

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16910

研究課題名(和文)細胞及び液性因子の局在を調節するスキャフォールドによる気管複合組織の再生

研究課題名(英文) Regeneration of tracheal complex tissue using a scaffold which regulates distributions of cells and soluble factors

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：当講座で開発した人工気管は臨床において上皮および間質の再生を達成してきた。しかし、気管軟骨の再生は誘導できなかった。動物実験では自家軟骨細胞移植により、人工気管内に軟骨組織が再生されたが、上皮再生の遅延も起こった。本研究では気管軟骨様の形状および物性を有するスキャフォールドを用いて軟骨細胞を適切な位置へと配置し、他組織の形成を阻害する軟骨細胞由来因子の拡散を抑えるヘパリンを周囲に配置した移植材を調製し、軟骨と上皮組織の再生を両立することを試みた。この移植材をウサギ気管欠損へ移植したところ、欠損を覆うように円弧状に軟骨が形成されており、上皮再生も比較的早く観察され、当初の目的が概ね達成された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では気管再生医療における軟骨再生技術を発展させ得る知見が得られた。

これまで用いられてきた人工気管は、空気の通り道として重要な気管の筒状構造を十分に維持するためにポリプロピレンを用いてきた。ポリプロピレンは形状が固定されているために、小児には使用できず、先天奇形による気管狭窄等を治療することができない。

動物実験では、軟骨細胞移植によって気管軟骨再生を可能とする技術が示されているが、軟骨細胞由来の因子は血管等の組織形成を阻害するという課題が存在していた。本研究で得られた結果は、軟骨細胞移植の負の要素を改善し、軟骨と他組織の再生を両立するための技術を提案している。

研究成果の概要(英文)：We previously developed an artificial trachea, which induces regeneration of the epithelium, and have clinically used it. However, the artificial trachea cannot induce regeneration of the cartilage. Although a cartilage tissue is formed in an artificial trachea seeded with chondrocytes after implantation into a rabbit tracheal defect, the chondrocyte-seeded artificial trachea hampered epithelial regeneration. In this study, we used a novel scaffold, which resembles the shape and physical property of the cartilage, as a container of chondrocytes. Additionally, we made an artificial trachea, which consists of the chondrocyte-containing scaffold and a collagen sponge with heparin, to inhibit diffusion of the angiostatic factors derived from chondrocytes. After implantation of the artificial trachea into a rabbit tracheal defect, cartilage with arch-like shape was formed to cover the defect. Epithelial regeneration on the artificial trachea was relatively fast.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

キーワード：気管 軟骨 上皮 再生

1. 研究開始当初の背景

当講座では再生誘導型の人工気管を開発し、世界に先駆けて臨床への使用を実施してきた (Omori et al. 2015)。この人工気管はコラーゲンスポンジとポリプロピレンにより構成されており、気管への移植後において上皮および間質の再生を誘導することで宿主組織へと定着することが可能であり、臨床成績も概ね良好であった。一方、気管軟骨の再生を誘導しないことから、呼気及び吸気の交換において重要な気管の筒状構造はポリプロピレンの枠組みに頼っている。軟骨成長過程の小児においては、非吸収性であり成長することのないポリプロピレンを使用することはできない。先天的な要因等により気管狭窄を生じた小児へも適用を可能とするために、軟骨組織を骨格とした、本来の期間により近い人工気管の開発が求められていた。

野本らは自家軟骨細胞を播種した人工気管をウサギの気管欠損領域に移植する実験を実施し、軟骨組織を再生させることに成功した (Nomoto et al. 2013)。この成果は小児適用可能な新しい人工気管への可能性を示す。しかし、軟骨細胞を播種した人工気管では、軟骨細胞が他組織の再生を遅延させるという副作用も見られた。外来異物の侵入を防ぐ上皮組織の再生遅延は、感染や炎症の危険性を増加させ、延いては移植材料の定着を妨げると考えられており、改善が求められる。

2. 研究の目的

軟骨組織は無血管組織として知られている。軟骨細胞はコンドロモジュリンに代表される血管新生阻害因子を分泌するが、正常な組織発生過程においては、血管新生阻害因子と親和性を有する細胞外マトリックスの存在や適切な軟骨細胞の配置によって、血管新生阻害因子は作用すべき領域に留まると考えられている。過去に野本らが作製した人工気管においては、素材の全体に軟骨細胞が播種されており、軟骨細胞由来の血管新生阻害因子が人工気管全体に拡散した可能性がある。血管新生の遅延は他の組織への栄養および酸素の供給を滞らせることから、他組織の再生にも影響を及ぼすと考えられる。

本研究では、軟骨細胞の局在を制限し、かつ軟骨細胞由来血管新生阻害因子の拡散を抑える人工気管を開発し、軟骨再生と気管上皮の再生を両立する気管再生技術を開発することを目的として実験を実施した。ヘパリンはコンドロモジュリン-1 と結合する一方で、コラーゲンとも結合することが知られている。コンドロモジュリン-1 拡散を抑える意図で、ヘパリンをコラーゲンスポンジへと結合させたスキャフォールドを作製した。これに軟骨細胞を播種した後にウサギ皮下へと移植し、血管新生および軟骨組織形成が両立されるかを評価した。さらに、高密度コラーゲンスポンジスキャフォールドとヘパリン結合コラーゲンスポンジを用いて新たな人工気管を作製した。高密度コラーゲンスポンジはウサギの気管軟骨と同様の形状へと整形可能であり、これに軟骨細胞を播種することで軟骨細胞局在を規定することを目的として使用した。また、高密度コラーゲンスポンジは、それ自体が軟骨組織に類似した強度を有することから、移植後に軟骨組織が形成されるまでの間、人工気管の形状を保つための物理的強度を担保することも目的として使用した。

3. 研究の方法

i) ヘパリンのコラーゲンスポンジへの結合性の確認

1%アテロコラーゲン溶液を凍結乾燥した後、熱脱水架橋を行うことでコラーゲンスポンジを作製した (Nakamura et al. 2019)。コラーゲンスポンジをヘパリン溶液に浸し、ヘパリン結合コラーゲンスポンジを作製した。リン酸緩衝生理食塩水により洗浄後、アルシアンブルー染色を行い、ヘパリンの結合を確認した。

ii) 自家肋軟骨細胞採取及び培養

全身麻酔下でウサギ (日本白色種、オス) 肋軟骨を採取した。コラゲナーゼ II を用いて組織を崩壊させることで軟骨細胞を得、培養系において増殖させた。継代は行わず、コンフルエントに達するまで培養し、トリプシン及び EDTA 溶液を用いて細胞を培養基質より回収し、コラーゲン溶液に懸濁した後、以下に詳述する移植実験に用いた。

iii) 自家肋軟骨細胞皮下移植実験

軟骨細胞を懸濁させたコラーゲン溶液をコラーゲンスポンジの中央に滴下し、37 でゲル化させた。ヘパリンを含む、あるいは含まない DMEM/F-12 に浸漬した後に、全身麻酔下のウサギの背部皮下へ移植した。これらの移植材料は2週間後に摘出し、凍結切片を作製した。軟骨および血管組織の形成を II 型コラーゲンおよび CD31 に対する免疫染色により評価した。

iv) 自家肋軟骨細胞気管移植実験

軟骨細胞を懸濁させたコラーゲン溶液をアーチ型の高密度コラーゲンスポンジへと滴下し、37 でゲル化させた。ヘパリンを含む DMEM/F-12 に浸漬したコラーゲンスポンジと、軟骨細胞を播種した高密度コラーゲンスポンジを組み合わせると半円筒状の人工気管を作製した。全身麻酔

下のウサギにおいて気管腹側を開窓し、人工気管を移植した。移植領域の凍結切片を作製し、軟骨組織の形成を II 型コラーゲンに対する免疫染色およびアルシアンブルー染色により評価した。血管、線毛及び杯細胞の形成をそれぞれ CD31、アセチル化チューブリン、ムチン 5AC に対する免疫染色により評価した。

4. 研究成果

i) ヘパリンのコラーゲンスポンジへの結合性

ヘパリン溶液に浸漬したコラーゲンスポンジはアルシアンブルー染色陽性となった。架橋処理等は施さず、リン酸緩衝液による洗浄を行った後においても陽性染色を呈したことから、ヘパリンのコラーゲンに対する結合性により、コラーゲンスポンジにヘパリンが残存したと考えられた。

ii) 自家肋軟骨細胞皮下移植

軟骨細胞を播種したコラーゲンスポンジはヘパリンの有無に関わらず皮下移植後に II 型コラーゲン陽性の軟骨組織が形成された。軟骨組織周辺の CD31 陽性領域はヘパリンを結合させたコラーゲンスポンジで多く観察された。

iii) 自家肋軟骨細胞気管移植

軟骨細胞を播種した高密度コラーゲンスポンジとヘパリン結合コラーゲンスポンジを用いて作製した人工気管は、気管移植後 2 週目から移植領域における II 型コラーゲン陽性軟骨組織および CD31 陽性血管組織の形成が観察された。移植後 1 か月目においては II 型コラーゲン陽性組織の領域が拡大されている様子であった。移植後 2 か月目においては、軟骨組織は気管開窓領域を覆うようにアーチ状に形成されている様子が観察された (図 1)。上皮再生に関しては、移植後 1 か月目において移植領域内腔面に上皮組織が形成されており、アセチル化チューブリン陽性の線毛細胞も観察された (図 1)。過去の研究において、軟骨細胞を含まないコラーゲンスポンジはウサギ気管へ移植後 2 週目において上皮の再生が観察されているが (Nakaegawa et al. 2016)、軟骨細胞を含むコラーゲンスポンジは移植後 8 週目において上皮の再生が観察されている (Nomoto et al. 2013)。これらの結果より、本研究で作成した人工気管には適切な位置での軟骨組織形成を誘導することが可能であり、さらに軟骨細胞移植による上皮組織の再生遅延を改善できる可能性が示唆された。

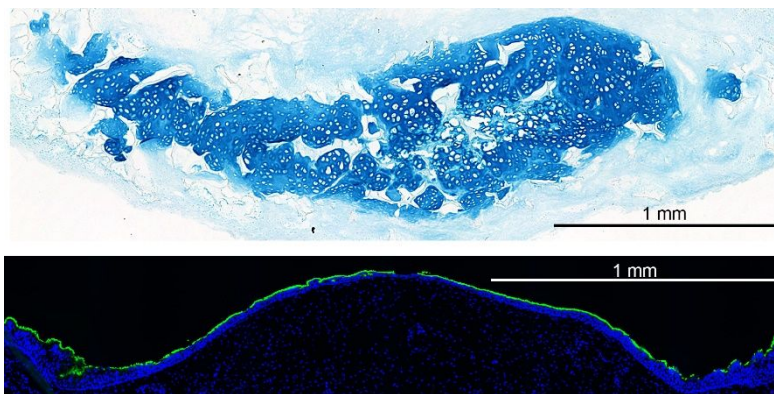


図 1
本研究で作製した人工気管を移植し、2 か月後の移植材料内 (上図)、1 か月後の移植領域内腔面 (下図)。それぞれ、軸位断の凍結切片をアルシアンブルー染色、アセチル化チューブリンに対する免疫染色に供した。下図では対比染色として核を DAPI により染色した。アセチル化チューブリン (緑)、DAPI (青)。

引用文献

Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Asato R, Yamashita M, Tanaka S, Magruffov A, Ito J, Shimizu Y. Regenerative Medicine of the Trachea: The First Human Case. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2005 Jun;114(6):429-33.

Nomoto M, Nomoto Y, Tada Y, Tani A, Otsuki K, Suzuki R, Nakamura T, Omori K. Bioengineered Trachea Using Autologous Chondrocytes for Regeneration of Tracheal Cartilage in a Rabbit Model. *Laryngoscope*. 2013 Sep;123(9):2195-201

Nakamura R, Katsuno T, Kitamura M, Yamashita M, Tsuji T, Suzuki R, Kishimoto Y, Suehiro A, Tateya I, Nakamura T, Omori K. Collagen Sponge Scaffolds Containing Growth Factors for the Functional Regeneration of Tracheal Epithelium. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019 May;13(5):835-845.

Nakaegawa Y, Nakamura R, Tada Y, Nomoto Y, Imaizumi M, Suzuki R, Nakamura T, Omori K. Effect of Structural Differences in Collagen Sponge Scaffolds on Tracheal Epithelium Regeneration. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2016 Feb;125(2):115-22.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakamura R, Katsuno T, Kitamura M, Yamashita M, Tsuji T, Suzuki R, Kishimoto Y, Suehiro A, Tateya I, Nakamura T, Omori K	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Collagen sponge scaffolds containing growth factors for the functional regeneration of tracheal epithelium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/term.2835	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----