

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861403

研究課題名(和文) 軟骨細胞と線維芽細胞を用いた新規人工気管の開発

研究課題名(英文) Development of a novel artificial trachea using autologous chondrocytes and fibroblasts

研究代表者

野本 美香 (Nomoto, Mika)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50554416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)： 以前の研究で、ウサギの自家軟骨細胞を培養、人工気管に播種し気管軟骨欠損部に移植する研究を行い、骨格となり得る軟骨組織の再生を確認した。一方で、軟骨細胞を導入した人工気管では上皮化の遅延が認められた。上皮化遅延は感染、再狭窄の原因となるため、上皮化を促進するために軟骨細胞を導入した人工気管に、さらに線維芽細胞を付加したハイブリッド型の人工気管を開発することを目的として本研究を行った。人工気管に自家軟骨細胞、同種線維芽細胞を導入し気管欠損部に移植したところ軟骨組織の再生は認められなかった。さらに人工気管に自家軟骨細胞、自家線維芽細胞を導入し移植したが軟骨組織の再生は認められなかった。

研究成果の概要(英文)： In our previous study, tracheal regeneration was successfully achieved by using bio-engineered trachea with chondrocytes. Otherwise, delay of epithelization on the inner lumen of bio-engineered trachea was observed. Delay of epithelization may cause some problems including infection or tracheal stenosis. The purpose of this was to develop a novel hybrid bio-engineered trachea with chondrocyte and fibroblasts, and to verify the effects of the trachea. As a result, cartilaginous regeneration was suppressed.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生医療 人工気管 軟骨細胞 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

我々はポリプロピレンの骨格に足場となるコラーゲンスポンジを付加した組織再生誘導型人工気管を開発・臨床応用を行い概ね良好な結果を得ている。しかし、骨格となるポリプロピレンは成長とともに伸長することがないので小児には適応外としている。

動物実験では、ウサギの肋軟骨から採取した自家軟骨細胞を培養、人工気管に播種し気管軟骨欠損部に移植する研究を行い、骨格となり得る軟骨組織の再生を確認した。一方で、軟骨細胞を導入した人工気管では気管内腔の上皮化の遅延が認められた。上皮化遅延は感染、再狭窄の原因となるため、上皮化を促進するために軟骨細胞を導入した人工気管に、さらに線維芽細胞を付加したハイブリッド型の人工気管を開発することを考案した。

2. 研究の目的

1) 線維芽細胞を採取、培養し十分量の細胞を確保する技術を確立する。

2) 培養軟骨細胞を導入した人工材料の足場素材の内腔面に培養線維芽細胞を付加する技術を確立する。

3) 自家軟骨細胞・線維芽細胞を導入した人工材料を気管欠損部に移植する実験を通して、移植後の移植軟骨細胞の挙動、軟骨組織形成の有無、気管軟骨断端あるいは軟骨膜の変化、長期安定性などを評価し、喉頭の枠組みとして機能する軟骨の再生が得られるかどうかを検証する。

4) 人工材料内腔面上皮や、血管新生など上皮下層の再生に関して線維芽細胞導入による効果の有無を評価する。

3. 研究の方法

(1) In vitro での線維芽細胞と軟骨細胞を有する人工気管の作製

〔対象〕日本白色系ウサギ

〔細胞の採取〕軟骨細胞の採取：全身麻酔下に、ウサギの肋軟骨を採取する。軟骨膜を取り除いた後コラーゲナーゼ処理し浮遊する軟骨細胞を濾過、採取する。同時に線維芽細胞を含んでいる口腔粘膜下組織を採取する。

〔培養〕10%FBSを含んだF-12細胞培養液等を用いて回収された軟骨細胞の継代培養を行う。線維芽細胞は口腔粘膜下組織の接着培養にて増殖させる。

〔培養気管の作製〕型コラーゲン溶液に再構成用緩衝液及び培養軟骨細胞を混合し軟骨細胞含有コラーゲン溶液を作製する。同様に線維芽細胞含有コラーゲン溶液も作製する。コラーゲン溶液は37℃でゲル化するものを用いる。

ウサギ用に作製した自己組織再生型人工気

管を足場材料とする。軟骨細胞含有コラーゲン溶液を足場材料に浸透させゲル化させ、さらに足場材料の内腔面に線維芽細胞含有コラーゲン溶液を付加し新規人工気管を作製する。

(2) In vivo での、ウサギの気管欠損部への培養気管の移植実験

〔対象〕日本白色系ウサギ

〔培養気管の作製〕(1)のように人工気管を作製する。

〔気管欠損モデルの作製〕全身麻酔下に喉頭・頸部気管を露出させ、気管軟骨を開窓する。喉頭欠損の大きさは約5.0×10.0mmとする。

〔気管再建〕培養気管が気管欠損部を覆うよう留置し6-0ナイロン糸で気管と縫合する。

〔標本採取〕観察期間の後にネブタール過剰投与により安楽死させた後、気管を摘出する。

〔標本作製・評価〕摘出した喉頭の標本作製し、H-E染色やアルシアンブルー染色での形態観察を行う。

4. 研究成果

(1) In vitro での線維芽細胞と軟骨細胞を有する人工気管の作製：

全身麻酔下にウサギの肋軟骨を採取し軟骨細胞の培養を行った。2～3回の継代培養で移植に十分量の軟骨細胞を得ることができた。

線維芽細胞の培養にあたっては頬粘膜、歯肉粘膜、口腔底粘膜、耳介皮膚を採取しそれぞれ接着培養を行った。皮膚は培養中にはがれてしまいうまく進まない例が多かった。粘膜からはいずれも線維芽細胞の増殖が確認できたが、手技の容易さから歯肉粘膜が最も採取に適していると考えられた。

自家移植を前提として、同一個体より全身麻酔下に肋軟骨と歯肉粘膜を採取しそれぞれ軟骨細胞、線維芽細胞の培養を行った。しかし軟骨細胞と線維芽細胞では一回の採取で得られる細胞数が異なり、また、増殖スピードも異なることより軟骨細胞が移植に十分な細胞数を採取できる時期には線維芽細胞は十分量に達していなかった。

そのため、口腔粘膜の採取と肋軟骨採取の時期をずらして細胞培養を行ったが、両方の細胞がそろって移植に十分な細胞数になるまで培養することが難しく、どちらか一方しか使用できる状態にならなかった。

(2) In vivo でのウサギの気管欠損部への培養気管の移植実験：

前述のように軟骨細胞と線維芽細胞がそろって移植に十分な細胞数になるまで培養することが難しかったため、違うウサギの培養軟骨細胞と培養線維芽細胞をくみあわせて人工気管に導入した。その人工気管は軟骨細

胞を採取したウサギの気管欠損部に移植した。つまり軟骨細胞は自家移植、線維芽細胞は同種移植となった。移植後2週間で喉頭気管を摘出し組織学的評価を行った。人工気管内に軟骨細胞はなく、癒痕組織、肉芽組織で置き換わっていた(図1、図2)。気管内腔面には肉芽が一部見られたが粘膜上皮の再生は認められた。

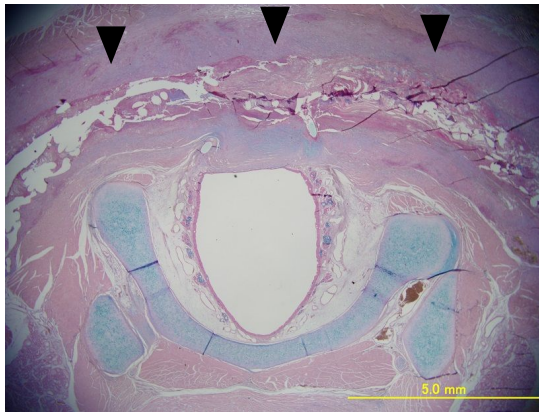


図1 人工気管内に軟骨組織の再生は認めない(黒矢頭)

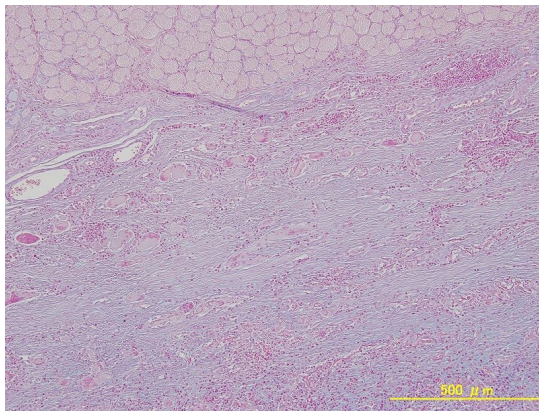


図2 人工気管内の肉芽組織と癒痕組織

人工気管に自家軟骨細胞のみ導入し移植した際は軟骨組織の再生を認めたのに対し、今回軟骨細胞が消失したことは線維芽細胞を同時に移植したことが関係しているのか、同種移植を併用したことが関連しているのかを確認する必要があった。その確認のため線維芽細胞も自家移植を行うことが必要であると考えた。

線維芽細胞を必要数確保するため、口腔粘膜の採取を広範囲に行ったところ、軟骨細胞と線維芽細胞の両方も移植に可能な細胞数を確保することができた。人工気管に自家軟骨細胞と自家線維芽細胞を導入し、ウサギの気管欠損部に移植した。移植後2週間で喉頭気管を摘出し組織学的評価を行った。人工気管内に軟骨細胞はごくわずかであり、移植した軟骨細胞の大部分は消失していた。人工気管内や気管内腔の粘膜下は癒痕組織、肉芽組織でしめられていた(図3a、図3b、図4)。

軟骨細胞は自家移植、線維芽細胞は同種移植とした実験と同様の結果となった。



図3a 人工気管内の一部に軟骨細胞をわずかに認める(黒矢頭)

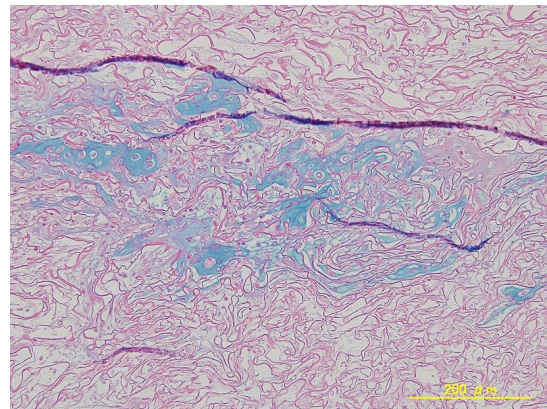


図3b 図3aの黒矢頭部拡大
軟骨細胞をわずかに認める

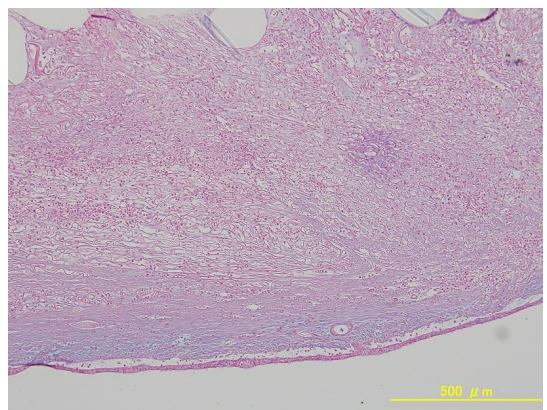


図4 粘膜下の肉芽組織と癒痕組織

以上より、人工気管内に軟骨組織の再生がなく、軟骨細胞もほぼ消失したのは線維芽細胞の影響と考えられた。軟骨細胞が人工気管内で増殖するより先に線維芽細胞が増殖して軟骨細胞が増殖する足場を奪ったことや、線維芽細胞から放出される何らかの物質が軟骨細胞の増殖を抑制したことなどが原因としては予想された。

線維芽細胞を軟骨細胞と一緒に移植することで人工気管内腔の上皮化促進を期待したが、第一の目標である軟骨細胞の増殖、軟骨組織の再生自体が認められなかった。今後、軟骨細胞を先に人工気管に導入、培養し、軟骨細胞がある程度増殖したのちに線維芽細胞を人工気管に付加、気管欠損部に移植するなどの方法で軟骨組織の再生と上皮化の促進の両者が得られる可能性などについて引き続き検討を行いたい。

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
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 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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野本 美香 (NOMOTO MIKA)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：50554416

(2) 研究分担者

なし