再生型人工気管に浸透させインキュベーター内に静置しゲル化させた。

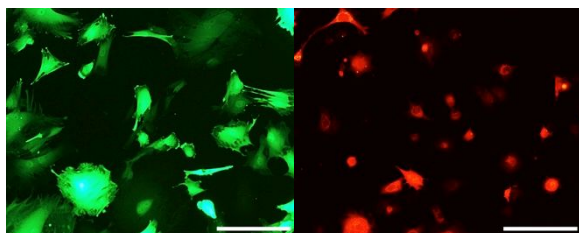


図 2 培養細胞の蛍光顕微鏡像  
左は軟骨細胞、右は軟骨膜細胞

#### 〔気管再建〕

自家細胞移植を意図して、ウサギは軟骨細胞および軟骨膜細胞を採取した個体と培養気管を移植する個体は同一とした。全身麻酔下にウサギの頸部を剃毛した後、頸部皮膚を縦切開し、さらに前頸筋を正中で縦切開し喉頭および気管を露出させた。気管前壁を気管の約 3 分の 1 周、長軸方向に 12~15mm 範囲で切除した。気管欠損部を覆うように半円筒形の培養気管を留置し、ナイロン糸にて空気漏れが無いよう慎重に縫合固定した。最後に前頸筋および皮膚を縫合した。

#### 〔標本の作製・評価〕

観察期間の後に、再建した気管を摘出した。固定の前に一部の摘出標本については事件動物用 CT、蛍光イメージングシステムでの評価を行い、その後パラフィン切片、凍結切片を作製して組織学的な評価を行った。

## 4. 研究成果

#### 〔CT〕

軟骨細胞および軟骨膜細胞を付加したモデルの移植から 5 週間後の標本では、気管再建部に一致して気管軟骨と同等の density で描出される組織塊 (図 3 矢印) が確認された。

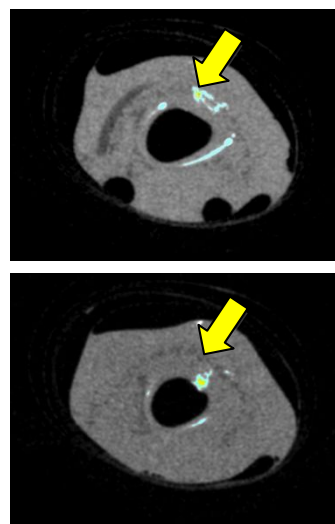


図 3 気管再建部の CT 画像

#### 〔蛍光イメージング〕

軟骨細胞および軟骨膜細胞を付加したモデルの移植から 5 週間後に摘出した気管に対し、気管膜様部を縦切開し、気管内面を明視下にして (図 4 矢印) 蛍光イメージングシステムで気管内腔を観察した。GFP および tdTOMATO の蛍光はいずれも検出できなかった。

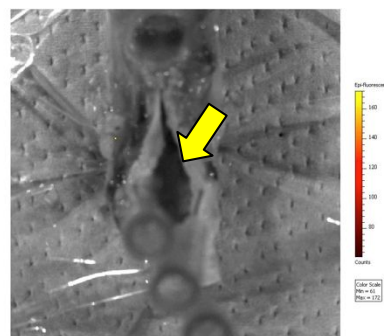


図 4 気管内腔の蛍光イメージング

#### 〔組織学的評価〕

##### 《軟骨膜細胞を付加したモデル》

移植から 5 週間後の標本では、H-E 染色で欠損部は上皮化しており、上皮下からポリプロピレンメッシュまでの間は比較的厚い線維性組織で占められていた。(図 5 上) 線維性組織内は血管新生が進んでいた。気管欠損部に一致した軟骨組織の形成は確認できなかった。Alcian Blue による染色では欠損部に軟骨形成は確認できなかった。(図 5 中



央) 型コラーゲンの免疫染色でも特異的な染色は欠損部に確認できなかった。(図 5 下)

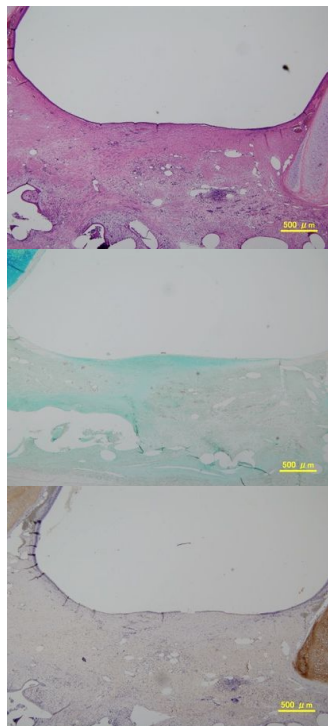


図 5 軟骨膜細胞付加モデルでの気管再建部の組織像

《軟骨細胞および軟骨膜細胞を付加したモデル》

移植から 17 日後の標本では、蛍光顕微鏡にて GFP 陽性細胞および tdTOMATO 陽性細胞の両者が確認できた。(図 6 左) 移植から 5 週間後の標本では GFP 陽性細胞および tdTOMATO 陽性細胞の両者が確認できなかった。(図 6 右)

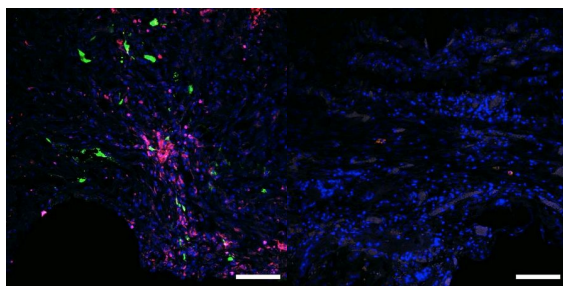


図 6 移植後の蛍光顕微鏡像  
左 17 日後、右 5 週後

移植から 5 週間後の標本の H-E 染色(図 7 上、中央)および Alcian Blue 染色(図 7 下)では軟骨断端からと考えられる顕著な新生軟骨の形成が確認できた。一方で気管欠損部に一致して孤立性に形成された軟骨組織は確認できなかった。

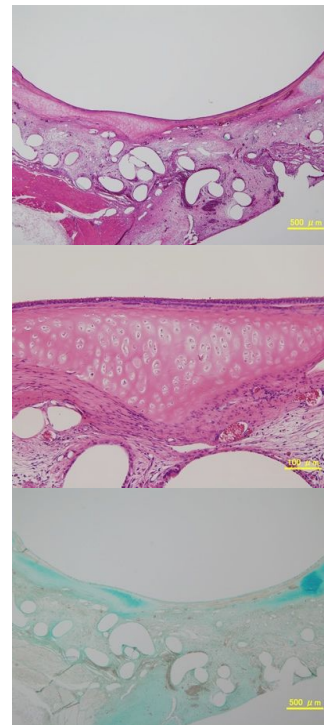


図 7 軟骨細胞および軟骨膜細胞付加モデルでの気管再建部の組織像

〔考案〕

自家軟骨細胞および軟骨膜細胞の両者を付加した培養気管による気管欠損部の再建を行った結果、移植から 5 週間後の標本で、軟骨断端由来と考えられる新生軟骨が確認できた。この新生軟骨には移植細胞は含まれてはいないと考えられ、付加した軟骨細胞および軟骨膜細胞が軟骨断端からの新生軟骨の形成に対しパラクライン作用により促進的に関与した可能性が考えられた。一方で、先の報告で示されていた、気管欠損部に一致して孤立性に生じた軟骨組織は確認できなかった。蛍光イメージングシステムや蛍光顕微鏡での観察において移植から 5 週間後の標本に蛍光標識された細胞が見いだされなかったことから、移植から 17 日後に生存していた軟骨細胞および軟骨膜細胞は、移植から 5 週間後には死滅していた可能性が考えられ、移植細胞からなる軟骨組織の形成には寄与しなかったと予想された。移植細胞が生着し続けられなかった原因は不明であるが、蛍光タンパク質を発現させるための遺伝子操作の関与は否定できないと考えられた。

軟骨細胞および軟骨膜細胞を付加した培養気管による気管再建は、気管欠損部の一部に新生軟骨の再生が得られことから、気管軟骨の再生を期待できる方法と考えられた。軟骨細胞や軟骨膜細胞が軟骨再生を促進させるパラクライン作用等の機序に関しては今後解明する余地があると考えられた。また移植細胞が自家細胞であったにもかかわらず生着できなかった原因に関しては、今後原因

を解明する必要性があると考えられた。

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 6件)

- 1) 演題: Cricoid Regeneration Using Bioengineered Prosthesis with Fibroblasts  
学会: The 14<sup>th</sup> Japan-Korea Joint meeting of Otolaryngology-Head and Neck Surgery  
演者: Yukio Nomoto, Wataru Okano, 他5名  
会期・開催地: 2012年4月12-14日・京都
- 2) 演題: 人工材料および線維芽細胞を用いた喉頭の再生  
演者: 野本幸男、岡野涉、他5名  
学会: 第11回日本再生医療学会総会  
会期・開催地: 2012年6月12-14日・横浜
- 3) 演題: 人工材料と培養細胞を組み合わせた気道の再生  
演者: 野本幸男、野本美香、他5名  
学会: 第12回日本再生医療学会総会  
会期・開催地: 2013年3月21-23日・横浜
- 4) 演題: Tracheal Regeneration with Induced Pluripoten Stem(iPS) cells  
演者: Yukio Nomoto, Mitsuyoshi Imaizumi, 他2名  
学会: 20<sup>th</sup> International Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies  
会期・開催地: 2013年6月12-16日・韓国、ソウル
- 5) 演題: 培養細胞を付加した人工材料による気道再生  
演者: 野本幸男、野本美香、他7名  
学会: 第34回日本炎症・再生医学会  
会期・開催地: 2013年7月2-3日・京都
- 6) 演題: 組織再生誘導型人工材料に培養細胞を付加した新規気道再建材料の開発  
演者: 野本幸男、野本美香、他7名  
学会: 第13回日本再生医療学会総会  
会期・開催地: 2014年3月4-6日・京都

〔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:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://fukushima-ent.jp>

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
野本幸男 (NOMOTO Yukio)  
福島県立医科大学・医学部耳鼻咽喉科・講師  
研究者番号: 70508811
- (2) 研究分担者  
( )  
研究者番号:
- (3) 連携研究者  
( )  
研究者番号: