

令和元年9月11日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10819

研究課題名(和文) 機能的な気管軟骨の再生に関する研究

研究課題名(英文) regeneration of the functional tracheal cartilage

研究代表者

野本 幸男 (Yukio, Nomoto)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：70508811

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)：軟骨自体が骨格として機能しうる気管軟骨の再生方法を探索すべく、本研究ではウサギを用いて肋軟骨から得た軟骨細胞、軟骨膜細胞を利用し気管軟骨の再生を図った。肋軟骨採取の際には気胸予防を意図して壁側胸膜側の軟骨を一部残しながら摘出した。軟骨組織及び軟骨膜組織それぞれを細切し、酵素処理を行い軟骨細胞及び軟骨膜細胞を採取した。Ⅰ型コラーゲン溶液に軟骨細胞及び軟骨膜細胞を懸濁し臨床応用されている人工気管(コラーゲンスポンジ及びポリプロピレンの複合材料)へ軟骨細胞及び軟骨膜細胞を付加し、さらにゲル化させた。自家移植を意図して、作製した培養気管を頸部気管欠損部に縫合し再建を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織再生誘導型人工気管は、成人への臨床応用にて良好な結果を得ているが、再建後生涯にわたりポリプロピレン製骨格が残存することから、小児に対しては使用されていない。非吸収性人工材料を排し、軟骨自体が骨格として機能しうる気管軟骨の再生が可能となれば、現状では治療が難しい小児の気管狭窄等に対して治療に寄与し得る。自己の細胞を利用した再生治療を志向した場合、気管軟骨と同じ硝子軟骨からなる肋軟骨は採取が比較的容易であり、機能障害、合併症の観点からもcell sourceとして有利と考えらる。軟骨膜の特性を理解し、軟骨とは区別して組織再生に利用することは、軟骨再生の新たなアプローチになり得る。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to regenerate tracheal cartilage with a function as frame using chondrocytes and perichondrial cells. Rabbits were used as experimental animals. Under general anesthesia, outer portion of costal cartilage was resected, and inner portion of the cartilage was left to avoid pneumothorax. Chondrocytes and perichondrial cells were collected by treating minced cartilage and perichondrium with an enzyme. The chondrocytes and the perichondrial cells were suspended in solution containing type 1 collagen. The suspension with the chondrocytes was injected into collagenous sponge of artificial trachea that had been used in clinical, and the suspension with the perichondrial cells was applied to the surface of the artificial trachea. The suspensions were gelled in an incubator. The bioengineered trachea with the cells was autografted to the defect of the trachea.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：気管再生 気管軟骨 軟骨細胞 軟骨膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

コラーゲンスポンジの足場とポリプロピレン製骨格からなる組織再生誘導型人工気管は、これまで甲状腺癌気管浸潤例や気管狭窄症例へ臨床応用され良好な結果を得ている。これまで経験した症例はいずれも成人例であり、再建後生涯にわたり人工材料が当初の形状を保持したまま残存することから、成長期にある小児に対して本人工気管を用いた気管再建は行われていないのが現状である。軟骨自体が骨格として機能しうる気管軟骨の再生が可能となれば、成人例への応用はもちろんであるが、治療に難渋することが多い小児の気管狭窄症例に対する治療の一選択肢となり得ると期待される。

## 2. 研究の目的

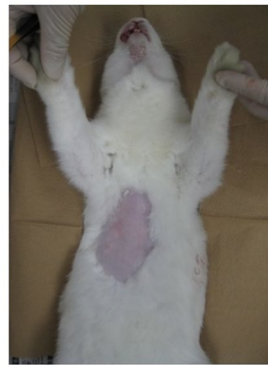
気管軟骨を組織学的に観察すると、硝子軟骨とそれを包むように線維性の軟骨膜組織が確認できる。軟骨組織には血管がなく、軟骨が恒常性を保つ上で軟骨膜が重要な役割を担っている。また軟骨膜には軟骨芽細胞、さらには軟骨幹細胞が局在するとの報告がある。両者を区別し利用することで、本来の気管軟骨に近い機能的な軟骨の再生に寄与できる可能性がある。

小児の気管再建にも適応しうる新規培養気管の開発を最終的な目標に掲げ、本課題では肋軟骨から得た軟骨細胞、軟骨膜細胞を用いた効率的な気管軟骨の再生に関して研究を行なった。

## 3. 研究の方法

### 軟骨組織の採取

培養気管作製に必要な軟骨細胞及び軟骨膜細胞は、自家移植を意図して気管再建を行う同一のウサギから得ることとした。気管軟骨は組織学的には硝子軟骨からなる。気管の他に鼻中隔軟骨、甲状軟骨、輪状軟骨、肋軟骨、関節軟骨なども硝子軟骨からなる。このなかで採取が容易で合併症のリスクが低く、十分な組織量を採取できる部位として肋軟骨が最適と考えられた。全身麻酔下に胸部を広く除毛し、下位の肋軟骨を触診にて確認し、肋軟骨に沿って皮膚及び皮下組織を切開し肋軟骨を露出させた。当初は肋軟骨を全周性に剥離して切断していたが、内側は壁側胸膜に近く、気胸に至ることがあったため、壁側胸膜側の軟骨をわずかに残しながら軟骨組織を採取する方法に変更した。



胸部を除毛



下位肋軟骨を露出



摘出した肋軟骨

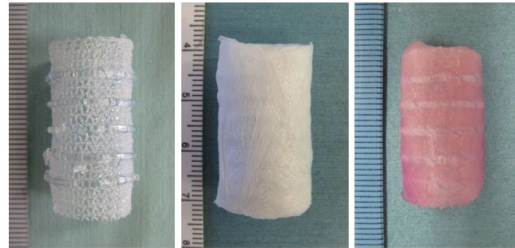
### 軟骨細胞及び軟骨膜細胞の採取

摘出した組織を洗浄し、軟骨組織から軟骨膜を分離した。分離は比較的容易であった。軟骨組織及び軟骨膜組織それぞれを細切り、2型コラーゲナーゼ処理を行い、セルストレーナーを用いて軟骨細胞及び軟骨膜細胞を採取した。軟骨細胞と比較すると、採取できた軟骨膜細胞はかなり少なかった。採取した軟骨細胞及び軟骨膜細胞はそれぞれを培養皿に移しFBS添加DMEMを用いて培養した。軟骨細胞は安定して増殖し、継代培養にて必要な細胞数が確保できた。一方軟骨膜

細胞は増殖が乏しく、十分量の細胞獲得には至らなかった。細胞数確保のため、軟骨膜を細切しその組織片を培養皿に貼り付けて組織片培養を行なったが、十分量の細胞数確保には至らなかった。

### 細胞を付加した培養気管の作製

臨床応用されている組織再生誘導型人工気管と同等で、ウサギ気管に適合するようサイズを調整したものを用いた。骨格は、ポリプロピレンメッシュを円筒型に加工し、その補強としてポリプロピレンワイヤーをリング状に巻きつけて固定し作製した。骨格の内面及び外側面に細胞の足場材料となるコラーゲンスポンジを付加した。氷冷し液状を呈している 1 型コラーゲン溶液に、5 倍濃度 DMEM、緩衝液を添加し、さらにトリプシン処理を行った軟骨細胞及び軟骨膜細胞を懸濁し細胞浮遊液を作製した。気管軟骨の層構造再現を意図して、皮内注射用シリンジ及び注射針を用い軟骨細胞懸濁液をコラーゲンスポンジの内部に注入し、さらに内側及び外側表面に軟骨膜細胞懸濁液を塗布し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内に静置しゲル化させた。



(左)骨格 (中央)コラーゲンスポンジ付加後  
(右)細胞懸濁液の付加及びゲル化後

### 培養気管による気管再建

自家移植を意図して、肋軟骨を採取した同一のウサギに対し、培養気管による気管再建を行なった。全身麻酔下に頸部正中を切開し前頸筋を正中で分離し頸部気管を露出させた。頸部気管前面を15×5mm程度の大きさを切除し気管欠損部を作製した。半円筒状の培養気管を用意し、欠損部を覆うように留置し、培養気管と気管をair-tightに縫合し再建した。培養気管を覆うように前頸筋を戻し縫合し、さらに皮膚を縫合した。術後経過観察期間に窒息、衰弱等により死亡したため、組織的な評価には至らなかった。

## 4. 研究成果

気管軟骨は組織学的には硝子軟骨からなる。気管軟骨の他にも鼻中隔軟骨、甲状軟骨、輪状軟骨、肋軟骨、関節軟骨などは硝子軟骨からなる。自己の細胞を利用した再生治療を志向した場合、気管軟骨と同じ硝子軟骨からなる肋軟骨はその他と比較し採取は容易であり、採取操作による機能障害、合併症等の観点からもcell sourceとして有利であると考えられた。

本研究では まずウサギ肋軟骨を採取し、軟骨細胞及び軟骨膜細胞の収集及び培養を行った。軟骨細胞は採取した肋軟骨から十分細胞が収集でき、継代培養も問題はなかった。一方軟骨膜細胞は、コラゲナーゼ処理後に収集できた細胞数は少なく、さらに継代培養での増殖が安定せず、十分量の細胞を得るには至らなかった。軟骨膜細胞の安定した獲得にはさらなる工夫が必要と考えられた。軟骨膜は軟骨組織を被覆し軟骨組織の恒常性維持に大いに寄与しているとともに、骨芽細胞、さらには軟骨幹細胞を含有するとされている。軟骨膜の特性を理解し、軟骨と区別して組織再生に利用することは軟骨再生の新たなアプローチとなり得ると期待される。

気管は内腔側から気管上皮層、上皮下層、気管軟骨の順で層構造を成している。さらに軟骨は内腔側から軟骨膜、軟骨、軟骨膜の順に層構造を成している。層構造を意図して、1型コラーゲンを介して組織再生誘導型人工気管のスポンジ内部に軟骨細胞を播種し、人工気管の表面に軟骨

膜細胞を播種した。比較的簡便な手法であり、層構造の構築に寄与するかどうかは今後の評価が必要と考える。

作製した培養気管は全身麻酔下にウサギの気管欠損部に自家移植した。頸部気管前面の部分切除により気管壁欠損部を作製し、反円筒形にした培養気管を欠損部にあてがい気管と縫合した。手術直後の回復は良好であったが、観察期間中に気道狭窄が原因で死亡した個体があり、再建部に肉芽などが形成した可能性が考えられた。

本研究ではウサギ肋軟骨から得た軟骨細胞、軟骨膜細胞を利用し気管軟骨の再生を図った。肋軟骨から軟骨細胞は十分量が得られたが、軟骨膜細胞は十分量獲得には至らなかった。型コラーゲン溶液介し、層構造を意図して軟骨細胞及び軟骨膜細胞を組織再生誘導型人工気管に付加した。自家移植を意図して、作製した培養気管により頸部気管欠損部に縫合し再建が可能であった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。