

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591881

研究課題名(和文) 気管細胞外マトリックスと自己骨髄幹細胞を用いた異種移植気道グラフトの開発と応用

研究課題名(英文) Development of air way xenotransplant graft with extracellular matrix and cytokine

研究代表者

呉 哲彦(GO, TETSUHIKO)

香川大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50313656

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)：ブタ気管を用いて新しい気道修復材料の開発を行った。ブタ気管を脱細胞化し細胞外マトリックス(ECM)を作製した。このECMの非抗原性は確認されており、これをパッチ状に用いてイヌ頸部気管に作製した気道欠損部を補修した。ECMグラフトは免疫抑制剤を用いずとも異種宿主(イヌ)に生着、欠損部位は安全に修復され臨床応用への可能性が示唆された。一方、erythropoietin, G-CSFのサイトカインを用いてグラフトの上皮化促進を図るも有意な効果は見られず、上皮化を促進する手法の開発が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the novel tissue material for airway repair. Pig trachea was decellularised by detergent - enzymatic method treatment into extracellular matrix (ECM) which was confirmed non-antigenicity. Patch material made from this ECM was applied as xenotransplant tissue graft to repair air way defect made on dog's cervical trachea. ECM patch graft derived from pig was incorporated in heterologous host of dog without immunosuppression and air way defect was restored successfully. On the other hand, applying cytokines such as erythropoietin, G-CSF did not improve epithelialization on the ECM graft, which needs to be investigated further.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生医学 気道再建 異種移植 人工材料

1. 研究開始当初の背景

呼吸器系手術において生じる気管、気管支レベルでの気道欠損は治療が困難であり、結果として生命の危機を引き起こしかねないため、欠損部または過切除範囲を補填しこれを可能にする医療材料、技術の開発がなされてきたが未だ十分とは言えない。

我々はこれまで気道修復の手法として気管軟骨の再生や誘導 (Igai H, Yokomise H, et al. ASAIO J 2008, Igai H, Yokomise H, et al. JTCVS 2007) を報告し、研究代表者は Detergent enzyme method (DEM) により作製された気管細胞外マトリックス (Conconi MT, et al. Transpl Int 2005) が抗原性を有さずかつ臨床応用の可能性 (柔軟性、気密性、組織適合性に優れ、十分な強度をもつ) があることを示し (Jungebluth P, Go T, et al. JTCVS 2009)、これに再生医工学の手法を用いて作製した人工気管は大動物への同種移植が可能であることを証明した (Go T, Jungebluth P, Macchiaini P, et al. JTCVS 2010)。これらの研究結果、経験をもとにこの非抗原性の細胞外マトリックスに注目し、移植のみではなく一般気道、呼吸器外科手術への応用、つまりは気道系手術における補填、修復に利用しようと考えた。なお且つドナー不足の懸念に対応し、免疫抑制剤を用いない異種移植グラフトの開発を考えたと。

また、幹細胞反応に関する micro niche の概念に代表される、種々のサイトカインとの反応により細胞分化ならびに血管新生が促進され創傷治癒が促進される現象 (Bader A, et al. Rejuvenation Res 2010) に着目し、サイトカインによる気道上皮の再生促進が行えないかと考えた。

2. 研究の目的

外傷や手術により生じる気道欠損を補修、補填する技術、材料の開発は未だ十分とは言えない。ブタ気管より作製した細胞外マトリックス (ECM) が非抗原性であることは記述

の通りであるが、本研究の目的は、このマトリックスを異種宿主 (イヌ) に移植し数種のサイトカインを用いて宿主への生着ならびに気道の上皮化を計り、臨床で遭遇する中枢気道欠損部の治療に応用し得る気道再建の新しい治療法を開発することである。

3. 研究の方法

(1) 細胞外マトリックスの作製

採取したブタ気管を DEM 法 (Conconi MT, et al. Transpl Int 2005;18:727-734) にもとづいて 4% sodium deoxycholate で 4 時間 ならびに DNase (1M NaCl, 2000KU DNase) を用いた 3 時間の灌流にて処理し、さらに 1 日の精製水内での保存の計 2 日を脱細胞化処理の 1 サイクルとした。この DEM 17 サイクルにて脱細胞されたブタ由来の気管細胞外マトリックス (ECM) を作製する。このマトリックスの非抗原性については検証済みであり、ブタの native trachea と比べその物理的特性、強度についても遜色ないことが証明されている。さらにその細胞誘導能も評価されている (Jungebluth P, Go T, et al. JTCVS 2009)。

(2) ECM の異種異所移植による拒絶反応の検討

全身麻酔下にイヌ背部皮下脂肪下に DEM 法で作成したブタ ECM 1cm × 2cm を移植埋没、縫着する。この後、継時的に移植されたマトリックスの一部を採取し組織、病理学的に検討し拒絶反応について評価する。

(3) ECM の異種同所移植

(a) ECM のみの移植

全身麻酔下にイヌ頸部気管軟骨部に 1cm × 2cm の欠損部を作製し同マトリックス単体を縫着し気管欠損部を修復した。経時的に同移植マトリックスを気管支鏡にて観察、移植グラフト (ECM) の状態を観察した。適時宿主 (イヌ) を犠牲死させ組織学的にマトリッ

クス上の反応、変化（拒絶反応、粘膜再生など）を評価した。いずれの移植後期間においても免疫抑制剤は用いなかった。

(b) ECM とサイトカインの併用によるマトリックス上皮化の促進

erythropoietin による上皮化の促進

イヌ頸部気管軟骨部に 1cm × 2cm の気道欠損を作製し気管欠損部を ECM にて移植修復した。さらに移植部周囲組織に erythropoietin 5000 IU を追加注入し、移植後 erythropoietin (100 IU/kg) の皮下注を 2 日毎 2 週間継続した。経時的にグラフトを気管支鏡にて観察し宿主の反応、マトリックス上の上皮化を検討した。適時イヌを犠牲氏させ移植グラフトの組織学的形態と反応、さらには再生上皮についても同様に検討した。

G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) による上皮化の検討

G-CSF による骨髄からの幹細胞の動因を期待し、また組織修復と血管新生の促進を図る (Tabata Y, Acta Biomaterial 2011) ことを目的に、ECM の異種同所移植に際し併用するサイトカインを G-CSF に変更しグラフトの状態を検討した。イヌ頸部気管軟骨部に 1cm × 2cm の気道欠損を作製し気管欠損部を ECM にて移植修復し、移植後 G-CSF (10 μg/kg) の皮下注を 2 日毎 2 週間継続した。尚、いずれの移植後期間においても免疫抑制剤は用いなかった。

4. 研究成果

(1) 細胞外マトリックス (ECM) の作製

DEM 法によるブタ気管の処理により長さ 6cm の細胞外マトリックスが作成された (図 1a)

走査型電子顕微鏡による確認では同マトリックスにコラーゲン繊維は残存するものの、有意な細胞の存在は認めなかった (図 1b)。記述 (Jungebluth P, Go T, et al. JTCVS

2009) の実験同様の ECM が得られており実験グラフトとして有効であった。



図 1a

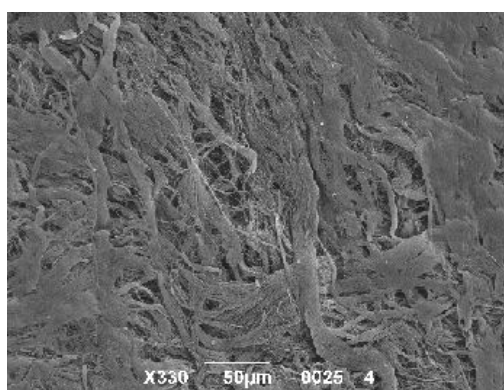


図 1b

(2) ECM の異種異所移植による拒絶反応の検討

ブタ ECM 1cm × 2cm をイヌ背部皮下脂肪下に移植埋没、縫着した。これを 4 週後に移植された ECM を取り出し評価した。肉眼的にもマトリックスはほぼ移植時の状態で存在しており、HE 染色による評価では、炎症細胞のマトリックス周囲への浸潤は認めるが、マトリックスの融解、壊死などの拒絶反応は観察されず (図 2)。同マトリックスが異種宿主においても生体内にて存在可能であることが確認された。

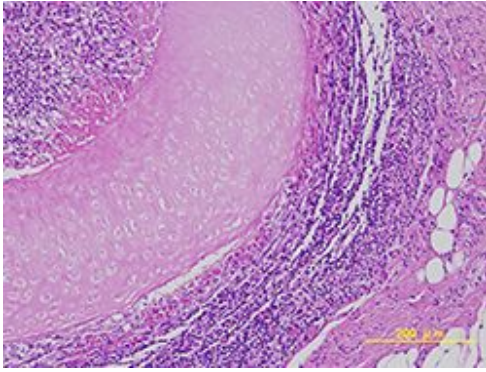


図 2

(3) ECM の異種同所移植

イヌ頸部気管軟骨部に 1cm × 2cm の欠損部を作製し、これを覆うように ECM パッチを逢着した (図 3a, b)。



図 3a

図 3b

術後 1 か月の気管支鏡写真ではグラフトは頸部気管に生着し、明らかな狭窄は認めなかった (図 4a)。移植後 3 か月のグラフトの評価ではグラフト表面には軽度の発赤が認められるのみで気管内腔も保たれていた (図 4b)。



図 4a



図 4b

半年後の評価ではグラフトは拒絶反応なく存在し、HE 染色による組織評価では気道上皮の再生が軽度ながら認められた (図 5a, b)。



図 5a

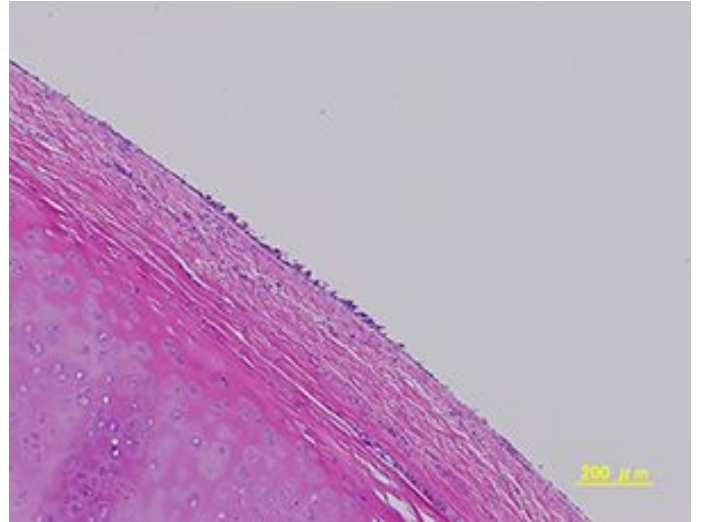


図 5b

このことから ECM は気道欠損部の修復材料として応用可能であることが示唆された。そこで気道上皮化を促進させるために、ECM の移植に erythropoietin、G-CSF を併用し宿主へ投与した。6 か月後の評価では ECM グラフトは宿主へ生着し気管内腔は狭窄なく開存しており、グラフト表面にも粘膜様の変化を認めた (図 6a)。



図 6a

HE 染色による評価ではサイトカインを用いない ECM 単独移植と比べて、いずれのサイ

トカインによってもグラフト上の上皮化の促進は確認されなかった(図 6b)。

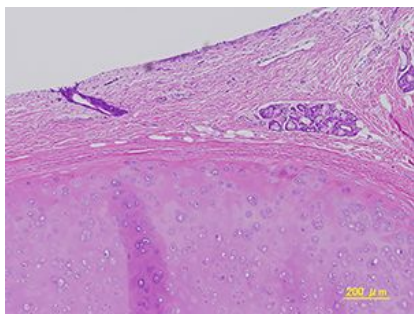


図 6b

以上のことより DEM 法により作成された ECM は気道修復の材料になることが示唆された。また異種移植においても ECM グラフトは免疫抑制剤の投与なく生着しており臨床への応用が期待されると考える。当初予定していた自己骨髄幹細胞からの気管軟骨誘導はグラフトの気管軟骨の長期存在が確認されたこと、強度が問題なかったことより施行しなかった。今後はグラフト上皮化の促進が課題であり、自己骨髄幹細胞を利用して同上皮化の促進が可能かどうかを検討する予定である。

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 1 件)

呉 哲彦、脱細胞化による気管 ECM の気道補填材料及び異種移植材料としての可能性について、
第 30 回日本呼吸外科学会総会、
2013 年 5 月 10 日、名古屋「名古屋国際会議場」

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

呉 哲彦 (GO TETSUHIKO)
香川大学医学部・附属病院・講師
研究者番号：50313656

(2) 研究分担者

松浦 奈都美 (MATSUURA NATSUMI)
香川大学医学部・附属病院・助教
研究者番号：20572853

笠井 由隆 (KASAI YOSHITAKA)
香川大学医学部・附属病院・助教
研究者番号：40610085

横見瀬 裕保 (YOKOMISE HIROYASU)
香川大学医学部・教授
研究者番号：80231728

(3) 連携研究者

()

研究者番号：