

気管線維芽細胞が気管上皮細胞に及ぼす影響

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 小林 謙（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）

鈴木 輝久（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）

研究要旨

コラーゲンスポンジ主体の人工気管は、臨床応用されて良好な結果を得ており、さらなる改良の余地としては上皮層の再生促進が考えられる。上皮層再生を促進する要素としては成長因子や細胞外マトリックスなどの成分が数多く存在するが、これらのほとんどを産生する線維芽細胞は構造的、機能的に正常な上皮層の再生に必要な存在として皮膚や角膜組織の研究から明らかになっている。本研究では、気管の上皮層再再生を促す要素として線維芽細胞に着目し、気管線維芽細胞が気管上皮細胞に及ぼす影響について調べた。その結果、気管線維芽細胞は、上皮細胞の移動、上皮細胞の増殖、上皮細胞の分化および分化細胞による上皮層の構造的・機能的な再構築を促進することが明らかになった。すなわち、線維芽細胞は気管上皮層の再生をその全過程を通じて促進することが明らかになり、コラーゲンスポンジを主体とした人工気管を移植した後に上皮層再生を促進する要素として有効であると考えられた。

A. 研究目的

気管上皮層は、線毛運動や粘液分泌という気管の恒常性維持に特異な機能を必要としている組織であるので、人工気管表面の上皮層の再生促進することは、気道病変切除後の障害を回避して Quality of Life の向上に繋がると考えられる。そこで本研究では、気管の上皮層再再生を促す要素として線維芽細胞に着目し、その基礎的な知見を得るために *in vitro* において線維芽細胞が上皮細胞に及ぼす影響について調べた。

B. 研究方法

上皮細胞はノーマルラットの気管からプロテアーゼ処理によって単離して、線維芽細胞はプロテアーゼ処理後の GFP ラット気管の組織片培養によって単離、増殖させた。

増殖させた線維芽細胞は低密度 (10^5 cell / ml) と高密度 (5×10^5 cell / ml) でコラーゲン溶液に懸濁し、ゲル化したコラーゲンゲル上に気管上皮細胞を 2×10^5 cell / cm² の密度で播種し、増殖培地 (EGF, Insulin, transferrin, FBS を含む DMEM / F-12) で培養した。培養4日後、培地を分化培地 (EGF, Insulin, transferrin, hydrocortisone, retinoic acid, bovine pituitary extract, ethanolamine, phosphoethanolamine, bovine serum albumin を含む DMEM / F-12) に交換してさらに6日間培養したものを免疫染色および走査型電子顕微鏡の標本とした。

上皮細胞移動能の測定は上述と同じ線維芽細胞を含む

コラーゲンゲル上にカバーガラスを用いて上皮細胞非被覆部を作製し、上皮細胞がコンフルエントに達した後、カバーガラスを除き、周囲からの上皮細胞の移動を経時的に写真撮影し、得られた写真の Scion Image による画像解析によって上皮細胞の移動能を測定した。

上皮細胞増殖能の測定は上述と同じ線維芽細胞を含むコラーゲンゲル上に上皮細胞を 2×10^3 cell / cm² の密度で播種し、5日間培養した。培養1、3、5日目のコラーゲンゲルから酵素処理によって細胞を遊離させた後、GFP 陰性の上皮細胞数を測定した。

ムチン分泌量の測定は上記の培養10日後の各上皮細胞層上層に分泌されたムチンを PBS で回収し、ELISA 法によって測定した。

C. 研究結果

コラーゲンゲル内に存在する線維芽細胞が上皮細胞の移動性へ及ぼす影響を調べると、線維芽細胞が上皮細胞の移動を活発にすることがわかった (図1A)。線維芽細胞存在と非存在条件における上皮細胞移動率の差は、培養開始24時間でもっとも大きく、培養5日間を通して線維芽細胞の密度によって上皮細胞の移動能も上昇していた。また、上皮細胞の増殖率も線維芽細胞によって上昇しており、低密度で20%、高密度で60%の上皮細胞が線維芽細胞非存在下よりも増加していた (図1B)。

培養10日後の上皮細胞層表面を走査型電子顕微鏡で観察すると、線維芽細胞の密度上昇に伴って線毛被覆領域の拡大が認められた (図2)。気管上皮層を構成する線毛細胞、杯細胞および基底細胞の存在を各々に特異的な

抗体、beta-tubulin- IV、MUC5AC および cytokeratin14の免疫染色で観察すると、線維芽細胞は、上皮細胞の線毛細胞、杯細胞および基底細胞への分化を促進して、線維芽細胞存在下の分化した細胞は極性をもって適切に配置した偽多列線毛上皮層を形成していた(図3)。一方、線維芽細胞非存在下ではこれらの機能細胞へ分化した細胞は少なく、分化していない上皮細胞が多く存在しており、細胞の形状は偽多列線毛上皮層に見られる円柱上皮ではなく立方上皮や扁平上皮であった(図4)。線毛細胞、杯細胞および基底細胞へ分化した上皮細胞数を比較すると、高密度の線維芽細胞存在下で線維芽細胞非存在下に対して、2.3倍、2.5倍、5.4倍であった(図6左)。

線維芽細胞が気管の上皮層と粘膜下層間に存在する基底膜の形成に及ぼす影響について、その主成分である laminin、type IV collagen および上皮細胞表面に存在する基底膜への接着分子である integrin beta4の抗体による免疫染色法で調べた。線維芽細胞存在下において laminin と type IV collagen は上皮細胞層下側に局在していた(図5)。線維芽細胞の密度が高いほどに基底膜の形成は促進されており integrin beta4も上皮細胞下側の細胞膜に局在していた。一方、線維芽細胞非存在下の laminin や type IV collagen は上皮細胞層下側だけではなく、上皮細胞層全体にまばらに存在しており、integrin beta4は上皮細胞層全体でほとんど認められなかった。

線維芽細胞が気管上皮層に特徴的な機能であるムチンの分泌に及ぼす影響について ELISA 法で調べた。上皮細胞によるムチンの分泌は、線維芽細胞非存在下でも培養日数の経過に伴って緩やかに増加していたが、低密度で線維芽細胞が存在するとその分泌量は約2倍に増加していた(図6右)。さらに高密度で線維芽細胞が存在すると、ムチンの分泌量は培養7~9日間で急激に増加し、非存在下の約5倍になっていた。

D. 考 察

上皮層再生の過程は、①上皮細胞の移動、②上皮細胞の増殖、③上皮細胞の分化および④分化細胞による上皮層の構造的・機能的な再構築であると考えられる。

移植再生組織表面への気管上皮細胞の被覆に要する時間は、上皮細胞の移動と増殖活性に依存する。本研究において線維芽細胞は、上皮細胞の移動と増殖を密度依存的に上昇させたことから、上皮層再生における上皮細胞被覆の促進することが明らかになった。線維芽細胞は上皮層再生過程における①と②に要する時間を短縮すると考えられた。

気管の粘液やイオン成分の調節や異物の除去に機能する線毛細胞、上皮層の物理的・生理的な保護に必要な粘液を分泌する杯細胞、線毛細胞と杯細胞の前駆細胞である基底細胞、各々に特徴的な性状をもつこれらの上皮細胞は、気管が適切に機能する上で必要不可欠な役割を果たしている。線維芽細胞はこれらの上皮細胞の分化、上皮層再生の過程の③を促進することが明らかになった。

線維芽細胞は極性をもった偽多列線毛上皮層の形成を

促進していた。この偽多列線毛上皮層の下側には、上皮層と粘膜下層の組織間相互作用を仲介して構造的、機能的に正常な上皮層の維持に必要な基底膜も再構築されていた。さらに気管上皮層の主要機能である線毛運動とムチン分泌に関しては、走査型電子顕微鏡像によって線毛被覆面積の拡大として、ELISA 法によってムチンの分泌量の増加として認められた。線維芽細胞は上皮層再生の過程である④も促進していることが明らかになった。

E. 結 論

線維芽細胞は気管上皮層の構造的、機能的な再生の全過程の促進作用があることが明らかになった。すなわち、コラーゲンスポンジを主体とした人工気管を移植した後に上皮層再生を促進する要素として有効であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kobayashi K, Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Kanemaru S, Nakamura T, Omori K: Effect of fibroblasts on tracheal epithelial regeneration in vitro. Tissue Engineering (accepted)

2. 学会発表

- 1) 小林 謙, 野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 挟間章博, 大森孝一: 線維芽細胞が気管上皮層の再構築に及ぼす影響. 第5回日本再生医療学会(2006. 3. 8-9, 岡山)

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

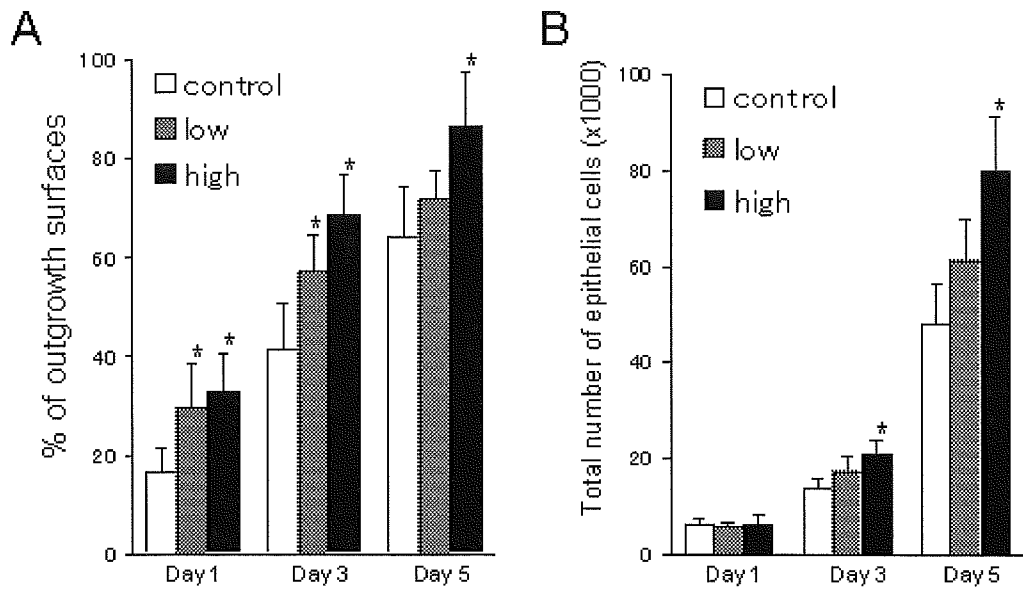


図1 線維芽細胞が上皮細胞の移動と増殖に及ぼす影響

線維芽細胞非存在下 (control)、低密度 (low) あるいは高密度 (high) 共培養した上皮細胞の移動能 (A) と増殖能 (B) を示す。* P < 0.05

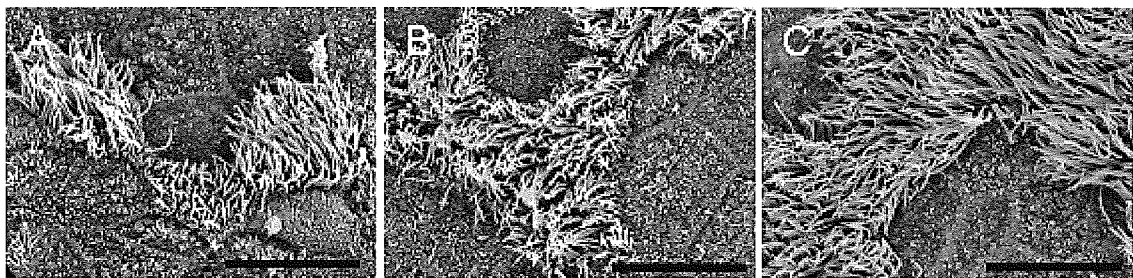


図2 線維芽細胞が上皮細胞層表面の線毛形成に及ぼす影響

線維芽細胞を含まない (A)、低密度 (B) あるいは高密度 (C) 線維芽細胞と共培養した上皮細胞層表面の走査型電子顕微鏡像を示す。Bar = 10 μ m.

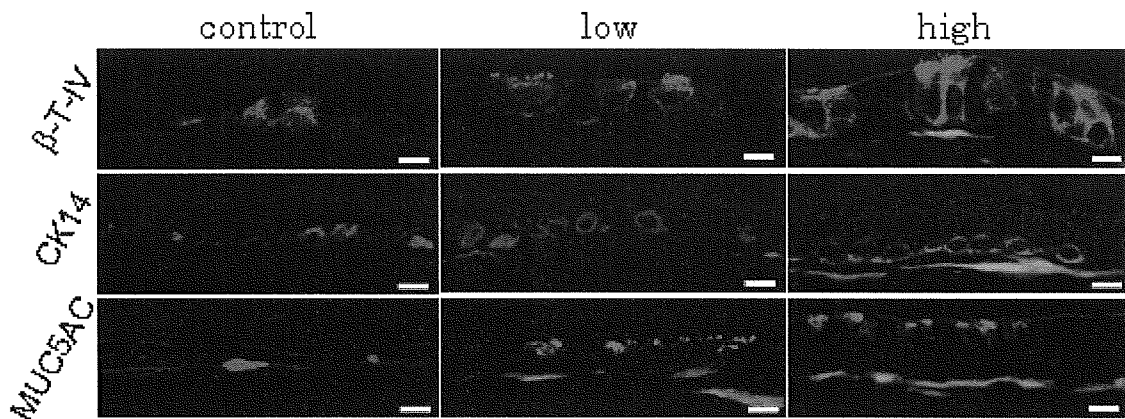


図3 線維芽細胞が上皮細胞の分化に及ぼす影響

線毛細胞 (β -T-IV)、杯細胞 (MUC5AC) および基底細胞 (CK14) に特異的な抗体の免疫染色像 (Blue) を示す。Green: GFP-positive fibroblasts. Bar = 10 μ m.

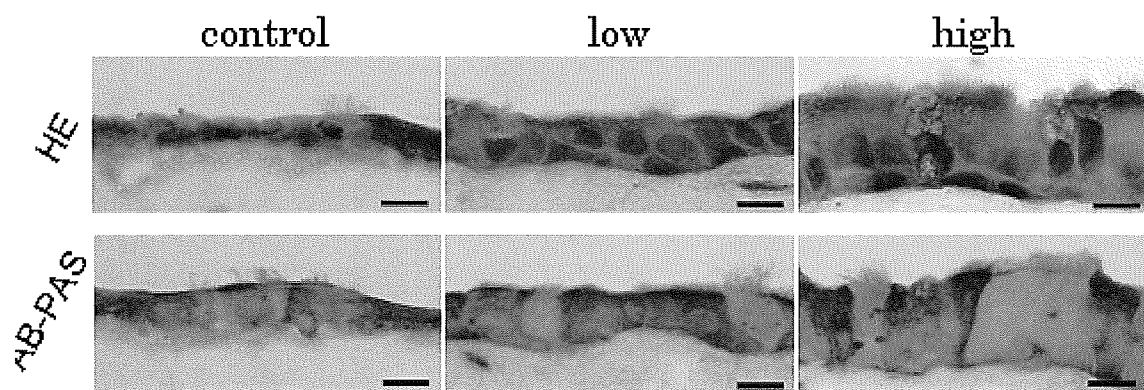


図4 線維芽細胞が上皮層の形態に及ぼす影響

HE と AB (Alcian Blue)-PAS による染色像を示す。Bar = 10 μ m.

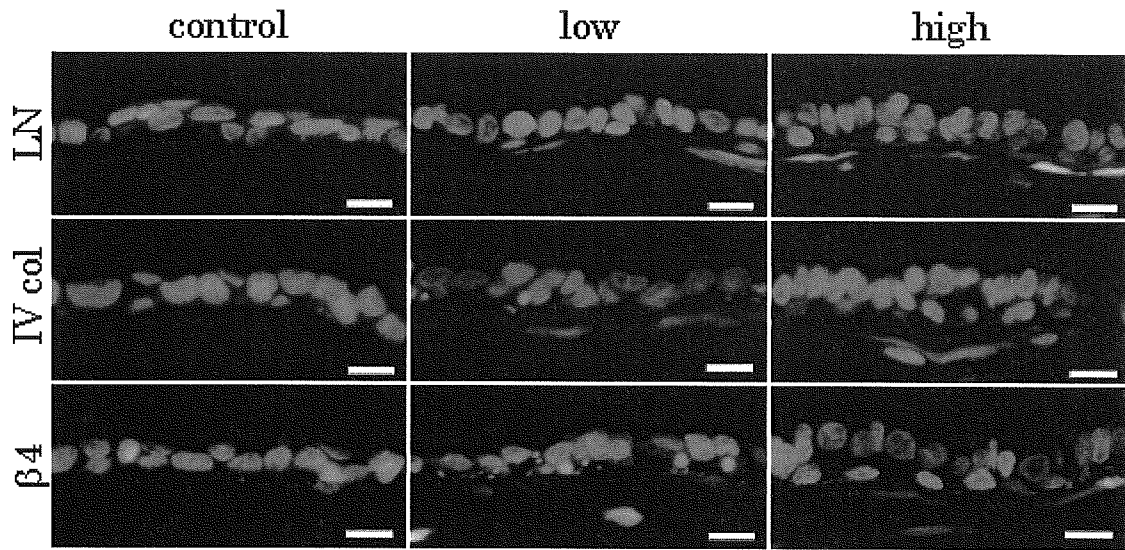


図5 線維芽細胞が基底膜の構築に及ぼす影響

Laminin (LN)、type IV collagen (IV col) および Integrin beta4 ($\beta 4$) に特異的な抗体の免疫染色像 (Red) を示す。Green: fibroblasts, Blue: DAPI. Bar = $10\mu\text{m}$.

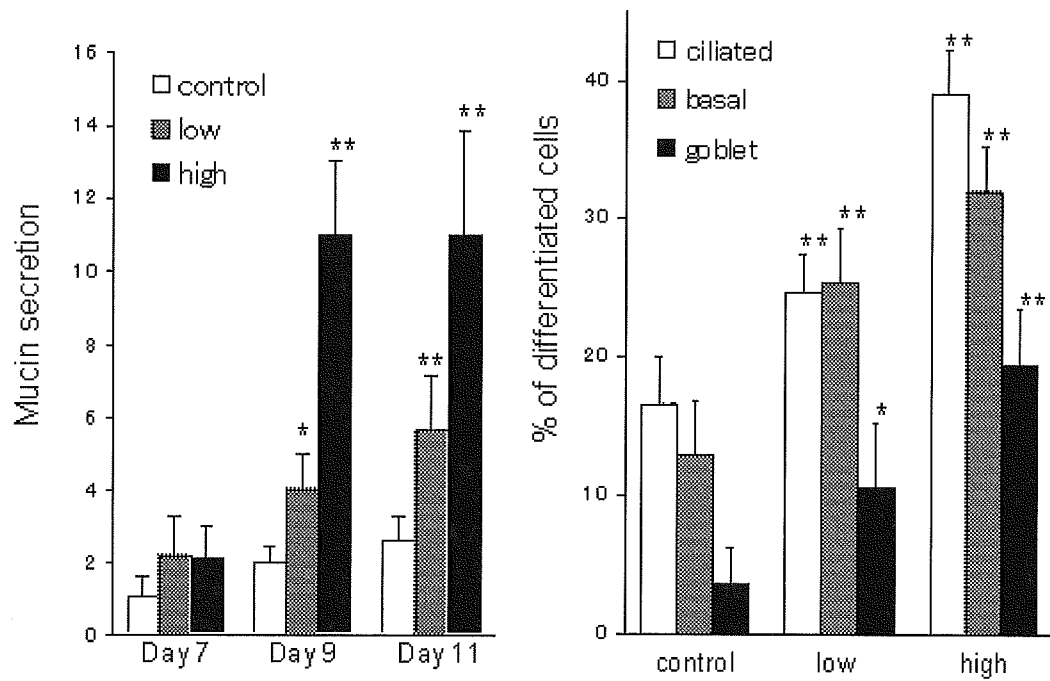


図6 線維芽細胞が上皮細胞の分化 (左) とムチン分泌 (右) に及ぼす影響

* $P < 0.05$

自家移植に適した線維芽細胞の検索

分担研究者 桑畑 直史（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）
研究協力者 小林 謙（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）
鈴木 輝久（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）
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）

研究要旨

気管上皮層の再生は前項の結果から線維芽細胞によって促進されることが明らかになった。しかし、免疫拒絶反応のない自己由来の細胞を用いる場合、気管から線維芽細胞を事前に採種することは移植患者への負担が大きい。そこで本研究では、気管線維芽細胞に匹敵する気管上皮層の再生促進作用をもち、なおかつ容易に採種可能な自己由来の線維芽細胞の供給組織を明らかにするため、気管由来線維芽細胞と皮膚真皮、鼻粘膜および口腔粘膜より採種した線維芽細胞との上皮層再生能力を比較した。その結果、口腔粘膜下層に由来する線維芽細胞によって誘導された上皮層は、その形態的特徴、機能タンパク質の局在、基底膜や密着結合の状態が気管線維芽細胞のものと同様であることが明らかになったので、気管の上皮層再生のための線維芽細胞の供給組織としては口腔粘膜下層が有効であると考えられた。

A. 研究目的

気管の上皮層は粘液の分泌、線毛運動あるいはイオン成分の調節など物理的・生理的に複雑な機能を必要とする。これらの機能が正常に働く気管上皮層の再生速度を上げることが、気道病変切除後の障害を回避して Quality of Life の向上に繋がると考えられる。我々の研究によって気管上皮層の再生は線維芽細胞によって促進されることが明らかになった。しかしながら、気管から線維芽細胞を事前に採種することは移植患者への負担が大きい。そこで本研究では、気管線維芽細胞に匹敵する気管上皮層の再生促進作用をもち、なおかつ容易に採種可能な自己由来の線維芽細胞の供給組織について調べた。

B. 研究方法

細胞採種はノーマルラットの気管粘膜下層、皮膚真皮、口腔粘膜下層および鼻粘膜下層より組織片培養によって線維芽細胞を、単離して、培養4週間以内に実験に用いた。

上皮細胞と線維芽細胞の共培養は前項“気管線維芽細胞が気管上皮細胞に及ぼす影響”と同じ条件で行い、培養10日目の標本を免疫染色した。

C. 研究結果

共培養によって形成された上皮層を HE 染色像で観察すると、線維芽細胞の由来組織毎にその形態が大きく変化することがわかった（図1）。気管由来の線維芽細胞は円柱上皮細胞を主体とした偽多列線毛上皮層、鼻腔由

来の線維芽細胞は立方上皮細胞主体の単層、口腔由来の線維芽細胞は立方上皮と円柱上皮細胞による多列線毛上皮層、皮膚線維芽細胞は扁平上皮細胞層の上に線毛を有する立方上皮細胞層が重層していた。

続いて、分化した気管上皮細胞の指標抗体で免疫染色すると、線毛細胞に特異的な beta-tubulin-IV はいずれの線維芽細胞と共培養した上皮層でも同程度の陽性反応を示した（図2）。杯細胞の指標である MUC5AC は、鼻粘膜と皮膚の線維芽細胞において幾分反応部位が少なかったが、線維芽細胞の由来毎に大きな違いは認められなかった（図3）。

基底膜の再構築は、その主成分である laminin の抗体による免疫染色像で観察した。気管、口腔および皮膚由来の線維芽細胞と共培養した場合には laminin の局在部位が上皮層-コラーゲン境界部に集中して観察されたが、鼻腔由来線維芽細胞との共培養では境界部以外にもまばらに染色されていた（図4）。また、type IV collagen の局在も laminin と同様に観察された（data not shown）。

水を選択的に通過させるチャネルタンパク質の aquaporin 4 は、気管、鼻腔および口腔に由来する線維芽細胞との共培養では上皮細胞の側部に局在していたが、皮膚由来線維芽細胞と共培養した上皮細胞層では基底膜側で観察された（図5）。aquaporin 4 と同じく水輸送に関わる aquaporin 5 は、気管、口腔および鼻腔線維芽細胞と共培養した上皮層では基底細胞層に局在していた（図6）。一方、皮膚由来線維芽細胞との組み合わせでは、基底細胞ではなくその上に存在する扁平上皮細胞の表面で aquaporin 5 の陽性反応が観察された。また、

上皮層からの溶質もれを防ぐ密着結合の構成タンパク質である Zo-1は気管および鼻腔の線維芽細胞と共培養した上皮層では基底細胞層中心に局在していたが、鼻腔線維芽細胞との組み合わせでは陽性部位が少なかった（図7）。口腔線維芽細胞の場合では基底細胞層とその上の細胞間隙に多く局在しており、皮膚線維芽細胞の場合は扁平上皮細胞の表面であった。なお、気管線維芽細胞と組み合わせた上皮層におけるこれらの機能タンパク質の局在は、in vivo 気管で報告されているものと一致していた。

D. 考 察

本研究の結果から、気管上皮層を構成する線毛細胞と杯細胞および上皮下層の基底膜は全ての組み合わせの上皮層で確認された。しかし、上皮層の形態的な特徴と機能タンパク質の局在様式は線維芽細胞の由来する組織によって大きく異なることが明らかになり、異なる組織に由来する線維芽細胞は、再生組織に組み込んで移植した場合に各々異なる上皮層誘導能をもつことを示唆していた。

それらの違いを気管線維芽細胞によって形成された上皮層と比較すると、皮膚由来の線維芽細胞と組み合わせた上皮層では、基底細胞層の上に扁平上皮細胞が重層しており、さらに皮膚線維芽細胞は aquaporin 4、5 および Zo-1の局在も気管上皮層のものとは異なっていた。また、鼻粘膜に由来する線維芽細胞においては、上皮層に厚みが無く、aquaporin 5も存在せず、基底膜やタイトジャンクションの形成も不十分であった。一方、口腔粘膜下層に由来する線維芽細胞と組み合わせた上皮層は、上皮層の形状、厚みおよび aquaporin 4、5の局在様式および基底膜やタイトジャンクションが気管のものと同様であると類似していると考えられた。

E. 結 論

気管線維芽細胞に代替する線維芽細胞の供給組織としては鼻粘膜、皮膚真皮よりも口腔粘膜下層が適していると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

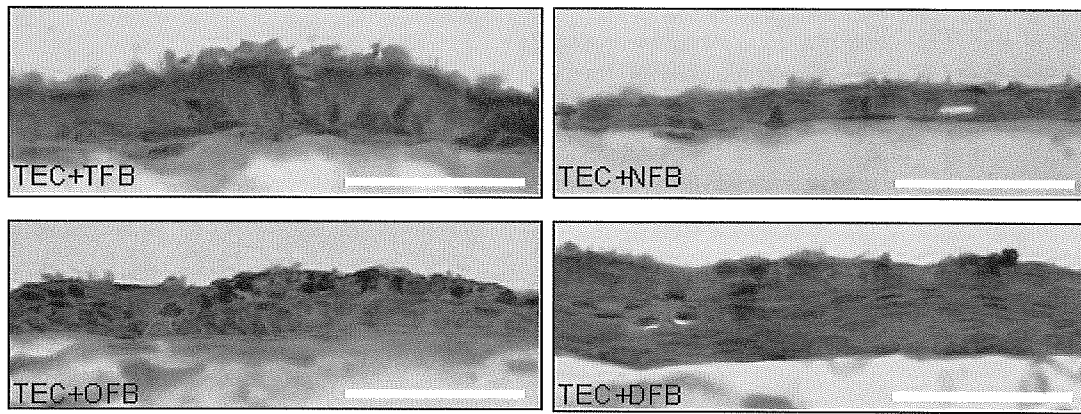


図1 各組織に由来する線維芽細胞が上皮層の形態に及ぼす影響

図は気管 (TFB、左上)、鼻粘膜下層 (NFB、右上)、口腔粘膜下層 (OFB、左下) および皮膚真皮 (DFB、右下) に由来する線維芽細胞と気管上皮細胞 (TEC) を共培養して形成された上皮層の HE 染色像を示す。Bar = 50 μ m (図2 - 7 も同じ)。

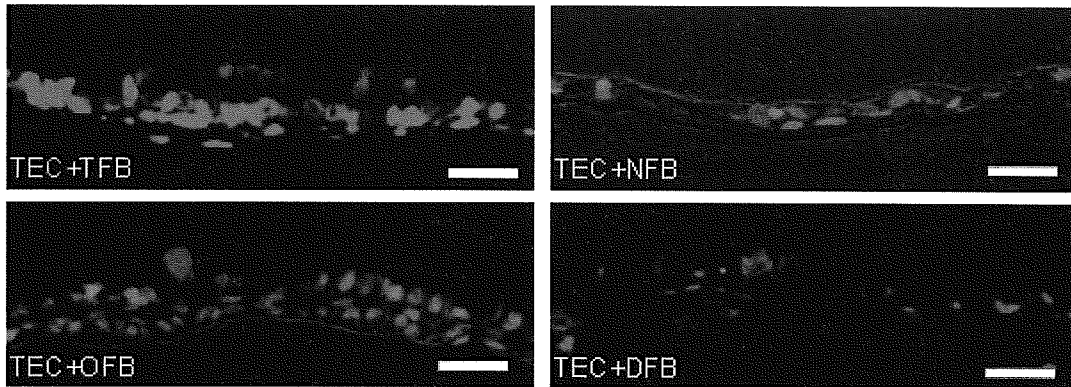


図2 各組織に由来する線維芽細胞が上皮線毛細胞の分化に及ぼす影響

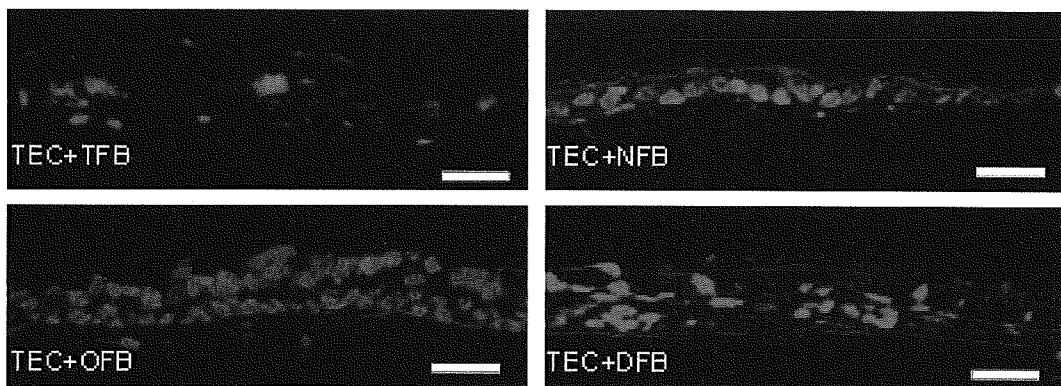


図3 各組織に由来する線維芽細胞が杯細胞の分化に及ぼす影響

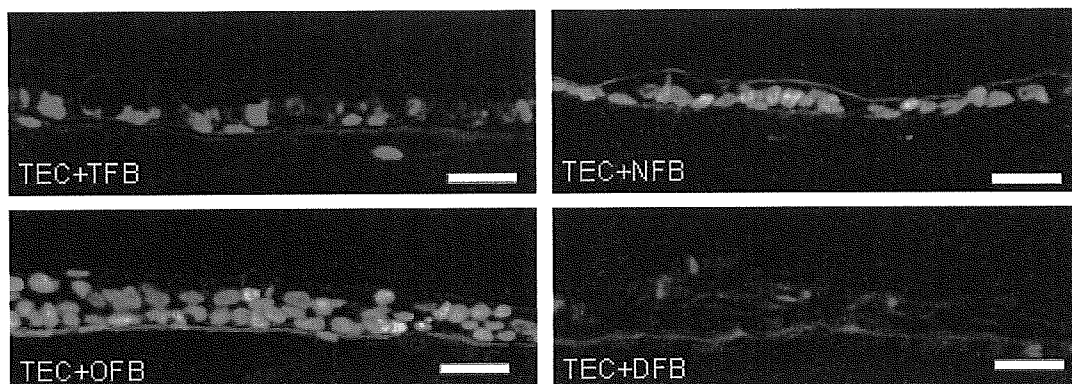


図4 各組織に由来する線維芽細胞が laminin の局在に及ぼす影響

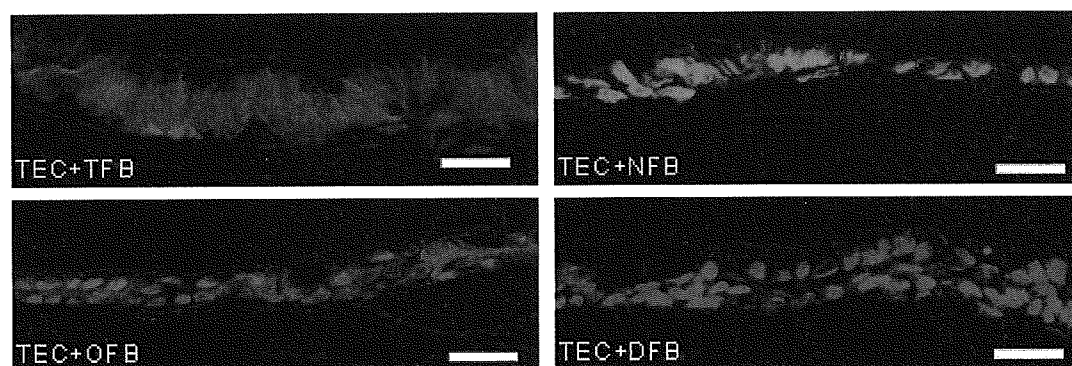


図5 各組織に由来する線維芽細胞が aquaporin 4 の局在に及ぼす影響

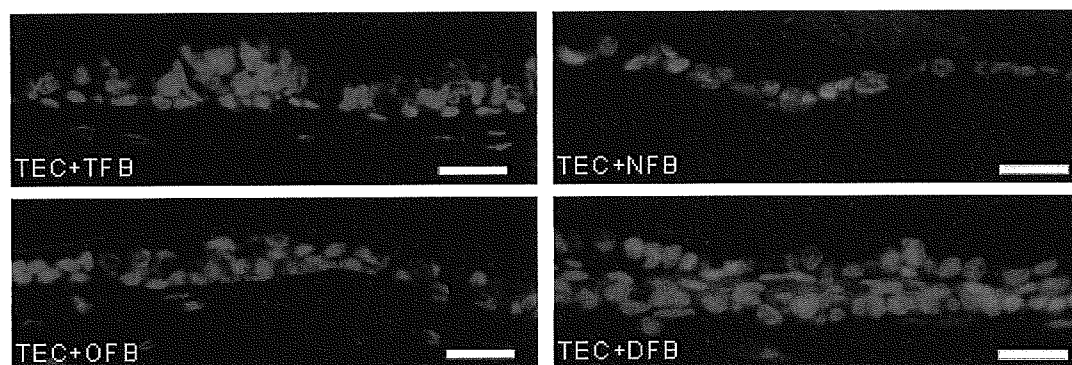


図6 各組織に由来する線維芽細胞が aquaporin 5 の局在に及ぼす影響

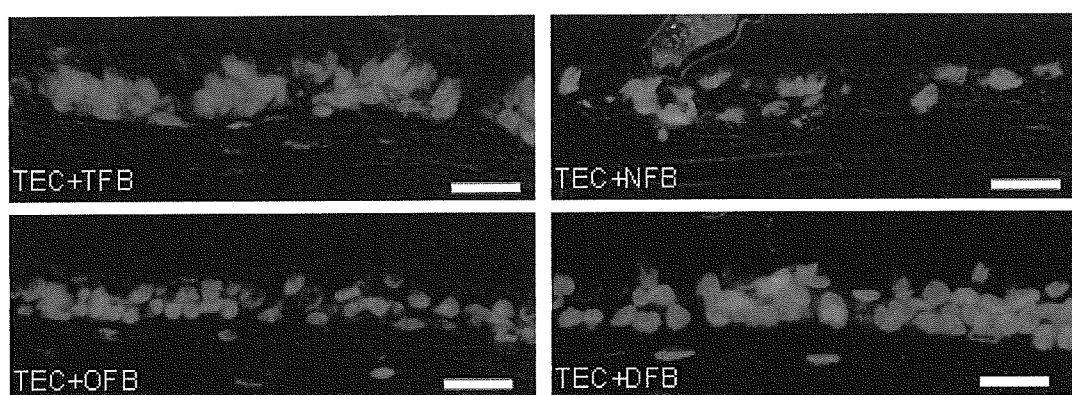


図7 各組織に由来する線維芽細胞が Zo-1の局在に及ぼす影響

培養気管上皮細胞及び線維芽細胞を用いたハイブリッド人工気管の作製

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）

小林 謙（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）

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。従来その再建には皮膚弁、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。しかし欠損の大きさが一期縫縮もしくは自己組織で再建可能な範囲を超えた症例の場合、手術適応外とされてしまうのが現状である。このような症例に対して長期的に安定な人工気管開発の必要性は非常に高いといえる。また手術侵襲の軽減が求められている今日において、これまで行われてきた自家組織による気管再建が侵襲を伴わない人工材料で可能になる意義は大きい。分担研究者の中村らにより開発された自己再生型人工気管は、主任研究者の大森らによりすでに数例に臨床応用され良好な結果を得ている。改善すべき点として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、人工気管内腔面の早期上皮再生を図る方法を探るべく、ラット培養気管上皮細胞及び線維芽細胞を用いたハイブリッド人工気管を作製し評価した。

A. 研究目的

分担研究者の中村らにより開発された自己再生型人工気管は、主任研究者の大森らにより甲状腺癌気管合併切除例をかきりにすでに数例に臨床応用されている。いずれも気管欠損部に対してパッチとして使用され、概ね良好な結果を得ている。一方改善すべき点として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、人工気管内腔面の早期上皮再生が本研究の最終的な目的である。本研究ではラットを用いた動物実験において気管上皮細胞及び線維芽細胞を組み入れたハイブリッド人工気管を試作し、*in vivo*、*in vitro*での評価を行った。

B. 研究方法

- SD系ラットを安楽死させた後、気管を摘出し、酵素処理をへて気管上皮細胞、及び気管上皮下線維芽細胞を採取した。10% fetal bovine serum を添加した DMEM 培地で気管上皮細胞懸濁液を作成した。豚腱由来の I-A 型コラーゲンを主成分としたコラーゲングルを自己再生型人工気管に用いられているものと同じコラーゲンスポンジ上に重層化し、先の細胞懸濁液中に沈め培養を行った。さらに継代培養を経た線維芽細胞が包埋されたコラーゲングルを用意し、先と同様の操作を行った。
- 培養後人工材料を組織学的および免疫組織化学的に評価した。
- SD系ラットに対して全身麻酔下に気管を露出させ、

気管前面に1.5×3.0mmの気管欠損を作製し、GFP 遺伝子導入気管上皮細胞を用いた人工材料を移植した。術後3日、7日、14日、30日にそれぞれ安楽死させ、再建部を含め気管を摘出し、経時的な組織学的変化を観察した。

C. 研究結果

気管上皮細胞を用いた人工材料を組織学的に観察したところコラーゲンスポンジに重層化されたコラーゲングルの表面に気管上皮細胞層の形成が確認できた。(図1) 蛍光免疫染色での観察では、上皮細胞層は cytokeratin 14、cytokeratin 18、occludin のいずれも陽性を示した。(図2)

気管上皮細胞と線維芽細胞を用いた人工材料を組織学的に観察したところコラーゲンスポンジに重層化されたコラーゲングルの内部に線維芽細胞が観察され、ゲルの表面には気管上皮細胞層の形成が確認できた。(図3) 細胞の形態、線毛の発現など、線維芽細胞なしのタイプと比べ、より強い分化傾向をもつ上皮細胞が観察された。

移植実験においては 移植した GFP 陽性細胞は移植後3日では残存していたが、7日以降では消失し GFP 陰性の上皮細胞で置き換わっていた。(図4) 上皮細胞層の形態は移植3日後では2層性扁平上皮、7日後では重層扁平上皮、14日以降では線毛円柱上皮へと分化した。上皮下層については移植3日後ではコラーゲングル及びスポンジに大きな変化がなかったものの、7日目では線維芽細胞、炎症細胞の侵入が観察され、14日以降では正常に近い上皮下組織の再生が観察された。(図5)

D. 考 察

われわれが扱っている自己再生型人工気管は内腔保持に必要な硬性と柔軟性をもたせたマーレックスメッシュ及びポリプロピレンステント製骨格とこれを被覆し細胞の足場となるコラーゲンスポンジからなる。開発段階での動物実験及び臨床応用においては人工気管に自己の血液を浸透させ使用しており、切除断端から上皮細胞層の進展が及ばない領域ではコラーゲンスポンジ、もしくはそこに生じた肉芽組織が時に長期間露出する。これまでの経験では人工気管内腔の上皮化遅延が大きな問題に発展したケースはないものの、感染巣や瘻孔の形成、肉芽形成による気管狭窄などの危険性が危惧される。上皮再生の工夫は自己再生型人工気管による気管再建をより確実な手技に発展させる上で重要な課題といえる。

コラーゲングルは従来から細胞培養の基材として有用である上に、気管上皮細胞の足場となる平面を得ることができる。さらにコラーゲンスポンジ上への重層が可能である。本実験ではコラーゲングル表面に気管上皮細胞層形成が確認でき、また免疫染色の結果から気管上皮細胞の phenotype は保持されていると考えられた。

線維芽細胞について研究協力者の小林は気管上皮細胞と線維芽細胞との共培養の検討を行い、線維芽細胞の存在が線毛の発現、基底膜の形成など気管上皮細胞の分化を促進するとの結果を導いた。より良好な上皮再生を得るためには線維芽細胞の間接的な役割が重要と考えられ、今後線維芽細胞を用いたハイブリッド人工気管の *in vivo* で評価が必要と考えられる。

気管欠損モデルへの移植実験では移植した気管上皮細胞は比較的短期間で自己の気管上皮細胞に置換した。原因として、同種移植であることから免疫拒絶の関与のほか、上皮細胞層とコラーゲングル間の接着の脆弱さがあげられる。前者は自己の口腔粘膜、鼻腔粘膜等から上皮細胞を採取し代用することで解決される可能性がある。後者に関しては線維芽細胞を導入し基底膜形成を促すことで改善を図れるかもしれない。

また上皮組織の経時的観察において、コラーゲングル層への線維芽細胞の侵入が認められた。コラーゲングルを創部へ充填した場合の創修復の一過程と考えられ、ハイブリッド人工気管を作製する際にコラーゲングルに線維芽細胞をあらかじめ包埋することの有用性を示唆する所見と考えられた。

E. 結 論

1. コラーゲングルを介して自己再生型人工気管に用いられているコラーゲンスポンジを気管上皮細胞層で被覆すること可能であった。さらにそのコラーゲングルに線維芽細胞を包埋する方法も可能であった。
2. コラーゲングル上で培養された気管上皮細胞の phenotype は比較的保たれていると考えられた。
3. 移植実験では移植した気管上皮細胞は比較的短期間で自己の気管上皮細胞に置換した。

4. 移植された人工材料上の気管上皮細胞は経時的にその形態を変えながら再生した。上皮組織は人工材料内部への線維芽細胞や炎症細胞の侵入を経て再生した。

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Kobayashi K, Miyake M, Hazama A, Wada I, Kanemaru S, Nakamura T, Omori K: Tissue engineering for regeneration of the tracheal epithelium. *Ann Otol, Rhinol Laryngol* (in press)
2. 学会発表
 - 1) Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Miyake M, Ogawa H, Hazama A, Omori K, Kanemaru S: Tissue engineering for regeneration of the tracheal epithelium. *The American Broncho-Esophagological Association(85th Annual Meeting)*(2005. 5. 13-14, Boca Raton, Florida)
 - 2) 野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 三宅将生, 挟間章博, 中村達雄, 金丸眞一, 大森孝一: 気管上皮細胞組織による人工気管表面の被覆の試み. 第26回日本炎症・再生医学会 (2005. 7. 12-13, 東京)
 - 3) 野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 三宅将生, 挟間章博, 小林 謙, 中村達雄, 金丸眞一, 大森孝一: 気管上皮細胞層を有する人工気管作製の試み. 第8回日本組織工学会 (2005. 9. 1-2, 東京)
 - 4) 野本幸男, 鈴木輝久, 多田靖宏, 三宅将生, 挟間章博, 小林 謙, 中村達雄, 大森孝一: 気管上皮細胞層を有するハイブリッド人工材料の作製. 第57回日本気管食道科学会 (2005. 11. 17-18, 京都)

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

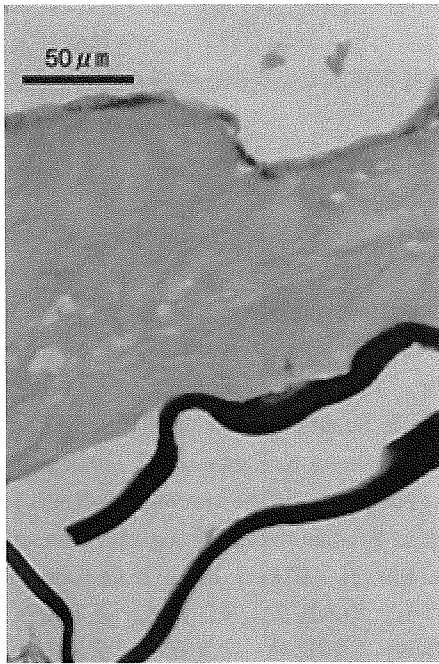
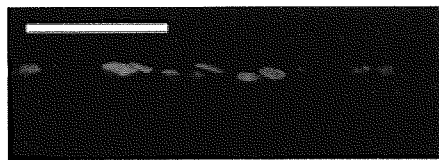
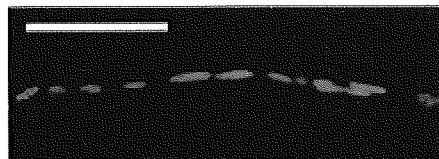


図 1

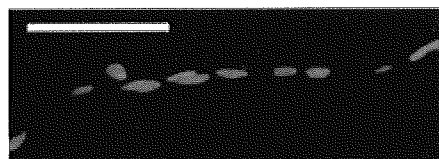
上から気管上皮細胞層、コラーゲングル層、コラーゲンスポンジ層



(a)



(b)



(c)

図 2

- (a) cytokeratin 14(red)
- (b) cytokeratin 18(red)
- (c) occluding(red)
- ※ nuclei(blue)

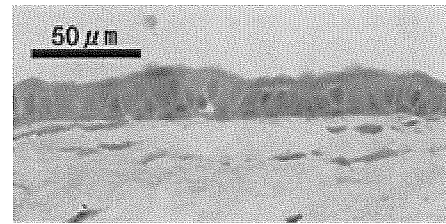


図 3

上より気管上皮細胞層、線維芽細胞が包埋されたコラーゲングル層

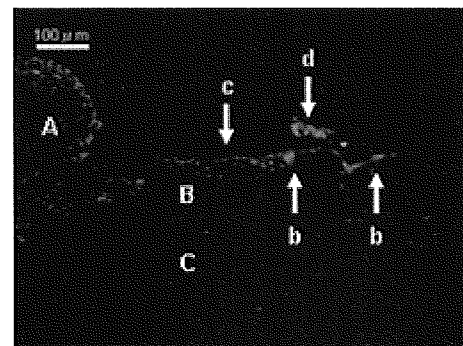
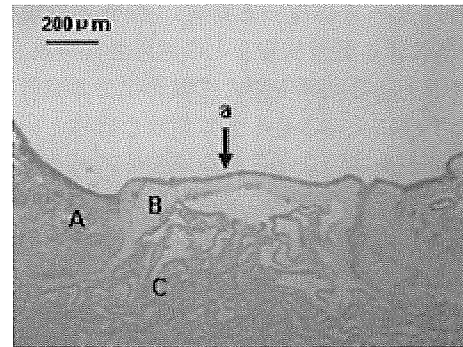
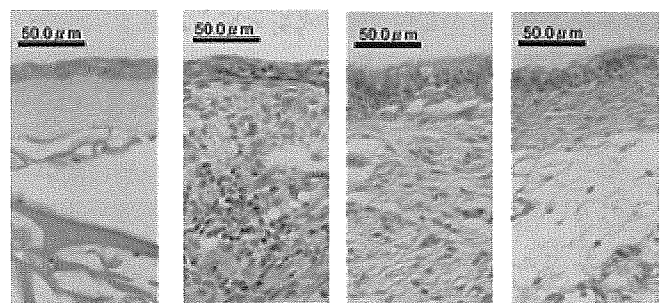


図 4

上段 移植後 3 日の HE 染色像

下段 移植後 3 日の蛍光顕微鏡像

(A)気管断端 (B)コラーゲングル層 (C)コラーゲンスポンジ層 (a)再生気管上皮 (b)GFP 陽性細胞 (c)GFP 陰性細胞 (d)脱落した GFP 陽性細胞塊



(a)

(b)

(c)

(d)

図 5

(a)移植後 3 日 (b)移植後 7 日
(c)移植後 14 日 (d)移植後 30 日

自己口腔線維芽細胞と自己脂肪組織由来細胞群を用いた ハイブリッド人工材料の被覆

分担研究者 小川 洋（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）
小林 謙（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）
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）

研究要旨

気管の再建方法として主任研究者の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あげられる。気管再建部の上皮化促進を図るため自家細胞を利用したハイブリッド人工材料を作製した。自己細胞は線維芽細胞と脂肪組織由来細胞群を使用し、移植を行った結果、コントロールに比べハイブリッド人工材料を使用した方が上皮化の促進がみられた。線維芽細胞単独よりも脂肪組織由来細胞群をあわせて使用した方が、結果が良好であり、免疫染色でも血管の新生・誘導が確認された。

A. 研究目的

主任研究者の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や気管狭窄例、喉頭外傷例に対するパッチによる再建を行い臨床応用を行っている。問題点としてはすべての症例に共通して、露出したコラーゲンスポンジ上での上皮化の遅延があげられる。経過中、創治癒不全に移行する可能性があり、昨年度、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、ラット気管上皮細胞を有するハイブリッド人工材料を作成し、ラット気管欠損モデルに移植を行った。その結果、移植後7日目に上皮化は軽度認められた。しかし、上皮化は不十分な状態であり、原因として、ハイブリッド人工材料表面の物理的刺激による細胞脱落、ドナー・ホスト間の免疫反応が考えられた。その解決方法として、自家細胞を用い、人工材料表面ではなく、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材料を、自家細胞を含有したコラーゲンゲルで包埋したハイブリッド人工材料を作成した。そのハイブリッド人工材料について気管損傷モデルで検討した。

自己細胞は線維芽細胞と脂肪組織由来の血管と間質を含む細胞群とした。その理由として、まず線維芽細胞は、皮膚、角膜あるいは口腔粘膜組織において、線維芽細胞が上皮細胞と相互作用し、機能的な上皮層の形成を促進することが報告されており、また、研究協力者の小林らは、気管由来の線維芽細胞は、気管上皮細胞の移動、増殖および分化を有意に促進し、口腔粘膜に由来する線維芽細胞は、気管線維芽細胞と同等以上の気管上皮促進作

用を有することと報告しているからである。今回は、臨床応用を考え、採取が容易な口腔粘膜の線維芽細胞を用いた。

また、上皮化促進には血管新生を早める必要があり、血管新生を促進する細胞の供給組織として、皮下の脂肪組織に着目した。脂肪組織は、成体において特異的に体積の増減が激しい組織であり、体積増加に伴って血管新生も活発に認められる。ラット脂肪組織を酵素処理し、遠心後に培養すると、細胞の接着能の差により血管と間質の分画（vascular and stromal fraction）が得られる。血管分画には血管内皮細胞が存在し、間質分画には間質系の細胞、脂肪前駆細胞およびCD54陽性の幹細胞が存在していることが確認されている。間質系の細胞は血管周囲を支持し、脂肪前駆細胞は血管新生を誘導する多種類のサイトカインを分泌することが知られており、血管と間質を含む細胞群を利用することで血管新生が期待できるものと考えた。

B. 研究方法

1. 細胞採取

a) ノーマルラットの口腔粘膜下層から組織片培養にて線維芽細胞を単離、3週間培養し、細胞数として4.8から $7.5 \times 10^5 / \text{ml}$ とした。

b) ノーマルラットの腹部皮下脂肪を2ml採取（図1）し、0.25%コラゲナーゼIIで酵素処理し、脂肪組織を分解する。それによって得られた細胞懸濁液を70 μm ポアサイズのセルストレーナーで濾過（図2）。濾過後の細胞懸濁液を遠心分離して得られた細胞をディッシュ上に播種。3時間後、ディッシュに接着した細胞群（stromal

fraction) を3週間培養した。

c) 上記 b) と同様な手法で得られた細胞をディッシュ上に播種することなく、vascular stromal fraction (図3) として培養せず移植に利用した。

2. ハイブリッド人工材料の作製

コントロールを含め、上記により得られた細胞を含む4種類のハイブリッド人工材料を作製した。尚、採取した自家細胞は移植前に DiI で細胞標識を行った。

① コントロール

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材料上に0.2%コラーゲンを重層化したもの

② fibroblast

0.2%コラーゲンゲル内に線維芽細胞を包埋し、コラーゲンスポンジに重層化したもの

③ fibroblast + stromal fraction

0.2%コラーゲンゲル内に線維芽細胞を包埋したものと方法1) - b) で得られた stromal fraction 細胞群を包埋したものをコラーゲンスポンジ両面に重層化したもの

④ fibroblast + vascular stromal fraction

0.2%コラーゲンゲル内に線維芽細胞を包埋したものと方法1) - c) で得られた vascular stromal fraction 細胞群を包埋したものをコラーゲンスポンジ両面に重層化したもの

3. 気管損傷モデルの作製

次に下記の手順で気管損傷モデルを作製した。

a) ノーマルラットにペントバルビタール (ネンブタール®) 25mg/kg を尾静脈より注射し、全身麻酔を行う。

b) 頸部正中切開にて気管を露出。第2、3、4気管輪に5×7mm大の電気メスをうい気管損傷を作成 (図4)。

c) 同気管損傷モデルに方法2) で作製した自己細胞由来のハイブリッド人工材料を自家移植する再建モデルを作成。前頸筋群、皮膚をそれぞれ縫合し、感染予防に大腿筋に ABPC100mg/kg を筋注。

4. 標本作製

1) ペントバルビタールナトリウム (ネンブタール®) 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4%パラホルムアルデヒドにて固定。

2) 摘出喉頭気管を凍結標本とし組織切片を作成する。

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) 血管のマーカーとなる抗 vWF 抗体にて免疫染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察し病理組織学的に評価する。

5. 評価項目

気管上皮再生、血管新生の状態、移植した自己細胞の生着について観察を行った。

C. 研究結果

ハイブリッド人工材料移植後7日目の HE 染色結果では、①コントロール例 (図5) は、気管欠損部位には上皮化は認められず、強拡大で少数の細胞が気管内腔面に確認されるのみであった。

② fibroblast 例 (図6) は、気管欠損部位に2から3層の上皮層が認められた。

③ fibroblast + stromal fraction 例 (図7) は気管欠損部位の上皮化はほぼ終了しており、強拡大で偽多列円柱上皮細胞からなる上皮層が形成されていた。また、細胞の極性もそろっているのが確認された。

④ fibroblast + vascular stromal fraction 例 (図8) も気管欠損部の上皮化はほぼ終了していた。強拡大では偽多列円柱上皮細胞からなる上皮層が形成され、少数ではあるが、気管内腔に面して線毛が確認され、また、粘膜下組織には血管も確認された。

③ (図9)、④ (図10) の免疫染色ではいずれも気管欠損部と気管残存部の境界粘膜下組織に抗 vWF 抗体陽性細胞が認められた。また、それは、DiI にて標識した細胞と同一のものであり移植細胞が血管新生に影響を与えている可能性が示唆された。

D. 考 察

コントロールに比較して② fibroblast 例は上皮層の形成がなされており、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材料の単独移植・気管再建より上皮化を早めるものと思われた。③ fibroblast + stromal fraction 例、④ fibroblast + vascular stromal fraction 例はいずれも形態学的に正常気管に近い上皮層の形成が認められた。② fibroblast 例と比較しても、上皮層の細胞層が厚く、偽多列円柱上皮細胞による上皮層が形成されていた。脂肪組織由来の血管分画、間質分画の細胞を線維芽細胞にくわえたハイブリッド人工材料は、①コントロール例、② fibroblast 例よりも気管の上皮化促進に有利に働いていることが示された。免疫染色でも移植細胞が血管新生を誘導または血管へ transformation したことが示唆され、上皮化が促進された理由の大きな一因と思われる。③ fibroblast + stromal fraction 例、④ fibroblast + vascular stromal fraction 例間に形態学的には大きな差異は認められず、今後、移植において脂肪組織由来の細胞分画の使用法についてはさらなる検討が必要である。いずれにしても、気管再建において人工材料単独移植よりも線維芽細胞、脂肪組織由来の細胞群 (血管分画、間質分画の細胞) を用いハイブリッド化させることは気管の上皮化促進に大いに有効である結果であった。臨床応用に向けて、線維芽細胞は口腔粘膜からの採取であり、また、脂肪組織も腹部からの採取であるため手技的にも容易であり患者への侵襲が少なく、また自家細胞を利用するため安全であると思われる。今後、ヒトへの応用に向け移植後の長期観察が必要と考え現在準備中である。

E. 結 論

口腔粘膜から線維芽細胞を採取・培養し、また、腹部脂肪組織から血管分画、間質分画の細胞を抽出した。得られた自家細胞を利用しハイブリッド人工材料を作製、気管欠損モデルに移植した結果、細胞を用いないコントロールと比べいずれのハイブリッド人工材料も欠損部の

上皮化が認められた。線維芽細胞を単独で使用したものより、脂肪組織由来の細胞群（血管分画、間質分画の細胞）をあわせて使用したものの方が、正常気管に近い上皮層が形成され、免疫染色でも移植細胞が血管新生を誘導または血管へ transformation したことが示唆された。ヒトへの臨床応用に向け、現在長期モデル実験を追加中である。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

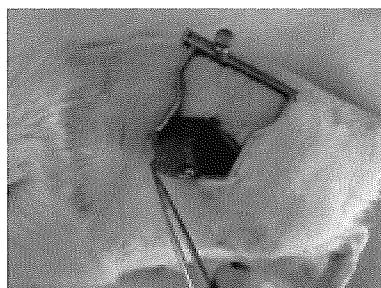


図1 皮下脂肪組織を採取

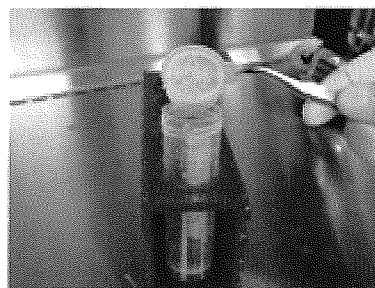


図2 セルストレーナーで濾過

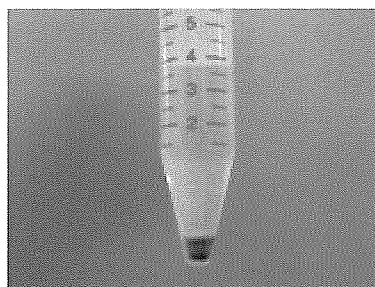


図3 vascular stromal fraction

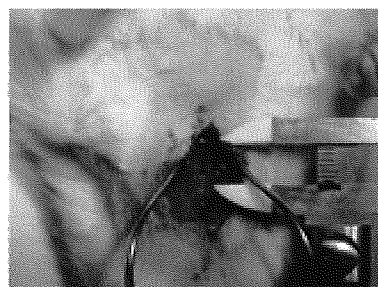


図4 気管損傷モデル

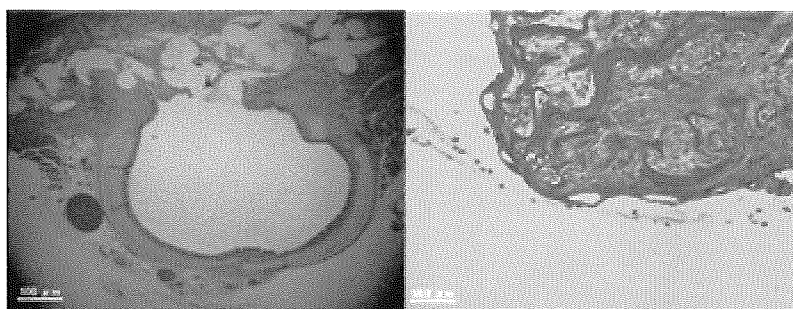


図5 ①コントロール例：右 弱拡大 左 強拡大

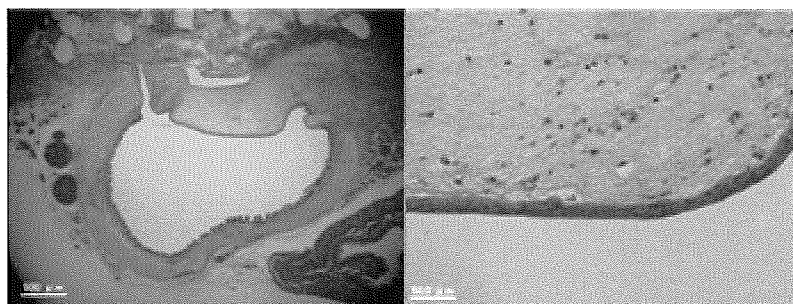


図6 ② fibroblast 例：右 弱拡大 左 強拡大

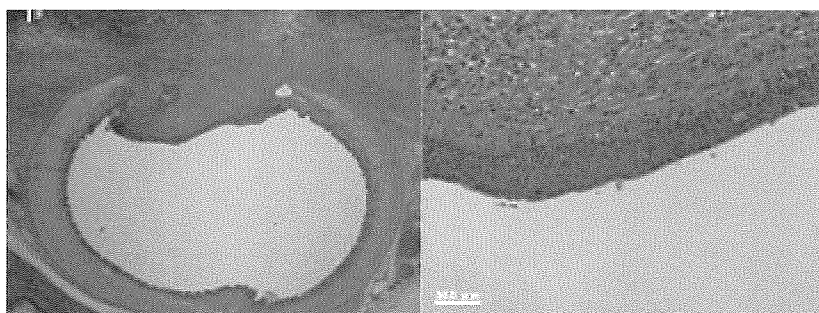


図7 ③ fibroblast+stromal fraction 例：右 弱拡大 左 強拡大

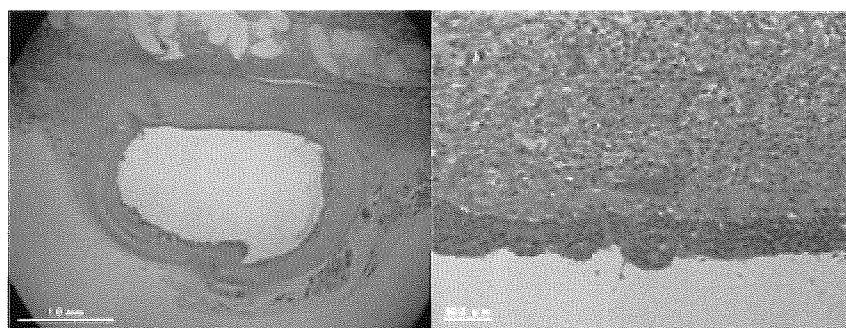


図8 ④ fibroblast+vascular stromal fraction 例：右 弱拡大 左 強拡大

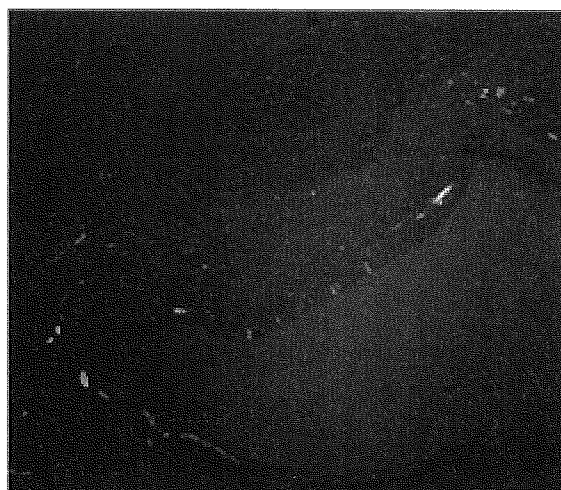
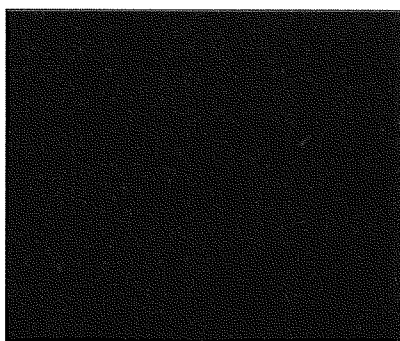


図9 ③ fibroblast+stromal fraction 例の免疫染色
 右上：緑 vWF 陽性
 右下：赤 DiI で標識した移植細胞
 左：merge 橙色 上記2者が陽性

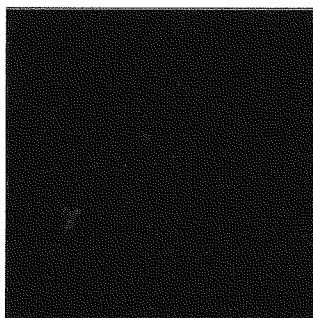


図9 ④ fibroblast+vascular stromal fraction 例の免疫染色
 右上：緑 vWF 陽性
 右下：赤 DiI で標識した移植細胞
 左：merge 橙色 上記2者が陽性

気道領域におけるヒト組織の培養および再生に関する研究

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 横山 秀二（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）
小林 謙（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）
分担研究者 多田 靖宏（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）

研究要旨

気道領域においては、腫瘍や外傷、奇形により組織の変形、欠損を生じることが多く、それにより形態的・機能的障害を引き起こす。

そこで、腫瘍や外傷、奇形により欠損した組織を自己組織で再建すべく、ヒト組織の細胞を確実に培養する方法について検討する。

A. 研究目的

腫瘍、外傷、奇形により欠損した骨・軟骨組織、上皮組織、結合織、筋肉、唾液腺などを自己組織で再建すべく、ヒト組織の細胞を確実に培養する方法について検討した。

B. 研究方法

[細胞単離および培養]

気管上皮細胞：摘出した気管片は抗生物質を含む PBS で洗浄した後、type XIV protease 溶液で酵素処理を施し、攪拌することによって剥離した気管上皮層を回収した。気管上皮層は緩やかなピペッティングによって十数個の上皮細胞塊に解した後、気管上皮細胞専用の増殖培地（EGF、Insulin、transferrin、hydrocortisone、triiodothyronine、retinoic acid、bovine pituitary extract、bovine serum albumin を含む DMEM / F-12）で培養した。

気管線維芽細胞：上述の酵素処理を施した気管から組織片培養法によって単離した。増殖培地としては10%牛胎児血清（FBS）を含む DMEM を用いた。

口腔粘膜上皮細胞：摘出した口腔粘膜は抗生物質を含む PBS で洗浄した後、Dispase 溶液で酵素処理を施すことによって粘膜下層から上皮層を分離した。得られた上皮層はトリプシン・EDTA 溶液中で解した後、10% FBS を含む DMEM を用いて培養した。

口腔粘膜線維芽細胞：上述の上皮層を除いた粘膜下層を組織片培養することによって単離し、10% FBS を含む DMEM を用いて培養した。

末梢血由来細胞（血管内皮前駆細胞を含む分画）：ヘパリン入りシリンジで採血した20ml の血液をクリーンベンチ内で血液を等量の PBS で希釈した。希釈血液から FicolI を用いた密度勾配遠心法によって単核球分画を分離した。得られた末梢血由来細胞を Fibronectin でコー

トしたフラスコ上に播種し、血管内皮前駆細胞用培地（EGF、bFGF、VEGF、IGF、heparin、ascorbic acid、FBS を含む MCDB 培地）で培養した。

脂肪由来細胞：摘出した皮下脂肪は抗生物質を含む PBS で洗浄した後、collagenase II 溶液で酵素処理を施すことによって細胞懸濁液にした。遠心分離によって脂肪細胞と脂肪滴を分離した後、pore70 μ m で濾過し、通過した分画を脂肪由来細胞分画として10% FBS を含む DMEM を用いて培養した。

[上皮細胞層と線維芽細胞層を有する再生組織の作製]

線維芽細胞層はコラーゲンスポンジ上に線維芽細胞を懸濁したコラーゲンゲル溶液を滴下して37℃でゲル化させることによって作製し、上皮細胞層は、ゲル上に上皮細胞を播種してコンフルエントに達するまで気管上皮細胞培地で培養することによって作製した。

C. 研究結果

上述した方法により6種類のヒト細胞培養を行った。気管上皮細胞顕微鏡写真（図1）、気管上皮線維芽細胞写真（図2）、口腔粘膜上皮細胞写真（図3）、口腔粘膜線維芽細胞写真（図4）、末梢血由来細胞写真（図5）脂肪由来細胞写真（図6）。

ヒト気管上皮細胞を用いて、上皮層、コラーゲンゲル層、コラーゲンスポンジ層からなる三層構造の再生組織を作製できた（図7左）。さらに上皮下層として線維芽細胞層を導入した再生組織を作製できた（図7右）。線維芽細胞層はエオジンの染色性が強くなり、細胞外基質の増加が観察された。

D. 考 察

これまで、欠損した組織を自己組織で再建すべく、ヒト組織の細胞を確実に培養する方法について検討し、6種類のヒト細胞培養を行った。

今後、細胞種類の追加、長期経過の観察などを行う予定である。また、無血清培地での細胞培養の可否、至適細胞数の決定などが今後の検討課題である。

E. 結 論

腫瘍や外傷、奇形により欠損した組織を自己組織による再建を目指し、ヒト組織の細胞を確実に培養する方法について検討し、6種類のヒト細胞培養を行った。今後更なる実験の追加、詳細な検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

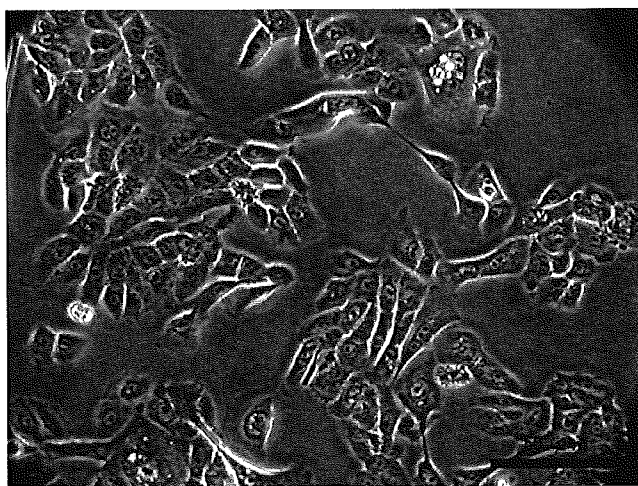


図1

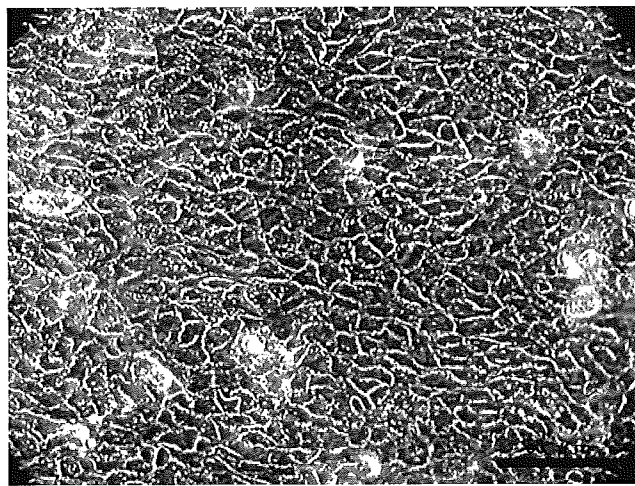


図3

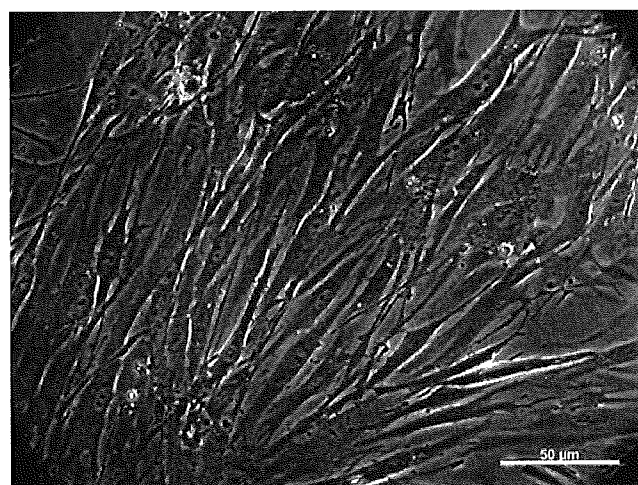


図2

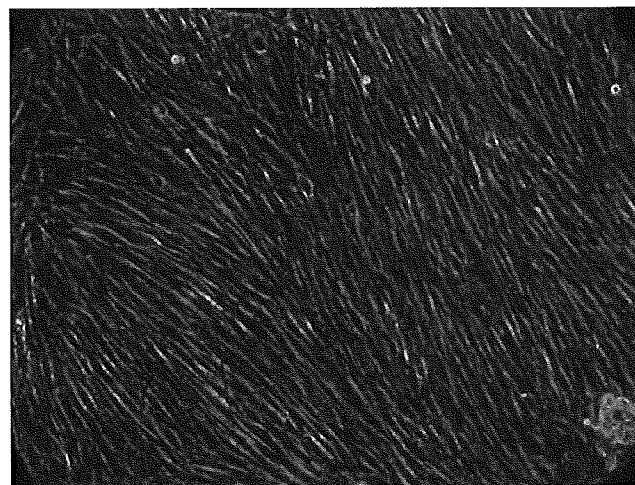


図4

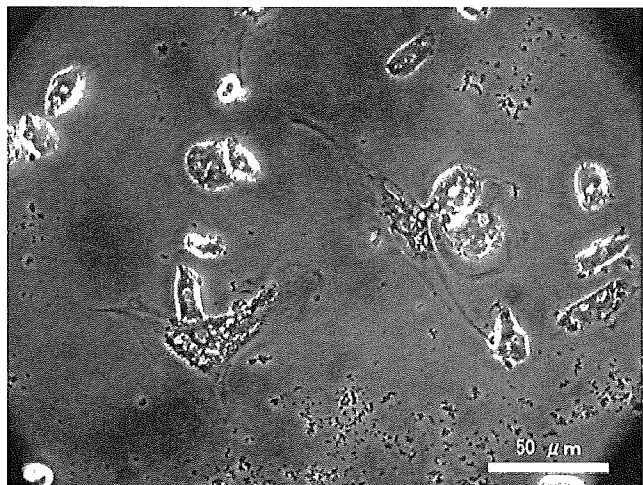


図5

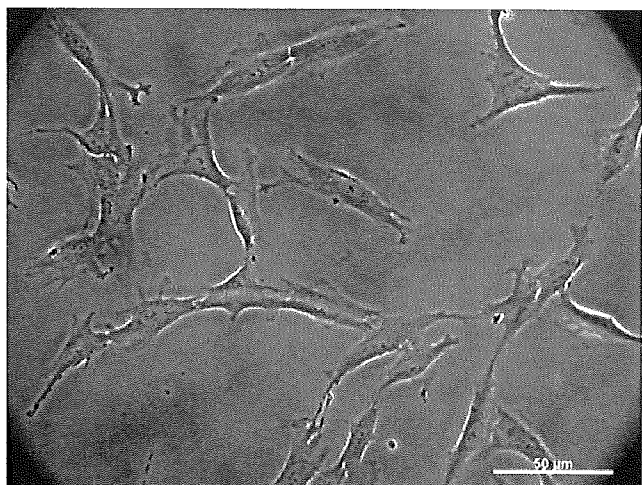


図6

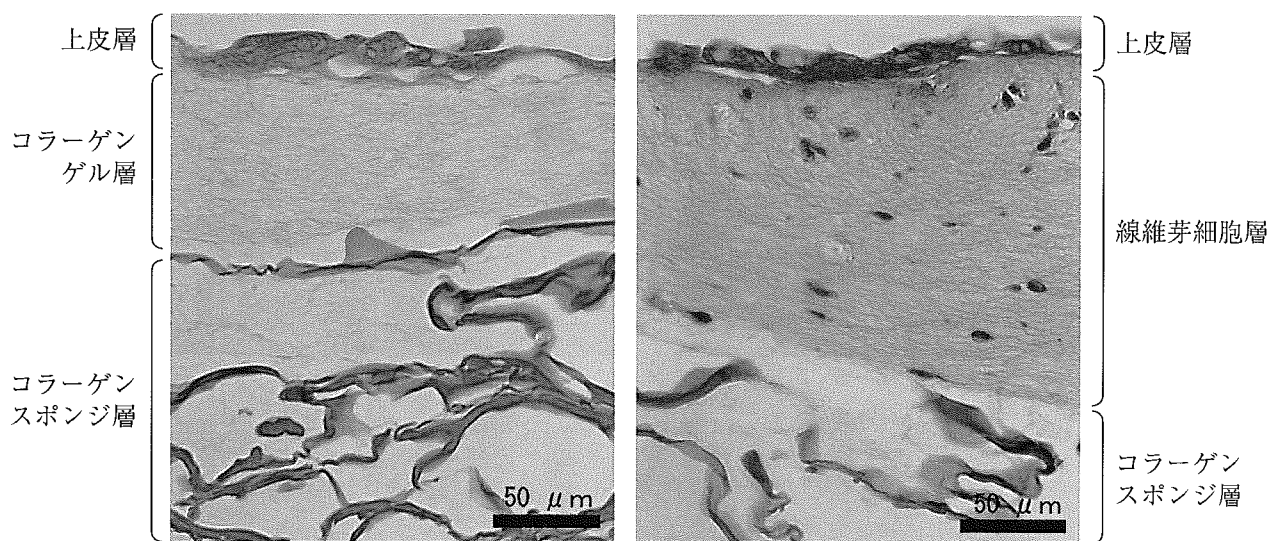


図7