

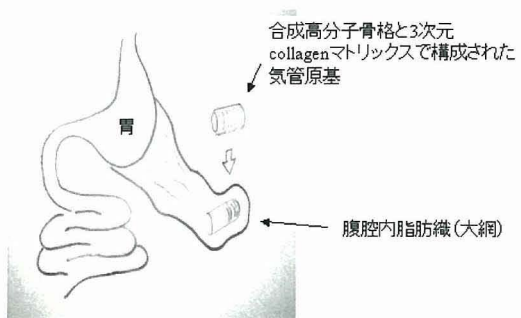


Fig. 8



Fig. 9



Fig.10

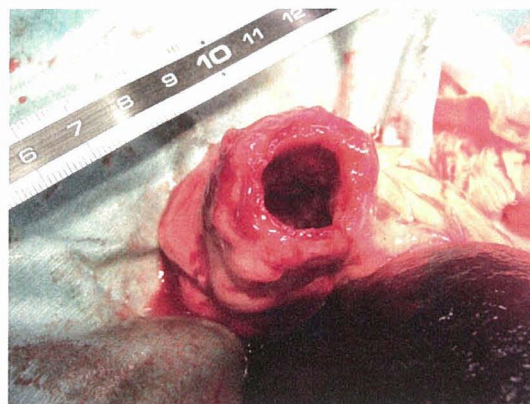


Fig.11

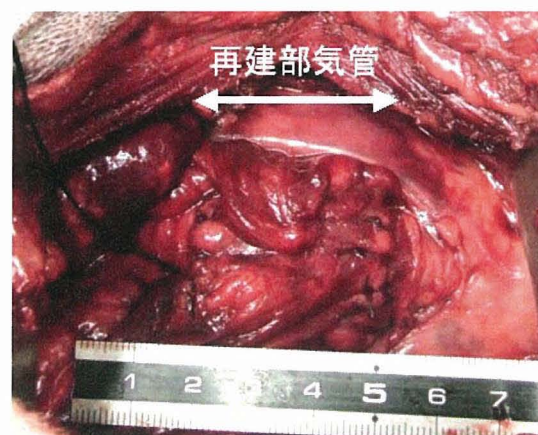


Fig.12

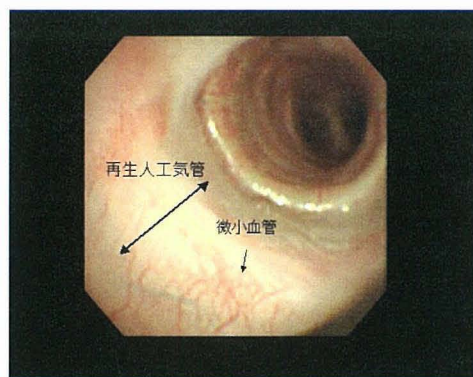


Fig.13

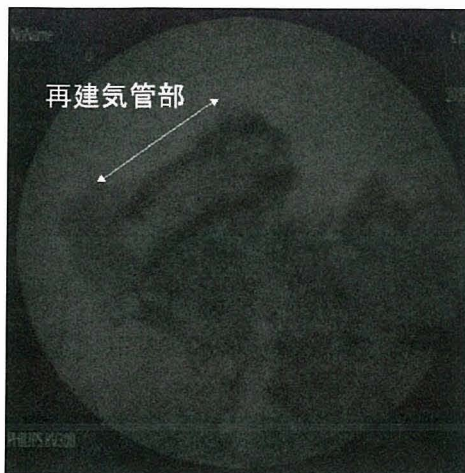


Fig.14



Fig.15

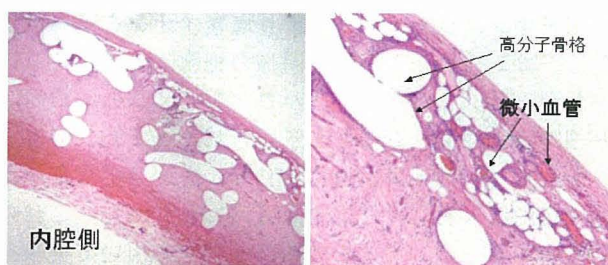


Fig.16

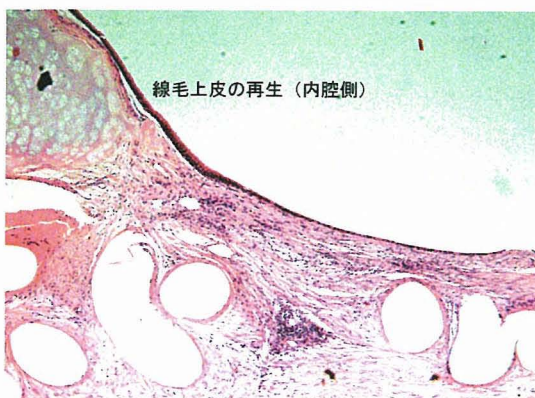


Fig.17

上皮培養細胞を用いた障害に起因する細胞死を防止する方法の研究

分担研究者 挾間 章博（福島県立医科大学生理学第一）

研究協力者 三宅 将生（福島県立医科大学生理学第一）

研究要旨

培養気道上皮細胞シートを生体に移植する際に機械的操作や低酸素条件による細胞障害を受ける可能性が大きい。このような細胞障害を防ぐ方法があれば、培養気道上皮細胞シートの生着率を上げることができると考えられる。本研究では、最近アポトーシスと関連があるとされている塩素イオンに着目し、細胞内塩素イオン濃度上昇を防ぐことができれば、機械的刺激や低酸素条件による障害性細胞死も防ぐことができるかどうかを検討した。実験を効率よく進めるために培養上皮細胞株（HeLa細胞）を用いて、細胞膜透過性を亢進させる **amphotericin B** を投与し、細胞死が起こることを蛍光色素取り込みを指標として観察した。この条件下で細胞外塩素イオン濃度を下げたり、塩素イオンチャネル阻害剤を加えることで細胞死が抑制されることが明らかとなった。このことから、塩素イオンチャネル阻害剤が、上皮細胞シートの機械的ダメージによる細胞死を防げる可能性があることが明らかとなった。

A. 研究目的

種々の細胞において、細胞外イオン環境が細胞の生死に関わることが明らかになりつつある。とくに、塩素イオンとアポトーシスの関係が注目され、低塩素イオン濃度条件がアポトーシスを抑制することが報告されている。平成16年～17年度の本助成研究において確立した培養上皮細胞シートを移植に用いる際に、細胞死を防ぐような手段を講ずることにより、組織を生着率を向上させることが出来ることが予想される。そのような条件を見出すことを本年度研究の目的とする。

B. 研究方法

効率よく細胞保護に関わる条件を見つけるために、培養上皮細胞株（HeLa細胞）を用いて実験を行った。具体的には、細胞外液に通常条件では細胞膜を通過しない蛍光色素（**propidium iodide** : PI）を加えておき、さらに細胞に膜透過亢進させ細胞障害をもたらす薬物（**amphotericin B**）を細胞外液に加える。この条件で、倒立蛍光顕微鏡にて経時的に観察を行うと、細胞が障害を受け細胞膜の透過性が亢進すると蛍光色素が細胞内に流入し、核DNAと結合すると蛍光を発するのが観察できる。細胞死を防ぐような薬物を同時投与して、障害を受けた細胞数を蛍光を用いて定量することにより、細胞死を防ぐ条件を見つけることができる。

C. 研究結果

これまでアポトーシスを防ぐことが知られている低塩素イオン濃度条件で、研究方法に示した細胞障害の実験を行った。コントロール条件（細胞外NaCl溶液）にお

いては、**amphotericin B** 投与により、約1時間で、殆どの細胞に蛍光色素の流入が認められ、細胞が障害を受けたことが明らかとなった。塩素イオンの代わりに分子量の大きい有機陰イオンであるグルコン酸を用いた溶液で細胞障害刺激を行うと、蛍光色素の細胞内へ流入が遅延し細胞死が抑制されることが明らかとなった（図参照）。ヨウ素イオン、臭素イオンにより塩素イオンを置換した場合は、コントロール溶液と同様の細胞障害が起こることがわかった。したがって、ハロゲンイオンの細胞内流入が細胞障害に関わることが予想された。また、塩素イオンチャネル阻害剤（**DIDS**、**NPPB**）を用いて塩素イオンの細胞内流入を防ぐと細胞障害は抑制された。これらの実験においては、主としてHeLa細胞を用いて実験条件の検討を行ったが、培養気道上皮細胞においても低塩素イオン濃度条件、および塩素イオンチャネル阻害剤により細胞障害を低減することが明らかとなった。

D. 考 察

培養組織を生体に移植すると、虚血や免疫応答により様々な形で移植組織中の細胞の障害が起こることが予想されるが、本研究を応用するとそれらの障害が低減できる可能性があると考えられる。実際の組織においては、体液のイオン組成を大きく変えることは不可能なので、塩素イオンチャネル阻害剤の投与が移植組織の生存を助ける薬物として有用であろう。ただし、塩素イオンチャネル阻害剤については、実際に臨床で使われた例がなく、実際の使用については、安全性の検討などを今後行う必要がある。

E. 結 論

本研究により、細胞外の塩素濃度を下げることにより、細胞障害に起因する細胞死が防げることが明らかとなった。また、細胞内への塩素流入を防ぐ目的で、塩素イオンチャネル阻害剤を投与しても細胞死が防げる事が分かった。

F. 研究発表

1. 論文発表

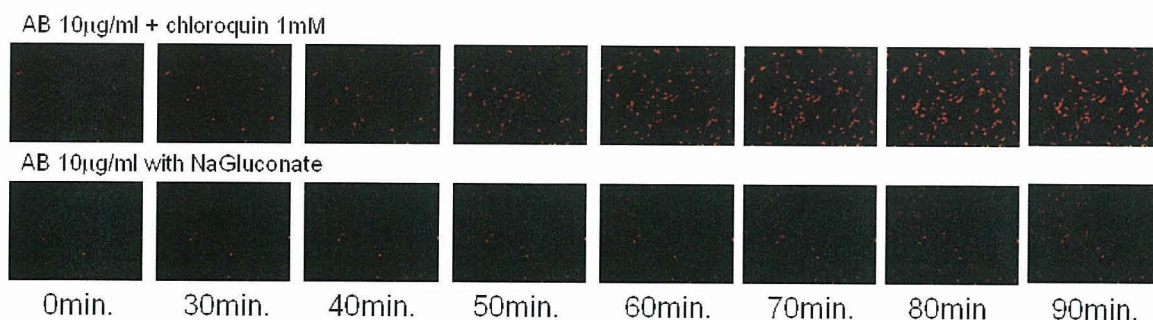
- 1) Nagase H, Gren J, Saito A, Liu K, Agre P, Hazama A, Yasui M. Molecular cloning and characterization of mouse aquaporin 6. *Biochem Biophys Res Commun.* 352:12-16, 2007
- 2) Katsuda S, Miyashita H, Takazawa K, Machida N, Kusanagi M, Miyake M, Hazama A. Mild hypertension in young Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolaemic (KHC) rabbits. *Physiol Meas.* 27:1361-1371, 2006.

- 3) 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 Eng.* 12:2619-2628, 2006
- 4) 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.* 115:501-506, 2006

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 低 Cl イオン条件による障害性細胞死（ネクローシス）抑制効果



気管再生に用いる自家移植用線維芽細胞の供給組織の検索

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

癌や外傷などで気管の一部を切除した場合、物理的、生理的な機能が失われているため、感染や機能障害のリスクが高くなる。この対策法として人工材料へ線維芽細胞を組み込んだ気管の再生組織が提案される。線維芽細胞は、全身の結合組織に散在する細胞であり、組織が損傷を受けると周囲から集まり、細胞外マトリックス（ECM）を産生して結合組織を再生する。線維芽細胞が産生する ECM は、結合組織だけではなく同時に上皮組織の再生を促進し、由来組織が異なる線維芽細胞は ECM の産生量や上皮細胞に及ぼす効果が異なることが報告されている。本研究では気管線維芽細胞の代わりに気管上皮層の再生を促進し、容易に採種可能な移植用線維芽細胞の供給組織を調べた。その結果、歯肉粘膜に由来する線維芽細胞は、気管上皮細胞の増殖、移動、細胞分化、気管線維芽細胞と同等もしくはそれ以上の促進作用を示し、誘導された上皮層の形態も正常気管上皮の特徴である偽多列線毛上皮層であった。歯肉粘膜の採取は容易であり、患者への負担も少ないことから、気管上皮層の形成を促進する線維芽細胞の供給組織として口腔粘膜が最も適切であると考えられた。

A. 研究目的

気管の上皮層は、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が粘液線毛クリアランスをおこない、気管内腔表面の生理環境の維持を果たしている。すなわち、気管上皮層の再生に要する時間が長いほど、術後における感染や機能障害のリスクが高くなり、患者への負担も重くなる。そこで、気管切除後の機能障害の回避と Quality of Life の向上を目的として機能的な気管上皮層の再生を促進する再生組織の研究に着手した。気管上皮層の再生を促進する因子としては、生体において気管上皮層下層に存在する線維芽細胞に着目した。気管から上皮細胞および線維芽細胞を単離して三次元的に共培養した *in vitro* の実験結果から、気管線維芽細胞は気管上皮層の増殖、移動、分化および粘液分泌を促進す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

1. 異なる組織に由来する線維芽細胞の採取・培養

実験動物としてラットを用い、同一個体から気管、皮膚、歯肉粘膜および鼻粘膜より線維芽細胞を outgrowth

法にて採取し、培養した。

2. 上皮細胞と線維芽細胞の共培養

線維芽細胞を含むコラーゲンゲル上に気管より酵素処理にて採取した上皮細胞を播種して共培養する。上皮細胞がコンフルエント到達後は、上皮細胞の分化を促進するため空気暴露した。

3. 線維芽細胞が上皮細胞の増殖・移動に及ぼす効果

各線維芽細胞が上皮細胞の遊走に及ぼす効果は、上皮細胞層の一部を剥離し、再び上皮細胞被覆するまでの時間を測定した。共培養した上皮細胞の増殖率は WST-1 試薬を用いて発色した培地の吸光度を測定することによって調べた。

4. 線維芽細胞が上皮細胞層の形態に及ぼす効果

線維芽細胞が上皮細胞層の形態に及ぼす効果は11日間共培養したコラーゲンゲルを薄切して HE 染色することによって調べた。

（倫理面の配慮）

動物実験に関しては、福島県立医大に動物実験計画書を提出し認められており、動物愛護の配慮も十分行い施行した。

C. 研究結果

各組織に由来する線維芽細胞が気管上皮細胞に及ぼす増殖（図1A）、移動（図1B）、形態（図2）への影響について比較した結果、鼻腔粘膜に由来する線維芽細胞は、上皮細胞に対する増殖および移動促進効果が低く、誘導された上皮細胞の形状も円柱上皮ではなく立方上皮

であった。皮膚線維芽細胞は気管上皮細胞に対して気管線維芽細胞と同程度の増殖、移動促進作用を示した。しかし、皮膚線維芽細胞によって誘導された上皮層は、二層構造を呈しており、上層は気管上皮層の特徴を示し、下層は *in vivo* 皮膚と同様に発達した基底層と扁平上皮層を有していた。歯肉粘膜に由来する線維芽細胞は、気管上皮細胞の増殖、移動、細胞分化気管線維芽細胞と同等もしくはそれ以上の促進作用を示し、誘導された上皮層の形態も正常気管上皮の特徴である偽多列線毛上皮層であった。

D. 考 察

上皮細胞は線維芽細胞と相互作用することによって本来有する形質を発現する。本研究において線毛運動や粘液分泌など特異的な機能を有する気管の上皮細胞は、相互作用の相方となる線維芽細胞の由来組織に対し、敏感に反応し、獲得した機能も大きく異なっていた。線維芽細胞は様々な組織に存在するが、由来する組織によって線維芽細胞の性質が異なることが報告されていることから、これらの違いが生じたと考えられ、歯肉粘膜に由来する線維芽細胞がもっとも気管線維芽細胞に近い気管上皮層誘導能を有していることがわかった。

E. 結 論

歯肉粘膜の採取は容易であり、患者への負担も少ない。口腔粘膜の線維芽細胞は気管以外の他の再生分野で既に臨床応用されてその安全性が示されていることから、気管上皮層の形成を促進する線維芽細胞の供給組織として口腔粘膜が最も適切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 and Omori K, Effect of fibroblasts on tracheal epithelial regeneration *in vitro*. *Tissue engineering* 12, 2619-2628, 2006
- 2) Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Kobayashi K, Miyake M, Hazama A, Wada I, Kanemaru S, Nakamura T and Omori K. *Tissue engineering for regeneration of the tracheal epithelium*. *Annals of Otology, Rhinology, and Laryngology* 115, 501-506, 2006
- 3) 大森孝一, 中村達雄, 多田靖宏, 野本幸男, 鈴木輝久, 小林 謙, 佐藤 聡, 金丸眞一, 安里 亮, 山下 勝 気管の再生と臨床応用, 分子呼吸器病, 第10巻, 216-219, 2006

2. 学会発表

- 1) Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Kobayashi K, Miyake M, Ogawa H, Hazama A, Omori K, Kanemaru S. The effects of fibroblasts upon the epithelial regeneration on the surface of the artificial trachea. The 86th Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological

Association Chicago, Illinois, USA. May, 2006

- 2) 野本幸男, 小林 謙, 多田靖宏, 鈴木輝久, 三宅将生, 挾間章博, 和田郁夫, 中村達雄, 大森孝一: 上皮細胞層を有するハイブリッド型人工気管の作製, 第107回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2006.5.11, 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

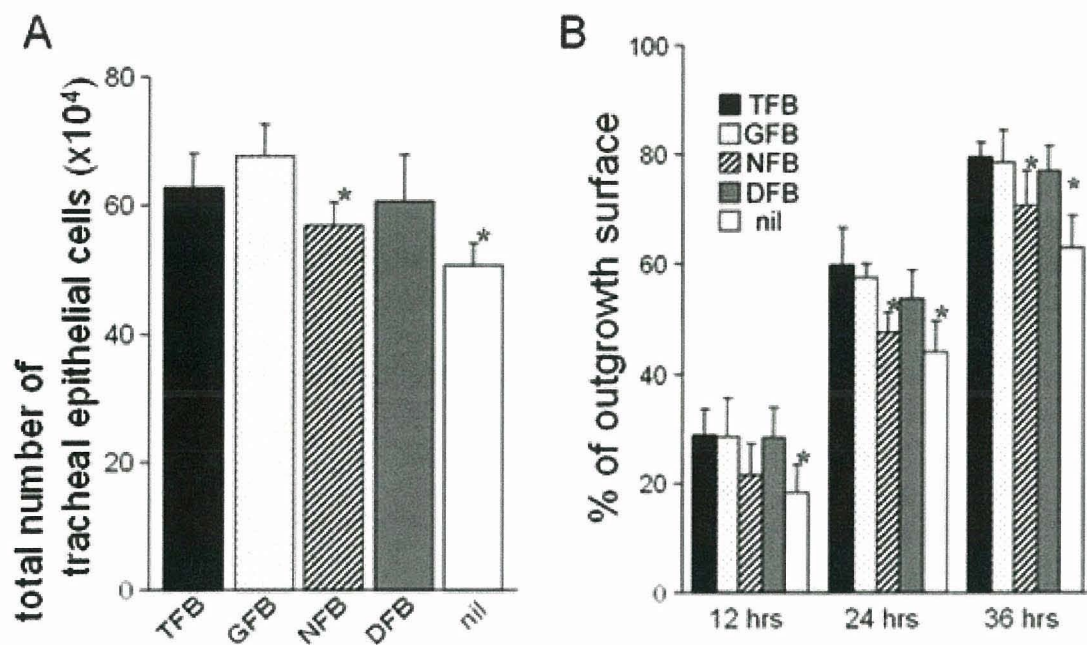


図1 各組織由来の線維芽細胞が気管上皮細胞の増殖(A)と移動(B)に及ぼす影響
TFB、GFB、NFB、DFB は各々気管、歯肉粘膜、鼻粘膜、皮膚に由来する線維芽細胞とともに共培養した上皮細胞、nil は線維芽細胞を含まないで培養した上皮細胞の数値を示す。

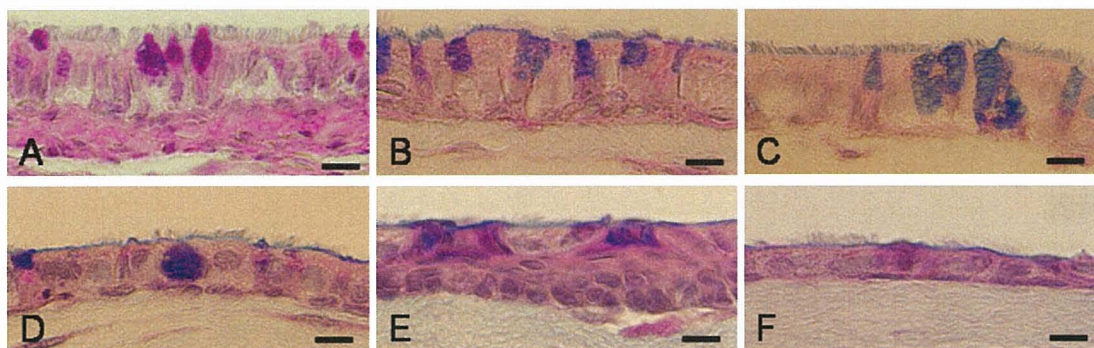


図2 各組織由来の線維芽細胞が気管上皮細胞層の形態に及ぼす影響
in vivo 気管上皮層(A)あるいは気管(B)、歯肉粘膜(C)、鼻粘膜(D)、皮膚(E)に由来する線維芽細胞とともに共培養した上皮細胞層、線維芽細胞非存在下の上皮細胞層(F)のアルシアンブルー・PAS 染色像を示す。

気管由来線維芽細胞を用いたハイブリッド人工気管

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）

研究協力者 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

我々の研究グループは、ポリプロピレンメッシュ製の骨格に足場としてコラーゲンスポンジを付加した自己再生型人工気管をこれまで複数の臨床例に応用し、概ね良好な結果を得てきた。一方、改善すべき点として気管内腔面上皮化遅延が挙げられる。今回我々は自己再生型人工気管を用いた気管再建後の内腔面上皮化促進を図るべく、自己再生型人工気管に気管由来線維芽細胞を付加したハイブリッド人工気管を作製し、in-vivoでの評価を行った。Sprague-Dawley (SD) 系ラットの気管から気管由来線維芽細胞を採取し継代培養した。さらにこの線維芽細胞に蛍光蛋白である monomeric yellow fluorescent protein (m-YFP) の遺伝子を導入した。I 型コラーゲン溶液に m-YFP で標識された線維芽細胞を混合し、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上に重層し、さらにゲル化させた。これを移植片(A)とし、コントロールとしてコラーゲンスポンジにコラーゲンゲルのみ重層したモデル(B)、コラーゲンスポンジのみのモデル(C)を用意した。これらをラット気管欠損モデルに移植した。14日目では、(A)では円柱線毛上皮が多数認められ、(B)では立方線毛上皮が部分的に認められ、(C)では重層扁平上皮が認められた。ゲル層の m-YFP 陽性細胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、術後3日目ではゲル層に分散したままであったが、7日目では上皮下への遊走・配列が認められ、14日目にはほぼ消失していた。線毛の有無、上皮細胞の形態などといった上皮層の分化は(A)が最も進んでおり、(C)が最も遅れていた。この結果は気管上皮細胞の増殖・分化に対する線維芽細胞の促進的効果を示唆するものと考えられた。さらに培養基質として優れた性質を有する I 型コラーゲンゲルを用いたことも、上皮化促進に寄与していると考えられた。また線維芽細胞は淘汰される以前の早い段階で人工気管内腔面上皮化促進に寄与している可能性が示唆された。

A. 研究の目的

臨床の場合において気管切除後の再建材料としての人工気管の必要性は非常に高かったにもかかわらず、十分に安全性が確立された人工気管はこれまでなかった。共同研究者である中村らは、筒状に加工された作製し、犬を用いた動物実験で良好な結果を報告した。これを踏まえ、共同研究者の大森らは、自己再生型人工気管を甲状腺癌気管浸潤例の気管再建に導入した。この初回臨床応用例では良好な結果が得られ、以降甲状腺癌、炎症性気管狭窄症例など併せて数例の気管再建にこの人工気管が用いられた。各症例の術後経過は概ね良好である。一方大森は初回臨床応用例の報告のなかで、気管内腔面上皮化に約2ヶ月を要したと指摘している。上皮化遅延は現在のところ臨床例において大きな問題には至っていないが、今後症例を増やしていく過程で、感染や瘻孔形成などの原因になる可能性は否定できない。今回我々は自己再生型人工気管を用いた気管再建後の内腔面上皮化促進を図る工夫として、自己再生型人工気管に気管由来線維芽細胞を付加したハイブリッド人工気管を作製し、in-vivoでの評価を行った。

B. 対象及び方法

Sprague-Dawley (SD) 系ラットの気管を採取し、酵素処理にて気管上皮細胞を除去した。気管を大きさ数mm程度の組織片に分割し、これを培養皿上で組織片培養した。培養開始後5日程度すると組織片から培養皿上に線維芽細胞が遊走・増殖するため、これを回収し継代培養した。こうして得られた気管由来の線維芽細胞に、蛍光蛋白である monomeric yellow fluorescent protein (m-YFP) の遺伝子をウイルスベクターを用いて導入した。I 型コラーゲン溶液に m-YFP で標識された線維芽細胞及び培地を混合し、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上に重層し、さらにゲル化させた。これを移植片(A)とし、コントロールとしてコラーゲンスポンジにコラーゲンゲルのみ重層したモデル(B)、コラーゲンスポンジのみのモデル(C)を用意した。

全身麻酔下に Sprague-Dawley (SD) 系ラットの気管を開窓し、先の移植片(A)、(B)、(C)を開窓部に充て閉鎖した。術後観察期間は3日、7日、14日とし、気管を摘出した上で、組織学的検討を行った。

(倫理面の配慮)

動物実験に関しては、福島医大に動物実験計画書を提出し認められており、動物愛護の配慮も十分行い施行した。

C. 結 果 (図1 参照)

3日目では、(A)、(B)は単層扁平上皮が認められた。(C)はコラーゲンスポンジが露出した状態であった。蛍光顕微鏡での観察では(A)のコラーゲンゲル層には、分散したままのm-YFP陽性細胞が認められた。

7日目では、(A)、(B)は重層扁平上皮が、(C)は単層の扁平上皮が認められた。蛍光顕微鏡での観察では(A)のコラーゲンゲル層には遊走して上皮下に配列したm-YFP陽性細胞が認められた。

14日目では、(A)では円柱線毛上皮が多数認められ、(B)では立方線毛上皮が部分的に認められ、(C)では重層扁平上皮が認められた。蛍光顕微鏡での観察ではゲル層のm-YFP陽性細胞がほぼ消失しており、宿主由来線維芽細胞と思われる細胞が多数浸潤していた。

D. 考 察

線維芽細胞にはコラーゲン産生の他、様々なサイトカインを放出し、上皮細胞の増殖・分化を促進する働きがあることが明らかにされている。皮膚科・形成外科領域ではコラーゲンスポンジに真皮由来線維芽細胞を付加した人工真皮が開発され、現在商品化された材料が臨床の場で使用されている。気管上皮細胞の増殖・分化に対する気管由来線維芽細胞の影響については、共同研究者の小林がin-vitroでの評価を行い、線維芽細胞の存在下では気管上皮細胞の増殖・分化、基底膜の形成が促進されることを明らかにした。本実験ではコラーゲンスポンジ上に気管由来線維芽細胞含有コラーゲンゲルを重層したモデル(A)、コラーゲンゲルのみを重層したモデル(B)、コラーゲンスポンジのみのモデル(C)をラット気管開窓部に移植するという、in-vivoでの評価をおこなった。線毛の有無、上皮細胞の形態などといった上皮層の分化は(A)が最も進んでおり、(C)が最も遅れていた。この結果は、小林の報告と同様、気管上皮細胞の増殖・分化に対する線維芽細胞の促進的効果を示唆するものと考えられた。また培養基質として優れた性質を有するI型コラーゲンゲルを用いたことも、上皮化促進に寄与していると考えられた。

今回の実験は同種移植の範疇に入ると考えられ、術後14日目に移植した細胞が消失したのは、宿主からの緩い免疫拒絶反応によるものと推測された。術後14日目で上皮化に差が生じたことは、移植された同種線維芽細胞が淘汰される以前の早い段階で、人工材料上の上皮化に促進的な効果を発揮した結果と考えられた。

E. 結 論

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上に気管由来線維芽細胞含有コラーゲンゲルを重層したハイブリッド型人工気管モデルを作製し、in-vivo

でその効果を評価した。

線維芽細胞含有コラーゲンゲル重層モデル(A)、非含有コラーゲンゲル重層モデル(B)、コラーゲンスポンジのみのモデル(C)をそれぞれラット気管欠損モデルに移植したところ、(A)が最も上皮細胞の分化が早く、(C)がもっとも遅かった。

ゲル層の移植線維芽細胞は、術後3日目ではゲル層に分散したままであったが、7日目では上皮下への遊走・配列が認められ、14日目にはほぼ消失していた。

線維芽細胞は淘汰される以前の早い段階で人工気管内腔面の上皮化促進に寄与している可能性が示唆された。

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 Tracheal epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 115:501-506, 2006

2. 学会発表

- 1) Nomoto Y, Kobayashi K, Suzuki T, Tada Y, Sato S, Miyake M, Hazama A, Wada I, Nakamura T, Omori K. The effect of fibroblasts upon the epithelial regeneration on the surface of the artificial trachea. the Eighty-Sixth Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological Association, Chicago, Illinois, May 19-20, 2006
- 2) 野本幸男, 小林 謙, 多田靖宏, 鈴木輝久, 三宅将生, 狭間章博, 和田郁夫, 中村達雄, 大森孝一: 上皮細胞層を有するハイブリッド型人工気管の作製 第107回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2006.5.11-13, 東京)
- 3) 野本幸男, 小林 謙, 多田靖宏, 鈴木輝久, 佐藤 聡, 岡野 渉, 和田郁夫, 中村達雄, 金丸眞一, 大森孝一: 上皮細胞層を有するハイブリッド人工気管作製の試み 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.11-12, 東京)
- 4) 野本幸男, 小林 謙, 多田靖宏, 鈴木輝久, 佐藤 聡, 岡野 渉, 和田郁夫, 中村達雄, 大森孝一: 線維芽細胞を組み合わせたハイブリッド人工気管作製の試み 第9回日本組織工学会 (2006.9.7-8, 京都)
- 5) 野本幸男, 小林 謙, 多田靖宏, 鈴木輝久, 佐藤 聡, 岡野 渉, 和田郁夫, 金丸眞一, 中村達雄, 大森孝一: 気管由来線維芽細胞を含有したハイブリッド人工気管モデル 第58回気管食道科学会総会ならびに学術講演会 (2006.10.5-6, 札幌)

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

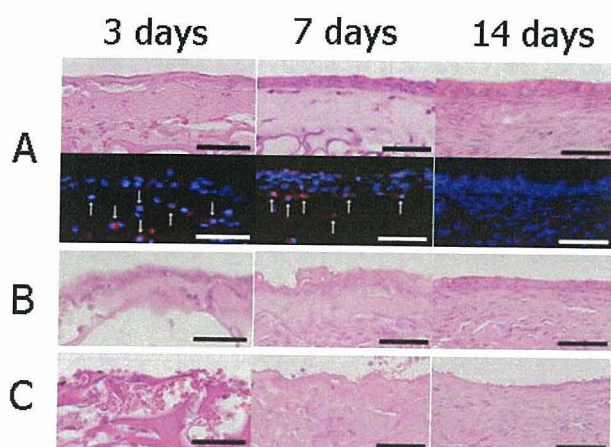


図 1

- A : コラーゲンスポンジ上に気管由来線維芽細胞含有コラーゲンゲルを重層したモデル
(上段は HE 染色 / 下段は蛍光免疫染色 ※赤 : m-YFP 青 : DAPI)
- B : コラーゲンスポンジにコラーゲンゲルのみ重層したモデル (HE 染色)
- C : コラーゲンスポンジのみのモデル (HE 染色)

※ scale = 50 μ m

自家脂肪組織由来幹細胞を利用した気管再生

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）

小林 謙（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）

研究要旨

気管は呼吸機能を維持する上で生体に必要不可欠な部位であり、癌や外傷などにより気管の一部を切除した場合、呼吸の他、発声、嚥下など様々な機能障害を生じ、Quality of lifeの低下を来す。その再建法として研究代表者の所属する研究チームは、コラーゲンを被覆した自己組織再生型の人工材料の移植による気管組織の再生を試みている。しかし、再建部の上皮化に問題があり、改善法として脂肪組織由来幹細胞を利用し上皮化促進に対する効果を調べた。結果、脂肪組織由来幹細胞を利用した移植1週間後、コントロールと比較して上皮化が促進しており、移植2週間後には正常気管に近い偽多列線毛上皮層が認められた。臨床応用を考えた場合、細胞移植は自家細胞が理想であり、脂肪組織は採取が容易で患者の負担は軽く、今後、自家移植に適する細胞の供給組織として有用であると思われた。

A. 研究目的

気管の上皮層の再生を促す要素として、生体からいかに血管新生を誘導するかが重要であると多くの研究者が報告している。以前から血管新生を促す細胞として骨髄由来の幹細胞が注目され、その有用性が報告されている。近年、骨髄以外に幹細胞を供給できる組織として、皮膚、唾液腺などが報告されはじめたが、本研究では脂肪組織由来幹細胞に着目し、気管上皮層の再生に及ぼす影響について調べた。

B. 研究方法

脂肪由来幹細胞はラット鼠径部皮下脂肪を採取し、コラーゲナーゼ処理して分解したものから、遠心後の上澄みの脂肪細胞を除いた沈殿分画を、セルストレーナーによって血管断片や未消化の脂肪組織を除いて得られる細胞をディッシュ上に播種、接着した細胞群を3週間培養した。そのようにして得られた細胞の多分化能は骨誘導培地、軟骨細胞誘導培地、神経細胞誘導培地、脂肪細胞誘導培地を使用することで各々骨細胞、軟骨細胞、神経細胞、脂肪細胞へと分化を誘導し確認を行った。脂肪組織由来幹細胞は本手法による得られることが判明した。

上記手法で得られた脂肪由来幹細胞は、*in vitro*の実験ではコラーゲンゲル内に、気管上皮細胞はそのコラーゲンゲル上で培養した。また、コントロールとして気管上皮細胞のみをコラーゲンゲル上で培養し、両者を比較した。*in vivo*の実験ではラット気管欠損モデルをまず作製した。脂肪由来幹細胞を含むコラーゲンゲルをコラーゲンスポンジとポリプロピレンメッシュからなる組織再生型人工材料上に重層したハイブリッド人工気管をラッ

ト気管欠損モデルに移植した。細胞を含まないものをコントロールとして、脂肪由来幹細胞が上皮層の再生に及ぼす影響を組織化学的手法で評価した。

（倫理面への配慮）

動物実験に関しては、福島県立医科大学に動物実験計画書を提出し認められており、動物愛護の配慮も十分行い施行した。

C. 研究結果

*in vitro*の実験では、脂肪組織由来幹細胞と共に培養した気管上皮細胞はいずれも線毛細胞や杯細胞が極性をもって存在する多列線毛上皮層を再構築しており、上皮層の表面には線毛細胞による線毛運動や杯細胞による粘液の分泌が観察された。コントロールでは、線毛細胞や杯細胞は少なく、多列線毛上皮層は形成していなかった。*in vivo*の実験では、脂肪組織由来幹細胞を含むハイブリッド人工気管の移植1週間後、その表面にはコントロールと比較して上皮化が促進しており（図1）、移植2週間後には円柱状の線毛細胞に分化した細胞および偽多列線毛上皮層が認められたが、コントロールではほとんど認められなかった（図2）。

D. 考察

本研究の結果から、脂肪組織由来幹細胞は上皮層・上皮層下の再構築を促進することが明らかになった。特に上皮に関しては正常気管上皮の特徴である偽多列線毛上皮層形成が促進しており、本研究で利用した幹細胞が分化誘導に大きな役割を果たしたのと考えられた。

E. 結 論

臨床応用を考えた場合、細胞移植は倫理的・安全性の面でも自家細胞が理想である。脂肪組織は採取が容易であり、また、採取できる細胞数も多い。いずれの点も患者の負担を軽減し、今後、自家移植に適する細胞の供給組織として有用であると思われる。

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 and Omori K. Effect of fibroblasts on tracheal epithelial regeneration in vitro. Tissue engineering 12, 2619-2628, 2006
- 2) Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Kobayashi K, Miyake M, Hazama A, Wada I, Kanemaru S, Nakamura T and Omori K. Tissue engineering for regeneration of the tracheal epithelium. Annals of Otology, Rhinology, and Laryngology 115, 501-506, 2006
- 3) 大森孝一, 中村達雄, 多田靖宏, 野本幸男, 鈴木輝久, 小林 謙, 佐藤 聡, 金丸眞一, 安里 亮, 山下 勝 気管の再生と臨床応用, 分子呼吸器病, 第10巻, 216-219, 2006

2. 学会発表

- 1) 鈴木輝久, 野本幸男, 多田靖宏, 小林 謙, 佐藤 聡, 小川 洋, 三宅将生, 挟間章博, 中村達雄, 金丸眞一, 田畑泰彦, 大森孝一: 第18回日本喉頭科学会総会・学術講演会 (2006.4.17, 熊本)
- 2) 鈴木輝久, 小林 謙, 野本幸男, 多田靖宏, 大森孝一: 自家脂肪組織由来の細胞群を用いたハイブリット人工材料の被覆 第27回日本炎症・再生医学会 (2006.7.12, 東京)
- 3) 小林 謙, 鈴木輝久, 野本幸男, 多田靖宏, 大森孝一: 脂肪組織由来の細胞が気管上皮層の再生に及ぼす影響 第8回日本組織工学会 (2006.9.8, 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

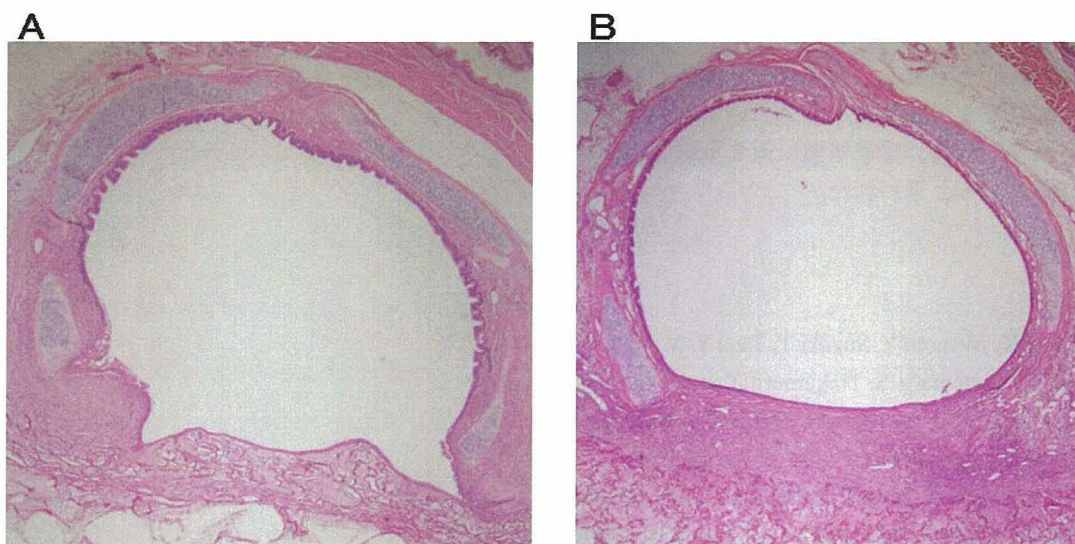


図1 移植後1週間のHE組織所見（A コントロール、B 脂肪組織由来幹細胞）
 コントロールに比べ脂肪組織由来幹細胞を含む移植モデルでは上皮下層の構築がすすみ、欠損部周囲と上皮がなめらかに連続している。上皮下層には多くの細胞が認められる。

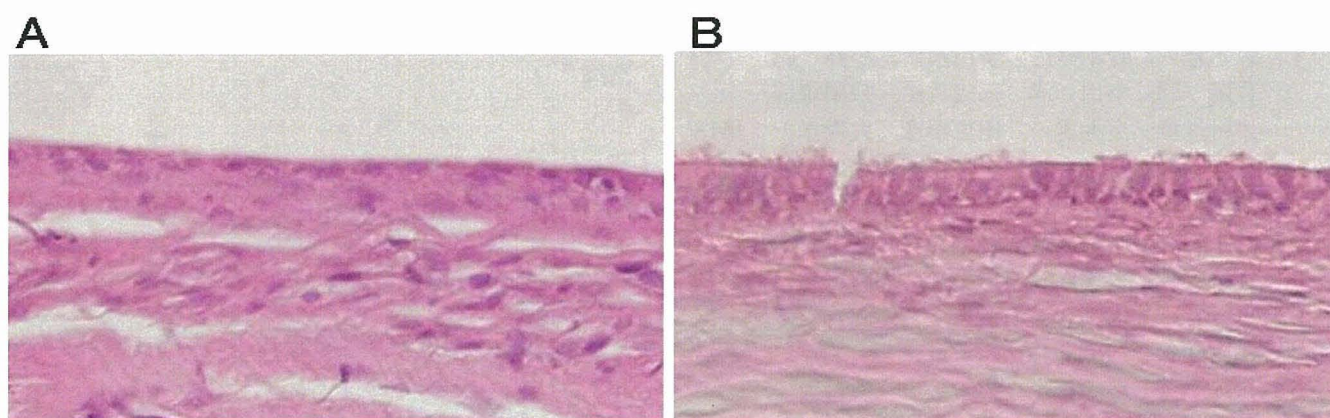


図2 移植後2週間のHE組織所見（A コントロール、B 脂肪組織由来幹細胞）
 脂肪組織由来幹細胞を含む場合、線毛細胞や杯細胞などもみられ、ほぼ正常に近い偽多列線毛上皮層が形成されている。

声帯再生を目的に移植された自己骨髄由来間葉系細胞の 生体内動態の検討

分担研究者 金丸 真一（京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）
中村 達雄（京都大学再生医科学研究所臓器再生応用分野）
研究協力者 山下 勝（京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）
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

細胞移植は将来有望な再生治療のひとつである。しかし、移植された細胞が組織再生にどのように働いていくかといった生体内動態についてはいまだ十分な検討はなされていない。本研究では移植された細胞の細胞内動態の検討を行った。

増殖中の細胞の DNA に取り込まれる BrdU というチミジンのアナログを用い骨髄由来イヌ間葉系細胞をラベルし、これを同一のイヌ声帯に移植。2 週間後移植部位を切除し、抗 BrdU 抗体を用いて観察した。この結果 BrdU 陽性細胞が多数観察され、移植細胞の少なくとも一部は生体内で増殖していないことが分かった。また、一方で移植細胞にレンチウイルスによって蛍光色素 GFP を導入した細胞を同一の上皮系細胞や筋系細胞に分化していることが分かった。

以上の結果より、移植細胞の多くは、細胞増殖することなく組織内にとどまり、直接分化することにより声帯再生に寄与している可能性を見いだした。さらに、損傷組織の大きさと移植細胞数から考えて、移植細胞のおもな働きは Paracrine といったシグナル伝達で、これによるホストの自己再生が関与していることを示唆させた。

A. 研究目的

細胞療法は、再生医療として今後最も期待されている治療法の一つである。細胞療法は、白血病における骨髄移植のように、すでにその有効性がはっきり認められ、臨床応用されているものもある。

近年、骨、心筋をはじめとするさまざまな組織で骨髄由来間葉系細胞（BSCs）移植による良好な再生が報告されている。しかし、移植された細胞の動態についてはいまだ十分な検討はなされていない。すなわち、移植された細胞が直接組織再生に働くのか、移植細胞は変化することなく Paracrine、Autocrine といったシグナル伝達で周辺のホストの細胞に働きかけて組織再生を促すといった間接的な効果によるものなのか、現状では明らかではない。さらには、細胞培養や管理方法の安全性など解決すべき問題も多い。したがって、今後の細胞移植を再生医療の一環として施行していく上では、これらの問題点を克服しつつ進める必要がある。

本研究では、移植された自己 BSCs が障害された組織再生にどのように働くのかを検討することを目的としている。

B. 研究方法

実験Ⅰ

ビーグル犬の骨髄より採取した間葉系細胞を 2 週間

シャーレで培養する。シャーレ内でコンフルエントになった状態で継代を行い、5-bromodeoxyuridine（BrdU）を添加しさらに 2 週間培養する。BrdU は細胞周期 S 期に特異的に取り込まれる DNA 合成基質の 1 つであるチミジンのアナログで、分裂増殖する細胞にのみ取り込まれる。2 週間後にこの細胞を回収し、電気メスで傷害を加えた同じイヌの声帯に移植し、2 週間後屠殺。摘出喉頭を抗 BrdU 抗体で染色し蛍光顕微鏡で観察した。

実験Ⅱ

別のビーグル犬で上記の条件と同じ手法で培養した間葉系細胞に、レンチウイルスを用いて緑色蛍光蛋白である GFP を導入。2 週間後にこの細胞を回収し、約 300 万個の細胞を同ビーグル犬の傷害声帯に移植。2 ヶ月後に屠殺し、摘出喉頭を上皮系細胞のマーカーであるパンサイトケラチン、筋系細胞のマーカーであるデスミンで染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

（倫理面の配慮）

動物実験に関しては、京都大学に動物実験計画書を提出し認められており、動物愛護の配慮も十分行い施行した。臨床応用に関しては倫理委員会の承認の上、ヘルシンキ宣言に則り人権擁護の配慮を行い、対象者に対する不利益、危険性の排除へ十分な配慮をはかり、研究計画に対する説明と同意（インフォームド・コンセント）を得られた上で研究を実施した。

C. 研究結果

実験 I

BrdU でラベルしたイヌ声帯に移植した間葉系細胞は、移植 2 週間後でも蛍光顕微鏡にて組織内で多数観察することができた。

実験 II

レンチウイルスで GFP を導入した間葉系細胞の一部は、移植された領域で上皮系、筋系細胞に分化していた。

D. 考 察

組織が傷害を受けるとその程度にもよるが、通常は外部との交通を遮断するために上皮性の細胞が表層を覆うとともに欠損部位に線維性組織が入り込み瘢痕を残して治癒する。声帯も例外ではなく、傷害部位はこのような治癒過程をたどる。すなわち、傷害部位は線維性組織の進入を受けることによって再生の場が失われてゆくと考えられる。これに対して、われわれはイヌを用いた動物実験で傷害された声帯にコラーゲン内で 3 次元培養した自己 BSCs を移植し良好な結果を報告してきた。これはコラーゲンが再生の場を確保し、組織再生の元になる細胞が成長する足場を提供する材料として最適であると考えられたこと、および BSCs 内に含まれる間葉系幹細胞は、声帯を構成する筋肉や粘膜固有層、上皮層などのさまざまな組織を再生しうる多分化能を有しているという理由からである。

本研究の実験 I において用いた BrdU はいったん細胞内に取り込まれた後は、その細胞が分裂すると薄まるため、通常分裂増殖を繰り返す細胞では確認できなくなる。一方、実験 I 示したように移植 2 週間後でも組織内で BrdU でラベルした細胞が多数確認できたということは、移植細胞は生体組織内で増殖していない可能性を示唆する。

また、実験 II において移植細胞は少なくとも 2 系統以上の細胞に分化しており、間葉系幹細胞が障害を受けた組織のシグナルに応じ、場の要請に従った分化によって組織再生を果たしたとみなされる。移植細胞が生体内で何らかの変化を起こす場合、宿主細胞とのシグナル伝達によると考えられるため、実験 I、II から移植細胞は組織内で、増殖のシグナルは受けることなく直接分化するシグナルのみを受けることによって傷害組織再生に寄与している可能性がある。

さらに、移植した細胞数が組織欠損の大きさに比較してかなり小さいことから、移植細胞は Paracrine などの作用により宿主の細胞に働きかけて組織再生を促すといった間接的な効果も想定される。また、今回の実験では確認していないが、移植細胞と宿主細胞の細胞融合などによる組織再生も考えられる。

いずれにしても、移植された間葉系細胞が組織再生に重要な役割を演じていることは確かである。

E. 結 論

1. 移植細胞は生体組織内で増殖していない可能性が示唆される。
2. 移植細胞は少なくとも 2 系統以上の細胞に分化しており、間葉系幹細胞が障害を受けた組織のシグナルに応じ、場の要請に従った分化によって組織再生を果たしたとみなされる。
3. 移植細胞は Paracrine などの作用により宿主の細胞に働きかけて組織再生を促すといった間接的な効果も想定される。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - 1) Kanemaru S, Yamashita M, Umeda H, Ohno T, Suehiro A, Hirano S, Omori K, Nakamura T, Ito J. The destiny and the behavior of the autologous bone marrow derived stromal cells implanted into the vocal fold. 2nd Modern Drug Discovery and Development Summit. Philadelphia, PA, USA, December 4-6, 2006.
 - 2) 金丸眞一：自己骨髄由来間葉系細胞移植による声帯の再生. 第58回日本気管食道科学会 ワークショップ (2006.10.6, 札幌)

G. 知的財産権の手願・登録状況

1. 特許取得
No.US7,011,829 B2
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

人工材料と自己筋膜を用いた声帯再生の試み

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 山下 勝（京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

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）

金丸 眞一（京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

研究要旨

喉頭癌や外傷などにより、喉頭を切除する際には、術後の呼吸・嚥下・発声について残存する機能や機能改善策について考慮しておくことが肝要である。

我々は組織工学的な手法に基づき、人工材料を用いた組織再生手法をすでにヒトへ臨床応用している。しかし、声帯を含む甲状軟骨部では構造上・機能上の複雑さから動物実験においても再生することは困難であった。

そこで、動物実験において我々が成功させた喉頭組織切除後の声帯再建手法を紹介する。

A. 研究目的

我々がすでに、輪状軟骨や気管への臨床応用を始めている豚皮膚由来コラーゲンを被覆したポリプロピレンを用いて、声帯の形態再生が可能であるか検討した。

B. 研究方法

ビーグル成犬5匹を用い、全身麻酔下に甲状軟骨の一部を含め、左声帯を切除する喉頭部分切除術を行った。（図1）上が頭側、右が左側。

汎用プラスチックであるシート状ポリプロピレンを骨格とし、コラーゲンスポンジにて被覆した。この材料に末梢動脈血を含浸させる。（図2）さらに大腿筋膜にて先の材料を包み、（図3）創部に固定した。（図4）

声帯の再生状況は、電子内視鏡による内腔面の観察、病理検査、声帯振動の評価にて行った。

（倫理面の配慮）

動物実験に関しては、京都大学に動物実験計画書を提出し認められており、動物愛護の配慮も十分行い施行した。臨床応用に関しては倫理委員会の承認の上、ヘルシンキ宣言に則り人権擁護の配慮を行い、対象者に対する不利益、危険性の排除へ十分な配慮をはかり、研究計画に対する説明と同意（インフォームド・コンセント）を得られた上で研究を実施した。

C. 研究結果

全例で術後の全身状態は良好であり、皮下気腫などの合併症も認めなかった。

典型的なモデル動物の喉頭内視鏡写真。（図5）

術前、（図5-A）声帯切除、（図5-B）材料移植後、（図5-C）術後1週間、（図5-D）術後2週間、（図5-E）術後1ヶ月。（図5-F）

このように、完全に切除した声帯と喉頭室の粘膜が上皮化し、きれいに再生されている事がわかる。他の2例の所見と総合すると、術後1週間までは筋膜が残存し、徐々に白色調に変化する。2週間目ころには筋膜が消失し、上皮化がほぼ完了。1ヶ月目には通常と同様のきれいな粘膜面が観察される、ということがわかった。

術後3ヶ月時点での5例全例の喉頭内視鏡所見を図6に示す。（症例A-E）

5例全例で喉頭粘膜の完全な上皮化を認めた。しかし、2例では左声帯の変形を生じ、また、うち1例で小肉芽の形成を認めた。

図7に摘出喉頭の組織所見について示す。（A弱拡大像・B強拡大像）Pで示すポリプロピレンの内腔側に完全な上皮化を認め、上皮下組織も層状に形成されている。上皮を拡大すると正常と同様の重層扁平上皮の再生がみられ、一部で筋組織の再生を生じていた。

再生声帯の振動は健側比11.3%であった。

D. 考 察

これまで、動物実験で成し得なかった、声帯を含む甲状軟骨部分切除モデルにおいて、正常粘膜上皮の再生を観察できた。

合併症はみられず、当術式の応用の可能性が期待される。

今後、再生効率を上げ、形態の再生をなし得た後には声帯のしなやかさを改善させて、正常の粘膜振動回復を目指したい。

E. 結 論

組織工学的手法により、これまで術後再建が全く不可能であった声帯再生を試みた。

3ヶ月までは概ね良好な結果を得た。わずかではある

ものの振動する声帯の再生を認めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 山下 勝:[ワークショップ] 声門の再生へむけて.
第58回日本気管食道科学会 (2006.10.5-6, 札幌)

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

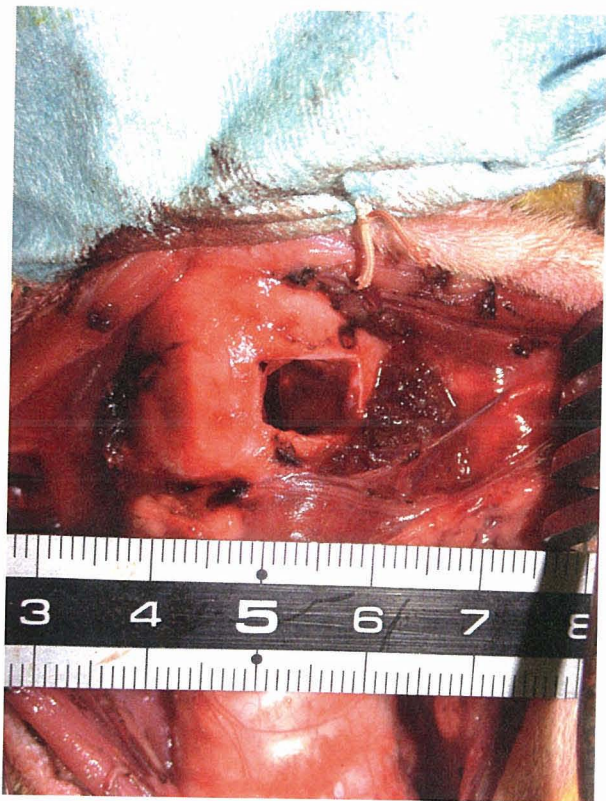


图 1



图 3



图 2



图 4

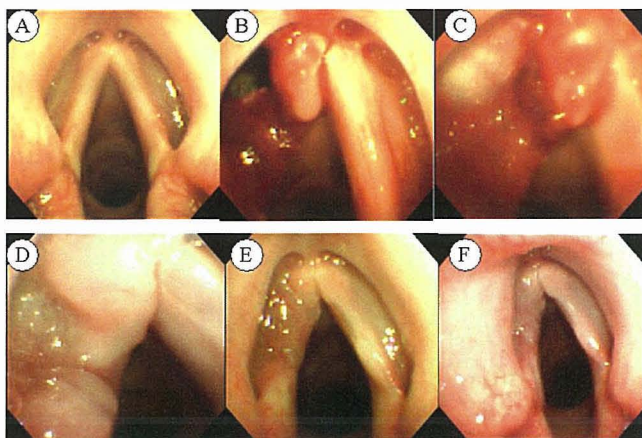


图 5

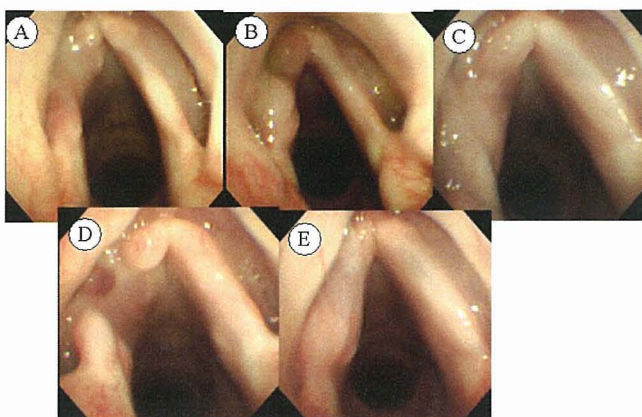


图 6



图 7

気管の再生治療

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）
中村 達雄（京都大学再生医科学研究科臓器再建応用分野）
金丸 眞一（京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）
松塚 崇（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）
横山 秀二（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

気道としての硬度を持った枠組みと内腔粘膜を同時に再生させることを目的として、組織工学的手法による気管再生のトランスレーショナルリサーチを行ってきた。本研究では動物実験による気管再生に関する長年の研究成果の蓄積をふまえて、「喉頭・気管の再生治療」について倫理委員会の承認を得て、主任研究者らは本再生治療を世界に先駆けて臨床応用を始め、現在までに7例に行っている。自己組織再生型の人工材料、手術手技について、またそれぞれの術後経過を述べ、今後の課題を明らかにする。

A. 研究目的

気道への悪性腫瘍の浸潤や炎症性疾患などで病変を切除した後の再建は難しく、複数回の複雑な手術や侵襲の大きな治療が行われており、未だ決定打がない状況である。主任研究者らは気管欠損部の組織再生をはかるために、*in situ* Tissue Engineering の手法を用い、自己組織再生型の人工材料を足場として移植する技術を開発し、動物実験で有効性と安全性を確認してきた¹⁻⁴⁾。本研究の目的はこの技術をヒトに臨床応用し、世界に先駆けて気管の再生医療を行うことで、低侵襲の医療の実現と医療費の削減をめざすことにある。さらに、本再生治療の今後の課題を明らかにする。

B. 研究方法

1. 人工材料の開発

管状の枠組みを保持するためポリプロピレン製のメッシュを管状にし、これを同質の材料でリング状に補強した。さらに組織再生の足場としてその周囲にコラーゲンスポンジを付加して、自己組織再生型の人工材料を開発した。ポリプロピレン製メッシュは特定保険材料として従来から胸壁や腹壁の補強に臨床に使用されているもので、開発の過程で生体に取り込まれるメッシュの至適な編み目の大きさを決定し260 μ mとした。コラーゲンスポンジは医療用のブタ皮膚由来のI型およびIII型コラーゲンを用いた。本人工材料ではコラーゲンとメッシュがはずれにくいようにするために、コラーゲン液をメッシュ上に塗布した上で、140℃、24時間の熱架橋を加えた。

2. 動物実験の概要

ビーグル犬を用いた動物実験で、本人工材料を気管欠

損部に移植し、最長5年の観察で、気管内腔の良好な上皮化が得られ、気道としての管腔も十分保たれている。組織学的評価では、このようにしてできた管状の組織管に、メッシュ内に結合織が入り込み、内腔面は再生した気管上皮で覆われ電子顕微鏡で線毛を確認した。軟骨組織は再生しなかったが、再生気管の硬度については機械的圧縮試験を行い生体気管と同程度であった。少数例で肉芽やメッシュの露出を認めたがいずれも軽度で呼吸には問題なかった。生体気管との接合部も安定した組織移行がみられ、長期に安全に使用できることがわかった。最長5年の観察で、気管の上皮再生は良好で問題なく経過している。これらのことから、自己組織再生型の人工材料は頭頸部癌の気道浸潤、声門下や気管の炎症性狭窄などにおける気管、輪状軟骨切除後の再建に臨床応用可能と考えられた。

（倫理面への配慮）

以上の動物実験の結果をふまえ、「喉頭・気管の再生治療」は京都大学医学部倫理委員会の承認を得て、ヘルシンキ宣言に則り本人工材料のヒトへの応用を開始した。さらに本再生治療は福島県立医科大学医学部倫理委員会でも承認された。

C. 研究結果

人工材料を用いた再建の利点として、低侵襲であり症例によっては気管切開が不要となり、また二次手術が不要となる可能性が挙げられる。先の基礎実験をもとに、2002年京都大学倫理委員会で「喉頭・気管の再生治療」の承認を得て現在まで2例の臨床応用を行っており最長4年2ヶ月の観察で経過良好である。本学においても2003年に同様に倫理委員会の承認を得て現在まで5例の