

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09165

研究課題名（和文）積層線維芽細胞シートを使用した術後気管支断端瘻の予防法の開発

研究課題名（英文）Development of a Prophylaxis for Postoperative Bronchial Fistula Using Multilayered Fibroblast Sheets

研究代表者

村上 順一（Murakami, Junichi）

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10725683

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：積層線維芽細胞シートの気管支断端補強効果を大型動物実験で検証した。イヌの口腔粘膜から線維芽細胞を単離し、積層線維芽細胞シートを作成できた。同細胞シートは6-8層の細胞積層構造を認め、一部に筋線維芽細胞を有すること、VEGF、HGF、TGF- β などの成長因子を高度に分泌することがわかった。口腔粘膜から作成した線維芽細胞シートを左肺後葉切除後の気管支切離断端に移植した。細胞シートの移植による有害事象は認めなかった。現在、組織学的評価を行っている。細胞シート移植群では対照群に比べて、気管支切離断端への軟部組織の付着や胸膜の被覆を認め、細胞シートが組織修復の促進に寄与した可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞シート移植によって肺切除後の気管支断端瘻を予防できれば、死亡率が高く、治療に難渋する気管支断端瘻治療に苦しむ患者や悩む医療者を激減させ、長期にわたる医療コストをも削減することができる。呼吸器外科手術における気管-気管や気管支-気管支吻合における縫合不全の予防、既に発症した気管支断端瘻に対する治療への適応拡大も見込まれる。さらに我々が最終的に目指す積層線維芽細胞シートの他家移植が可能となれば、自己の細胞・組織採取が不要な新規バイオマテリアルとして、外科他領域における術後合併症（術後出血、腸管縫合不全、術後膵液漏、胆汁漏、髄液漏、乳糜漏、神経損傷など）の予防への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The effect of multilayered fibroblast sheets in reinforcing bronchial breaks was verified in a large animal experiment. Fibroblasts were isolated from canine oral mucosa, and laminated fibroblast sheets were prepared. The cell sheets were found to have 6-8 layers of stacked cell structures, some of which contained myofibroblasts, and to secrete high levels of growth factors such as VEGF, HGF, and TGF- β . Fibroblast cell sheets prepared from the oral mucosa were transplanted into the bronchial stump after resection of the posterior lobe of the left lung. No adverse events due to the implantation of the cell sheets were observed. Histological evaluation is currently underway. Soft tissue adhesion to the bronchial stump and pleural coverage was observed in the cell sheet transplantation group compared to the control group, suggesting that the cell sheets may have contributed to accelerated tissue repair.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：気管支断端瘻 積層線維芽細胞シート 再生医療 肺切除術

1. 研究開始当初の背景

肺癌の罹患数の増加に伴い、外科治療である肺切除の件数は近年増加傾向で、2016年は4万件を超えている (Gen Thorac Cardiovasc Surg. 2019)。肺切除の際は気管支を切離する必要がある(器械縫合器を使用)。気管支断端瘻は肺切除後の重篤な合併症で、気管支の切離断端に瘻孔ができて、同部位から空気が漏れて発症する。気管支断端瘻は同側胸腔感染による胸膜炎や膿胸、残存肺の肺炎が複合的に関与し、重症化するため死亡率は高く、QOLは著しく低下し、完治するにも数ヶ月から1年はかかる。発症の危険因子が臨床データから統計学的に推測されているが、根本的な発症機序は解明されておらず、確固たる予防法はない。気管支断端瘻の原因として、外科医の経験から切離断端部における組織修復の遅延が疑われている。我々の動物実験から、肺切除後の気管支断端では内腔上皮や壁の再構築は起こらず、壁外の新生線維組織の増生のみで修復されることが実証された (Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2016)。つまり、術後早期に気管支断端の壁外における組織新生を促すことが気管支断端瘻の予防につながることを示唆された。そこで研究代表者が所属する研究室が独自に開発した積層線維芽細胞シートによる組織修復の促進効果に着目した。気管支断端における積層線維芽細胞シートによる組織修復の促進効果を検証し、同細胞シートを使用した術後気管支断端瘻に対する新規予防法を確立することを計画し、小型動物実験から研究を開始した。既にラット肺切除モデルで自家移植による積層線維芽細胞シートの気管支断端補強効果を証明した (Semin Thorac Cardiovasc Surg. 2021)。気管支断端瘻の予防を目的とした同細胞シートの臨床応用へは中型または大型動物における有効性を示す必要がある上、コスト削減、汎用性、患者への負担軽減の観点から他家細胞によるシート移植が理想である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)中型または大型動物を使用し、積層線維芽細胞シートによる気管支断端修復の促進効果、(2)小型動物を使用し、他家積層線維芽細胞シートの移植による気管支断端の組織修復過程における自家移植との差異を科学的に分析することである。

3. 研究の方法

(1) イヌを用いた積層線維芽細胞シートによる気管支断端修復の促進効果の実証(図1)
ラット肺切除モデルで証明された積層線維芽細胞シートの効果を前臨床試験として、大型動物であるイヌを用いて実証する。

1) 積層線維芽細胞シートの作製

口腔粘膜から線維芽細胞を単離し、積層線維芽細胞シートを作製する。細胞シート培養液より、細胞シートから分泌される成長因子を同定し、定量する。

2) 積層線維芽細胞シートの気管支断端への自家移植

口腔粘膜を採取した1-2週間後に、イヌに全身麻酔をかけ、片肺換気下に左開胸で左肺後葉切除を行う。後葉気管支は自動縫合器で切離し、気管支切離断端に積層線維芽細胞シートを自家移植する。尚、対照群には細胞シートを移植しない。

▶ 積層線維芽細胞シート作製プロトコール

- ✓ イヌの口腔粘膜から積層線維芽細胞シートを作製 (培養皿: 6/24 well plate, 濃度: 2.5×10^5 個/ml)
- ✓ 口腔粘膜採取から約14日間で10枚以上作製可能(24 well plate)



図1

(2) 小型動物を用いた積層線維芽細胞シートの同種他家移植による組織修復過程の分析

小型動物としてラットを使用し、Wistar/ST ラットの口腔粘膜から単離した線維芽細胞で積層細胞シートを作成し、口腔粘膜を採取した Wistar/ST ラット(自家)または他系統 SD ラット(他家)肺切除モデルの気管支断端に移植し、他家移植による気管支断端の線維組織増生、耐圧能や血流増強効果(上記実験方法)について自家移植との差異を検証予定であった。気管支切離断端への細胞シート移植に伴う線維組織増生の評価に難渋したため、ラットの食道縫合モデルで同種他家移植の効果を検証した。ラットで食道縫合モデルを作製し、他家積層線維芽細胞シートを移植することで縫合部の創傷治癒が促進するかを検証した。食道縫合モデルはラットの食道を切離し、4点結節縫合による再吻合を行うことで作製した。コントロール群(食道の切離/縫合のみ)と他家シート群(食道の切離/縫合後、他家積層線維芽細胞シートを前壁/後壁に1枚ずつ計2枚移植)に分け、移植後3日目と5日目に犠牲死させ、縫合部の耐圧能や縫合不全率を評価した。また、縫合部の組織学的解析(Azan染色、CD31免疫染色)およびqPCR解析(コラーゲンI型/III型、VEGF)を行った。

4. 研究成果

(1) 積層線維芽細胞シートの作製

全身麻酔下に犬の口腔粘膜全層を数片ほど採取し、培養液に浸し、線維芽細胞を単離し、積層線維芽細胞シートを作製した(図2)。組織学的に評価すると、HE染色で細胞シートは6~8層に細胞が積層しており、Azan染色で細胞間のコラーゲンの存在を確認した。免疫染色でそれらすべての細胞がVimentin陽性であったが、少数の細胞で α SMA陽性となり、線維芽細胞の一部が筋線維芽細胞へ分化した可能性が示唆された。

同細胞シートを培養液で培養したところ、VEGF、HGF、TGF- β などの成長因子が高度に分泌されていることがわかった。しかしながら、IL-10の分泌は少ないことがわかった。概ね、ラットで作成した積層線維芽細胞シートと同様の結果であった。

(2) 積層線維芽細胞シートの気管支断端への自家移植

パイロット実験として全身麻酔下に左開胸で左肺後葉切除を行った。細胞シートの移植を行うにあたって、気管支を切離する方法、細胞シートの移植方法を検討し、気管支切離にはヒトと同じように自動縫合器を用いること、細胞シートは6well plateで作成できるサイズのものに色素をつけ、薬匙で断端へ移植する方法を選択した。口腔粘膜を採取した2週間後に、イヌ(N=2)に全身麻酔をかけ、片肺換気下に左開胸で左肺後葉切除を行った。後葉気管支は自動縫合器で切離し、気管支切離断端に積層線維芽細胞シートを自家移植した。対照はイヌ(N=2)に全身麻酔をかけ、片肺換気下に左開胸で左肺後葉切除を行い、気管支切離断端に積層線維芽細胞シートを移植せず手術を終了した。術後は十分に除痛を行なった。それぞれ、左肺後葉切除7日後に犠牲死させ、気管支切離断端を含む標本を摘出した。手術を施行したイヌ4体すべてにおいて周術期に大きな合併症は認めず、細胞シートの移植による有害事象は認めなかった。

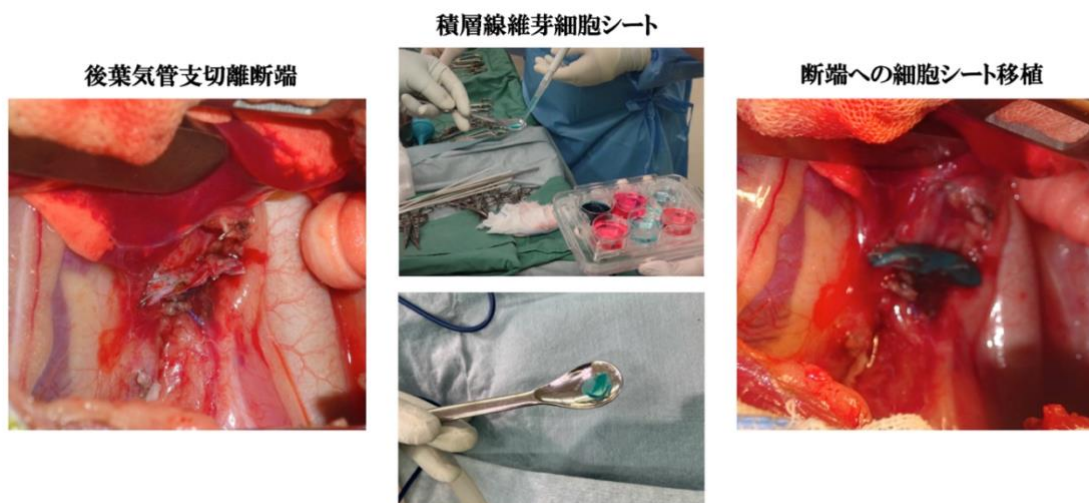


図2

現在、組織学的評価を行っている。現在のところ、細胞シート移植群では対照群に比べて、気管支切離断端への軟部組織の付着や胸膜の被覆を認め(図 3)、細胞シートが組織修復の促進に寄与した可能性があるとみている。

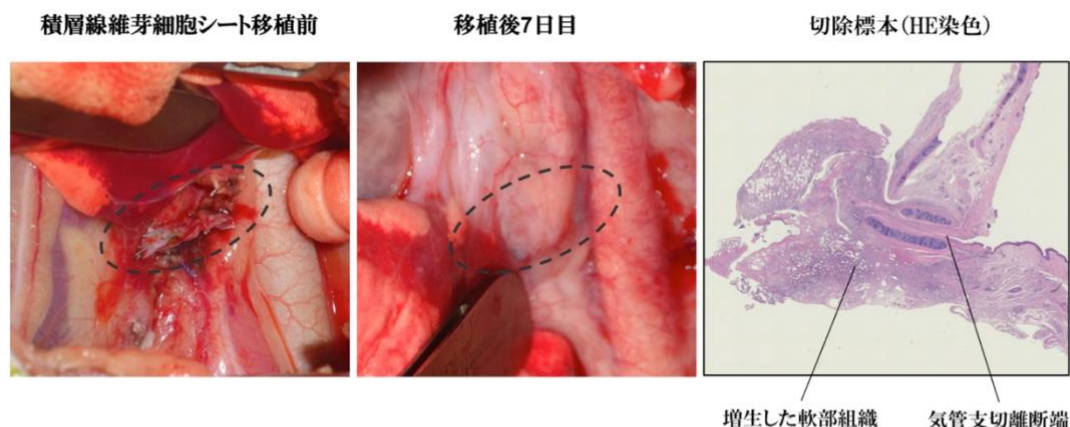


図 3

(3) ラットを用いた積層線維芽細胞シートの同種他家移植による食道縫合モデルにおける組織修復過程の分析

手術後に長期生存を得られる食道縫合モデルを確立した。術後 5 日目において、縫合部の耐圧能は他家シート群で有意に高値だった(251.3 mmHg vs.164.6 mmHg、 $p=0.014$)。縫合不全率は他家シート群で低率だったが有意差は認めなかった(1/12(8.3%) vs.5/12(41.6%)、 $p=0.15$)。組織学的解析では他家シート群で Azan 染色陽性の範囲が広く、コラーゲン量の増加が示唆された($p=0.018$)。qPCR 解析では他家シート群でコラーゲン I 型/III 型や VEGF の mRNA 発現が増加していた($p=0.049$ 、 $p=0.042$ 、 $p=0.013$)。ラットの食道縫合モデルでは、他家積層線維芽細胞シート移植によって縫合部の耐圧能が上昇し、統計学的有意差を認めなかったものの縫合不全の発生率を低下させた。縫合部のコラーゲン量の増加や血管新生によって縫合部が補強される可能性が示唆された。

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 1件）

1. 著者名 Yoshimine Sota, Ueno Koji, Murakami Junichi, Saito Toshiro, Suzuki Ryo, Asai Yoshiyuki, Ikeda Eiji, Tanaka Toshiki, Hamano Kimikazu	4. 巻 34
2. 論文標題 Autologous Multilayered Fibroblast Sheets Can Reinforce Bronchial Stump in a Rat Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 349 ~ 358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.semtcvs.2021.03.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉峯宗大、田中俊樹、村上順一、山本直宗、濱野公一
2. 発表標題 積層線維芽細胞シートの移植による気管支断端の治癒促進効果の検討
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉峯宗大、田中俊樹、村上順一、山本直宗、濱野公一
2. 発表標題 積層線維芽細胞シートを用いた気管支断端瘻の予防法開発
3. 学会等名 第38回日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉峯宗大、田中俊樹、村上順一、山本直宗、濱野公一
2. 発表標題 積層線維芽細胞シートを用いた気管支断端瘻の予防法
3. 学会等名 第121回日本外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上順一、吉峯宗大、山本直宗、田中俊樹、濱野公一
2. 発表標題 積層線維芽細胞シートによる肺切除後気管支断端補強
3. 学会等名 第74回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

〔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
研究分担者	田中 俊樹 (Tanaka Toshiki) (50457305)	山口大学・医学部附属病院・講師 (15501)	
研究分担者	溝口 高弘 (Mizoguchi Takahiro) (90844796)	山口大学・医学部附属病院・助教 (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------