

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462707

研究課題名(和文)脱細胞化した気管・気管支を足場とした気管・気管支再生に関する研究

研究課題名(英文)Evaluation of the in vivo re-cellularization of the decellularized trachea in a rat model of orthotopic tracheal transplantation

研究代表者

臼井 規朗 (Usui, Noriaki)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・その他部局等・小児外科主任部長

研究者番号：30273626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：気管・気管支を脱細胞化した足場を生体内に同所性移植して、生体内でどのように再細胞化されるのかを検討した。9週齢オスのSDラットの気管を脱細胞化して足場とし、組織学的評価・力学的評価ののち、SDラットに同所性に移植した(n=9)。その後気管支鏡検査を行い、4週間後に犠死させ、気管の組織学的検討を行った。

脱細胞化した気管では細胞成分は完全に除去されていた。足場の強度は正常気管と比べて1/6程度に減少していた。同所性移植を行った9匹の4週後の生存率は78%(7/9)であった。術後1カ月の組織学的所見として、線毛を伴う円柱上皮は吻合部を介して足場内に再生するが、軟骨細胞の再生は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：Aim: We investigated the in vivo re-cellularization of the decellularized trachea.

Materials & Methods: Nine tracheas of adult Sprague-Dawley rats were harvested and decellularized. After histological and mechanical examination of these scaffolds, the decellularized tracheas were implanted orthotopically (n=9). After 4 weeks of implantation, endoscopic evaluation of the tracheas was performed, followed by resection and histological evaluation.

Results: Complete removal of cell components after 9 cycles of decellularization was verified. The elastic intensity of the decellularized trachea corresponded to one sixth of the native trachea. Of the nine rats which received decellularized tracheal transplantation, two rats died due to graft obstruction. Consequently, survival rate after 4 weeks of implantation was 78%. Histological examination revealed that ciliated columnar epithelium was regenerated into the luminal surface of the scaffold, although a cartilage regeneration was not observed.

研究分野：医歯薬学

キーワード：気管軟骨 再生医療 脱細胞化

## 1. 研究開始当初の背景

広範囲型先天性気管狭窄症や気管無形成など、小児における気管・気管支の先天異常は時に極めて重篤な呼吸困難を呈し、しばしば死に至る。病変が広範囲に及ぶこれらの先天性疾患に対して、「気管移植」が研究されてきたにもかかわらず、気管の解剖学的な特性や免疫学的な特性の問題から、いまだ臨床応用されるに至っていない。そこで、小児呼吸器外科領域においても気管・気管支に関する再生医療の発展が期待されてきた。

成人における気管の再生医療に関する分野では、非分解性素材や脱細胞化したヒト気管を足場とし、軟骨細胞や上皮細胞を播種して再生した気管を用いた臨床応用例がすでに報告されている。しかし、小児における気管の再生は、必要とされる範囲が非常に長く、患児の成長に伴って径や長さが成長する必要があるので、生体非分解性素材の足場を利用せずに広範囲の気管を再生させることが要件と考えられてきた。近年、小児においても脱細胞化したヒト気管に自己の間葉系幹細胞を播種して再生した気管を用い、気管のほぼ全長を置換した症例の2年生存例が報告され、注目されている。脱細胞化 (decellularization) は、生体の器官を構成する細胞外マトリックス (ECM) をそのままの形で保存しながら、免疫原性を有する細胞成分を完全に除去する技術であり、ECM が組織特異性を維持した形で保存されているため、生体に非常に近い培養環境を細胞の足場として提供できる点で再生医療における応用範囲が広いと考えられる。2008年にOttらは実質臓器である心臓そのものを脱細胞化後に細胞播種して再細胞化し、拍動する心臓を再生することに成功した。2年後には全肺についても同様に脱細胞化後に再細胞化を行い、臓器として機能する肺の再生も可能であることを示した。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、以上の研究動向を踏まえて、実験動物において気管・気管支を脱細胞化し、この足場を生体内に同所性移植することによって、生体内でどのように再細胞化されるのかについての検証を行った。

## 3. 研究の方法

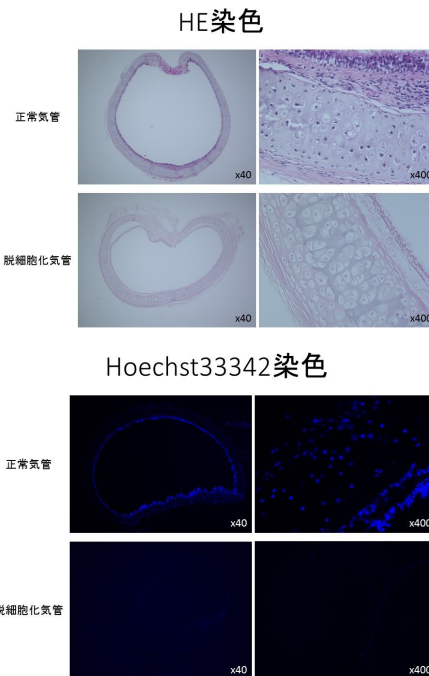
9週齢オスのSDラットの気管を摘出し、4% sodium deoxycholateとDNase I solutionを用いて脱細胞化を行った。脱細胞化プロトコールを以下に示す。

		正常気管	脱細胞化気管
<1 cycle>			
<b>Solution</b>	<b>Incubation period</b>		
4% Sodium deoxycholate	2h		
Ultrapure water	10min × 2		
DNase I solution	3h		
Ultrapure water	10min × 2		
<b>Total 9 cycles</b>			
<small>Jungebluth et al. Nature Protocols 2014</small>			

得られた足場について組織学的評価 (HE染色・Hoechst33342染色による細胞成分除去の評価、Safranin-O染色による軟骨基質グリコサミノグリカンの評価) を行った後に、レオメーターを用いて同週齢の正常気管と管腔径保持力の比較実験を行った。次いで、8週齢オスのSDラットにこの脱細胞化気管を同所性に移植した (n=9)。その後、気管支鏡検査を行い、移植4週間後に犠死させ、気管を摘出し、組織学的検討を行った。

## 4. 研究成果

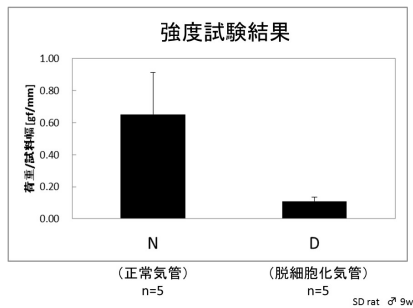
HE染色およびHoechst33342染色の結果から、作成した脱細胞化気管において細胞成分が完全に除去されていることを確認した。



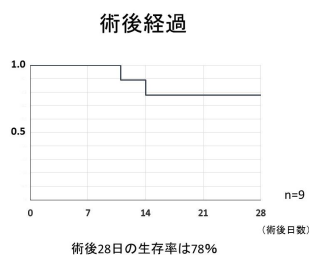
Safranin-O染色では、軟骨基質グリコサミノグリカンが温存されていることを確認した。



一方、足場の強度試験では、脱細胞化気管の管腔径保持力は、正常気管と比べて 1/6 程度に減少していた。

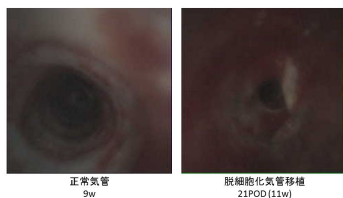


同所性移植を行った 9 匹のうち 2 匹が経過観察中に死亡し、4 週後の生存率は 78% (7/9) であった。



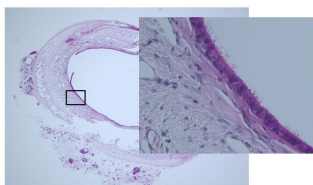
気管支鏡所見では、移植片内腔の狭小化を認めた。

気管支鏡検査

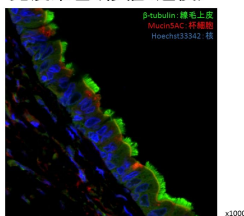


移植後の HE 染色では、足場内腔に線毛を伴う上皮細胞の再生を認め、免疫組織化学染色では、足場内腔に線毛上皮細胞のマーカーである  $\alpha$ -tubulin および杯細胞のマーカーである Mucin5AC 陽性の細胞が認められた。

HE染色 (移植4週後)



免疫染色 (移植4週後)



一方で、軟骨細胞の再細胞化は認められなかった。以上より、ラット気管を脱細胞化する

と強度は正常気管の 1/6 程度まで低下した。子の足場を生体内に同所性移植したところ、術後 1 カ月の生存率は 78% であった。術後 1 カ月の組織学的所見として、線毛を伴う円柱上皮は吻合部を介して足場内に再生するが、軟骨細胞の再生は得られなかった。脱細胞化法の変更や、再細胞化を促す因子の添加等の方法が必要である可能性が示唆された。

## 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 1 件)

1. Satoshi Umeda, Shigeru Miyagawa, Satsuki Fukushima, Noriko Oda, Atsuhiko Saito, Yoshiki Sakai, Yoshiki Sawa, Hiroomi Okuyama. Enhanced Pulmonary Vascular and Alveolar Development via Prenatal Administration of a Slow-release Synthetic Prostacyclin Agonist in Rat Fetal Lung Hypoplasia. PLoS One. 11(8):e0161334. 2016 Aug 16 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 梅田 聡他、脱細胞化気管の生体内における再細胞化の検討 第 15 回日本再生医療学会総会 2016. 3 大阪
2. 梅田 聡他、ラット同所性気管移植モデルを用いた脱細胞化気管の生体内における再細胞化の検討 第 53 回日本小児外科学会学術集会 2016. 5 福岡

〔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

臼井 規朗 (USUI Noriaki)  
大阪母子医療センター・小児外科・主任部長  
研究者番号： 3 0 2 7 3 6 2 6

#### (2) 研究分担者

梅田 聡 (UMEDA Satoshi)  
大阪大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号： 6 0 7 1 5 1 7 6

奥山宏臣 (OKUYAMA Hiroomi)  
大阪大学・医学系研究科小児外科・教授  
研究者番号： 3 0 2 5 2 6 7 0

上野豪久 (UENO Takehisa)  
大阪大学・医学系研究科小児外科・講師  
研究者番号： 1 9 4 5 6 9 5 7

田附裕子 (TAZUKE Yuko)  
大阪大学・医学系研究科小児外科・准教授  
研究者番号： 1 0 3 9 7 6 9 8