

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592625

研究課題名(和文)複合的成長因子と軟骨細胞移植療法による気管形成術の開発研究

研究課題名(英文)Tracheoplasty by combined growth factor and injectable cell therapy

研究代表者

古村 眞 (Komura, Makoto)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：10422289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨を再生する過程で、b-FGFをゼラチンに含浸させ、徐放化することが有用である。適切なb-FGF徐放量について検討した。3週齢のC57B6Jマウス耳介軟骨細胞をゼラチンと β -tri-calcium-phosphate(β -TCP)1mlあたりに 10×10^6 個の軟骨細胞を播種して、 $100 \mu\text{g/ml}$ 以上のb-FGFを徐放することで有意に軟骨が再生されることを確認した。

また、気管と接する食道前壁に軟骨プレートを生じ、この再生軟骨を気管へ剥移植する気道再建術を考案した。食道に軟骨細胞とゼラチンによる足場にて軟骨が再生されることを確認し、軟骨プレートを用いた気管形成術が可能であった。

研究成果の概要(英文)：A gelatin sponge with slowly releasing basic fibroblast growth factor (b-FGF) enhances chondrogenesis. This study investigated the optimal amount of basic fibroblast growth factor (b-FGF) in gelatin sponges to fabricate engineered cartilage. Gelatin sponges impregnated with more than $100 \mu\text{g/ml}$ b-FGF incorporating β -TCP with chondrocytes (10×10^6 cells/ml) can fabricate engineered cartilage at 4 weeks after implantation. We devised a new tracheoplasty using a cartilage graft engineered outside the esophagus. This study investigated the feasibility of fabricating cartilage engineered outside the esophagus and using it to perform tracheoplasty in a rabbit model. Tracheoplasty with cartilage engineered outside the esophagus may be useful for developing reconstructed airways.

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 気道再建 成長因子

1. 研究開始当初の背景

狭窄部が気管全長の 30% を越える気管狭窄症に対して、slide tracheoplasty が標準術式となっているが、侵襲的な胸骨正中切開による開胸が施行され、縫合線からの肉芽形成による狭窄・出血や術後気管軟化症が認められる。また、気管狭窄症は心奇形を合併する症例も多く、より低侵襲で確実な治療方法の開発が望まれている。

我々は、気管狭窄症に対して気道用ステント系足場素材を開発し、1/3 から 1/4 周の板状の気管軟骨を作成した。家兔の頸部気管前壁欠損モデルに bFGF(basic fibroblast growth factor) の徐放化製剤とともに軟骨細胞を播種した足場を移植することで、軟骨再生が促進されることを報告 (J Pediatr Surg. 43:2141-6 2008) した。しかし、この再生軟骨は、斑状に集簇しており、均一な軟骨再生は認められなかった。我々は、ヒト気管軟骨細胞が、継代培養によって、脱分化して軟骨細胞の本来の性質を失うことを報告 (Pediatr Surg Int. 24:1117-21, 2008) した。この不均一な再生軟骨には、軟骨細胞の脱分化が関与しているものと考えている。また、共同研究者の星和人准教授らは、高分子化合物による足場素材を生体内に移植すると、炎症細胞が遊走される事を報告している。足場素材を使用する事は、均一な軟骨の再生に悪影響を与える大きな一因と考えている。

そこで、我々は最初に軟骨組織から分離直後の継代培養していない軟骨細胞 (107 個/cm³) を生体内に移植して軟骨が再生される事を確認 (Int J Art organ. accept) した。しかし、軟骨組織から分離される細胞数は、組織の重さ (ヒト気管 106 個/1g、家兔耳介 106 個/g) で規定されていた (未発表 data)。我々の研究では、再生軟骨足場 1cm³ あたり 106 個以上の軟骨細胞を播種する必要があった。分離直後の軟骨細胞で軟骨を再生するには、同等量の組織採取が必要で現実的ではない。もう一つの問題点を解決するために、足場素材を使用せず、軟骨細胞と bFGF 徐放化製剤を混合したゲルを皮下・筋肉内に注射し、軟骨が再生される事を確認 (未発表 data) した。しかし、再生された軟骨の形状は、不規則で形態をコントロールすることは不可能であった。

2. 研究の目的

我々は、この二つの問題点を解決するために、まず軟骨組織より分離直後の少数の軟骨細胞に軟骨細胞増殖因子・再分化誘導因子の徐放化製剤を複合的に投与する事で必要な体積の軟骨が生体内で再生可能ではないかと考えた。これは、

我々が、すでに bFGF の徐放化製剤を気管の外側に投与して、気管軟骨壁内の軟骨細胞数が増加する現象を生体内で確認 (未発表 data) しており、分離直後の脱分化していない細胞にも同様の効果があると考えているからである。次に、形態をコントロールするために、軟骨細胞と成長因子のゲルを気管狭窄部の後壁にあたる食道外膜下に注入し軟骨壁を再生することとした。これは、食道外膜下に細胞を注入する事で、細胞が保持され、形態が制御されると考えたからである。また、この再生軟骨壁をパッチとして狭窄部の後壁に縫合し、気管の内腔を拡張する新たな術式を考案した。

本研究では、発育期家兔の気管にシリコンチューブを巻き作成した気管狭窄モデルを使用して、脱分化していない軟骨細胞と複合的成長因子を食道前壁に注入する細胞移植療法にて再生軟骨壁を作り、気管を形成する新たな術式を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

実験

軟骨を再生する過程で、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF) をゼラチンに含浸させ、徐放化することが有用である。しかし、適切な b-FGF 徐放量については、確認されていないので、有用な b-FGF の徐放量について検討を行った。

3 週齢の C57B6J マウス耳介から軟骨細胞を分離・培養した。25% TCP 含有ゼラチン (PI5) 多孔体に b-FGF を徐放化する為に、0、10、100、500、1000、2000 µg/cm³ 含浸させた。この足場 (n=5) に 1x10⁷ 個細胞/cm³ を播種し、同系マウスの皮下に移植した。移植後 2、4、6 週で摘出し、移植片の重さ、DNA 量、蛋白定量、組織学的検討、移植片内のマクロファージ数カウントを行った。

実験

家兔耳介軟骨細胞を継代培養し十分量の細胞を確保して、再生軟骨 1 cm³ あたり 106 ~ 107 個の細胞をゲル状にして食道壁に注入し、軟骨再生ができるかを組織学的に確認する。また、均一な厚さの軟骨を再生するために、食道壁への軟骨細胞の注入法について検討する。移植後 4 週、8 週で軟骨細胞を注入した食道を摘出して、組織学的検討 (H&E 染色、SafraninO 染色、ToluidineBlue 染色) を行う。また、再生軟骨内のグリコサミノグリカン定量し、軟骨基質量を測定する。さらにヤング率を計測して、再生軟骨の物理学的特性について検討する。食道壁に軟骨再生ができない場合は、頸部の筋肉内に軟骨が再生されることが確認されているので、気管近傍の筋肉内

に軟骨を再生させて実験を進める。

4. 研究成果

実験

- (1) b-FGF 徐放量：各々の b-FGF 徐放量で、移植片重量が規定され、2、4、6週での重量の変化に有意差は認められなかった。
- (2) DNA 量：b-FGF を徐放すると、移植後2週で DNA 量がピークとなった
- (3) マクロファージ数：それぞれの組織切片内で、ほぼ半数の細胞がマクロファージであった
- (4) 蛋白定量：コラゲナーゼタイプ・グリコサミノグリカンは、b-FGF 徐放量が $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上で4、6週で有意に上昇した。
- (5) 組織所見：移植4週後、 $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の徐放で移植片内部の軟骨基質を確認した。

以上より、移植片の内部に軟骨が再生される場合は、移植2週後で DNA 量が増加し、 $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の b-FGF をゼラチン (PI5) で徐放化する必要がある。

軟骨を再生する過程で、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF) の、徐放製剤が有用であることが確認された。さらに、b-FGF の徐放製剤を用いた軟骨再生課程について検討した。

b-FGF 徐放による軟骨再生では、2週目までに組織内の細胞数を増加させ、軟骨基質産生とともに DNA 量が低下していた。b-FGF の投与量は、マクロファージの遊走総数に影響を与えにくいものと考えられた。

実験

気管と接する食道前壁に軟骨プレートを再生し、気管への移植する気道再建術が可能であるか検討した。

5週齢の家兎から耳介軟骨を採取し、軟骨細胞を分離した。-TCP 含有ゼラチン (PI5) 多孔体に塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF) $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ を含浸させ徐放化し、分離直後の軟骨細胞 (10×10^6 個/ cm^3) を播種した。この移植片を頸部気管の背側にある食道前壁に移植し、軟骨プレートを再生させた。移植4週後、頸部気管膜背側を部分切除し、軟骨再生プレートを、気管部分切除した切開孔に縫合し気道再建を行った。

5羽の気道再建を行った。b-FGF を徐放化することは、食道前壁に軟骨を再生する上で有用であった。食道前壁軟骨再生プレートによる気道再建術は、実現可能な術式であった。

食道前壁に軟骨プレートを再生させることが可能であり、解剖学的にこの再生軟骨プレートを頸部気管に移植する術式が実施可能であった。この再生軟骨プレートの作成法をさらに低侵襲化する

ことで、低侵襲術式が開発されるものと考ええる。

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0件)

[学会発表](計4件)

1. Makoto Komura, Keisuke Suzuki, Ryouyuke Satake, Tetsuro Kodaka, Kan Terawaki, Hiroaki Komuro, Tadashi Iwanaka
Tracheoplasty with cartilage engineered outside the esophagus PAPS2014 Banff, Canada 2014.5.25-29
2. 古村 眞, 古村浩子, 大谷裕之, 石丸哲也, 小西健一郎, 岩中 督, 星 和人, 高戸 毅, 田畑泰彦 気管狭窄症に対する低侵襲術式開発のための食道壁軟骨再生の為の研究 第13回日本再生医療学会総会 京都 2014.3.4-6
3. 古村 眞, 古村浩子, 大谷裕之, 星 和人, 高戸 毅, 田畑泰彦, 岩中 督 塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF) の徐放化による軟骨再生過程の検討 第13回日本再生医療学会総会 京都 2014.3.4-6
4. 古村浩子, 大谷裕之, 古村 眞, 小室広昭, 田畑泰彦, 岩中 督 ゼラチン多孔体による軟骨再生の為の塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF) 徐放量の検討 第12回日本再生医療学会総会 横浜 2013.3.21-23

[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：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古村 眞 (KOMURA, Makoto)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：10422289

(2) 研究分担者

田畑 泰彦 (TABATA, Yasuhiko)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：50211371

岩中 督 (IWANAKA, Tadashi)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：90193755

星 和人
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30344451

(3) 連携研究者

()

研究者番号：