

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16571

研究課題名（和文）実臨床を目指した大型動物での積層線維芽細胞シートを用いた気管支断端瘻予防法の開発

研究課題名（英文）Development of a method to prevent bronchial stump fistulas using multilayered fibroblast cell sheets in large animals for clinical use

研究代表者

竹内 由利子（Takeuchi, Yuriko）

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00938392

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：気管支断端瘻は肺切除術後の最も重篤な合併症の一つであるが、確立した予防法は未だ存在しない。本研究では、独自に開発した積層線維芽細胞シートが、高い血管新生、組織修復、細胞増殖能を有することを示した。さらに、イヌ左肺後葉切除モデルにおいて、同細胞シートが気管支断端の血管新生及び組織増生を促し、気管支断端瘻を予防する可能性があることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、大型動物での肺切除後気管支断端修復における積層線維芽細胞シートの有用性と安全性を示したものである。小動物の気管支断端モデルにて、同細胞シートが血管新生を介して気管支断端を強化させることは既に示していたが、よりヒトに近い大型動物で検証できたことは、今後の臨床応用に向けて重要な過程となる。また、実臨床における気管支断端瘻の発生率は肺全摘で4.5%であり、その死亡率は18-50%と高率である。救命できても治療に難渋し、治癒には数カ月から1年以上の時間を要することが多い。このような重大な合併症の予防法が開発されることは、肺切除を受ける患者及び医療者にとって大変意義深い。

研究成果の概要（英文）：Bronchopleural fistula is one of the most serious complications after pneumonectomy, but there is still no established prevention method. In this study, we demonstrated that our originally developed multilayered fibroblast sheets have high angiogenesis, tissue repair, and cell proliferation ability. Furthermore, in a canine model of pneumonectomy, the cell sheets promoted angiogenesis and tissue proliferation of bronchial stump and may prevent bronchopleural fistula.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：線維芽細胞 細胞シート 血管新生 気管支断端瘻 再生医療 動物モデル 大型動物

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2019年における日本のがん統計では肺癌の罹患数は第2位であり、肺切除件数も年々増加している。肺切除を行う際、切離された気管支は縫合閉鎖され気管支断端となるが、これが破綻した病態が気管支断端瘻で、肺切除術後の最も重篤な合併症の一つである。肺全摘術後の気管支断端瘻による死亡率は18-50%と致死的であるが、確立した予防法は未だ存在しない。

我々は以前より線維芽細胞の血管新生作用に着目した再生医療研究を行ってきた。線維芽細胞はコラーゲンを産生し、血管新生を促進させる成長因子である VEGF、HGF を分泌することで創傷治癒の過程で重要な役割を果たすことが広く知られている。また、再生医療に用いる細胞として、皮膚や口腔内組織から低侵襲かつ容易に単離、培養できる点で骨髄幹細胞や脂肪幹細胞と比較して優れている。我々は、独自の方法で線維芽細胞を積層させシート化(積層線維芽細胞シート)することに成功した(特願 2017-117568)。既にマウス皮膚潰瘍モデルやウサギ下肢虚血モデルにおいて、血管新生作用により創傷治癒を促進させることを報告し (Sci Rep. 2016, Am J Transl Res. 2017, Cell Physiol Biochem. 2018)、臨床研究として患者に提供するに至っている(Am J Transl Res. 2021)。さらに、積層線維芽細胞シートを気管支断端へ移植することで、気管支断端における血管新生の促進に伴い血流が増加し、気管支断端瘻が予防されることを、ラット気管支断端モデルにおいて明らかにしてきた(Semin Thorac Cardiovasc Surg. 2021)。

ヒトへの応用の前に、サイズが大きくよりヒトに近い動物種であるイヌで実験を行い、具体的な移植手技を確立するとともに、より確かな有効性を証明する必要があると考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的はヒト肺切除後の気管支断端瘻に対する有効な新規予防法を開発することである。そのために、大型動物での積層線維芽細胞シートの有用性と安全性を証明する必要がある。本研究では、イヌ肺切除後の気管支断端に積層線維芽細胞シートを自家移植し、血流増加作用や気管支断端部の補強効果を調べるとともに、移植手技の確立及び移植の安全性について検討する。

3. 研究の方法

(1) イヌ積層線維芽細胞シートの作製

イヌの口腔粘膜から線維芽細胞を単離し、細胞を培養皿に播種する。イヌの線維芽細胞が積層されたシートとして回収でき、かつ気管支断端を被覆するのに適した厚さ、サイズとなるための培養皿、培養日数を検討する。

(2) イヌの肺切除による気管支断端モデルの作製と細胞シートの移植

全身麻酔下にイヌの左肺葉気管支を切離、縫合閉鎖後、気管支断端に積層線維芽細胞シートを移植し、ハンドリングの容易さや断端部への密着度の観点から、最適な厚さ、サイズの組み合わせを検討する。更に、気管支断端部を十分に覆うための移植方法、固定方法(フィブリン糊、ゼラチン製剤などの併用の有無)を検討する。

(3) イヌ積層線維芽細胞シートの組織評価と血管新生促進能の評価

線維芽細胞シートのパラフィン切片を作製し、HE染色、Azan染色、Vimentin、 α SMAによる免疫組織染色を行う。

線維芽細胞シートを DMEM +HFDM-1 +5% FBS +Rho kinase inhibitor(20 μ M)で3日間培養し、培養液中の VEGF、HGF、Angiopoietin-1、Angiopoietin-2、MCP-1、TGF- β の濃度を ELISA で測定する。未使用の培養液と比較することで、細胞シートが分泌する因子を同定する。

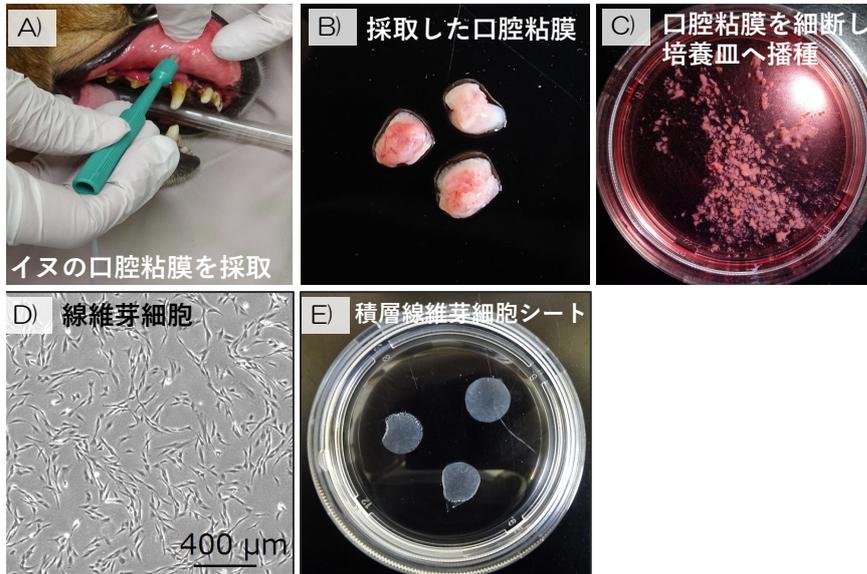
(4) イヌ積層線維芽細胞シート移植による気管支断端の組織学的評価

細胞シート移植4週後に摘出した気管支断端のパラフィン切片を作製する。抗 CD31 抗体、抗 α -SMA 抗体での免疫組織染色を行い、細胞シート非移植群と比較する。

4. 研究成果

(1) イヌ積層線維芽細胞シートの作製

イヌの口腔粘膜を採取し、細断して培養皿に播種することで、線維芽細胞を単離した。細胞を 6-well plate に 2.5×10^5 cells/ml 播種し、2週間培養し、シート化(厚さ 50~60 μ 、直径 1.5cm)させた。



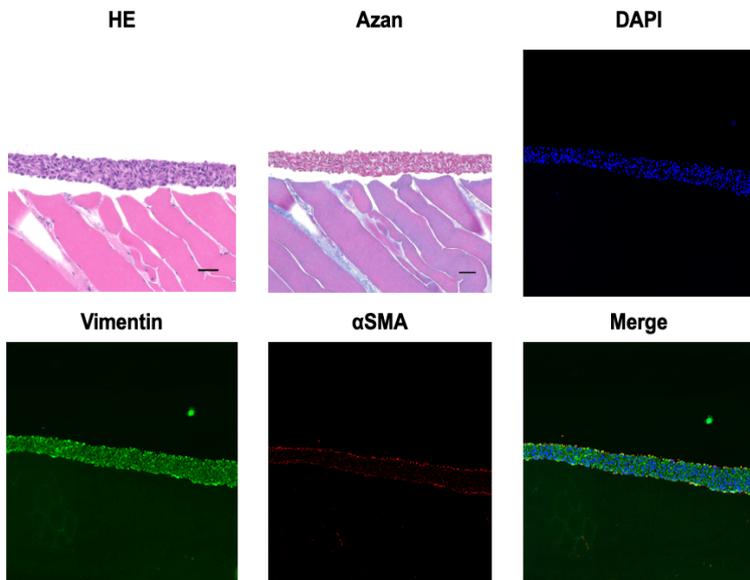
(2) イヌの肺切除による気管支断端モデルの作製と細胞シートの移植

全身麻酔下に左開胸でイヌ左肺後葉切除モデルを作製した。イヌの気管支断端モデルは、自動縫合器を用いて断端を切断、閉鎖することにより作成したが、これは通常臨床で行っている手術手技とほぼ同等であり、容易に実施できた。気管支断端部に移植する際のハンドリングは、スプーン状の機器を用いることにより効果的に断端部を覆い、密着させることができ、フィブリン糊、ゼラチン製剤などによる固定は要さなかった。上記(1)の方法で作成した細胞シートの厚さ、サイズは適切であった。

(3) イヌ積層線維芽細胞シートの組織評価と血管新生促進能の評価

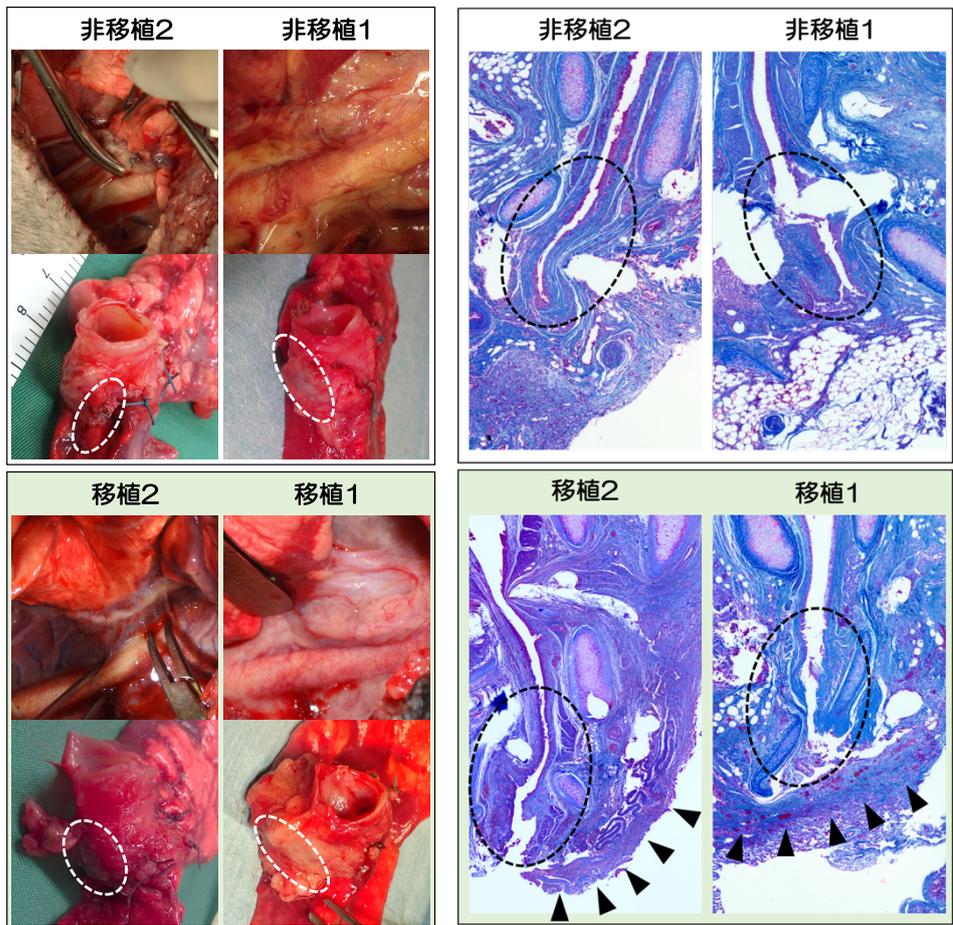
HE染色で6~8層の細胞積層を、Azan染色で細胞間コラーゲンを確認した。構成細胞の殆どがVimentin陽性であったが、 α SMA陽性細胞を少数認め、線維芽細胞の一部における筋線維芽細胞へ分化が示唆された。

積層線維芽細胞シートの培養液中にはVEGF、MCP-1、TGF- β が高濃度であり、高い微小血管新生、組織修復、細胞増殖効果を有している可能性が示唆された。



(4) イヌ積層線維芽細胞シート移植による気管支断端の組織学的評価

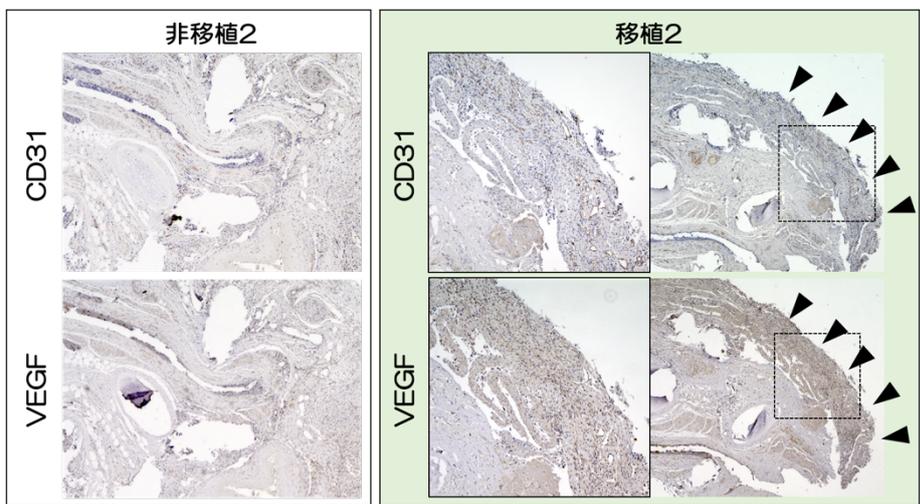
移植群(N=2)では断端に積層線維芽細胞シートを貼付し、自家移植した。非移植群(N=2)では細胞シートを移植しなかった。全ての犬肺切除モデルは標本摘出まで生存し、再開胸時に気管支断端瘻は認めなかった。細胞シートの移植による有害事象はなかった。1週間後に安楽死させ、細胞シート移植の有無による気管支断端の変化の違いを検討した。肉眼的には、非移植群では断端自体を視認できたが、移植群では軟部組織で覆われていた。また、Azan染色では移植群で断端壁外に膠原線維の増生を伴う新生組織を認めた。



白点線は後葉気管支切離断端

黒点線は後葉気管支切離断端

CD31、VEGFにて免疫染色を行ったところ、移植群では断端壁外の新生組織に CD31 陽性の微小血管が多くみられ、VEGF 発現の亢進を認めた。



これらのことより、肺切除後の気管支断端に貼付された積層線維芽細胞シートは、局所における血管新生や組織新生を促し、気管支断端を補強する可能性がある。本法はヒト肺切除後の気管支断端瘻に対する有効な新規予防法となり得る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上 順一, 田中 俊樹, 吉峯 宗大, 山本 直宗, 濱野 公一
2. 発表標題 大型動物の気管支断端における積層線維芽細胞シート移植による組織修復の促進効果
3. 学会等名 第124回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------