

機関番号：14401  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20592087  
 研究課題名(和文) 新素材を足場骨格に応用した小児の気管・気管支再生に関する研究  
 研究課題名(英文) Research on regenerative medicine of pediatric airways  
 using new materials as scaffolds and scaffold-free cell sheets.  
 研究代表者  
 臼井 規朗 (USUI NORIAKI)  
 大阪大学・医学系研究科・准教授  
 研究者番号：30273626

研究成果の概要(和文)：まず、生物分解性を有するポリトリメチレンカーボネートを足場の新素材として利用して軟骨再生を試みたが、軟骨細胞の接着・培養は困難であった。次に、軟骨細胞シートを利用して、足場を用いず円筒状軟骨構造体を再生させることに成功した。In vitro において再生された円筒状軟骨構造体は、組織学的にもほぼ正常軟骨と同様の構造を有し、適度な弾性と強度を有していることが証明された。本軟骨構造体は、様々な形状に加工して利用可能と考えられたが、臨床応用のためには更なる動物実験によつての確認が必要と思われた。

研究成果の概要(英文)：We first tried to use Poly-tri-methylene-carbonate as new materials for scaffolds in cartilage regeneration, however resulted in failure of regeneration. Then, we developed a novel procedure for fabricating engineered cartilage, which maintained the shape and a proper level of rigidity and flexibility, under in vitro conditions using sheet-based tissue engineering techniques. Auricular chondrocytes were harvested from rabbits and cultivated under high-density conditions to form a chondrocyte sheet. The sheet was looped around a silicon tube and cultivated for 6 weeks. The engineered cylindrical cartilage was sufficiently elastic and stiff to maintain the structure without disruption. Histologically, the construct contained a Safranin-0 positive cartilaginous matrix accompanied by the expression of type II collagen. The glycosaminoglycan content increased and reached 72% of the native tracheal cartilage after 6 weeks of cultivation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：(1) 再生医療、(2) 気管軟骨、(3) Scaffold-free、  
 (4) ポリトリメチレンカーボネイト、(5) Tissue engineering、  
 (6) Cell sheet、(7) 回転培養、(8) Cylindrical cartilage

## 1. 研究開始当初の背景

小児における気管・気管支の先天異常においては、時として極めて重篤な呼吸困難症状を呈する場合がある。ことに気管無形成や広範囲型先天性気管狭窄症などの疾患では、治療の対象部位が広範囲にわたるため、何らかの外科的成形術によって気道を再建する以外に救命の手段がない。しかし、外科的成形術によって再建された気管や気管支は、気道内圧の変化に対して内腔を保持できるだけの十分な強度を持たないことが多い。肉芽の形成や再狭窄が発生し易く、呼吸管理に難渋する症例が多かった。この様な理由から、小児呼吸器外科の領域では、小児の気管や気管支についての再生医療の発展が期待されてきた。

近年、成人の呼吸器外科領域では再生気管が臨床応用され、良好な治療成績が報告されはじめている。これら成人における再生気管は、主として悪性腫瘍のために切除を余儀なくされた気管の代用として用いられるもので、生物非分解性の素材を足場として、周囲からの結合組織や気管粘膜上皮の再生を促すことによって形成されている。

一方、小児においては、気管や気管支の長さや内腔径が成長に伴って発育していくため、再生気管についても、成長に伴って長さや内腔径が増大することが必要となる。そのため、小児における再生気管では、十分な物理的強度有すると同時に、その骨格構造が、成長に伴って発育するという条件を満たさなければならない。このことは、成人領域で行われているような生物非分解性の素材を足場として利用できないということを意味している。すなわち、小児における気管の再生においては、1) 適切な生物分解性素材を用いた足場を開発するか、2) 足場そのものを利用せずに気管再生を行うかの、どちらかしか手段がない。

従来、気管軟骨の再生において、生物分解性の足場素材を用いる場合、ポリグリコール酸やポリ乳酸がしばしば用いられてきた。しかし、これらの研究では軟骨組織の培養を継続していくうちに、素材の分解の際に生じる代謝産物のためと思われる軟骨組織の萎縮が生じることが報告されてきた。

そこで研究代表者は、すでに臨床で縫合糸等に使用されている生物分解性素材であるポリトリメチレンカーボネイトに着目した。ポリグリコール酸やポリ乳酸は、生体内で加水分解されると酸性の代謝産物が産生されるのに対し、ポリトリメチレンカーボネイトは、酵素による分解を受け、中性の代謝産物が生じる点が他と異なっている。そのため、分解後の代謝産物による細胞障害性が低く、

従来問題となってきた軟骨組織の萎縮が防止できる可能性があると考えられる。

小児の気道再生におけるもう一つの問題解決の手段として、足場そのものを用いない気管軟骨再生法が考えられる。近年、細胞シートを応用した再生医療が臨床応用されつつあり、気管軟骨においても軟骨細胞シートを生体内で管状の軟骨組織に再生させる試みが報告され始めている。軟骨細胞は高密度で培養することにより、軟骨基質を産生することが知られているため、軟骨細胞シートから軟骨基質を産生させることができれば、軟骨細胞自体が足場に匹敵する強度を獲得できる可能性もあると推測される。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、以下の2つの目的を設定した。

(1) 目的1: 生物分解性素材であるポリトリメチレンカーボネイトを用いて、多数の pore を有するシート状構造体を形成し、これを足場として軟骨組織を再生することにより、軟骨の足場としてのポリトリメチレンカーボネイトの特性を評価する。

(2) 目的2: 軟骨細胞をシート状に培養することで、足場を用いずに軟骨組織による円筒状構造体を再生させ得るかどうかを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 実験1: トリメチレンカーボネイトを用いた生物分解性足場の作製および軟骨細胞培養実験:

まず、トリメチレンカーボネイトを、コレステロールを用いて開環重合させ、高分子ポリマーであるポリトリメチレンカーボネイトを作製した。次に、この内部に細胞培養に必要な数とサイズの pore を形成するため、クロロホルムに溶解したポリトリメチレンカーボネイトと、塩化ナトリウム結晶を混合してシート状に成型し、クロロホルムを十分に揮発させ、乾燥・硬化させた。水中に浸漬して塩化ナトリウムのみを溶出させ、多数の pore を有するシート状のポリトリメチレンカーボネイトの構造体を作製した。このシート状構造体を顕微鏡にて観察し、pore の数とサイズを評価したのち、pore の数とサイズが適切となるように、工程の見直しと調整を行った。作製されたシート状のポリトリメチレンカーボネイトの構造体を足場として、以下に述べる方法で軟骨細胞の播種を行った。

軟骨細胞は、New Zealand white rabbit (1.5~2.0kg) から採取した。家兎の耳介を採取して、耳介軟骨のみを取り出し、0.15% II 型コラゲナーゼにて融解させて軟骨細胞を分離した。軟骨細胞は 10% 胎仔血清、100IU/mL

ペニシリン、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシンを加えた Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) 培養液にて培養し、1 継代ののち、 $2 \times 10^6$  個/ml の濃度として、ポリトリメチレンカーボネイトの足場に播種した。培養管内で 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で 3 日間振盪培養して生着せしめたのち、さらに 2 週間培養を継続した。

(2) 実験 2 : 軟骨細胞シートを用いた円筒状軟骨構造体の作製に関する実験 :

実験動物には New Zealand white rabbit (1.5~2.0kg) を用いた。家兔耳介を採取して、耳介軟骨のみを摘出し、0.15% II 型コラゲナーゼにて軟骨を融解させて軟骨細胞を分離した。軟骨細胞は、上記と同様の DMEM にて培養し、1 継代させたのち、 $2 \times 10^6$  個/ml の濃度で、培養皿に高密度培養した。上記培養液に 50  $\mu$ g/mL アスコルビン酸、40  $\mu$ g/mL L-プロリン、0.1mmol/L 非必須アミノ酸、1/mL Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 を添加し、1 週間の初期培養を行なった。

初期培養にて形成された軟骨細胞シート (図 1, a) は、滅菌した直径 7mm のシリコンチューブに巻き付けて糸で固定し (図 1, b)、37°C の条件下に、①静置培養、および②10rpm の速度による回転培養を継続した。それぞれの条件で培養した円筒状の軟骨細胞シートは、培養開始後 0 週後、2 週後、4 週後、6 週後に採取し、外観と性状を観察したのち、ホルマリン固定し、HE 染色およびサフラニン O 染色染色、II 型および I 型 collagen に対する免疫組織化学染色を行った。また、軟骨組織中のグリコサミノグリカン (GAG) の量を測定した。GAG 量の測定は、ブリシアンアッセイキット (Biocolor, Belfast 社製) を用いて行った。回転培養後 6 週後の円筒状軟骨構造体については、レノメーター

(CR-500DX, Sun Scientific 社製) を用いて物性強度を測定した。物性強度は軟骨構造体を 10mm の長さに切断し、60mm/分の速度で圧迫し続け、円筒の直径が 1/2 になった際の圧力とした。

#### 4. 研究成果

(1) 結果 1 : トリメチレンカーボネイトを用いた生物分解性足場の作製および軟骨細胞培養実験 :

トリメチレンカーボネイトで疎水性を示すコレステロール(Chol)と、親水性を示す poly(ethylene glycol) monomethyl ether (mPEG) を用いて高分子ポリマー、ポリトリメチレンカーボネイト (PTMC) を作製し、その開環重合数を確認した。Gel permeation chromatography を用いて測定したところ、Chol-PTMC は数平均分子量 (Mn) 38561, 重量平均分子量 (Mw) 131960、mPEG-PTMC は Mn

36034, Mw 114292 であった。また、1H NMR spectra を用いて測定したところ、PTMC は、トリメチレンカーボネイト約 1600 個からなる高分子ポリマーであることが確認された。

次に、それぞれの水の接触角を測定したところ、Chol-PTMC は、浸水前は 85 度であったが、7 日間の浸水後には、78 度となった。一方、mPEG-PTMC は、それぞれ 61 度、53 度であった。従って、水中の特性は、Chol-PTMC の方が細胞接着にとって適切な疎水性を有するが示された。

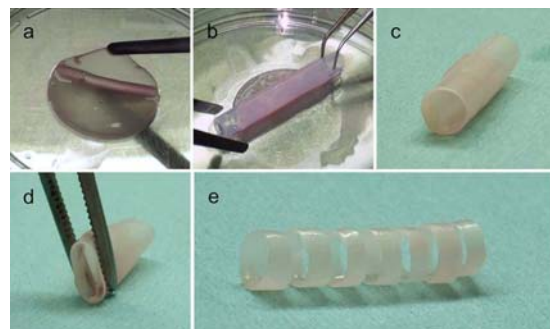
次に、Chol-PTMC および mPEG-PTMC を用いて、多数の pore を有する PTMC を作製した。Chol-PTMC では浸水当初 pore size が維持されたが、浸水後時間が経つに従って徐々に収縮し、pore の消失が認められた。これは、Chol が疎水性を示すため水溶液内で凝集したためと考えられた。一方、mPEG-PTMC では、浸水後も pore size は縮小することなく形態が維持された。しかし mPEG-PTMC は、親水性が強いため、細胞接着の点では不利と考えられた。

Chol-PTMC および mPEG-PTMC を単独で足場として、軟骨細胞の播種を行ったところ、Chol-PTMC では pore が消失するため、また mPEG-PTMC では親水性が強すぎるため、軟骨細胞の適度な接着は得られず、培養を継続しても軟骨の十分な再生は得られなかった。従って、PTMC を軟骨細胞の足場とするためには、Chol-PTMC および mPEG-PTMC のそれぞれの特性を生かすため、両者の混合比を適切に調整し、足場としての特性を更に検討する必要があると考えられた。

(2) 結果 2 : 軟骨細胞シートを用いた円筒状軟骨構造体の作製に関する実験 :

6 週後の①静置培養および②回転培養によって、軟骨細胞シートは共に軟骨基質が増生し、円筒状軟骨構造として形成された。この円筒状軟骨構造体は、軸のシリコンチューブを抜去しても形状は維持されていた (図 1, c)。側面よりの圧迫に対しても、十分な弾性を有し、圧迫を解除すると元の形状に復帰した (図 1, d)。また、円筒状軟骨構造体を切断してリング状に加工しても、十分その形状を維持できることが示された (図 1, e)。

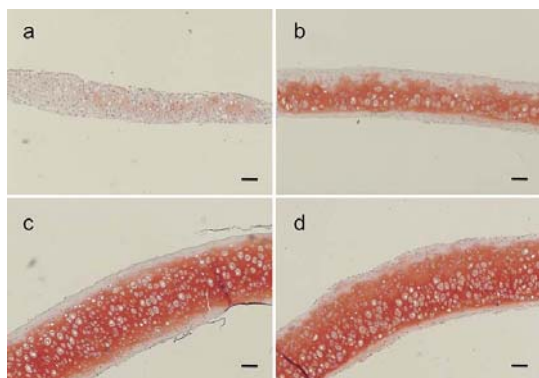
図 1



HE染色では、初期培養後（0週後）、すでに軟骨細胞の周囲に軟骨基質が認められた。静置、回転ともに培養を2週～6週後まで継続することにより、軟骨細胞数、軟骨基質量はいずれも増加し、軟骨の厚みも増した。

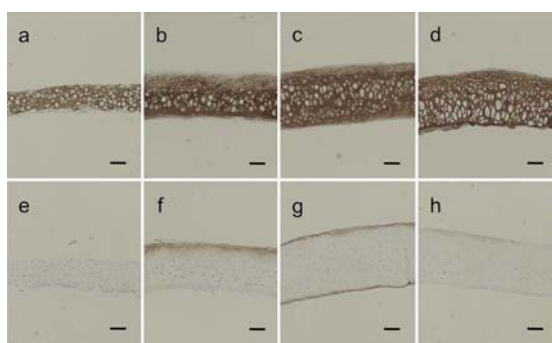
サフラニンO染色で染色されるGAGは、0週後ではわずかであったが（図2, a）が、培養継続2週後で増加した（図2, b）。6週後には①静置培養（図2, d）、②回転培養（図2, c）ともに、GAGの染色性が増加するとともに、軟骨の厚みも増し、正常な気管軟骨とほぼ同様な所見を呈するまでになった。

図 2



II型コラーゲンは、0週後より全体的に存在し、回転培養の継続によって軟骨の厚さが増しても、分布に大きな変化は認められなかった（図3, a～d）。これに対して、I型コラーゲンは0週後では染色されなかったが（図3, e）、回転培養開始後2週後には辺縁に出現し（図3, f）、回転培養6週後には軟骨の両側辺縁で染色された（図3, g）。一方、静置培養では、培養6週後もI型コラーゲンの染色性が低いままであった（図2, h）。

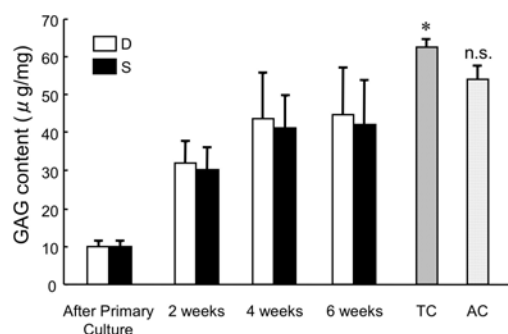
図 3



円筒状軟骨構造体に含有されるグリコサミノグリカン量は、①静置培養、②回転培養ともに、0週後から4週後まで増加し、6週後にはプラトーに達した。この量は、家兎耳介軟骨に含まれるGAG含有量と同程度であり、

家兎気管軟骨のGAG量の約72%であった（図4）。

図 4



### 【考察】

本研究では、まずポリトリメチレンカーボネートという高分子を足場の新素材として応用し、軟骨構造体の再生を試みた。生物分解性のあるポリトリメチレンカーボネートに多数のporeを持たせることには成功したが、poreを有した構造を維持させながら、足場に軟骨細胞を接着させるのは、今回の実験条件では困難であった。今後、素材の混合比などに改良を加える必要があると考えられた。

次いで、軟骨細胞が高密度培養された時に軟骨への分化が促進され、基質を産生するという性質を利用し、軟骨細胞シートのみから、足場を用いずに円筒状軟骨構造体を再生させる実験を行った。In vitroにおいて再生された円筒状軟骨構造体は、組織学的にもほぼ正常軟骨と同様の構造を有し、適度な弾性と正常軟骨に匹敵する強度を有していることが証明された。この軟骨構造体は、様々な形状に加工することが可能で、in vitroで加工した上で、in vivoに軟骨移植して使用することも可能と考えられた。

しかし、本法を今後臨床応用していく上では、実際に動物に移植実験を行うなど、in vivoでの実験を行って検討を加えることが必要と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

① Tani G, Usui N, kamiyama M, Oue T, Fukuzawa M. In vitro construction of scaffold-free cylindrical cartilage using cell sheet-based tissue engineering. *Pediatr Surg Int* 26: 179-185, 2010

② 谷 岳人, 臼井規朗, 神山雅史, 福澤正洋. 小児外科における再生医療-足場を用いない気管軟骨再生の試みと境界領域としての臓器再生医療- 日本周産期・新生児医学会雑誌 46: 993-996, 2010

〔学会発表〕(計4件)

① Tani G, Usui N, kamiyama M, Fukuzawa M. Tissue engineering of tracheal cartilage: Scaffold free cartilaginous constructs using cell sheet-based tissue engineering. 106<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society of Paediatric and Adolescent Medicine Potsdam, Germany, 9.16-19, 2010

② 谷 岳人, 臼井規朗, 神山雅史, 福澤正洋. 小児外科における再生医療-足場を用いない気管軟骨再生の試みと境界領域としての臓器再生医療- 46回日本周産期・新生児医学会学術集会 神戸 7.11-13, 2010

③ 谷 岳人, 臼井規朗, 神山雅史, 福澤正洋. 軟骨細胞シートを応用した気管軟骨再生法の開発 110回日本外科学会定期学術集会名古屋 4.8-10, 2010

④ 谷 岳人, 臼井規朗, 神山雅史, 福澤正洋. 軟骨細胞シートを応用したin vitroにおける気管軟骨再生法の開発 46回日本小児外科学会学術集会 大阪 6.1-3, 2009

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

臼井 規朗 (USUI NORIAKI)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：30273626

### (2) 研究分担者

谷 岳人 (TANI GAKUTO)  
大阪大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：60467561

澤井 利夫 (SAWAI TOSHIO)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：20403074  
(H20年まで研究分担者として参画)

渡邊 順司 (WATANABE JYUNJI)  
大阪大学・工学系研究科・准教授  
研究者番号：60323531  
(H21年まで研究分担者として参画)

神山 雅史 (KAMIYAMA MASAFUMI)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：20403074  
(H21年から研究分担者として参画)