

図1 ラット気道上皮細胞

培養1週間後
主として非線毛細胞の増殖が認められる



図2 ラット気道上皮細胞

培養1週間後
杯細胞(粘液産生細胞:細胞内に空胞が存在)が認められる。

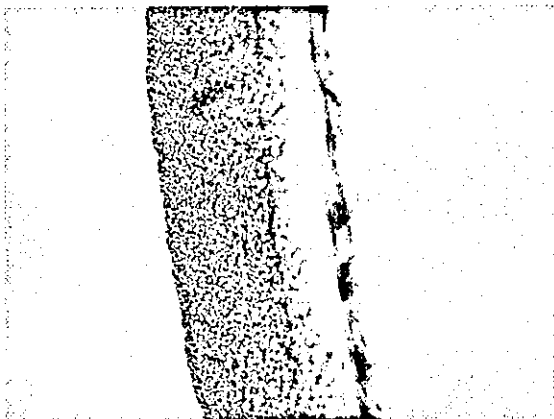


図3 人工材料上のラット気道上皮細胞

培養5日
単層気道上皮、コラーゲンゲル層、PTFE 製フィルター膜が観察できる。

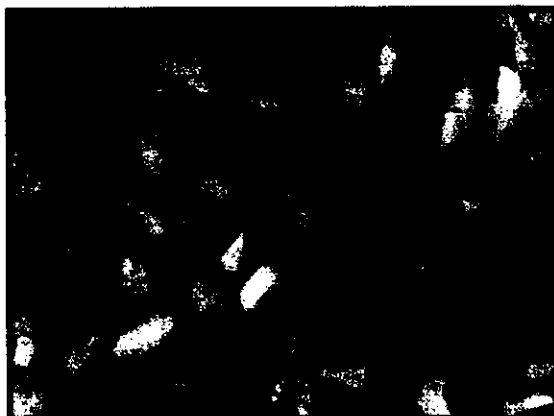


図4 人工材料上の GFP 発現ラット気道上皮細胞

培養5日
蛍光顕微鏡により観察。単層の上皮細胞が認められる。

培養気管上皮細胞層によるハイブリッド人工材料の被覆

主任研究者 大森孝一（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）
研究協力者 野本幸男（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）
鈴木輝久（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）
三宅将生（福島県立医科大学医学部生理学第一）

研究要旨

気管原発の悪性腫瘍や甲状腺、喉頭、食道原発の悪性腫瘍気管浸潤例、気管狭窄をきたした気管外傷、カニューレ抜去困難症などの疾患では時に気管の再建が必要になる。部分切除（非全周性切除）の際の再建材料として従来皮膚弁の他、気管内腔保持を目的とする硬性素材として鼻中隔軟骨、耳介軟骨といった自家組織が多く使われてきたが、最近ではハイドロキシアパタイト、コラーゲンなどの人工材料を使用した報告も散見されるようになった。一方環状切除（全周性切除）において大きな欠損部を再建する方法は確立しているとは言えず、人工気管の開発が急務と考えられる。共同研究者の中村らは、マーレックスメッシュ、ポリプロピレンステント及びコラーゲンスポンジからなる自己再生型人工気管を開発し、臨床応用されている。一方問題点としてはコラーゲンスポンジ表面の上皮化の遅延が挙げられる。そこで、今回われわれは自己再生型人工気管の内腔面に上皮層を作ることを目的とし、*in vitro*で人工材料の表面を気管上皮細胞層で被覆しその性状を評価した。作成した上皮細胞層は単層で密度としては正常な上皮層と比べ疎な状態であったが、免疫染色では Cytokeratin 14、Cytokeratin 18、Occulsin に陽性を示し気道粘膜上皮の性質を有すると考えられた。

A. 研究目的

共同研究者の中村らは、マーレックスメッシュ、ポリプロピレンステント及びコラーゲンスポンジからなる自己再生型人工気管を開発した。さらに臨床応用として共同研究者の大森らは甲状腺癌気管合併切除例に対してこの人工気管をパッチとして使用し、良好な結果を得ている。一方問題点としては気管内腔側に露出したコラーゲンスポンジ表面の上皮化の遅延が挙げられる。上皮化の遅延は感染のリスクを高め、さらには瘻孔形成などの深刻な状態に進展する可能性をはらんでいる。そこで上皮化促進を図るべく、すでに臨床応用された自己再生型人工気管の内腔面に上皮層を作ることを目的とし、*in vitro*で人工材料の表面を気管上皮細胞層で被覆しその性状を評価した。

B. 研究方法

1. SD 系ラットの気管を摘出し、4℃、24～48 時間プロテアーゼ処理を行い、気管上皮細胞を採取した。洗浄後 Penicillin G、Streptomycin、amphotericin B、及び 15% fetal bovine serum を添加した DMEM 培地で細胞懸濁液を作成した。豚腱由来の I A 型コラーゲン（Cellmatrix）に再構成用緩衝液を作用させ生じたコラーゲンをコラーゲンスポンジ上に重層化し、これを培養皿の底に留置して細胞懸濁液を満たし培養を行った。
2. 培養を経た人工材料及びラットの正常な気管につい

てパラフィン切片を作成し、H-E 染色及び気道上皮のマーカーである Cytokeratin 14 と Cytokeratin 18、tight junction の存在を示す Occulsin について免疫染色を行った。

C. 研究結果

HE 染色：人工材料の断面を観察したところコラーゲンスポンジ、コラーゲングル、気管上皮細胞層の 3 層構造が確認できた（図 1）。上皮細胞層は単層構造であった。線毛構造は確認できなかった。

免疫染色：人工材料上の上皮細胞層は正常な気管上皮細胞層と同様に Cytokeratin 14、Cytokeratin 18、Occulsin のいずれも陽性を示した（図 2、図 3、図 4）。

D. 考察

今回使用した自己再生型人工気管は 足場としてのコラーゲンメッシュにマーレックスメッシュとポリプロピレンステントで内腔保持必要十分な硬性と柔軟性を待たせ構造となっている。そのままの状態で移植した場合には気管内腔面にコラーゲンスポンジが露出し、上皮形成に必要な平面が得られにくい。コラーゲングルは従来から細胞培養の基材として利用されている素材であり、かつコラーゲンスポンジ上への重層が可能であったため本研究ではこれを採用した。

作成した上皮細胞層は単層で密度としては正常な上皮層と比べ疎な状態であった。細胞浮遊液中の細胞数、培養期間、増殖因子の添加など、より密な上皮細胞層を作

成するための条件についての今後検討が必要と考えられた。

Cytokeratin 14 と cytokeratin 18 は気道上皮やその他の上皮系細胞で陽性を示すことが知られており、また occludin は tight junction の存在を示唆しているとされている。今回の結果から人工材料上に作成した気管上皮細胞層は、免疫組織学的には気道粘膜上皮の性質を有すると考えられた。

今後は、人工材料を気管欠損モデル動物に移植し、移植細胞の正着の有無、上皮化への影響に関して in vivo にて評価を行う予定である。

E. 結論

1. 自己再生型人工気管に使用されているものと同等のコラーゲンスポンジの表面に、ゲルを介して気管上皮細胞層を作ることが可能であった。
2. 人工材料上に作成した気管上皮細胞層は、免疫組織学的には気道粘膜上皮の性質を有すると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 野本幸男、鈴木輝久、多田靖宏、三宅将生、挾間章博、金丸眞一、大森孝一：組織工学的手法による気管上皮細胞組織の作成. 第 56 回日本気管食道科学会 (2004. 11. 25-26)
- 2) 多田靖宏：<シンポジウム>気道の再生. 第 17 回日本喉頭科学会 (名古屋 2005. 3. 18-19)
- 3) 鈴木輝久、野本幸男、多田靖宏、三宅将生、挾間章博、金丸眞一、大森孝一：ラット気管上皮細胞組織の作成と気管損傷モデルへの移植. 第 17 回日本喉頭科学会 (名古屋 2005. 3. 18-19)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



图1 H-E 染色

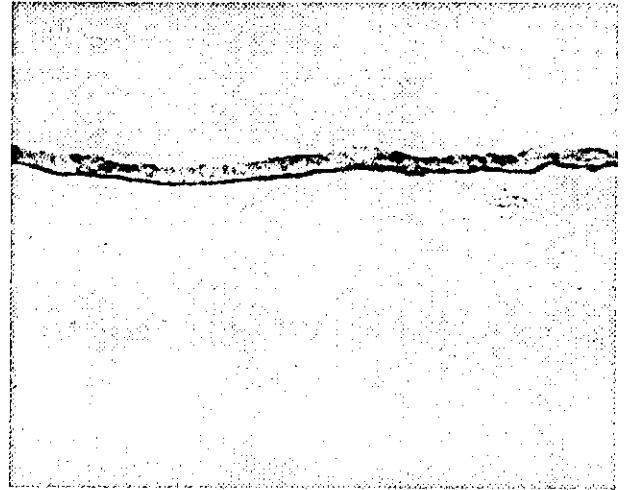


图4 occludin

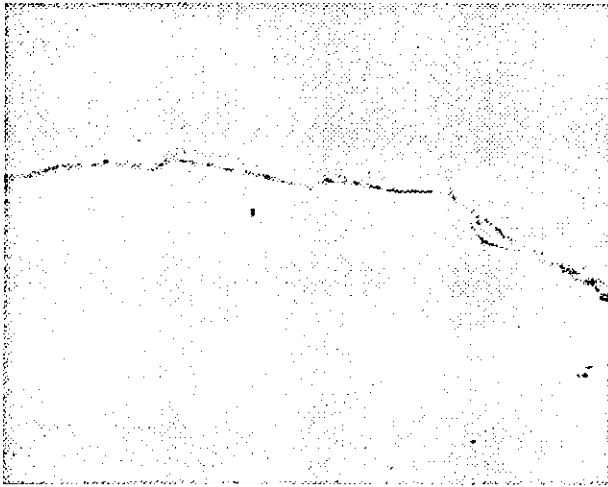


图2 cytokeratin14

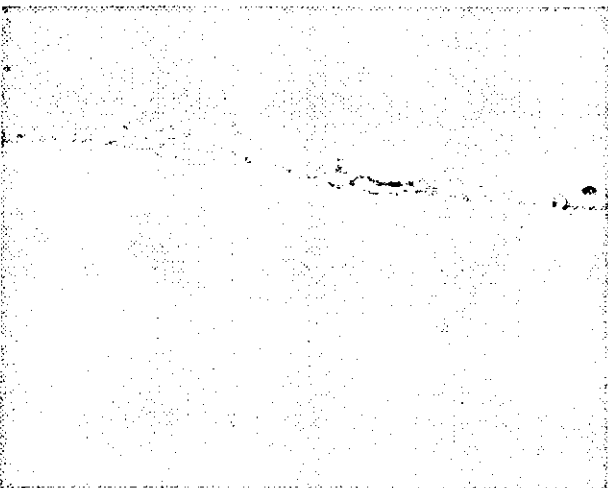


图3 cytokeratin18

ハイブリッド人工材料における培養ラット気道上皮細胞の性質： 免疫組織化学的手法を用いて

分担研究者 挟間章博（福島県立医科大学医学部生理学第一）
研究協力者 三宅将生（福島県立医科大学医学部生理学第一）

研究要旨

本プロジェクトで使用する培養細胞シートと生体内の気管上皮の間で、どの程度違いがあるのかを検討しておくことは、よりよい気道再生術を目指す上で重要である。よって本研究では、Na-K-ATPase、Occludin、PCNAの発現を単層培養上皮で免疫組織化学的に検討した。その結果、Na-K-ATPaseとOccludinは培養気道上皮細胞でも生体内と同様な発現が保たれていたが、PCNAに関しては生体内よりも強い発現がみられた。こうした結果から、培養細胞シートの多層化とそれに伴う細胞増殖能の秩序あるコントロールが培養細胞シートに求められるということが示唆された。

A. 背景

現在本プロジェクトでは人工材料上にシート状に培養した細胞で気道欠損部をカバーする方法を探っているが、どのような分化状態が細胞シートとして適切であるか、その培養条件を評価する必要がある。その際には正常気道上皮の構造や、物質透過などの機能に関与する分子が発現しているかどうかのポイントとなる。

B. 研究目的

本研究では、ラット正常気管で発現していた分子の培養気道上皮細胞における発現を確認することを目的とした。特にOccludinはTight Junctionに局在するタンパクで、細胞シートの形成を判断するのに適切と考えられる上に、気管で特徴的な発現を観察することができたので、分化マーカーとして有用である。また、ナトリウムポンプ(Na-K-ATPase)は物質の輸送能を推し量る上で有用で、PCNAは細胞増殖の指標となっている。

このように本研究では上記タンパクの培養気道上皮細胞における発現を免疫組織化学的に明らかにし、気道再生に用いる培養細胞シートがどの程度生体内に近いものか解明を試み、よりよい培養条件の探索へ寄与することを目的とした。

C. 研究方法

ラット気管組織を採取し、人工材料上に数日培養した（詳細は別章参照）。培養細胞は人工材料上に生着させた状態のまま4%パラホルムアルデヒド水溶液にて浸漬固定した。標本はエタノール系列（70%、80%、90%、95%、95%、99%、99%、99%：各60分）で脱水

後、キシレン（2時間x3回）を通し、パラフィン（2時間x4回）に包埋した。5 μ m厚の切片を作成し、キシレン（15分x3回）、99%エタノール（10分x3回）を通した後に、0.3%H₂O₂/メタノールで1時間インキュベートして内在性ペルオキシダーゼを失活させた。その後エタノール系列によって親水化させ、1% BSA/0.2% gelatin/0.05% saponin/ PBS(pH7.4)でブロッキングした後、各一次抗体と4℃でovernight反応させた。さらに0.1% BSA/0.2% gelatin/0.05% saponin/ PBS(pH7.4)で5分間3回洗浄し、ビオチン標識された二次抗体と室温で1時間反応させた。次に0.1% BSA/0.2% gelatin/0.05% saponin/ PBS(pH7.4)で5分間3回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識アビジン-ビオチン複合体を30分間反応させた。酵素発色の場合はTris/DAB（0.2mg/ml）/0.03%H₂O₂溶液で10分行い、対比染色はヘマトキシリンを用いた。染色後、エタノール系列、キシレンを通して封入し検鏡した。蛍光観察の場合はTexus Red-ストレプトアビジン溶液で20分間反応させたものを検鏡した。

一次抗体：

Anti-Na-K-ATPase マウスモノクローナル抗体、10000倍希釈
Anti-occludin: ウサギポリクローナル抗体（Santacruz社）、200倍希釈
Anti-PCNA: マウスモノクローナル抗体、3000倍希釈

D. 結果

気道培養細胞は現在の条件ではコラーゲン膜上で多層化せず、単層にとどまっていた。しかし、Occludinと

Na-K-ATPaseは培養気道上皮で発現していることを確認できた(図1、図2)。PCNAも培養細胞ではほとんどの細胞で陽性だった(図3)。

E. 考察

今回の結果から、気道上皮培養細胞は多層化する以前の単層の状態でも、上皮細胞に特徴的な細胞骨格や物質輸送能の一部が保たれていることが確認できた。またPCNA染色によると、それぞれの細胞は増殖能を失っておらず、この点で生体中の上皮細胞とは異なっていた。今後、培養細胞を多層化させた際に増殖能がどのように制御され、組織としての機能を果たすのかどうか興味深い。

F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

「ラット気道上皮細胞培養法の確立」参照。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

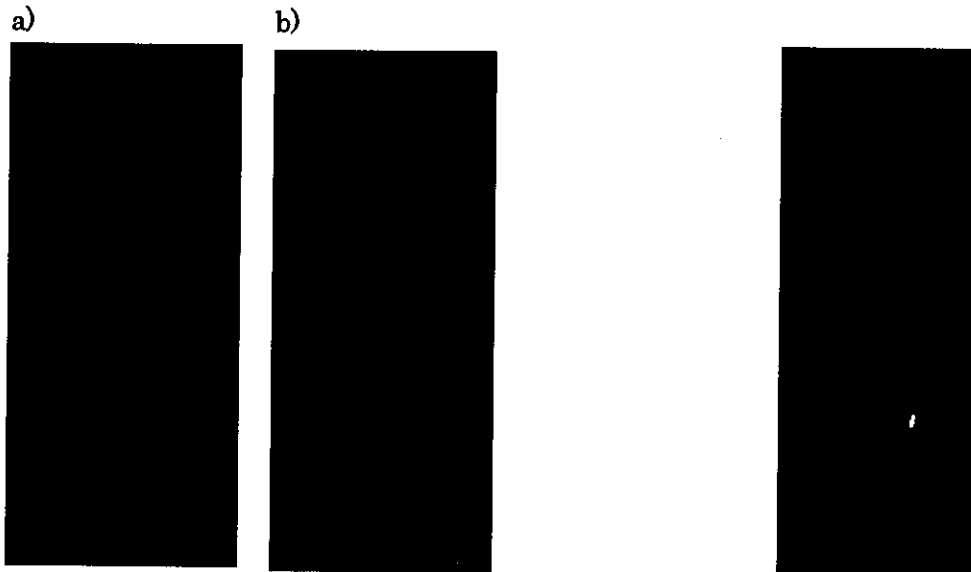


図1 Occludinの培養上皮細胞での発現 (200倍) 図2 Na-K-ATPaseの培養上皮細胞での発現 (200倍)
a) 明視野+蛍光、b) 蛍光のみ

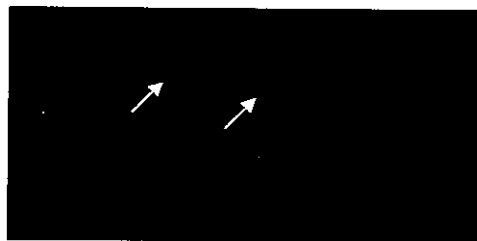


図3 PCNAの培養上皮細胞での発現 (200倍)

ラット気管における細胞骨格と物質輸送関連分子の免疫組織化学的解析

分担研究者 挾間章博（福島県立医科大学医学部生理学第一）

研究協力者 三宅将生（福島県立医科大学医学部生理学第一）

研究要旨

組織工学的手法による気道再建術の評価のためには、まずラット正常気管の構造や機能を明確にしておく必要がある。本研究では免疫組織化学的手法を用いて、細胞骨格・増殖・物質輸送に関わる分子の正常ラット気道でのタンパク発現を解析した。その結果、AQP3、Occludin、Cytokeratin14、Cytokeratin18、PCNAの発現を確認する事ができ、気道再生治療の効果を細胞の構造・機能といった側面から分析可能になった。

A. 背景

再生医療では形成術だけではなく、機能を回復させることが特に重視されるため、再生部位に対する機能評価法の確立は研究を進める上で重要となっている。組織の機能は個々の細胞が適切に分化することで発揮されるので、形態学的な手法によって分化度を解析し評価することが可能である。そのために正常気道上皮の構造や機能と関連した細胞分化マーカーの発現に関する情報が必要とされている。特に異物排出に関わる繊毛などの気道上皮に特徴的な構造や、物質透過といった機能に関与する分子は興味深い。

B. 研究目的

本研究ではこうした構造や機能に関連する分子のラット気管における発現の確認を目的とした。ケラチンは細胞骨格を形成することで知られているが、その種類は多岐に及び、組織や細胞の種類によって使い分けられている。Cytokeratin14はtype-Iのケラチンで、type-IIのケラチンであるCytokeratin5と4量体を形成して、主な上皮細胞の細胞骨格を形作っている。

OccludinはTight Junctionに局在するタンパクで、4個の膜通過ドメインを持ち、裏打ちタンパクであるZO-1などと結合してTight Junctionを介する物質輸送や生体防御に関与している。

また、細胞膜を介した物質輸送では上皮性ナトリウムチャネル(ENaC:ナトリウムイオンを輸送)、クロライドチャネル(CIC:塩素イオンを輸送)、アクアポリン(aquaporin:水分子を輸送)などが知られていて、気道上皮への適切な温度の供給に用いられるなど、呼吸器分野での生理的な意義も大きい。さらに、PCNAは主にS期の細胞の核に存在するタンパクで、DNAの複製に関与しているため、細胞増殖の指標として広く用いられている。

このように本研究では上記タンパクの正常ラット気管にお

ける発現を免疫組織化学的に明らかにし、上皮における増殖・分化・物質輸送の動態を理解を深めることで気道再生法の評価と改善に寄与することを目的とした。

C. 研究方法

ラット気管組織を採取し、4%パラホルムアルデヒド水溶液にて浸漬固定した。標本はエタノール系列(70%、80%、90%、95%、95%、99%、99%、99%:各60分)で脱水後、キシレン(2時間×3回)を通し、パラフィン(2時間×4回)に包埋した。5 μ m厚の切片を作製し、キシレン(15分×3回)、99%エタノール(10分×3回)を通した後に、0.3% H_2O_2 /メタノールで1時間インキュベートして内在性ペルオキシダーゼを失活させた。その後エタノール系列によって親水化させ、1%BSA/0.2%gelatin/0.05% saponin/ PBS(pH7.4)でブロッキングした後、各一次抗体と4 $^{\circ}C$ でovernight反応させた。さらに0.1%BSA/0.2%gelatin/0.05% saponin/ PBS(pH7.4)で5分間3回洗浄し、ビオチン標識された二次抗体と室温で1時間反応させた。次に0.1%BSA/0.2%gelatin/0.05% saponin/ PBS(pH7.4)で5分間3回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識アビジン-ビオチン複合体を30分間反応させた。酵素発色の場合はTris/DAB(0.2mg/ml)/0.03% H_2O_2 溶液で10分を行い、対比染色はヘマトキシリンを用いた。染色後、エタノール系列、キシレンを通して封入し検鏡した。蛍光観察の場合はTexus Red-ストレプトアビジン溶液で20分間反応させたものを検鏡した。

一次抗体:

Anti-cytokeratin14: マウスモノクローナル抗体 (Chemicon社)、200倍希釈

Anti-cytokeratin18: マウスモノクローナル抗体 (Chemicon社)、200倍希釈

Anti-ENaC \cdot alpha: ウサギポリクローナル抗体 (Sigma社)、200倍希釈

Anti-occludin: ウサギポリクローナル抗体 (Santacruz社)、
200倍希釈

Anti-AQP3: ウサギポリクローナル抗体 (オーフス大学
Nielsen教授より分与)、2000倍希釈

Anti-ClC-3: ウサギポリクローナル抗体 (Sigma社)、200倍
希釈

Anti-PCNA: マウスモノクローナル抗体、3000倍希釈

D. 結果

図1、図2、図3、図4に示すように、Cytokeratin14、
Cytokeratin18、OccludinとClC-3は気道上皮に発現している
ことを確認できた。AQP3は気道上皮細胞の基底部で強く発現
していた(図5)。また、ENaC \cdot alphaは繊毛細胞に発現がみ
られたが、特にapical plasma membraneで染まっていた(図
6)。PCNA陽性細胞は基底膜下の細胞では数多くみられたが、
上皮細胞側ではあまりみられなかった(図7)。

E. 考察

今回の免疫染色によって、アクアポリン、ナトリウムチャネ
ル、Occludinの発現を確認することができた。これらによって、
気道再生治療が水・イオン輸送へ及ぼす影響や輸送能の獲得
に関して、細胞膜上のチャネルを介した経路とタイトジャン
クションを介した経路の両方で解析できる準備が整った。

また、ラット気道上皮でのCytokeratin14とCytokeratin18の存在
を同定した。さらにPCNA染色によると、基底膜下の細胞は増
殖していることが推測されたが、上皮細胞ではあまり活発な
増殖はみられなかった。

F. 結論

今回解析した分子の発現動態を培養気道上皮細胞や再生治
療中の気道で比較することによって、どの程度本来の気道の
構造や機能を保持・獲得しているかについて分析可能になっ
た。

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

「ラット気道上皮細胞培養法の確立」参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



図1 気管におけるcytokeratin14の発現 (200倍)



図2 気管におけるcytokeratin18の発現 (200倍)

a)



図3 気管におけるOccludinの発現 a) 100倍 b) 400倍

b)



図6 気管におけるENaC-alphaの発現 (200倍)

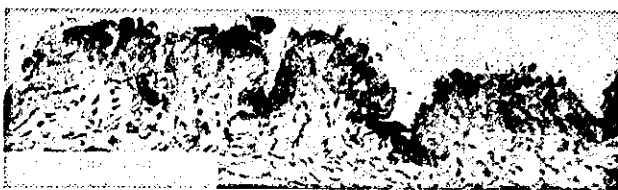


図4 気管におけるClC-3の発現 (200倍)



図5 気管におけるAQP3の発現 (200倍)



図7 気管におけるPCNAの発現 (200倍)

気管欠損モデルへのハイブリッド型人工材料の移植

主任研究者 大森孝一（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）
研究協力者 鈴木輝久（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）
野本幸男（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）

研究要旨

気管の再建方法として自家組織の他、最近では人工材料も使われつつある。大森らはコラーゲンスポンジとコラーゲンメッシュからなる人工気管による再建を行い臨床応用にまで至っている。問題点は露出したコラーゲンスポンジ上での上皮化の遅延が挙げられる。

われわれは組織工学的手法を用いコラーゲンスポンジ表面を上皮細胞層で被覆することで上皮化促進できないかと考え、コラーゲンスポンジ（CS）上にコラーゲンゲル（CG）を重層化し GFP 遺伝子改変導入ラット気管上皮細胞で被覆したものと CS を KOKEN 社製組織培養用コラーゲン膜（cellgen）で被覆し、さらに cellgen を GFP 遺伝子改変導入ラット気管上皮細胞で被覆したもの（GFP+cellgen+CS）の 2 種類の移植片を作製した。免疫組織学的に移植片は気管粘膜上皮の性質を有することを確認した。気管欠損モデルに同移植片を移植後、欠損部位が上皮化するまでの間、移植片上の GFP 標識気管上皮細胞が残存することが確認できた。

A. 研究目的

大森らは奥村らと同様の素材を用い甲状腺癌気管合併切除例に対するパッチによる再建を行い臨床応用にまで至っているが、問題点としては露出したコラーゲンスポンジ上での上皮化の遅延が挙げられる。経過中、創治癒不全に移行する可能性があり、その解決方法としてコラーゲンスポンジ表面を上皮細胞層で被覆し上皮化促進についてラット気管損傷モデルを作成し検討を行った。

B. 研究方法

気管再建材料として①、コラーゲンスポンジ（CS）上にコラーゲンゲル（CG）を重層化し GFP 遺伝子改変導入ラット気管上皮細胞で被覆したもの（GFP+CG+CS）②、CS を KOKEN 社製組織培養用コラーゲン膜（cellgen）で被覆し、さらに cellgen を GFP 遺伝子改変導入ラット気管上皮細胞で被覆したもの（GFP+cellgen+CS）上記①または②を材料とし、再建術後 3、7、30 日後に病理組織学的に評価検討した。

a、*in vitro* での移植片の作成。（①、②）

- 1) 9W 齢 SD 系ラット、9W 齢 SD 系 GFP 遺伝子改変導入ラットの気管を摘出しプロテアーゼ処理を行い、細胞を分離。
- 2) 牛血清加培養液にて継代培養を経た細胞の懸濁液を作成。
- 3) コラーゲンスポンジ上にコラーゲンゲルを重層化したもの、CS を KOKEN 社製組織培養用コラーゲン膜（cellgen）で被覆したものを準備し、この上に細胞懸濁液を満たし培養して再建材料を作製。
- 4) 同移植片の標本を作製し免疫染色で気道上皮のマ-

ーカーであるサイトケラチン 14（図 1）とサイトケラチン 18（図 2）が陽性であることを確認した。

b、次に下記の手順で気管損傷モデルを作製した。

- 1) 9W 齢 SD 系ラットにペントバルビタール（ネプターール®）25mg/kg を尾静脈より注射し、全身麻酔を行う。
- 2) 頸部正中切開にて気管を露出。第 2、3、4 気管輪に電気メスを用い 5mm 大の気管損傷を作成。（図 3）
- 3) 同気管損傷モデルに前記①②の材料を用いた再建モデルを作成。

①、②の再建材料を損傷部位に被覆（図 4）、前頸筋群、皮膚をそれぞれ縫合した。大腿筋に ABPC 100mg/Kg を筋注。

c、標本作製

- 1) ペントバルビタールナトリウム（ネプターール®）を 25mg/kg を尾静脈よりし静注し腹部大動脈から脱血死亡させ、喉頭気管を摘出し（図 5、6）10%ホルマリンにて固定したのち 10%ホルマリン+10%蟻酸にて脱灰し標本とする。
- 2) 摘出標本をパラフィン包埋し組織切片を作製する。
- 3) ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行い、顕微鏡下に観察し病理組織学的に評価する。
- 4) 抗 GFP 抗体にて免疫染色を行い、レーザー顕微鏡にて観察し病理組織学的に評価する。

C. 研究結果

移植後 3 日ではいずれの系でも気管の上皮化は不十分であった。（図 7）炎症細胞の浸潤が気管欠損部周囲に認められた。

移植後7日で、気管上皮の再生が認められた。(図8)
①、②いずれの系でも被覆部位に蛍光顕微鏡下に GFP 陽性細胞が確認された。また、欠損部は炎症細胞とあわせ血管の増生、一部器質化も認められた。

移植 30 日はいずれの系でも気管損傷部位に上皮の再生が確認された。(図9) 気管軟骨の再生は確認できなかったが、上皮下には器質化した組織が確認された。

D. 考察

in vivo として、ラットの気管損傷部位に GFP 標識気管上皮・コラーゲンゲル・コラーゲンスポンジからなる移植片と GFP 標識気管上皮・コラーゲン膜・コラーゲンスポンジからなる移植片を充填したところ、上皮化するまでの期間、損傷部位に上皮細胞が残存することが確認できた。免疫組織学的には、作製した気管上皮細胞層は気道粘膜上皮の性質を有していた。本手法が上皮化促進にどの程度寄与するかの評価について、今後より大きな気管損傷モデルでの治癒比較が必要と考えられた。

E. 結論

気管再建材料として①コラーゲンスポンジ(CS)上にコラーゲンゲル(CG)を重層化し GFP 遺伝子改変導入ラット気管上皮細胞で被覆したもの (GFP+CG+CS) ②CS を KOKEN 社製組織培養用コラーゲン膜 (cellgen) で被覆し、さらに cellgen を GFP 遺伝子改変導入ラット気管上皮細胞で被覆したもの (GFP+cellgen+CS) の 2 種類の移植片を作製した。作製した移植片①、②はいずれも免疫組織学的に気管粘膜上皮の性質を有した。気管欠損部位に移植片①、②を移植後、欠損部位が上皮化するまでの間、移植片上の GFP 標識気管上皮細胞が残存することが確認できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 多田靖宏：<シンポジウム>気道の再生. 第 17 回日本喉頭科学会 (名古屋 2005. 3. 18-19)

2) 鈴木輝久、野本幸男、多田靖宏、三宅将生、挾間章博、金丸眞一、大森孝一：ラット気管上皮細胞組織の作成と気管損傷モデルへの移植. 第 17 回日本喉頭科学会 (名古屋 2005. 3. 18-19)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

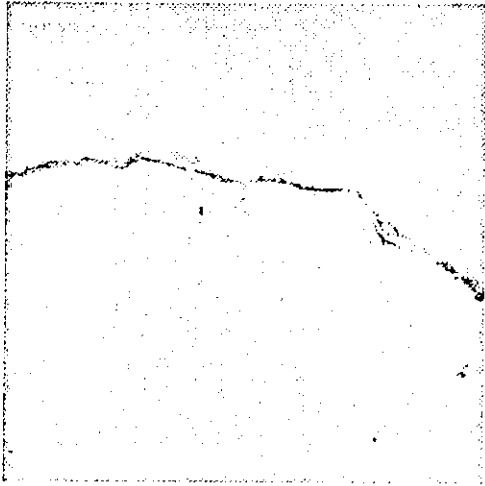
なし

2. 実用新案登録

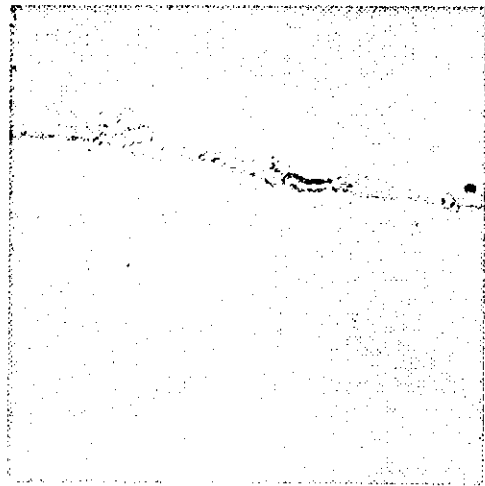
なし

3. その他

なし



(図1 CK14)



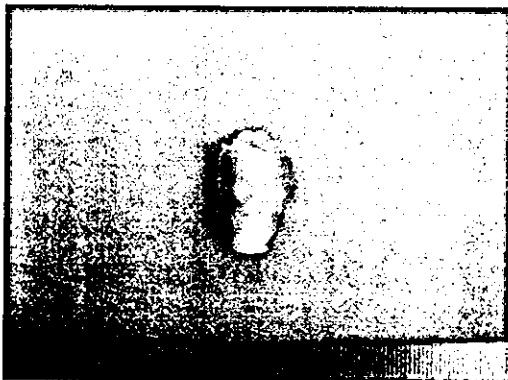
(図2 CK18)



(図3 気管損傷)



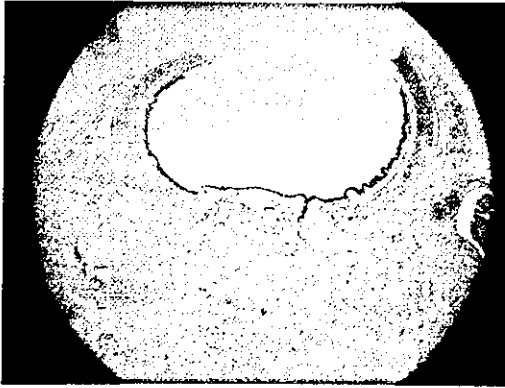
(図4 損傷部位を再建材料で被覆)



(図5 摘出喉頭気管1)



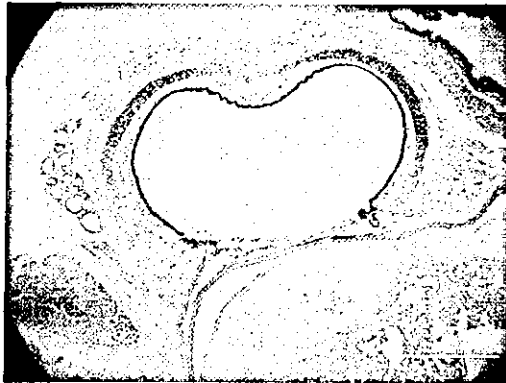
(図6 摘出気管喉頭2)



(図7 移植後3日 ①モデル弱拡大)



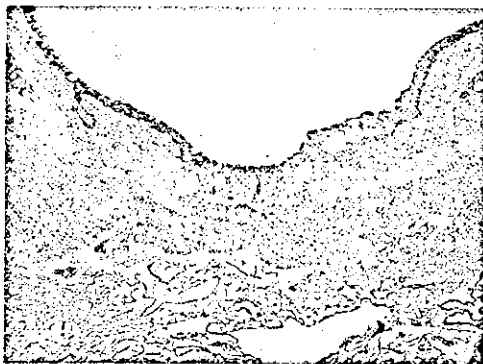
(図7 移植後3日 ①モデル強拡大)



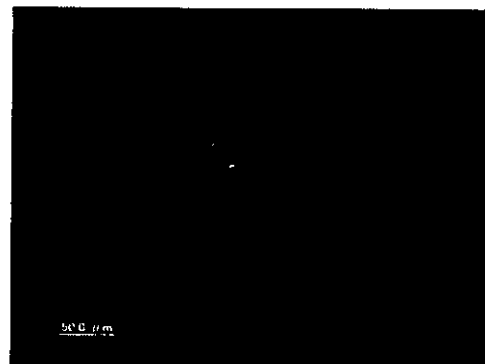
(図7 移植後3日 ②モデル弱拡大)

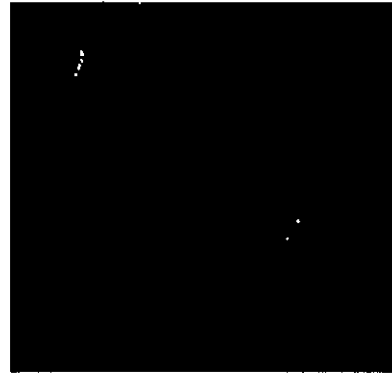
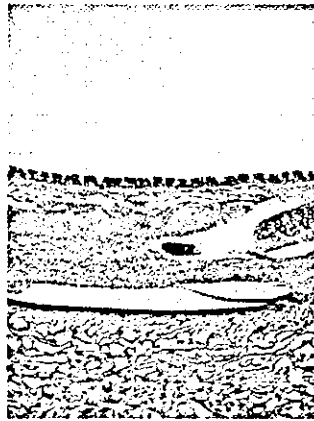
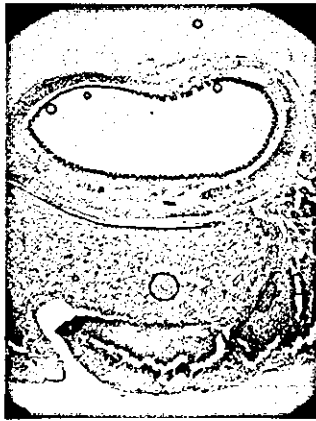


(図7 移植後3日 ②モデル強拡大)

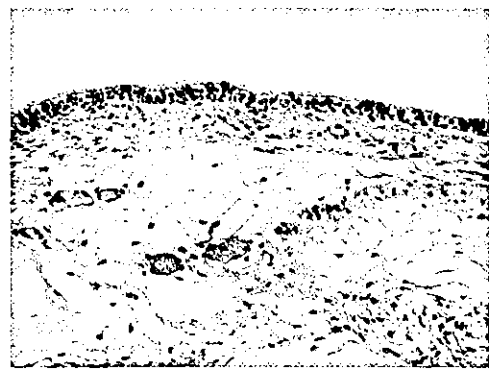


(図8 移植後7日 ①モデル 右HE染色、左蛍光染色 緑：GFP細胞、青：核染色)



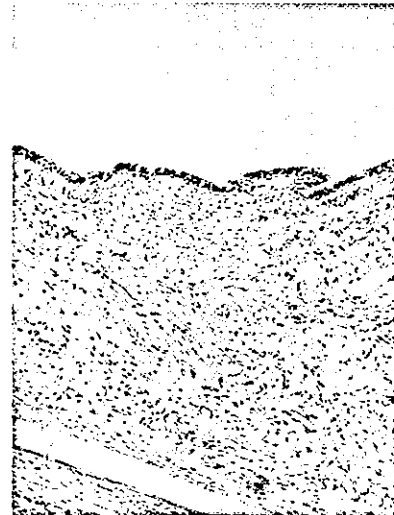


(図8 移植後7日 ②モデル 右、中 HE 染色、左蛍光染色 緑：GFP 細胞、赤：核染色)



(図9 移植後30日①モデル 弱拡大)

(図9 移植後30日①モデル 強拡大)



(図9 移植後30日②モデル 弱拡大)

(図9 移植後30日②モデル 強拡大)

組織工学の手法を用いた末梢気道の再生治療

分担研究者 中村達雄（京都大学再生医科学研究所臓器再建応用分野）
研究協力者 森野茂行、福田正順、田尾裕之、中田 顕、河南里江子、
小林丈士、吉谷 信、早川克己、野田澤俊介、瀧川敏算、
東 高志、堤 定美
（京都大学再生医科学研究所、京都大学大学院工学研究科）

研究要旨

気道は中枢の気管と末梢の気管支・細気管支によって構成されるが、外科的な再生（再建）は気管支までが対象になる。気管支よりさらに末梢の細気管支や肺泡レベルの再生は内科治療の対象である。本研究では末梢気道を増殖因子として bFGF を用いて Tissue Engineering の手法で再生させる治療法の開発を目指している。

A. 研究目的

慢性閉塞性肺疾患（COPD）とは、完全には可逆的ではない気流制限により特徴付けられる病的状態である。気流制限は、通常進行性で、吸入された有害な粒子やガスに対する肺の異常な炎症反応が伴っている病態である。気流制限は吸い込まれた有害なガスの量や、末梢気道の炎症反応により生じる肺実質破壊の程度により起こる。正常人でも気流制限はさまざまな程度で起こりうる。WHO と世界銀行が行った Global Burden of disease Study による 1990 年の世界有病率は、1000 当たり男性 9.34、女性 7.33 である。現在増加傾向にあり 1990 年の死因の第 6 位から、2020 年には第 3 位に上昇する予測である。日本においても、現在約 5 万人がこの疾患により在宅酸素療法を受けている。2001 年に発表された肺疾患疫学調査研究会が行った調査によると、COPD は本邦において、未治療の患者を含めると、推定患者数は 530 万人で現在も増加傾向にある疾患である。治療法としては現在のところ酸素吸入療法以外には有効な治療法はなく、この病態の進行を遅らせる手立てもないのが現状である。肺気腫に対して、Volume reduction surgery や肺移植術が行われ初めている。手術侵襲や周術期の合併症を乗り越えた症例では、その効果は多大なものである。しかし多くの肺気腫症例では全身状態が非常に悪化していることが多く、全身麻酔自体が大きな危険を伴うため、手術治療成績は満足できる物ではない。COPD では呼吸細気管支壁と肺泡壁が破壊され、肺泡が拡張して呼気が十分に行えない。

また肺泡拡張により肺動脈圧の上昇が認められ、肺動脈圧の上昇は VQ shunt の増加を伴い換気効率を悪化させる。肺泡の再生を誘導させることができれば、根治的な治療になると考えられる。既に、分化能力の高い骨髄由来細胞を用いた治療が試みられている。しかし成人において一度壊れた肺泡の構造的、組織学的

再生は難しく、組織学的に再生した論文の再動物実験では組織学的再生が得られないなどの報告もあり、今後さらなる検討が必要と考えられる。

もうひとつ臨床応用への可能性を持つ治療的方法として、細胞増殖因子を用いて再生を誘導させることが考えられる。例えば、血管新生増殖因子を用いて血管新生を促し、肺動脈圧を低下させ VQ shunt を改善せしめ、ひいては換気効率の改善をもたらす。また血流増加により鍵となる細胞をその部位に誘導するか、あるいは血流により再生に必要な液性因子を供給し、その結果として肺泡の再生を促進することにより、壊れた肺泡構造の組織学的再生を促進し COPD の症状を改善させることが可能であると考えられる。このような血管新生増殖因子の例としては、線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF)、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、トランスホーミング増殖因子 (TGF)、Matrix Metalloproteinases inhibitor (MMP Inhibitor)、アンジオポエチン、アンジオスタチン、アドレノメジュリン、インターロイキン、ケモカインなどの生理活性タンパク質およびペプチド、ならびにプロスタグランジンなどの生理活性低分子物質などが挙げられ、現在検討を繰り返されている。

B. 肺気腫に対するグロースファクターの有効性

Massaro らは 1997 年エラスターゼを投与して作成した肺気腫モデルラットに対して、All trans retinoic acid (ATRA) を腹腔内投与により、組織学的に一部改善することを報告した。その後、ATRA による検討は呼吸器だけではなく多臓器においても検討されたが、2003 年 Adult FVB マウスにおいては retinoic acid は肺泡再構築に影響を及ぼさないという報告がなされた。MMP Inhibitor がタバコ吸引性肺気腫モデルの炎症反応を抑制し肺気腫予防に効果があったとす

る報告もなされている。

我々は線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF) の経気道的投与が肺気腫により低下した呼吸機能を改善するかについて検討を行っている。bFGF は、繊維芽細胞 (3T3) の増殖を促進する因子として最初に下垂体および脳から同定された成長因子である。bFGF は、種々の組織および臓器において、血管新生、平滑筋細胞成長、創傷治癒、組織修復、造血、神経細胞の分化等の多岐にわたる機能を有することが見いだされている。最も強力な血管新生因子のひとつである bFGF は、呼吸器臓器において肺胞上皮細胞、基底膜、細胞外マトリックスに存在し、肺実質および気管支の発生、分化に関与する。現在、心筋梗塞、慢性下肢動脈閉塞症、褥瘡などの治療薬として臨床応用され始めている。

C. 研究方法

ビーグル犬 15 匹 (体重 9~14kg) を用い 1) control group、2) FGF(-) group、3) FGF(+) group に分けた。肺気腫モデルは FGF(-) group、FGF(+) group に対して行った。動物用麻酔薬を皮下注射して全身麻酔した。気管内挿管行い気管支鏡を左気管支に挿入した。豚豚エラストーゼ 50mg (3750 単位) を生理食塩水 5ml に溶解し、噴霧カテーテルを末梢気管支までもって行き、10 回に分けて左肺全体に散布した。散布後 28 日を経過したものを左肺肺気腫モデルとして利用した。右肺を正常肺と比べて比較を行った。

グロースファクターの作用時間、作用効果を増幅させる目的で、ゼラチンマイクロ粒子を Drug delivery system (DDS) として用いた。bFGF 200 μ g をゼラチンマイクロ粒子 (粒子平均径 10 μ m) に含有させたものを生理食塩水 5ml に攪拌し、FGF(+) group の左肺に、気管支鏡を使い左肺全体に 10 回に分けてびまん性に散布した。FGF(-) group にたいしては bFGF を含有しないゼラチンマイクロ粒子のみを経気道的に散布した。bFGF による治療の前後での変化を見るべく、動脈血液ガス分析、MRI による相対的血流を測定し比較した。

D. 研究結果

1. MRI

MRI を使用し、ビーグル犬を全身麻酔した後、仰臥位で撮影する。右内頸動脈に静脈ルートを確保し、ガドリニウム造影剤を注入すると約 3 秒後より肺内血管が造影され、造影効果により、MRI の信号値が高くなる。MRI の信号値は造影剤投与後において血流量に比例するため、血流量が多い部位ほど信号値は高くなる。肺動脈の血流量には個体差があるため、その個体差をなくすべく、投薬した左肺を正常の右肺で代わった MRI 信号値の左右比で比較した。ガドリニウム造影剤 3ml 注入後 MRI の撮影を開始した。造影剤を注入後約 60 秒にわたり、170 枚の冠状断面を撮影し、肺実質の限局した区域の信号値を連続的に測定し、グラフ化した。

結果を図 1-4 に示す。肺血管 3 次元立体構成像 (図 1) において、エラストーゼの投与量の増加に伴い、肺血管陰影の損傷、欠損が増強していた。重度肺気腫

モデルにおいては、左肺の血管陰影の欠損や減衰が、視覚的に明らかに認められた。これらの結果はエラストーゼの用量依存性に肺気腫モデル (軽症肺気腫モデルのエラストーゼ投与量は 750U、重症肺気腫モデルのエラストーゼ投与量は 3000U) の重傷度が変化することを示唆する。Dynamic contrast-enhanced MRI 冠状断面像を図 2 に示す。ガドリニウム造影剤を投与後、上大静脈、右心房、右心室、肺動脈、肺実質、肺静脈、大静脈の順に時間を追って造影されるのが確認できた。肺実質での造影効果は、造影剤投与後 20 秒前後にピークを認めた。(A) エラストーゼ投与前のモデルでは、左肺実質と右肺実質の造影効果に左右差はなかった。(B) エラストーゼ投与後モデルでは左肺の造影効果が低下しており、明らかな左右差を認めた。左右差は約 15~20 秒後に最も強かった。(C) bFGF 治療モデル [FGF(+) group] においては、低下していた左肺の造影効果が改善しており、右肺の造影効果に近似していた。これらの冠状断面像の肺実質領域をプロットし 60 秒間の信号強度をグラフ化したものが図 3 である。(A) エラストーゼ投与前のモデルでは左肺実質と右肺実質の信号強度に差はなく左右信号強度比率は 0.99 ± 0.02 であった。(B) エラストーゼ投与後モデルでは、左肺の信号強度の低下が見られた。信号値のピーク時である 20 秒前後の低下は著しかった。信号強度比率 0.70 ± 0.07 。(C) bFGF 治療モデルにおいては左肺信号値の改善が認められ、右肺信号値に近づいた。信号強度比率 0.88 ± 0.06 (図 4B)。bFGF を含有しないゼラチンマイクロ粒子のみの投与群 (コントロール群) では信号強度比率は 0.69 ± 0.05 であり信号値の改善は認められなかった。これらの結果は bFGF 投与により、投与領域血流の有意な改善を示した ($P=0.004$)。また条件を一定にした mechanical ventilation 下の換気条件 ($FiO_2=0.2$, Tidal volume=18.0ml/kg, I:E=1:2, Respiratory rate=10/min) で測定した血液ガス分析でも、bFGF 治療モデルにおいて改善を認めた (図 4A)。

2. 組織学的検索

エラストーゼの経気道的投与により、肺容積、胸郭体積は増大する。(図 5)。これらの結果は他の多くの動物実験でも同様の結果が認められており、生体内で起こる代償的变化と考えられる。人間の生体内でも同様の变化が初期の肺気腫では起こると考えられ、全肺気量増大、barrel chest などに代表される肺気腫性変化に近似している。さらにエラストーゼ経気道投与量や投与回数を増やすと、胸郭体積の代償的増大は、やがて起こらなくなり末期の肺気腫に似た病態になると考えられるが、動物ではコミュニケーションを親密にとることは難しく、人間に行えるような集約的治療が困難なため、全肺気量が低下してくるほど重症の動物モデルを作成するのは非常に困難であると考えられる。肺容積は bFGF 治療モデル [FGF(+) group] において、減少し正常化してくる。

平均肺胞径 (linear intercept) はエラストーゼの暴露部、投与量に比例し増大してくる (図 5B)。これらの変化は、エラストーゼによる肺胞隔壁の破壊に伴

うものであり、組織学的標本で確認できる(図6)。これら平均肺胞径増大や肺容積増大した所見が、bFGF治療モデルでは、改善をみとめ正常化してきている。しかし、今回我々の組織学的標本で一度壊れた肺胞の構造的、組織学的再生が起こっているとは考えにくかった。おそらく細胞間マトリックスにおいて、多くのグロースファクターや生理活性物質が複雑に相互作用し、細胞再生や分化誘導を引き起こしていると考えられるため、bFGF単剤において、細胞再生や肺胞隔壁を新しく作り出すのは困難である。しかしbFGFなどの生体内投与により、少なからず何らかの変化を生体内に引き起こすと考えており、そのようなグロースファクターの細胞や生体内にたいする影響や、作用をひとつひとつ解明していくことが、細胞を分化誘導し生体内で再生できうることに繋がると考えている。今回の実験で病変部での血流を改善することにより、組織において再生に必要な液性因子の供給が可能であると考えている。

E. 考察

肺気腫に対する、bFGFの経気道的投与により投与された肺実質内に明らかな血流量の増加を認めた。それらの血流増加は肺気腫により低下した呼吸機能の改善を引き起こした。しかし今回の研究で一度壊れた肺胞の構造的、組織学的再生が起こっているとは考えにくかった。今回の実験で病変部での血流を改善することにより、組織において再生に必要な液性因子の供給が可能になると考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamura, T., Inada, Y., Fukuda, S., Yoshitani, M., Nakada, A., Itoi, S., Kanemaru, S., Endo, K., Shimizu, Y.: Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube. *Brain Research*. 1027: 18-29 (2004)
- 2) Nakamura, T.: Regenerative medicine for respiratory diseases. *JMAJ. (Japan Medical Association Journal)* 47: 333-337 (2004)
- 3) 中村達雄: 人工気管。「先端医療シリーズ 26 呼吸器外科 呼吸器外科の最新医療」(末舂恵一、人見滋樹: 監修者、加藤治文、小林絃一、近藤 丘、清水信義、白日高歩、和田洋巳 編、厚徳社) 62-65 (2004)
- 4) 中村達雄: 神経誘導管(人工神経). *高分子*. 53:154 (2004)
- 5) Takahashi, M., Nakamura, T., Toba, T., Kajiwara N., Kato, H., Shimizu, Y.: Transplantation of endothelial progenitor cells into the lung to

alleviate pulmonary hypertension in dogs. *Tissue Engineering*. 10: 771-779 (2004)

- 6) 森野茂行、福田正順、中村達雄: 再生医療と画像診断-失われた機能の再生をめざして-大型動物モデルの生体モニタリング. *映像情報 Medical*. 36: 821-825(2004)
 - 7) 中村達雄: 気道の再生. *呼吸と循環*. 53: 119-125 (2005)
 - 8) 森野茂行、鳥羽紀成、高橋 充、永安 武、中村達雄: 肺気腫のグロースファクターによる治療. *呼吸と循環*. 53: 141-147 (2005)
- #### 2. 学会発表
- 1) 森野茂行、中村達雄、鳥羽紀成、高橋 充、永安武、櫛引俊宏、田畑泰彦、吉谷 信、清水慶彦: 肺気腫: グロースファクターによる治療. 第44回日本呼吸器学会学術講演会 (2004.3.31-4.2 東京)
 - 2) Morino, S., Nakamura, T., Toba, T., Takahashi, M., Nagayasu, T., Yoshitani, M., Shimizu, Y.: Basic fibroblast growth factor induces recovery of pulmonary blood flow in the canine emphysema models: Quantitative assessment using dynamic contrast-enhanced MRI. *American Society for Artificial Internal Organs, 50th Anniversary Conference* (2004.6.17-19 Washington, DC)
 - 3) 森野茂行、中村達雄、鳥羽紀成、高橋 充、永安武、東 高志、堤 定美、櫛引俊宏、田畑泰彦、吉谷 信、清水慶彦: 徐放性線維芽細胞増殖因子を用いた肺機能再生に関する検討. 第25回日本炎症・再生医学会 (2004.7.13-14 東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Figure 1

Three dimensional MRI in the pulmonary vascular

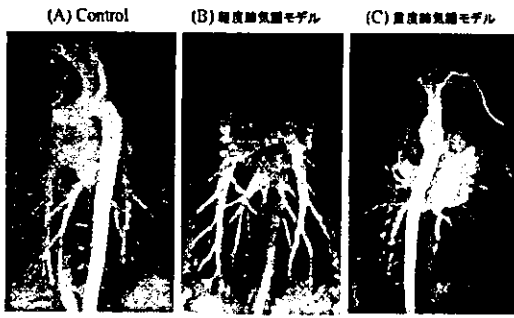


Figure 4

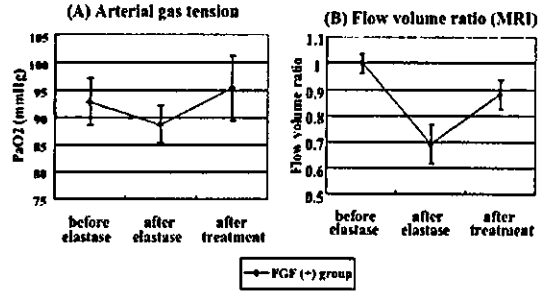


Figure 2

dynamic contrast enhanced MRI

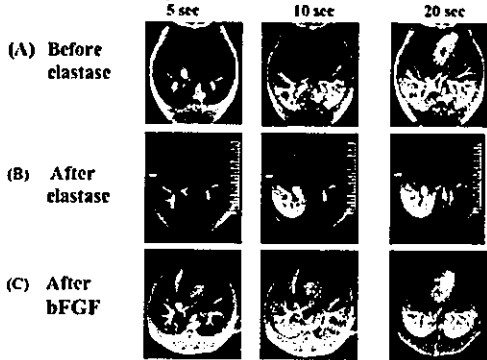


Figure 5

Histological findings

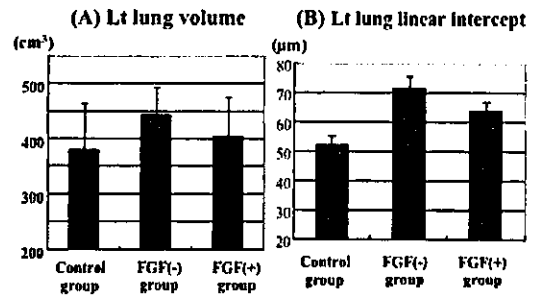


Figure 3

Signal intensity curve during 60 seconds

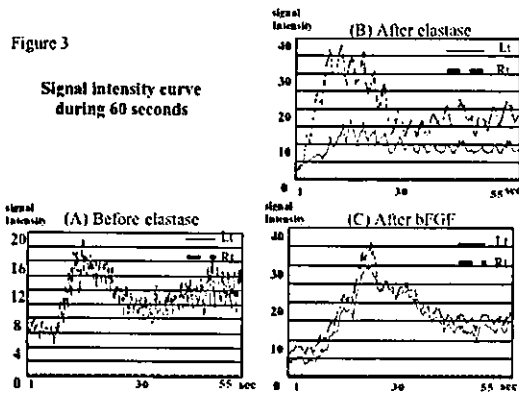
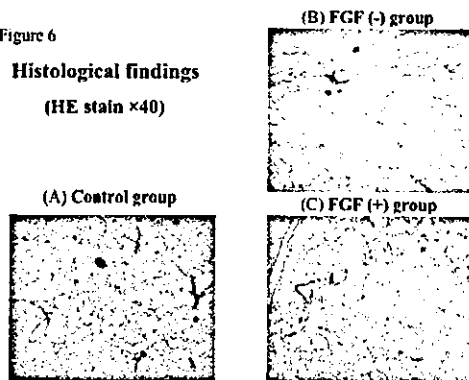


Figure 6

Histological findings (HE stain ×40)



※図の説明

図 1) 肺血管 3 次元立体構成像 : (A) Control group、(B) 軽度肺気腫モデル (エラスターゼ投与量: 750 U)、(C) 重度肺気腫モデル (エラスターゼ投与量: 3000 U)。エラスターゼの投与量の増加に伴い、肺血管陰影の損傷、欠損が増強していた。重度肺気腫モデルにおいては、左肺の血管陰影の先細りや減衰が、視覚的明らかに認められた。

図 2) Dynamic contrast-enhanced MRI 冠状断面像: (A) エラスターゼ投与前モデル、(B) エラスターゼ投与後モデル、(C) bFGF 治療モデル。ガドリニウム造影剤を投与後、上大静脈、右心房、右心室、肺動脈、肺実質、肺静脈、大静脈の順に時間を追って造影される。エラスターゼ投与前モデルでは、左肺実質と右肺実質の造影効果に左右差はなかった。エラスターゼ投与後モデルでは左肺の造影効果が低下しており、明らかな左右差を認めた。左右差は 20 秒前後に最も強かった。bFGF 治療モデルにおいては、低下していた左肺の造影効果が改善されている。

図 3) Signal intensity versus 60 s time curve: (A) エラスターゼ投与前モデル、(B) エラスターゼ投与後モデル、(C) bFGF 治療モデル。エラスターゼ投与前モデルでは左肺実質と右肺実質の信号強度に差はなかった。エラスターゼ投与後モデルでは、左肺の信号強度の低下が見られた。信号値のピーク時である 20 秒前後の低下は著しかった。bFGF 治療モデルにおいては左肺信号値の改善が認められ、右肺信号値に近づいた。

図 4) (A) 動脈血液ガス分析 : FGF(+) group ではエラスターゼ投与により悪化した PaO₂ が bFGF 治療により改善した。(B) MRI 信号値左右比 : エラスターゼ投与により、左肺の信号値が低下したため左右比は低下している。bFGF 投与後により左肺の信号強度は改善され、左右比が上昇している。

図 5) 組織学的比較: (A) 肺容積 : FGF(-) group ではエラスターゼ投与により左肺容積が上昇している。FGF(+) group ではエラスターゼにより上昇した左肺容積が bFGF 治療により減少し正常化している。(B) 平均肺胞径 (linear intercept) : FGF(-) group ではエラスターゼ投与量により左肺の肺胞径が拡大している。FGF(+) group では、エラスターゼ投与により拡大した肺胞径が縮小正常化している。

図 6) 組織学的所見 HE 染色×40: (A) Control group、(B) FGF(-) group、(C) FGF(+) group。