

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659628

研究課題名(和文) ビーグル犬 iPS 細胞を用いた新しい気道再建の研究

研究課題名(英文) Novel tracheal reconstruction using iPS cells of Beagle dogs.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000 円、(間接経費) 840,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、世界に先駆けて樹立したビーグル犬 iPS 細胞を自己組織再生型人工気管に応用し、気道を再建する新しい手術術式を確立することであった。ビーグル犬再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。

ビーグル犬からの iPS 細胞の樹立は、初期化する細胞として成犬由来の細胞を用いた場合、予想以上に難しく、本研究期間内には成功しなかった。しかし、in situ Tissue Engineering の手法で ADS や骨髄液を用いることにより気道組織の早期の組織化が可能なが判明した。

研究成果の概要(英文)： We challenged to establish new iPS cell line from adult Beagle dogs, but it was as much difficult than we had expected before the beginning of this experiment, to reset the mature cells of Beagle dogs. Hence we could not establish the cell line within the study period. However it was revealed the potential of ADS cells or bone marrow cell to the cell source of in situ Tissue Engineering instead of iPS cells. This method will contribute the reconstruction of airway as a new surgical approach. The reason may be due to the difference of the aging of the cell source, namely the cell from adult Beagle dog may have an unknown mechanism which works against the reprogramming.

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：気管 再建 幹細胞 iPS細胞 ビーグル犬 気道

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、長区域の気管切除に際して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用し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20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 Otology, Rhinology & Laryngology*. 113: 623-627, 2004)。しかしながらいず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、マウスとヒト以外では 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ビーグル犬 iPS 細胞の樹立に取り組み、これに世界で初めて成功している。(MRD, 2009, Shimada, H., et al.)。本研究はそれを呼吸器外科領域に用い新しい気道再建術式を開発する試みであった。

2. 研究の目的

(1) 研究期間内の目標

本研究課題の具体的な目標は次の3点で

ある。

iPS細胞が気管を構成する細胞に分化するか。

iPS細胞誘導による早期上皮化の検討。臨床応用に向けてレトロウイルスを用いない効率的iPS細胞作製技術の確立。

(2)シリコンなど人工物を使った気道再建の試みは、これまで全て失敗に終わっている。脱細胞処理をした生体由来材料や allograft を使った臨床研究が続けられているが、iPS 細胞を用いた気道再建は他に例を見ないものである。生体内組織再生 (*in situ* Tissue Engineering) の胸部外科領域における応用であり、成功すれば気道狭窄に苦しむ多くの患者の福音になると期待できる。

3. 研究の方法

(1) ビーグル犬 iPS 細胞の作製

ビーグル成犬の組織から線維芽細胞を取り出し、レトロウイルスを用いて、それに遺伝子導入を行なうことによって iPS 細胞化を試みた。併行してウイルスを使わない新しい手法もヒト iPS 細胞樹立の方法にならって行なった。

(2) 気道の再組織化による再建手技の確立

医療用のポリプロピレンメッシュとコラーゲンを組み合わせた気道再生の足場(scaffold)としての人工気管を作製した。計10本。

iPS 細胞は樹立できなかったため、これに骨髄由来の幹細胞(MSC)と ASC (脂肪由来幹細胞)を含漬させる系でビーグル犬の気道再建を頸部気管で行なった。

4. 研究成果

レトロウイルスフリーの新しい RNA 法によるビーグル犬 iPS 細胞の樹立を目指して、研究を行った。しかしながら、素材となる細胞をいろいろ変えても本法においては初期化効率が悪く、本研究期間内にビーグル犬 iPS 細胞を樹立するには至らなかった。一方、脂肪細胞由来の前駆細胞 / 幹細胞(ADSC)を用いた系においては、気管においた足場(scaffold)に十分な力学的強度を有する自己組織が誘導されることが判明した。気道の自己組

織化、上皮化に ADSC が有効に働くという新しい所見は、大型動物(ビーグル犬)の移植実験において確認されたものであり、これはこれまで問題となっていた再建気管の狭窄や上皮化の遅れを克服する新しい突破口となる可能性を示唆するものとして重要であると考えられた。

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 25 件)

1. Nakamura, T., Fumitsugu, K., Sato, T., Nakada, A., Wakatsuki, M., Sasauchi, K., Kida, N., Kanemaru, S., Omori, K., Kaneko, M., Shigeno, k., Inada, Y., Endo, K.: Artificial trachea and In situ tissue engineering: twelve gean-follow up.in canine model. Int Artif Organs. 35(8): 608(2012) 査読有
2. 中村達雄: 肺に対する再生医療応用の可能性. 侵襲と免疫. 21(2): 7-12(2012) 査読無
3. 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
4. Honda, M., Hori, Y., Shionoya, Y., Yamamoto, K., Kida, N., Kojima, F., Nakamura, T.: Fluid overload deteriorate the chylothorax. Disease of Esophagus. Diseases of the Esophagus.25: 269-272(2012), DOI10.1111/j.1442-2050.2011.01237.x 査読有
5. 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
6. 平野滋、金丸眞一、中村達雄、伊藤壽一: PGA チューブによる反回神経再建を施行した甲状腺癌長期経過の一症例. 頭頸部癌. 38(3): 363-367(2012) 査読無
7. 中瀬有遠、萩原明於、中村達雄: in situ Tissue Engineering による人工食道の開発. G.I. Research. 20(5): 40-43(2012) 査読無
8. Yukihiro Tatekawa. Akira Nakada. Tatsuo Nakamura. : Intrahepatic biliary ablation with pure ethanol: an experimental model of biliary atresia. Surg Today. (2012) DOI 10.1007/s00595-012-0379-2 査読有
9. Shigeno, k., Nakada, A., Kaneko, M., Wakatsuki, M., Hashimoto, Y., Inada, Y., Nakamura, T.: Regeneration of canine inferior alveolar nerve by polyglycolic acid-collagen tube. Int Artif Organs. 35(8): 569(2012) 査読有
10. Wakatsuki, M., Kaneko, M., Sasauchi, K., Nakada, A., Shigeno, k., Nakamura, T.: Promotion of bone repairing by use of novel Collagen scaffold in Rabbit skull defect model. Int Artif Organs. 35(8): 591(2012) 査読有
11. Kaneko, M., Wakatsuki, M., Shigeno, k., Nakada, A. Nakamura, T.: The experiment of the bone regeneration in the canine fronfale. Int Artif Organs. 35(8): 608(2012) 査読有
12. 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(3): 583-589(2012) DOI10.1002/lary.22389 査読有
13. Ohno, S., Hirano, S., Kanemaru, S., Mizuta, M., Ishikawa, S., Tateya, I., Nakamura, T., Ito, J.; Role of Circulating Mesenchymal Stem Cells in Vocal Fold Wound Healing. Laryngoscope. 122(11): 2503-2510(2012) DOI10.1002/lary.23543 査読有
14. Ishikawa, S., Tateya, I., Hayakawa, T., Masaki, N., Takizawa, Y., Ohno, S., Kojima, T., Kitani, Y., Kitamura, M., Hirano, S., Setou, M., Ito, J.: Increased expression of phosphatidylcholine (16:0/18:1) and (16:0/18:2) in thyroid papillary cancer. PLoS One.7(11):

- e48873(2012)DOI10.1371/journal.pone.0048873 査読有
15. Imaizumi M, Nomoto Y, Sato Y, Sugino T, Miyake M, Wada I, Nakamura T, Omori K: Evaluation of the use of Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) for the Regeneration of Tracheal Cartilage. *Cell Transplantation*, 22:341-353(2013) DOI10.3727/096368912X653147 査読有
 16. Tani A, Tada Y, Takezawa T, Imaizumi M, Nomoto Y, Nakamura T, Omori K: Regeneration of Tracheal Epithelium Using a Collagen Vitrigel-Sponge Scaffold Containing Basic Fibroblast Growth Factor. *Annals of Otolaryngology & Laryngology*, 121(4): 261-268, 2012. 査読有
 17. 大森孝一, 多田靖宏, 野本幸男, 谷亜希子, 金丸眞一, 中村達雄: 声門・声門下・気管狭窄の外來治療: 喉頭気管溝形成と気道再建を中心に. *日本気管食道科学会会報*, 63(2): 124-129, 2012. 査読無
 18. 萩原明於, 辻本洋行, 阪倉長平, 中村達雄: 消化器系における神経再生: 神経再生を用いる直腸癌の新しい手術戦略. *G.I. Research*. 20(6): 48-55(2012) 査読無
 19. Nakamura T, Kojima, F., Sato, T., Hamaji, M., Kaneko, M., Kanemaru, S., Nakada, A., Omori, K., Shigeno, K., Wakatsuki, M., Endo, K.: Novel tracheal prosthesis using in situ Tissue Engineering. *Int J Artif Organs* 36:585 (2013) 査読有
 20. Shigeno, K., Kaneko, M., Wakatsuki, M., Nakada, A., Hashimoto, Y., Honda, M., Inada, Y., Nakamura T: Regeneration of Canine Inferior Alveolar Nerve by Polyglycolic Acid-Collagen Tube with Platelet Rich Plasma. *Int J Artif Organs*. 36:571 (2013) 査読有
 21. Nakada, A., Shigeno, K., Sato, T., Kobayashi, T., Wakatsuki, M., Uji, M., Nakamura T: Manufacture of a weakly denatured collagen fiber scaffold with excellent biocompatibility and space maintenance ability. *Biomed Mater*. 8: 45010-45019 (2013) doi: 10.1088/1748-6041/8/4/045010. 査読有
 22. Machiguchi, T., Nakamura T: Cellular interactions via conditioned media induce *in vivo* nephron generation from tubular epithelial cells or mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 435: 327-333(2013) doi: 10.1016/j.bbrc.2013.04.050. 査読有
 23. 大森孝一, 多田靖宏, 野本幸男, 谷亜希子, 金丸眞一, 中村達雄: 生体内組織再生誘導型的人工気管を用いた気道再建. *再生医療*. 12: 57-63, (2013) 査読無
 24. Imaizumi, M., Nomoto, Y., Sato, Y., Sugino, T., Miyake, M., Wada, I., Nakamura T, Omori, K.: Evaluation of the use of induced pluripotent stem cells (iPSCs) for the regeneration of tracheal cartilage. *Cell Transplantation*. 22: 341-353 (2013) doi: 10.3727/096368912X653147. 査読有
 25. Nomoto, M., Nomoto, Y., Tada, Y., Tani, A., Otsuki, K., Suzuki, R., Nakamura T, Omori, K.: Bioengineered trachea using autologous chondrocytes for regeneration of tracheal cartilage in a rabbit model. *Laryngoscope*. 123: 2195-2201 (2013)doi: 10.1002/lary.23784. 査読有
- 〔学会発表〕(計9件)
1. Nakamura T: In situ Tissue Engineering. Annual Meeting of The Korean Bronchoesophagological Society (2012.5.12 Seoul(Korea)) 招待講演
 2. Nakamura T: Clinical Application of a Tissue-engineered Trachea. Annual Meeting of The Korean Bronchoesophagological Society (Symposium) (2012.5.12 Seoul(Korea))
 3. 中村達雄: 人工神経管 (PGA-tube) による末梢神経再生と in situ Tissue Engineering (生体内再生). 第32回日本臨床麻酔学会 (2012.11.1 福島) 招待講演
 4. Shigeno, K., Shionoya, Y., Nakada, A., Kaneko, M., Wakatsuki, M., Hashimoto, Y., Inada, Y., Nakamura T: REGENERATION OF CANINE INFERIOR ALVEOLAR NERVE BY POLYGLYCOLIC ACID-COLLAGEN TUBE. 39th Annual

- ESAO Congress (2012.9.26-29 Rostock (Germany))
5. 中田 顕：弱変性 collagen fiber scaffold の有用性について。日本再生医療学会 (2012.6.12-14 横浜)
 6. Ohno, S., Hirano, S., Kanemaru, S., Mizuta, M., Ishikawa, S., Tateya, I., Nakamura, T., Ito, J.: Role of Circulating Mesenchymal Stem Cells in Vocal Fold Wound Healing. The 92nd Annual Meeting of The American Broncho-Esophagological Association. (2012.4.19 San Diego (USA))
 7. Nakamura, T., Kojima, F., Sato, T., Hamaji, M., Kaneko, M., Kanemaru, S., Nakada, A., Omori, K., Shigeno, K., Wakatsuki, M., Endo, K.: Novel tracheal prosthesis using in situ Tissue Engineering. 40th Annual ESAO Congress (2013.9.11-14 Scotland)
 8. Kojima, F., Sato, T., Takahata, H., Okada, M., Sugiura, T., Oshiro, O., Date, H., Nakamura, T.: In-Vivo Localization of Micro Radio Frequency Identification Tag: Concept Proof of Novel Surgical Marking System for Small Peripheral Lung Nodule. 第 2 1 回アジア胸部心臓血管外科学会 (2013.4.6 神戸)
 9. Takahata, H., Sugiura, T., Kojima, F., Sato, T., Okada, M., Oshiro, O.: Impact of Transmission Power Variation to the Position Estimation Error Performance of RFID-tag Assisted Surgery Support System. International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society(EMBC'2013) (2013.7.3-7 Osaka)

{ その他 }

<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