

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791730

研究課題名(和文) 細胞膜シートと回転培養法を応用した足場を必要としない気管軟骨再生法の開発

研究課題名(英文) Construction of scaffold-free tracheal cartilage using self sheet-based tissue engineering and dynamic culture

研究代表者

谷 岳人 (TANI GAKUTO)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60467561

研究成果の概要(和文)：家兎の耳介軟骨より軟骨細胞シートを作製し、チューブに巻き付けて円筒状にして回転培養を行なったところ、軟骨細胞シートは円筒の形を維持し、十分な弾力性も有しており、グリコサミノグリカン含有量は耳介軟骨とほぼ同等であった。この円筒状シートをリング状や螺旋状に加工してもその形状を維持することができた。円筒状シートを自家移植しても内腔の開存性があり、弾力性を有していたが、正常耳介軟骨と比べてグリコサミノグリカン含有量は有意に低下していた。

研究成果の概要(英文)：Auricular chondrocytes were harvested from New Zealand white rabbits and cultivated to form a chondrocyte sheet. The sheet was looped around a silicon tube and cultivated in dynamic conditions. Engineered cartilage maintained the shape and a proper level of rigidity and flexibility, under in vitro conditions. Glycosaminoglycans content of the engineered cartilage corresponded approximately to the content of the rabbit auricular cartilage. Engineered cartilage was easy to convert the cylindrical cartilage into serial ring cartilages by slicing. The graft of engineered cartilage maintained a cylindrical shape, and was elastic and stiff. But, the GAG content of the graft was significantly decreased.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：再生医療、軟骨再生、細胞シート、回転培養

1. 研究開始当初の背景

生物非分解性素材を足場として用いて気管を再建し、周囲から結合織や気管粘膜上皮の再生を促すことにより気管再生をさせる

方法が成人呼吸器外科領域で臨床応用されている。成人の場合は再生気管が成長する必要がないため生物非分解性足場が残存しても問題にならないが、小児呼吸器外科領域で

は再生気管が将来に成長に備えて足場に非分解性素材が含まれないこと、骨格となる軟骨が内腔を保持できる強度を有すること、呼吸運動や頸部の伸展・屈曲運動に追従可能な柔軟性を有することが必要である。

従来の軟骨再生の研究においては、生物分解性素材が足場として用いられてきたが、これらは足場周囲に炎症反応を来たして細胞外基質の産生が不十分となったり、足場周囲の軟骨細胞が壊死したりして軟骨組織が退縮することが報告されてきた。

近年、生物分解性素材などの足場を必要としない軟骨再生法の研究が報告されはじめ、軟骨においても軟骨細胞からシートを作製する方法が報告されている。このシートは様々な形状に形成することが可能で、形成後に自己の皮下組織に移植することによって、*in vivo* で任意の形状の軟骨が作製できることが報告されている。

本応募研究課題は *in vitro* で作成した軟骨細胞シートを、回転培養法を応用することによって、*in vitro* において培養しながら円筒状の軟骨構造体として形成し、さらにこれを *in vivo* において再生気管として利用しようと試みる全く新たな研究と位置づけられる。

2. 研究の目的

小児の先天性気道疾患の治療に必要な広範囲の気管を実験的に再生する方法を開発することを目的とする。

本研究では足場を必要としない軟骨細胞シートを用い、これに回転培養法を応用することによって、自己の軟骨細胞のみで円筒状の軟骨構造体を形成し、全体として伸展・屈曲運動に耐えうる柔軟性を有した再生気管の骨格構造の作製法を開発する。作製した円筒状の軟骨構造体を自家移植して気管置換術に使用できるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 軟骨細胞シートおよび円筒状軟骨構造体の作成

家兎より耳介軟骨を摘出して、軟骨細胞を採取する。採取した軟骨細胞を培養して継代する。培養細胞を回収して $2.0 \times 10^6/\text{ml}$ となるように懸濁してシャーレに播種する。1週間培養してできた軟骨細胞シートの組成について組織染色 (HE 染色、サフラニン-0 染色)、免疫染色 (I 型コラーゲン、II 型コラーゲン) およびグリコサミノグリカン測定を行う。軟骨細胞シートをシリコンチューブに巻き付けて円筒状にして回転培養を行う。回転培養 2, 4, 6 週にそれぞれシリコンチューブの内筒を抜去したときの肉眼的観察、強

度、屈曲や伸展に対する柔軟性について検討する。また、組織染色 (HE 染色、サフラニン-0 染色)、免疫染色 (I 型コラーゲン、II 型コラーゲン) およびグリコサミノグリカン測定を行い、正常軟骨の組成と比較検討する。

(2) 円筒状軟骨構造体の自家移植

in vitro で再生させた円筒状軟骨構造体を家兎に頸部の胸鎖乳突筋内にシリコンチューブを内筒として留置したまま自家移植する。円筒状軟骨構造体は回転培養 4 週間したものを移植に使用した。自家移植 4 週間後に移植片を摘出してシリコンチューブを抜去したときの内腔の開存性、柔軟性、力学的強度について検討をする。また、組織染色 (HE 染色、サフラニン-0 染色)、免疫染色 (I 型コラーゲン、II 型コラーゲン) およびグリコサミノグリカンの定量を行い、正常の気管軟骨との比較検討を行う。また、*in vitro* から *in vivo* への環境の変化によって、円筒状軟骨構造体にどのような変化が起きたかを検討する。

4. 研究成果

(1) 軟骨細胞シートおよび円筒状軟骨構造体の作成

家兎の耳介軟骨より採取した軟骨細胞を高密度で細胞を播種すると軟骨細胞シートを作成することができた。軟骨細胞シートはしっかりと強度を有しており、シートが損傷することなくシリコンチューブに巻き付けることができた。シリコンチューブに巻き付けた細胞シートを回転培養したところ、軟骨細胞シートは徐々に厚みが増した。

軟骨細胞シートをシリコンチューブに巻き付けて 6 週間回転培養を行った後にシリコンチューブを取り除くと、軟骨細胞シートは変形することなく円筒の形を維持していた。また、外部より圧迫、屈曲などの圧力を加えてもその圧力を解除すると元の形状にすぐに戻る弾力性も有していた。この円筒状のシートをリング状に切断しても、螺旋状に切開を加えても、その形状を維持することができ、内腔の開存性も得られていた。

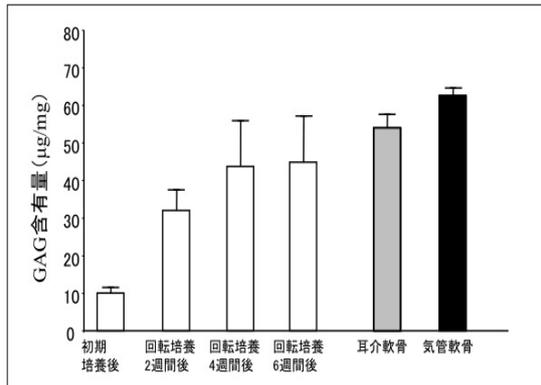
HE 染色では軟骨シートの厚さが回転培養 4 週間までは増していった。しかし、4 週間以上は軟骨シートの厚みに変化はなかった。

サフラニン-0 染色では、回転培養開始前はほとんど染色されなかったが、回転培養 2 週間後には全体的に染色されており、軟骨細胞シートの厚みの増加とともに染色範囲も増加していた。

免疫染色では、II 型コラーゲンは回転培養前より軟骨細胞シート全体が染色されており、回転培養後も染色の低下は認められなかった。I 型コラーゲンは回転培養前からほと

んど染色されず、回転培養後は軟骨シートの辺縁若干染色を認めるのみであった。

各培養期間のグリコサミノグリカン (GAG) を定量すると回転培養 4 週間まではグリコサミノグリカン含有量は増加傾向が認められた。しかし、4 週間以上回転培養を継続してもグリコサミノグリカン含有量の増加は認められなかった。回転培養 6 週間後のグリコサミノグリカン含有量は兔の耳介軟骨内の含有量とほぼ同等まで達しており、兔の気管軟骨と比べると 72% まで達していた。



生体外ではあるが、この軟骨細胞シートは、自己の細胞のみでも十分な細胞外基質が産生され円筒状の構造を維持できる強度を有しており、圧迫や屈曲に耐えうる十分な柔軟性を有しているため、再生気管の骨格として使用できるものであった。

(2) 円筒状軟骨構造体の自家移植

自家移植後 4 週間後に摘出して、内腔の開存性、弾力性、組織染色、免疫染色、グリコサミノグリカンの定量を行った。移植片はシリコンチューブを抜去しても内腔の開存性があり、外部より圧迫や屈曲などの圧力を加えてもその圧力を解除すると元の形にすぐに戻る弾力性を有していた。

HE 染色では軟骨組織内の一部に石灰化が認められた。

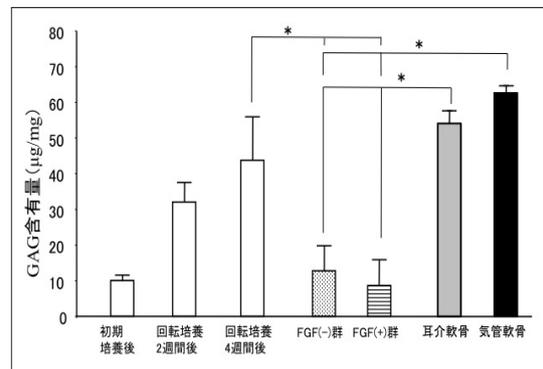
サフラニン-O 染色にてグリコサミノグリカンの染色範囲が移植前に比べると減少していた。

免疫染色は移植前の組織と比較してみると、II 型コラーゲンの染色が減少し、I 型コラーゲンの染色が増加していた。

グリコサミノグリカンの定量では移植前に比べると有意にグリコサミノグリカン含有量が減少していた。正常気管軟骨と比べてもグリコサミノグリカン含有量は有意に低かった。

移植後にグリコサミノグリカンが減少していたため、軟骨内のグリコサミノグリカン

含有量を増加させることが知られている塩基性線維芽細胞増殖因子に着目した。自家移植前に円筒状軟骨構造体にこの塩基性線維芽細胞増殖因子を塗布して自家移植を行い、自家移植後 4 週間後に摘出して同様の評価を行った。塩基性線維芽細胞増殖因子を塗布した移植片のサフラニン-O 染色は移植前に比べて染色範囲が減少していた。また II 型コラーゲンの染色も減少し、I 型コラーゲンの染色は増加しており、塩基性線維芽細胞増殖因子の塗布しなかったものと同様の所見であった。また、グリコサミノグリカン含有量は塩基性線維芽細胞増殖因子を塗布しても改善は認められなかった。



生体外にて足場を用いずに円筒状の立体的構造の軟骨を再生することができた。またこの軟骨構造体は加工しても立体的構造を維持することができ、移植前に加工することが可能であり、今までにない新たな研究成果であった。自家移植後では立体的構造は維持されたが、軟骨基質のグリコサミノグリカンや II 型コラーゲンが減少した。今後、軟骨が体内で生着するための適切な体内環境を調べることにより、この生体外で作製した立体的構造を呈している軟骨構造体を気管移植に使用できる可能性が十分にあると思われる。

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 2 件)

- ① Gakuto Tani, Noriaki Usui, Masafumi Kamiyama, Takaharu Oue, Masahiro Fukuzawa, In vitro construction of scaffold-free cylindrical cartilage using cell sheet-based tissue engineering, Pediatric Surgery International, 査読有, Vol. 26, (2010), 179-185

- ② 谷岳人、白井規朗、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建医療-、日本周産期・新生児医学会雑誌、査読無、46 巻、(2010)、993-996

[学会発表] (計 4 件)

- ① Gakuto Tani, Tissue engineering of tracheal cartilage: Scaffold-free cartilaginous constructs using cell sheet-based tissue engineering, Annual Meeting of the German Society of Paediatric and Adolescent Medicine, 2010. 9. 18, Filmpark Babelsberg (Germany)
- ② 谷岳人、小児外科における再生医療 2 -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建医療-、日本周産期・新生児医学会学術集会、2010. 7. 12、神戸国際会議場
- ③ 谷岳人、軟骨細胞シートを応用した気管軟骨再生法の開発、日本外科学会定期学術集会、2010. 4. 9、名古屋国際会議場
- ④ 谷岳人、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、日本小児外科学会学術集会、2009. 6. 3、大阪国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：