

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20215

研究課題名(和文)持続的な成長因子シグナリングを可能にする人工気管の開発

研究課題名(英文) Fabrication of the artificial trachea which induces sustained growth factor signaling

研究代表者

中村 亮介 (Nakamura, Ryosuke)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：40736708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌浸潤などにより切除を余儀なくされた気管において、切除により生じた欠損領域を再建するための人工気管が当講座で開発され、臨床に使用されているが、人工気管の内腔が上皮に覆われるまでの長期間要することが課題であった。FGF-2に上皮再生促進効果があることから、本研究ではFGF-2を効果的に人工気管移植領域に供給できるように人工気管を改良することを目的として研究を行った。人工気管の主要な部品であるコラーゲンスポンジにヘパリンを結合させることで、FGF-2はコラーゲンスポンジに強く保持され、移植した場合に比較的長期間作用でき、上皮再生を促進できることを示唆する結果が本研究より得られた。

研究成果の概要(英文)：Our group developed an artificial trachea capable of inducing in situ tissue regeneration, and have clinically used the artificial trachea for reconstructing tracheal defects, which were generated by resecting regions suffering from stenosis or malignant tumors. Because FGF-2 reportedly promotes epithelial regeneration, we investigated a method for supplying FGF-2 to the reconstruction area effectively. Heparin-conjugation to collagen sponge, which is main component of the artificial trachea, delayed loss of FGF-2 from the collagen sponge. Implantation study suggested the heparin-conjugated collagen sponge retaining FGF-2 prolonged effects of FGF-2 on cells invading to the sponge, and promoted epithelial regeneration.

研究分野：医歯薬学

キーワード：気管 ヘパリン FGF-2 再生 線毛

1. 研究開始当初の背景

気管再建に関する研究は、1881年のGluckらによるイヌを用いた気管端々吻合実験に端を発する。その後、この手技は実臨床にも応用され、1968年にハーバードのGrilloらによって、6 cm以下の切除である場合には気管の端々吻合が可能であることが報告された。現在では、気管端々吻合が気管全周切除後の治療として気管外科における標準術式となっている。一方、広範な気管切除を行った症例ではこの端々吻合術の適応とならない。術後における縫合不全や縦隔炎などの重篤な合併症を引き起こす危険性があり、患者の苦しい頸部前屈姿勢などが必要であるといった問題もある。これらに対して、臨床で安全に行える術式の確立を目指し、気管をグラフトや人工物で再建しようとする試みが1940年代から進められてきたが、不十分な血管新生、上皮化の遅延、肉芽形成や離開、逸脱が問題となり、十分な成果は得られていない。

1997年以降、組織工学的手法を用いた各種組織の再生についての研究が進み、気管、食道、胃、小腸、声帯、輪状軟骨の再生に成功している。気管の再生に関しては、Nakamura、Shimizuらにより、コラーゲンスポンジを気管型に成型した自己組織再生型人工気管が開発されている。われわれのグループは倫理委員会の承認のもと、2施設で12例の臨床例を経験しているが、問題点として気管内腔面の完全な上皮化に約2ヶ月要したことが挙げられる。また、動物実験からは、移植したスポンジ上に再生される上皮組織は、上皮に被覆されたばかりの段階では扁平上皮であり、移植領域一面が線毛で覆われるまでには更なる長期間を要することがわかっている。

細胞の増殖や分化を刺激する成長因子(GF)をスキャフォールドに混合し、移植部位へ供給することが、上皮再生を促進するひとつの手段として挙げられる。しかし、GFは概して半減期が短く、持続的な作用が期待できない。当講座では、スキャフォールドに含有させた線維芽細胞成長因子(FGF-2)が、ラットにおける気管上皮再生を促進することを確認している。しかし、FGF-2の効果が短期的なものであったことを示唆するデータも得られた。

持続的なGF供給を可能にするためにGF徐放性を有するスキャフォールド開発についての研究が行われている。今まで徐放性のスキャフォールド開発のために用いられてきたものに、ヘパリンを結合させたスキャフォールドが挙げられる。ヘパリンや、その類似分子であるヘパラン硫酸鎖は多種多様なGFと結合することで、GFの拡散や酵素分解を防ぎ、細胞の活動を間接的に調節し得る。しかし、気管再生の研究においてヘパリンを結合させたスキャフォールドを利用した試みは他のグループからは報告されておらず、我々の

グループにおいて研究が始まったばかりである。

2. 研究の目的

我々は持続的なGF供給能を有するスキャフォールドを開発するために、ヘパリンをコラーゲンスポンジに結合させたスキャフォールド(ヘパリン結合スポンジ)を開発した。本研究では、ヘパリン結合スポンジにおけるFGF-2の保持性および徐放性について*in vitro*および*in vivo*で評価する。また、FGF2シグナルの下流で活性化されるextracellular-signal regulated kinase (Erk)のリン酸化を調べることで、実際に細胞への作用が持続するかについても調べる。そして、FGF2を含有させたヘパリン結合スポンジがラット気道上皮の再生に有効であるかを移植実験によって評価する。

3. 研究の方法

(1) ヘパリンを結合させたコラーゲンスポンジのFGF-2保持性および徐放性

ヘパリン溶液とコラーゲンスポンジをインキュベートすることでヘパリンをコラーゲンスポンジに結合させた後、FGF-2溶液に浸漬させてFGF-2を保持させた。スポンジを洗浄し、洗浄液中に流出したFGF-2をEnzyme-linked immunosorbent assayにより定量した。また、洗浄後のスポンジを固定し、FGF-2に対する一次抗体、および西洋ワサビペルオキシダーゼ標識二次抗体と反応させ、3,3'-diaminobenzidineと過酸化水素を用いて発色させることで、スポンジ内に残留したFGF-2を可視化した。

(2) 培養系における気管上皮組織形成促進作用の評価

気管に限らず、一般的に組織修復過程では、上皮組織が修復する過程において線維芽細胞などの間葉系の細胞が損傷領域に侵入して上皮細胞の足場をつくる必要があり、その足場上で上皮細胞が被覆される。これを*in vitro*で再現した実験系において、ヘパリンを結合させたコラーゲンスポンジの上皮組織形成促進性について評価した。具体的には、FGF-2を保持させたスポンジに気管間葉系細胞を播種し、その上部に薄いコラーゲンを調製した。その後、ゲル上に気管上皮細胞を播種し、培養系で気管上皮様組織を形成させた。タイトジャンクション構成分子であるzonula occludens-1 (ZO-1)と線毛細胞マーカーであるIV-チューブリンに対する免疫染色により、*in vitro*で形成された上皮組織の成熟化について評価した。

(3) 移植実験における Erk1/2 リン酸化細胞の免疫染色

ヘパリンを結合させた、あるいはさせないコラーゲンスポンジを移植実験に用いた。また、両スポンジについて、移植前に FGF-2 溶液に浸したものと浸さなかったものを用意した。

ラットの気管前壁に欠損を作製し、スポンジを欠損部に移植した。移植後数日から2週間以内に気管およびスポンジを摘出した。スポンジ内に含まれる FGF-2 をウェスタンブロッティングにより調べることで、生体内での FGF-2 保持性を評価した。また、移植領域の組織切片を作製し、FGF-2 により刺激されるシグナル伝達経路の中で代表的な (mitogen-activated protein kinase) MAPK 経路の構成分子である Erk1/2 のリン酸化について免疫染色で調べることで、FGF-2 シグナルの持続性に関する情報を得た。

(4) ヘパリンを結合させたコラーゲンスポンジの気管欠損への移植実験

(3) において記述したようにラットの気管前壁に欠損を作製した。ヘパリンを結合させた、あるいはさせないコラーゲンスポンジを FGF-2 溶液に浸し、ラット気管欠損へと移植した。

移植後2週目において移植領域の組織切片を作製し、上皮化および線毛形成について免疫染色により評価した。また、移植領域に再形成された上皮の線毛を蛍光標識コムギ胚アグルチニンによって染色した。ハイスピードカメラを用いて再生上皮における線毛の運動性を評価した。

4. 研究成果

(1) FGF-2 の保持性および徐放性の評価

ヘパリン (0-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を結合させたコラーゲンスポンジを FGF-2 溶液に浸漬した後、複数回洗浄を行った。ヘパリン 2, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を結合させたコラーゲンスポンジではヘパリンを結合させていないコラーゲンスポンジと比較して、2 回目以降の洗浄液中に流出された FGF-2 量が多かった。また、洗浄後のコラーゲンスポンジを FGF-2 に対する抗体を用いて免疫染色した結果、2-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のヘパリンを結合させたコラーゲンスポンジでは、ヘパリンを結合させないコラーゲンスポンジと比較して強い FGF-2 陽性染色が観察された。したがって、コラーゲンスポンジにヘパリンを結合させることにより FGF-2 の保持性が高まり、緩やかな FGF-2 徐放が行われると考えられた。

(2) 培養系における気管上皮組織形成促進作用の評価

ヘパリン 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を結合させたコラーゲンスポンジをヘパリン結合スポンジと呼び、更に実験を行った。

コラーゲンスポンジ、あるいはヘパリン結合スポンジに FGF-2 を保持させた後、スポンジ内に気管間葉系細胞を播種し、スポンジ上に気管上皮細胞を播種した共培養系で気管上皮様構造の形成を調べた。ヘパリンを結合させたスポンジでは、単なるコラーゲンスポンジに比べて気管上皮細胞は密に存在し、タイトジャンクション構成分子である ZO-1 の細胞間接合領域への局在化と線毛形成の進行が促進されていた (図1)。したがって、ヘパリンをコラーゲンスポンジに結合させることにより気管上皮の成熟化を早めることができる可能性が考えられた。

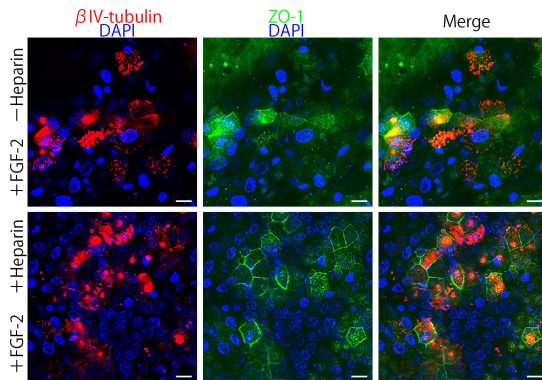


図1 ヘパリンを結合させたコラーゲンスポンジを用いて in vitro で再構成させた気管上皮組織

ヘパリンを結合させたコラーゲンスポンジあるいは結合させないコラーゲンスポンジを FGF-2 に含浸した後、スポンジ内で気管間葉系細胞を、スポンジ上で気管上皮細胞を培養し、気管上皮組織を再構成させた。IV-tubulin (赤) および ZO-1 (緑) の免疫染色および DAPI による核染色 (青) 像を示す。Bar: 10 μm 。が観察された。

(3) 気管欠損へ移植したヘパリン結合スポンジの FGF-2 保持性の評価

FGF-2 を含ませたコラーゲンスポンジあるいはヘパリン結合スポンジをラット気管欠損に移植した。移植後のスポンジ内の FGF-2 をウェスタンブロッティングで検出した結果、コラーゲンスポンジと比較してヘパリン結合スポンジで FGF-2 のバンドが太かった。ヘパリン結合スポンジは移植に用いた場合にも FGF-2 保持性を発揮することが示唆された。

(4) FGF-2 含有ヘパリン結合スポンジの移植領域およびその周辺における Erk1/2 リン酸化

FGF-2 により刺激されるシグナル伝達経路の代表的なものに MAPK シグナル経路が存在する。この経路の下流で機能するリン酸化 Erk1/2 について、スポンジ移植後に免疫染色により調べた。移植後 12 時間目の FGF-2 を含有させたコラーゲンスポンジ内において、大部分の細胞がリン酸化 Erk 1 / 2 陽性である様子が観察されたが、移植後 48 時間目においては、リン酸化 Erk1/2 陽性細胞はあまり見られなくなった(図 2)。

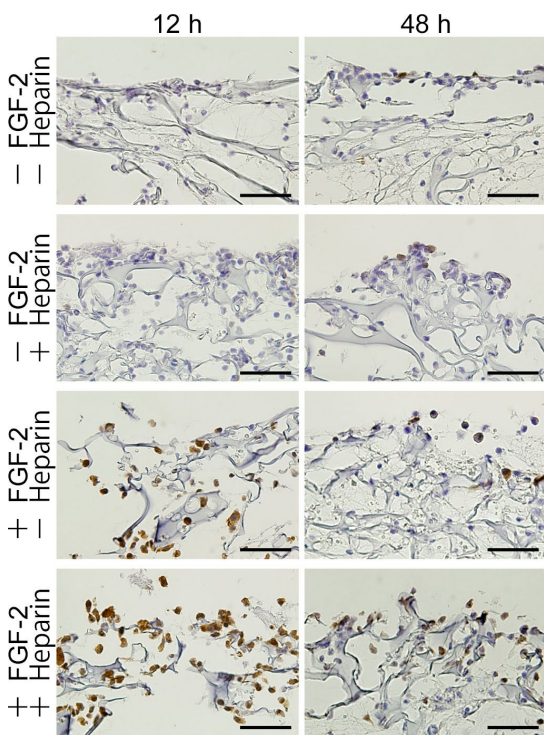


図2 スポンジ移植領域のリン酸化 Erk1/2 に対する免疫染色像
気管欠損への移植後 12、48 時間目のコラーゲンスポンジ、ヘパリン結合スポンジ、FGF-2 を含浸させたコラーゲンスポンジ、FGF-2 を含浸させたヘパリン結合スポンジのパラフィン包埋切片をリン酸化 Erk1/2 に対する抗体で免疫染色した。茶：リン酸化 Erk1/2。青：ヘマトキシリン染色。Bar: 50 μ m。

一方、FGF-2 を含有させたコラーゲンスポンジ内においては、移植後 48 時間目においても比較的多数のリン酸化 Erk1/2 陽性細胞が観察された。また、これらのスポンジを移植した後、移植領域から離れた気管上皮においてもリン酸化 Erk1/2 陽性細胞が観察され

たが、FGF-2 含有ヘパリン結合スポンジを用いた場合、FGF-2 含有コラーゲンスポンジと比較して、移植領域外の上皮におけるリン酸化 Erk1/2 陽性細胞はあまり観察されなかった(図 3)。したがって、ヘパリン結合コラーゲンスポンジを移植に用いることで、コラーゲンスポンジを移植した場合と比較して、移植領域内の細胞への FGF-2 供給を持続し、移植領域外への FGF-2 流出を抑制がされたと推察される。

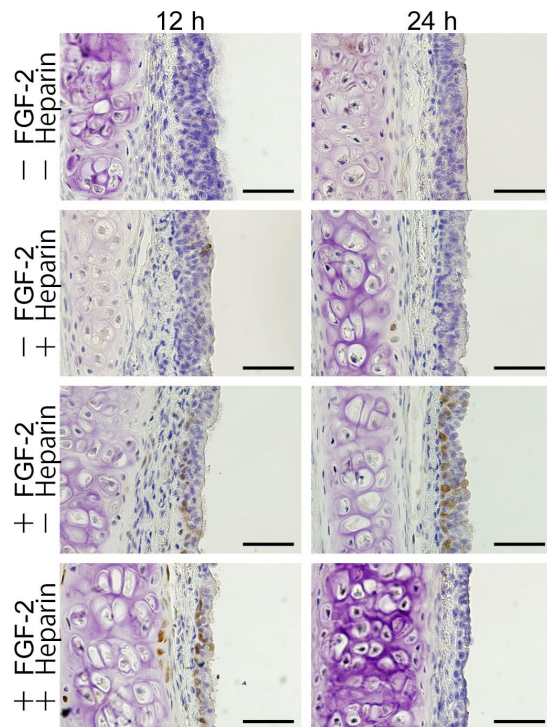


図3 スポンジ移植領域外のリン酸化 Erk1/2 に対する免疫染色像
コラーゲンスポンジ、ヘパリン結合スポンジ、FGF-2 を含浸させたコラーゲンスポンジ、FGF-2 を含浸させたヘパリン結合スポンジの移植後 12、24 時間目に気管を採取し、パラフィン包埋切片を作製した。移植領域外の組織をリン酸化 Erk1/2 に対する抗体で免疫染色した。茶：リン酸化 Erk1/2。青：ヘマトキシリン染色。Bar: 50 μ m。

4) 気管欠損へ移植したヘパリン結合スポンジの上皮再生促進作用の評価

FGF-2 を含ませたコラーゲンスポンジあるいはヘパリン結合スポンジの移植後 2 週目において、移植領域は中央まで上皮化されていたが、FGF-2 含有ヘパリン結合スポンジを移植した群では FGF-2 含有コラーゲンスポンジを移植した群と比較して多列線毛上皮に近い上皮が観察された。また、線毛運動の機能

として1秒あたりに線毛が波打つ回数(線毛運動周波数:CBF)を指標とした場合、FGF-2含有コラーゲンスポンジを移植した群で形成された上皮のほうが有意に高いCBFを示した。したがって、コラーゲンスポンジにヘパリンを結合させることで気管上皮再生を促進できることが示唆された。

該当なし

(4)研究協力者
該当なし

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)

Nakamura R, Omori K et al. Heparin cross-linked collagen sponge scaffolds improve functional regeneration of rat tracheal epithelium. Journal of Tissue Engineering and Regenerative medicine, 2017, Epub ahead of print. DOI: 10.1002/term.2204. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

中村亮介、大森孝一 他、ヘパリンを含有する気管再建材によるFGFシグナリングの時間的調節に関する研究、第15回日本再生医療学会総会、平成28年3月19日、大阪

中村亮介、大森孝一 他、FGF-2保持性を高めたコラーゲンスポンジによるラット気管上皮の再生、第67回日本気管食道科学会総会ならびに学術講演会、平成27年11月20日、福島

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 亮介(NAKAMURA, Ryosuke)
京都大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号: 40736708

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者