

FIG. 2. Isolated and cultured SMCs. (A) Immediately after enzymatic isolation, SMC were characterized by a slender shape. (B) At day 3 in culture, SMCs show a broad, spreading shape with several mitotic figures. (C) At day 7, the cultured SMCs appear subconfluent and have a fusiform shape with groups of cells aligned closely, in parallel orientation. (D) At day 12, the cultured SMCs show a hill-and-valley pattern with numerous areas of cellular retraction. The SMC express α -smooth muscle actin (E) and basic calponin (F). Original magnification $\times 40$ (A–D); $\times 100$ (E and F).

sue samples were cleared by washing with xylene, followed by air drying at room temperature for 5 min. The secondary antibody was fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated to goat anti-rabbit or goat anti-mouse immunoglobulin (Dako); after its application, slides were washed and specimens were mounted with cover slips using Vectashield mounting medium containing 4',6-diamidino-2-phenylidole (DAPI, Dako). Specimens were examined using a fluorescence microscope (IX70, Olympus).

Electron microscopy

Smooth muscle cells that were only seeded in the collagen sponge and implanted at SMC 12 weeks were examined by transmission electron microscopy (TEM). Specimens were cut into 1-mm cubes and fixed in 2% glutaraldehyde in cacodylate buffer for 12 h at room temperature. The specimens were further fixed in osmium tetroxide, dehydrated in graded alcohol, and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were stained with lead acetate and lead citrate. The specimens were observed

using a transmission electron microscope (JEM-2000EX, JEOL, Tokyo, Japan).

RESULTS

Smooth muscle cells from stomach wall

Smooth muscle cells obtained from the stomach wall by enzymatic dispersion initially were characterized by a slender shape (Fig. 2A). After culture for 3 days, SMCs began to redifferentiate, and numerous cells undergoing mitosis were observed (Fig. 2B). At 7 days, SMCs appeared subconfluent, with individual regions of cells aligned in close, parallel orientation (Fig. 2D). At 12 days, SMCs showed morphologic characteristics typical of smooth muscle cells, as indicated by a hills-and-valleys appearance described by Chamley-Campbell *et al.*²⁷ (Fig. 2D). SMC identity was confirmed by immunoreactivity for α -SMA and for basic calponin (Fig. 2E and F). Cultured SMCs did not stain for an epithelial marker (cytokeratin) or an endothelial marker (vWF). In addition, all cells were stained for vimentin while very few cells were stained for desmin (data not shown).

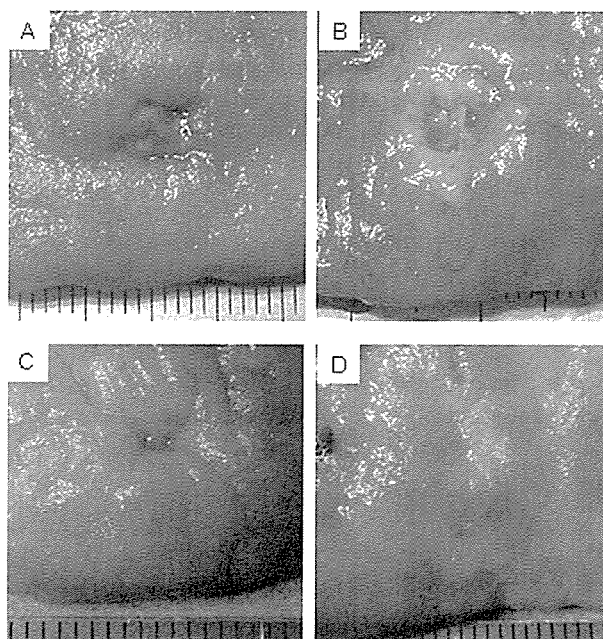


FIG. 3. Macroscopic findings on the luminal side of the graft area. The SMC (–) group (A) and SMC (+) group (B) at 4 weeks after implantation, and the SMC (–) group (C) and SMC (+) group (D) at 12 weeks after implantation. (A and B) In both groups, the luminal surface of the graft area was not covered with mucosa at 4 weeks, but had an ulcerative appearance. (C) At 12 weeks, the graft surfaces in the SMC (–) group were covered by regenerated mucosa that was depressed relative to the adjacent mucosa. (D) At 12 weeks in the SMC (+) group, it was difficult to macroscopically distinguish the appearance and contour of the regenerated mucosa from that of the normal mucosa.

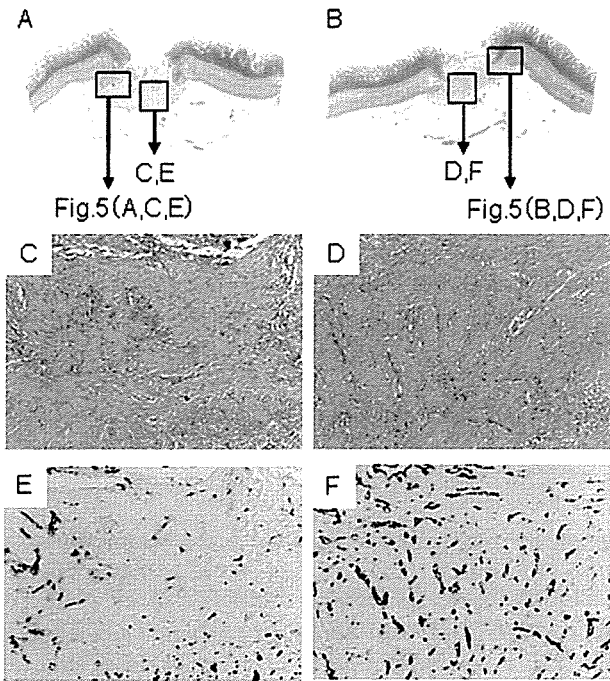


FIG. 4. Histologic and immunohistochemical features of the graft area at 4 weeks after implantation. H&E staining is shown for the SMC (-) group (A) and SMC (+) group (B). (C-F) High-power views of boxed regions in A and B: H&E staining (C and D) and immunostaining for von Willebrand factor (E and F). A considerably greater number of blood vessels are observed in the graft area in the SMC (+) group than in the SMC (-) group. Original magnification $\times 2$ (A and B); $\times 100$ (C-F).

Collagen sponge scaffolds seeded with smooth muscle cells

The scaffolds had shrunk about 10% from their original size at 12 h after seeding. SMCs were seeded on lattice spaces of collagen sponge scaffolds; almost all cells showed DiI labeling (Fig. 1E and F). When we seeded the cells without collagen solution, far fewer cells remained in the sponge scaffolds because they passed through the pores of the sponge. In addition, the seeded cells were distributed unevenly in the collagen sponge when collagen solution was not used for seeding (data not shown).

Macroscopic examination

All animals survived until the scheduled time for euthanasia. During the experiment, change in body weight did not exceed 1 kg, and no anastomotic problems, such as dehiscence, occurred. The serosal aspect of both scaffolds remained firmly covered with omentum after 4, 8, and 12 weeks. At 4 weeks after implantation, Vicryl sutures had nearly disintegrated, and silicone sheets had almost come off the luminal surface of the graft site. With both groups, the luminal surface of the graft area was not

covered with mucosa at 4 weeks but rather had an ulcer-like appearance (Fig. 3A and B). At 8 weeks, graft surfaces were covered with regenerated mucosa that was depressed relative to adjacent mucosa. At 12 weeks, the SMC (-) group showed the same depressed contour (Fig. 3C). At 12 weeks in the SMC (+) group, however, the appearance and contour of regenerated mucosa were difficult to distinguish macroscopically from normal mucosa (Fig. 3D).

Microscopic examination

Postoperative interval of 4 weeks

SMC (-). The graft site was infiltrated with cells, capillaries, and connective tissue. Immunohistochemical staining for vWF indicated the location of blood vessels,

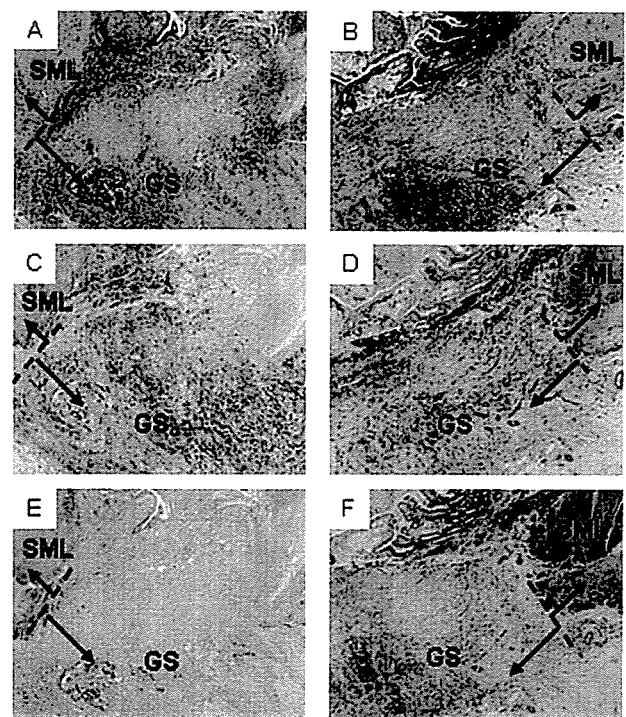


FIG. 5. Histologic and immunohistochemical features of the graft area at 4 weeks after implantation. (A, C, and E) High-power views of boxed regions in Fig. 4 A. (B, D, and F) High-power views of boxed regions in Fig. 4 B. (A and B) Hematoxylin and eosin staining; (C and D) Immunostaining for α -SMA; (E and F) immunostaining for basic calponin. To the left of the dashed line is original smooth muscle layer (SML); to the right is the graft site (GS) in A, C, and E. To the right of the dashed line is SML; on the left is GS in B, D, and F. In the SMC (-) group, most cells at the graft site were myofibroblasts because they were stained immunohistochemically for α -SMA but not for basic calponin (C and E). In the SMC (+) group, both SMC and myofibroblasts were stained immunohistochemically with anti- α -SMA (D). SMC were identified by their immunoreactivity with anti-basic calponin. SMC were sparsely dispersed among the more numerous myofibroblasts (F). Original magnification $\times 2$ (A and B); $\times 40$ (C-H).

some of which were in the graft area (Fig. 4C and E). Most cells at the graft site were myofibroblasts, as they stained immunohistochemically for α -SMA but not basic calponin²⁹ (Fig. 5A, C, and E). As noted macroscopically, the luminal surface was not yet covered with epithelial cells.

SMC (+). The graft site was infiltrated by cells, capillaries, and connective tissue. Immunohistochemical staining for vWF showed that the SMC (+) group had a considerably higher number of blood vessels in the graft site than in the SMC (-) group (Fig. 4C and F). Both SMCs and myofibroblasts were stained immunohistochemically with anti- α -SMA. SMCs were identified by their immunoreactivity with anti-basic calponin. SMCs were sparsely dispersed among the more numerous myofibroblasts. These cells showed DiI labeling by fluorescence microscopy, confirming that their origin was of implanted cells (Fig. 5B, D, and F). A transitional mucosal epithelial layer began to line the luminal surface of the graft site at the end of the anastomosis.

Postoperative interval of 8 weeks

SMC (-). The luminal surface of the graft site was covered with a monolayer of mucosal columnar epithelial cells. Collagen sponge scaffolds were absorbed, and myofibroblasts had disappeared. A thin smooth muscle layer, the muscularis mucosae, was stained immunohistochemically with anti- α -SMA and anti-basic calponin (Fig. 6 A, C, and E).

SMC (+). The luminal surface of the graft site was covered with a regenerated epithelial cell layer that included goblet cells and had a villus-like configuration, although these villi were shorter than those in adjacent normal mucosa. Immunohistochemical staining with anti- α -SMA and basic calponin and detection of the labeled cells using a fluorescence microscope showed the presence of implanted SMCs in the lamina propria and formed a deeper smooth muscle layer (Fig. 6B, D, and F). The collagen sponge scaffolds were absorbed, and myofibroblasts had disappeared. Implanted SMCs were multi-layered, and the surface area of the graft site shrank.

Postoperative interval of 12 weeks (reanastomosed at 8 weeks)

SMC (-). The luminal surface of the graft site was covered with a regenerated epithelial cell layer showing very short villi. No significant change in thickness of the muscularis mucosae was noted between 8 and 12 weeks.

SMC (+). The luminal surface of the graft site was covered completely by a relatively well-developed epithelial layer with numerous villi and also an orderly smooth muscle layer (Fig. 7A-C). At this time point, these villi were more developed and the implanted SMCs had more polarity than they had at 8 weeks. To examine

the dual location of DiI-labeled SMCs and basic calponin expression at the graft site, samples were stained for immunofluorescence and analysis using a fluorescence microscope. Implanted SMC were noticed to organize into a circumferential smooth muscle layer and were present in part of lamina propria (Fig. 7D-I).

Phenotypic change of SMC

SMC underwent a spontaneous change in phenotype—from the contractile state to the synthetic state—during the culture.³⁰ SMCs seeded only in the collagen sponge contained large nuclei, large amounts of rough endoplasmic reticulum and mitochondria, and very few myofibril bundles with dense bodies (Fig. 8A). These findings show that these SMCs are in the synthetic state.³⁰ SMCs implanted at 12 weeks contained many bundles of thick and thin myofibrils with associated dense bodies and organelles, such as mitochondria, a Golgi appa-

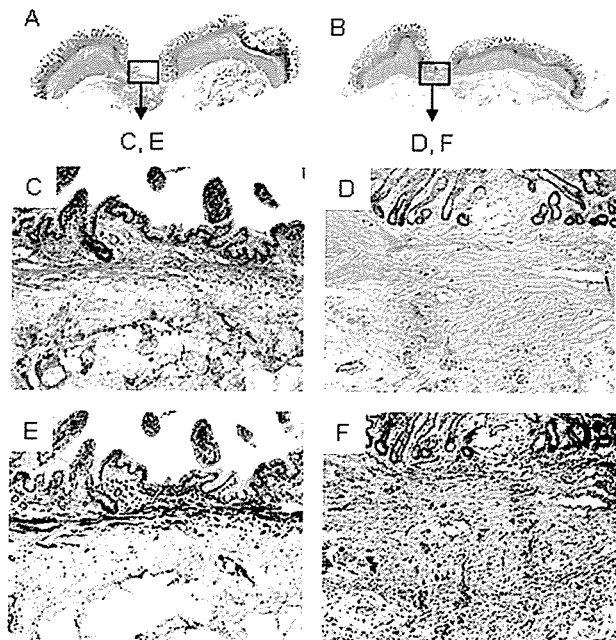


FIG. 6. Histologic and immunohistochemical features of the graft area at 8 weeks after implantation. Hematoxylin and eosin staining is shown for the SMC (-) group (A) and SMC (+) group (B). (C-F) High-power views of A and B: H&E staining (C and D); immunostaining for basic calponin (E and F). The luminal surface of the graft site was covered with a monolayer of mucosal columnar epithelial cells (C). A thin smooth muscle layer, the muscularis mucosae, was stained immunohistochemically with anti-basic calponin (E). The luminal surface of the graft site was covered with a regenerated epithelial cell layer that included goblet cells and had a villus-like configuration; however, these villi were shorter than those in adjacent normal mucosa (D). Implanted SMCs formed a thicker smooth muscle layer (F). Original magnification $\times 2$ (A and B); $\times 100$ (C-F).

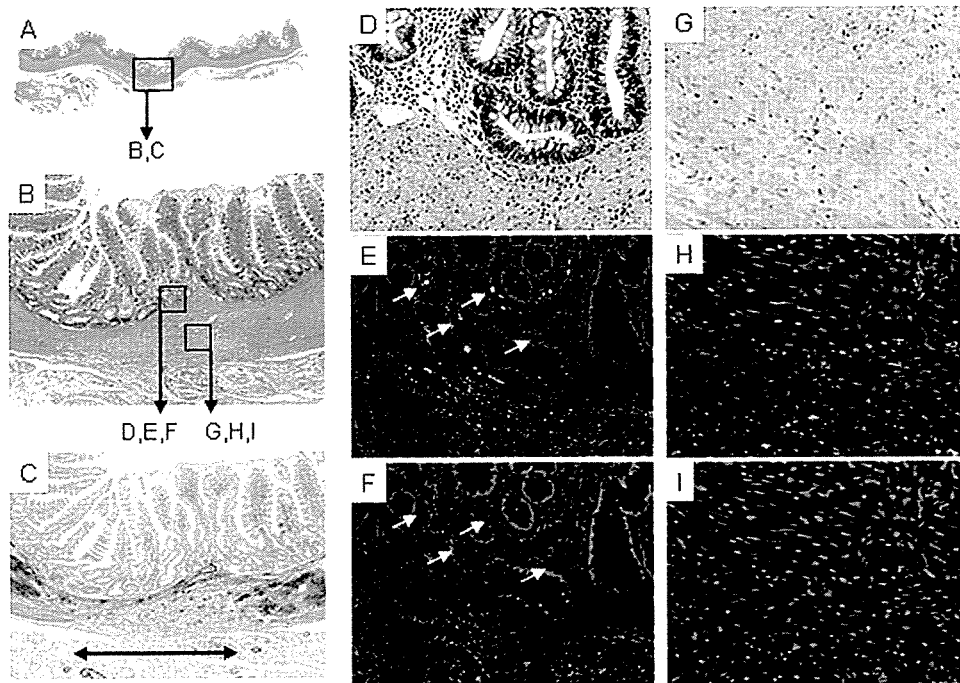


FIG. 7. Histologic, immunohistochemical, and immunofluorescence features of the graft area at 12 weeks after SMC (+) scaffold implantation. (A) Hematoxylin and eosin staining. (B and C) High-power views of A: H&E staining (B); immunohistochemical staining for basic calponin (C). The graft site is shown by the bar. (D–I) High-power views of B: a portion of the lamina propria of the graft site (D–F); a portion of the smooth muscle layer of the graft site (G–I). (D and G) H&E staining; (E and H) immunofluorescence staining for basic calponin. (F and I) The location of SMC labeled by DiI. The luminal surface of the graft site was completely covered by a relatively well-developed epithelial layer with numerous villi and an orderly smooth muscle layer. It was observed that implanted SMCs were organized into a circumferential smooth muscle layer and were present in a part of the lamina propria (arrows, E and F). Original magnification $\times 2$ (A); $\times 40$ (B and C); $\times 400$ (D–I).

ratus, and ribosomes that are localized in the perinuclear region. These findings indicate that these SMCs are in the contractile state (Fig. 8B).³⁰

DISCUSSION

We pursued organ tissue engineering with autologous cells in order to avoid transplantation problems such as rejection, long-term immunosuppression, donor scarcity, ethical issues, and infection. This study focused on regeneration of the smooth muscle layer of the intestine, using collagen scaffolds seeded with autologous SMCs suspended in collagen solution. Although tissue engineering of bladder and vessels using SMC-seeded scaffolds had been reported previously,^{18–21} this study may be the first demonstration of tissue engineering of intestine using SMC-seeded scaffolds.

We obtained SMCs from the smooth muscle layer of the stomach wall, which has an abundance of smooth muscle. We were able to resect a portion of the smooth muscle layer of stomach wall via an incision of <3 cm in length, with an operative time of <15 min and with-

out any complications. Therefore, this procedure seems to be safe and minimally invasive. Thus, we considered the stomach wall to be an appropriate source of SMCs. Our simple method of enzymatic dispersion made it possible to obtain differentiated SMCs of high purity. Isolated SMCs entered mitosis and proliferated *in vitro* in 10% blood serum. Our results were similar to those of previous reports:^{18–21,23} when we seeded SMCs on the collagen sponges without collagen solution, many cell-free spaces were seen on the collagen sponge, as was reported in a study with poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) mesh-collagen hybrid scaffolds.²² Transmission electron microscopic analyses revealed that SMCs that were only seeded in the collagen sponge were in a synthetic state. On the other hand, implanted SMCs changed their phenotype from the synthetic to the contractile state *in vivo*.

At an early time point in our study (4 weeks after implantation), the graft site was infiltrated by numerous myofibroblasts in both groups. In the SMC (+) group, the implanted SMC were sparsely distributed among many myofibroblasts in the graft site. The myofibroblasts existing during wound healing were reported to disappear

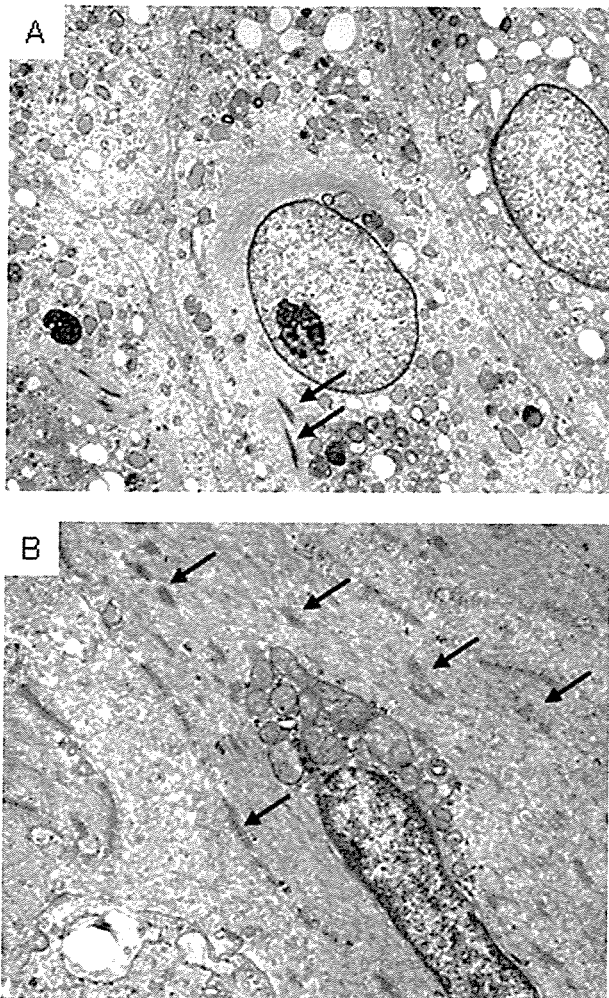


FIG. 8. Transmission electron microscopic appearance of SMCs. SMC just seeded into the collagen sponge shows large nuclei and a large amount of rough endoplasmic reticulum and mitochondria and very few myofilament bundles with dense body (arrows). This cell is in the synthetic state (A). SMC implanted at 12 weeks contains several bundles of thick and thin myofilaments with associated dense bodies (arrows) and organelles, such as mitochondria, a Golgi apparatus, and ribosomes that are localized in the perinuclear region. This cell is in the contractile state (B). Original magnification $\times 3000$ (A); $\times 12,000$ (B).

gradually later.²⁹ At 8 weeks in the SMC (-) group, no myofibroblasts remained and only a thin smooth muscle layer (muscularis mucosae) was seen. In the SMC (+) group at this time point, myofibroblasts had disappeared and implanted SMCs were forming a smooth muscle layer, although their arrangement within the layer was random. At 12 weeks after implantation in the SMC (+) group, implanted SMCs demonstrated polarity of arrangement, appearing as the circular muscle layer without any evidence of longitudinal muscle layer formation. In the future we

plan to investigate the character and function of this regenerated smooth muscle layer.

Angiogenesis in the submucosa supports the healing of the overlying epithelium. Immunohistochemical staining for vWF indicated the location of blood vessels. We included the picture of immunohistochemical staining for vWF in the SMC (+) and SMC (-) groups at 4 weeks after implantation. A considerably greater number of blood vessels was observed in the graft area in the SMC (+) group than in the SMC (-) group. These findings suggest that implanted SMC may release some angiogenic growth factors, such as vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. As a result, implanted SMCs may accelerate mucosal healing. The lamina propria, which forms the cores of villi, consists of connective tissue fiber, fibroblasts, mature fibrocytes, and smooth muscle cells.³² Our implanted SMCs were also seen in the lamina propria. In this study, SMC (+) group showed a relatively well-developed epithelial layer with numerous villi, while the SMC (-) group had a regenerated epithelial cell layer with very short villi. Recent studies have demonstrated that intestinal fibroblasts promote proliferation of intestinal epithelial cells *in vitro*.^{33,34} These results suggest that the lamina propria has an important role in growth of mucosa and formation of villi. We believe that growth of the lamina propria was promoted by SMC implantation, resulting in a more normal appearance of the regenerated mucosa.

Graft sites shrank to a smaller area than the original size of scaffolds. For regeneration of small intestine in a tubular configuration, it is necessary to prevent the shrinkage of the graft area. Shrinkage may occur due to the following reasons. First, the mechanical strength of this collagen sponge may not have been very low and degradation time of this collagen sponge may have been very short. To regenerate the small intestine tissue, the scaffold may need more long time to keep the structure. Second, the number of seeded SMCs may have been too small. Because implanted SMCs are constituents of both smooth muscle layer and lamina propria, application of large numbers of SMCs to the scaffolds may be needed. Future investigations *in vivo* will determine the optimal number of SMC to be seeded. Third, growth of blood vessels into the scaffolds may have been insufficient, even though neovascularization could be seen in the graft site at 4 weeks. Recent reports have demonstrated the angiogenic effect of vascular endothelial growth factor or hepatocyte growth factor in tissue engineering.^{35,36} In the future we will investigate the effect of such tropic factors in our scaffold model.

In this study, regenerative epithelial cells immediately covered the scaffold. However, a much longer time will be required to regenerate mucosa when this

is attempted over a wide area. Culture of intestinal epithelial cells *in vitro* is difficult. Epithelial units containing intestinal stem cells disaggregate soon after plating, and the isolated cells die within a few days.³⁷ However, a recent study reported success in culturing of intestinal epithelial cells on amniotic membranes or on fibroblasts embedded in collagen gel.^{34,37} We plan to investigate the culture of autologous intestinal epithelial cells on a collagen scaffold seeded with SMCs. If this approach succeeds, far more extensive regeneration of intestine over a reasonably short time will be expected.

In conclusion, implanted SMCs formed a smooth muscle layer and possibly accelerated epithelization of the luminal surface. Collagen sponge scaffolds seeded with autologous smooth muscle cells show a potential for regeneration of small intestine.

REFERENCES

- Vanderhoof, J.A., and Langnas, A.N. Short-bowel syndrome in children and adults. *Gastroenterology* **113**, 1767, 1997.
- Todo, S., Reyes, J., Furukawa, H., Abu-Elmagd, K., Lee, R.G., Tzakis, A., Rao, A.S., and Starzl, T.E. Outcome analysis of 71 clinical intestinal transplantations. *Ann. Surg.* **222**, 270, 1995.
- Langer, R., and Vacanti, J. Tissue engineering. *Science* **260**, 920, 1993.
- Kim, S.S., Kaihara, S., Benvenuto, M.S., Choi, R.S., Kim, B.S., Mooney, D., and Vacanti, J.P. Effect of anastomosis of tissue-engineered neointestine to native small bowel. *J. Surg. Res.* **87**, 6, 1999.
- Kaihara, S., Kim, S.S., Kim, B.S., Mooney, D.J., Tanaka, K., and Vacanti, J.P. Long-term follow-up of tissue engineered intestine after anastomosis to native small bowel. *Transplantation* **69**, 1927, 2000.
- Tavakkolizadeh, A., Berger, U.V., Stephen, A.E., Kim, B.S., Mooney, D., Hediger, M.A., Ashley, S.W., Vacanti, J.P., and Whang, E.E. Tissue-engineered neomucosa: morphology, enterocyte dynamics, and SGLT1 expression topography. *Transplantation* **75**, 181, 2003.
- Gardner-Thorpe, J., Grikscheit, T.C., Ito, H., Perez, A., Ashley, S.W., Vacanti, J.P., and Whang, E.E. Angiogenesis in tissue-engineered small intestine. *Tissue Eng.* **9**, 1255, 2003.
- Duxbury, M.S., Grikscheit, T.C., Gardner-Thorpe, J., Rocha, F.G., Ito, H., Perez, A., Ashley, S.W., Vacanti, J.P., and Whang, E.E. Lymphangiogenesis in tissue-engineered small intestine. *Transplantation* **77**, 1162, 2004.
- Grikscheit, T.C., Siddique, A., Ochoa, E.R., Srinivasan, A., Alsberg, E., Hodin R.A., and Vacanti, J.P. Tissue-engineered small intestine improves recovery after massive small bowel resection. *Ann. Surg.* **240**, 748, 2004.
- Parnigotto, P.P., Marzaro, M., Artusi, T., Perrino, G., and Conconi, M.T. Short bowel syndrome: experimental approach to increase intestinal surface in rats by gastric homologous acellular matrix. *J. Pediatr. Surg.* **35**, 1304, 2000.
- Wang, Z.Q., Watanabe, Y., and Toki, A. Experimental assessment of small intestinal submucosa as a small bowel graft in rat model. *J. Pediatr. Surg.* **38**, 1596, 2003.
- Demirbilek, S., Kanmaz, T., Ozardal, L., Edal, M.N., and Yucesan, S. Using porcine small intestinal submucosa in intestinal regeneration. *Pediatr. Surg. Int.* **19**, 588, 2003.
- Chen, M.K., and Badylak, S.F. Small bowel tissue engineering using small intestinal submucosa as a scaffold. *J. Surg. Res.* **99**, 352, 2001.
- Hori, Y., Nakamura, T., Matsumoto, K., Kurokawa, Y., Satomi, S., and Shimizu, Y. Tissue engineering of the small intestine by acellular collagen sponge scaffold grafting. *Int. J. Artif. Organs* **24**, 50, 2001.
- Gauthier, G.F. The muscular tissue. In: Leon, W., ed., *Histology*. New York: Elsevier, 1983, pp. 257-279.
- Hori, Y., Nakamura, T., Kimura, D., Kaino, K., Kurokawa, Y., Satomi, S., and Shimizu, Y. Experimental study on tissue engineering of the small intestine by mesenchymal stem cell seeding. *J. Surg. Res.* **102**, 156, 2002.
- Brittingham, J., Phiel, C., Trzyna, W.C., Gabbeta, V., and McHugh, K.M. Identification of distinct molecular phenotypes in cultured gastrointestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* **115**, 605, 1998.
- Zhang, Y., Kropp, B.P., Lin, H., Cowan, R., and Cheng, E.Y. Bladder regeneration with cell-seeded small intestinal submucosa. *Tissue Eng.* **10**, 181, 2004.
- Fossum, M., Nordenskjold, A., and Kratz, G. Engineering of multilayered urinary tissue *in vitro*. *Tissue Eng.* **10**, 175, 2004.
- Opitz, F., Shenke-Layland, K., Richter, W., Martin, D.P., Degnkolbe, I., Wahlers T.H., and Stock, U.A. Tissue engineering of ovine aortic blood vessel substitutes using applied shear stress and enzymatically derived vascular smooth muscle cells. *Ann. Biomed. Eng.* **32**, 212, 2004.
- Remuzzi, A., Mantero, S., Colombo, M., Morigi, M., Binda, E., Camozzi, D., and Imberti, B. Vascular smooth muscle cells on hyaluronic acid: culture and mechanical characterization of an engineered vascular construct. *Tissue Eng.* **10**, 699, 2004.
- Nakanishi, Y., Chen, G., Komuro, H., Ushida, T., Kaneko, S., Tateishi, T., and Kaneko, M. Tissue-engineered urinary bladder wall using PLGA mesh-collagen hybrid scaffolds: a comparison study of collagen sponge and gel as scaffolds. *J. Pediatr. Surg.* **38**, 1781, 2003.
- Guyton, A.C. Contraction and excitation of smooth muscle. In: Guyton, A.C., and Hall, J.E., eds., *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia: Harcourt, 2001, pp. 87-94.
- Kiwamoto, H., Ma, F., Higashira, H., Park, Y., and Kurita, T. Identification of muscarinic receptor subtypes of cultured smooth muscle cell and tissue of human bladder body. *Int. J. Urol.* **8**, 557, 2001.
- Suzuki, S., Kawai, K., Ashoori, F., Morimoto, N., Nishimura, Y., and Ikada, Y. Long-term follow-up study of artificial dermis composed of outer silicone layer and inner collagen sponge. *Br. J. Plast. Surg.* **53**, 659, 2000.
- Suzuki, S., Matsuda, M., Maruguchi, Y., Nishimura, Y., and Ikada, Y. Further applications of "bilayer artificial skin." *Br. J. Plast. Surg.* **48**, 222, 1995.

27. Chamley-Campbell, J., Campbell, G. R., and Ross, R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol. Rev.* **59**, 1, 1979.
28. Frid, M.G., Shekhonin, B.V., Koteliansky, V.E., and Glukhova, M.A. Phenotypic changes of human smooth muscle cells during development: late expression of heavy caldesmon and calponin. *Dev. Biol.* **153**, 185, 1992.
29. Darby, I., Skalli, O., and Gabbiani, G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab. Invest.* **63**, 21, 1990.
30. Chamley-Campbell, J., and Campbell, G. R. What controls smooth muscle phenotype? *Atherosclerosis* **40**, 347, 1981.
31. Basson, M.D. Gut mucosal healing: Is the science relevant? *Am. J. Pathol.* **161**, 1101, 2002.
32. Glenn, H.S., and Robert, E.P. Small intestine. In: Sternberg, S.S., ed., *Histology for the Pathologist*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997, pp. 495–517.
33. Goke, M., Kanai, M., and Podolsky, D.K. Intestinal fibroblasts regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor. *Am. J. Physiol.* **274**, 809, 1998.
34. Kalabis, J., Patterson, M.J., Enders, G.H., Marian, B., Iozzo, R.V., Rogler, G., Gimotty, P.A., and Herlyn, M. Stimulation of human colonic epithelial cells by leukemia inhibitory factor is dependent on collagen-embedded fibroblasts in organotypic culture. *FASEB J.* **17**, 1115, 2003.
35. Hidaka, C., Ibarra, C., Hannafin, J.A., Torzilli, P.A., Quitoriano, M., Jen, S.S., Warren, R.F., and Crystal, R.G. Formation of vascularized meniscal tissue by combining gene therapy with tissue engineering. *Tissue Eng.* **8**, 93, 2002.
36. Linn, T., Erb, D., Schneider, D., Kieszun, A., Elcin, A.E., Bretzel, R.G., and Elcin, Y.M. Polymers for induction of revascularization in the rat fascial flap: application of vascular endothelial growth factor and pancreatic islet cells. *Cell Transplant.* **12**, 769, 2003.
37. Tryphonopoulos, P., Espana, E.M., Tseng, S.C., Tzakis, A., and Ruiz, P. Rat enterocyte cultures on human amniotic membranes. *Transplant. Proc.* **36**, 373, 2004.

Address reprint requests to:

Yuen Nakase, M.D.

*Department of Surgery for Functional Regulation of
Digestive System*

Graduate School of Medical Science

Kyoto Prefectural University of Medicine

465 Kawaramach Hirokoji Kajicho

Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566

Japan

E-mail: yuen-n@koto.kpu-m.ac.jp

甲状腺癌治療における気道の再生医療

Regenerative medicine of airway reconstruction for the treatment of thyroid cancer

大森 孝一¹⁾ 中村 達雄²⁾ 多田 靖宏¹⁾ 野本 幸男¹⁾
鈴木 輝久¹⁾ 金丸 眞一³⁾ 安里 亮³⁾ 山下 勝³⁾

- 1) 福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科学講座
2) 京都大学再生医科学研究所・臓器再建応用分野
3) 京都大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科

Keywords 甲状腺癌 気道 再生医療 人工気管 スキャフォールド

はじめに

甲状腺癌は悪性腫瘍の中では予後が比較的良好であり、分化癌では10年累積生存率は95%以上と高くほぼ満足する成績が得られているといえるが、喉頭、気管、食道、大血管、縦隔など正中部の隣接臓器へ浸潤した場合は難治である¹⁾。特に喉頭や気管に浸潤した例では、喉頭機能を温存できるか、気管切開を回避できるかなどがQuality of Life (QOL)に大きく影響する。

気道は鼻腔、咽頭、喉頭、気管と気管支・細気管支によって構成されるが、喉頭、気管、気管支は管状の枠組みを軟骨が保持しており、内腔面は外界に接している。気道に悪性腫瘍が浸潤した例では病変切除後の、気道欠損部の再建が問題になる。これには、気道としての硬度をもった枠組みと内腔粘膜を同時に再建するのが理想的である。従来、硬性組織には各種の軟骨、骨、人工材料などが²⁾、内腔面組織には皮膚や粘膜などが用いられたが、二期的にしかも他部位の手術が必要であった。また、気管切除後の端々吻合術は、縫合不全の可能性や術後の挿管および頸部前屈体位など解決すべき問題点が残されている。

人工気管については1960年代から数多くの研究が行われてきたが³⁾、満足な臨床成績を残すことができなかった。1995年、中村らは組織工学的な手法で、自己組織の再生を誘導するようにデザインした新しい人工材料を開発した。本人工材料をスキャフォールド(足場)として用い、動物実験で気管組織の再生を実現できることが報告され⁴⁾⁵⁾、筆者らは人工材料を改良し輪状軟骨の切除後の欠損モデルに移植し、正常と同等の硬さをもち、かつ良好な上皮化が得られることを報告した⁶⁾。

2002年、筆者らは本技術を用いて「気道の再生医療」を世界に先駆けて臨床例に行い⁷⁾、現時点では6例に施行しており術後経過は良好である。このうち甲状腺癌の切除後の即時再建は3例である。

本稿では、組織工学的手法による気道再生の基礎技術とその臨床応用例を呈示し、さらに次のステップとして解決すべき課題を示す。

スキャフォールドの開発

自己組織の再生を誘導するようにデザインして人工材料を開発した⁸⁾⁹⁾。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、さらに組織再生のスキャフォールドとしてその周囲にコラーゲンスポンジを付

Omori, Koichi¹⁾ / Nakamura, Tatsuo²⁾ / Tada, Yasuhiro¹⁾ / Nomoto, Yukio¹⁾ / Suzuki, Teruhisa¹⁾ / Kanemaru, Shinichi¹⁾ / Asato, Ryo¹⁾ / Yamashita, Masaru³⁾
E-mail : omori@fmu.ac.jp

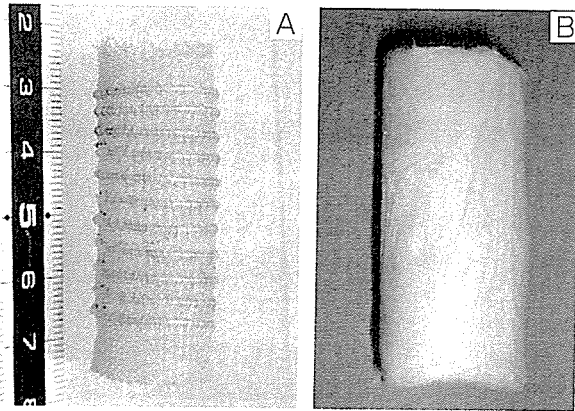


図1 スキャフォールド

A：構造(ポリプロピレンメッシュ管と補強のリング)
B：外観(Aにコラーゲンスポンジを付加)

加した(図1)。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を目的に実際に臨床に使用されている材料で、生体に取り込まれるメッシュの最適な編み目の大きさを開発の過程で検証し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重層コーティングして厚く付着させ、140 $^{\circ}$ C、24時間の熱架橋を加えた。

動物実験の概要

動物実験は、当該施設の動物実験規定にのっとり、愛護的に動物を扱い疼痛を与えないように全身麻酔で行った。ビーグル犬を用い、頸部気管および胸部気管では、環状切除後に自己組織再生型の人工材料で気管断端を覆うように縫合した¹⁾³⁾。輪状軟骨では、弓部(前半部約1/2周)を切除し、人工材料を欠損範囲に応じて1/2周から2/3周を用いた⁴⁾。人工材料は自己の血液でコラーゲンを湿潤させてから用いた。術後、気管内視鏡では内腔面は良好な上皮化を認め、少数例で

肉芽や内腔狭窄を認めたが、いずれも軽度で呼吸に問題はなかった。組織学的評価では、管状の再生組織管のメッシュ内に結合織が入り込み、再生した気道上皮には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、再生組織の硬度は機械的圧縮試験で正常気管および輪状軟骨と同程度であった。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¹⁾³⁾。

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。

臨床応用

動物実験の結果をふまえ、京都大学医学部倫理委員会、福島県立医科大学医学部倫理委員会の承認を得て、ヘルシンキ宣言にのっとり、患者・家族には治療内容を十分に説明し同意を得た上で、「喉頭・気管の再生治療」のヒトへの応用を行った。

2002年に第1例目として、甲状腺進行癌の気管浸潤例に対して気道の再生医療を行った¹⁾。症例は79歳女性、主訴は前頸部腫脹。CTにて、甲状腺右葉全体を占める直径約5 cmの腫瘍を認め、気管内視鏡検査では声門下に続く気管内腔の右側に隆起を認め、甲状腺腫瘍の気管浸潤が疑われた。手術は全身麻酔下に行った。甲状腺右葉は腫瘍で占拠され頸部気管に癒着していたため、安全域を付けて3気管輪、半周到わたって切除した。本人工材料の2/3周分をトリミングし、自己の血液を注入し、その欠損部をパッチする形で縫合した。気管切開孔をおかず一期的に再建し、術当日に抜管した。術後2週間にはコラーゲンがみられ、術後2ヵ月でほぼ上皮化し人工材料は被覆され、術後3年7ヵ月では、気管内腔面は上皮で覆われ組織再生は良好である(図2)。

第2例目は71歳男性、主訴は前頸部腫脹。CTにて、

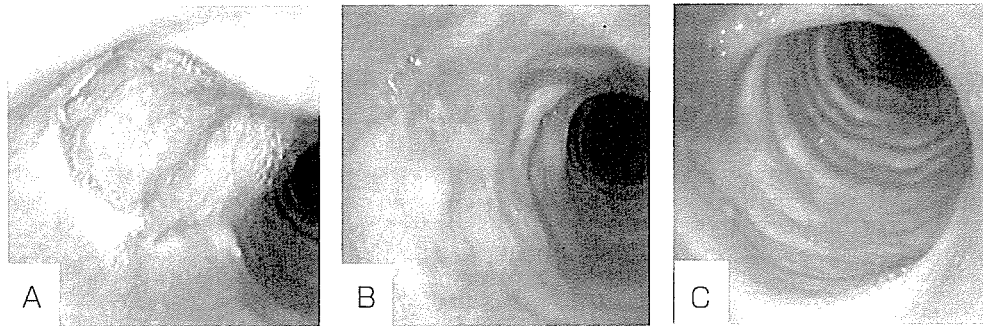


図2 臨床例1：気管浸潤例

- A：術後2週間の内視鏡所見
- B：術後2ヵ月の内視鏡所見
- C：術後3年7ヵ月の内視鏡所見

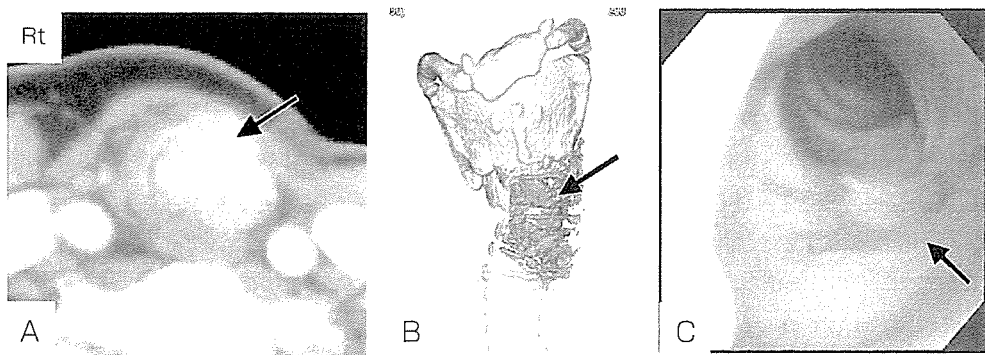


図3 臨床例3：輪状軟骨気管浸潤例

- A：術前のCT，輪状軟骨左側への腫瘍浸潤(→)
- B：術後の3D-CT，人工材料(→)
- C：術後1年の内視鏡所見，上皮化は完了している(→)

甲状腺右葉に腫瘍を認め、甲状腺癌気管浸潤が疑われた。手術は全身麻酔下にて行い、甲状腺腫瘍を露出した。腫瘍は右反回神経を巻き込んでおり、神経切断を余儀なくされた。腫瘍は第1-2気管輪に浸潤しており、約1/3周切断した。その欠損部は10mm×12mmで、本人工材料をトリミングして1/2周分の材料に自己の血液を注入し、気管欠損部をパッチする形で縫合した。術後3日目に軽度のair leakを認めたが、ドレインと圧迫で軽快した。術後2年6ヵ月経過した現在、気管内腔の上皮化は良好で順調な経過である。

第3例目は59歳女性。1988年に他施設にて甲状腺

癌の診断にて甲状腺左葉切除術を施行され、2001年に局所再発し甲状腺全摘術を行った上で¹³¹I内照射を施行された。2004年に局所再発し、CTにて腫瘍は輪状軟骨、気管への浸潤が認められた(図3A)。

術中所見は、輪状軟骨弓部および第1-2気管軟骨の正中から左半分が破壊されており、腫瘍が露出していた。左反回神経は腫瘍を貫いており、切断を余儀なくされた。腫瘍を鋭的に切除し、切除断端を迅速病理診断に提出し陰性を確認して切除を終了した。輪状軟骨弓部と第1-2気管輪の半周を切除した。気道欠損部に本人工材料をトリミングして2/3周分の材料に自

己の血液を注入し、パッチする形で縫合した。術後の3D-CT像(図3B)から移植した人工材料の大きさがわかる。最後に気管孔を閉鎖して手術を終了した。

術直後の喉頭内視鏡検査では両披裂部の浮腫を認めた。輪状軟骨の広範な切除により術後の喉頭浮腫の持続が予想されたため、一晚挿管したままで経過観察し、翌日に内視鏡で喉頭浮腫の軽減を確認した上で抜管した。再建術後2ヵ月で再建材料の内腔は薄く被覆されたが、内腔が完全に上皮化するには約10ヵ月を要した。図3Cに術後1年の内視鏡像を示す。術後1年4ヵ月では、肉芽や再狭窄はなく特に問題を生じていない。

考 察

臓器再生にはスキャフォールド、細胞、環境調節因子が必要で、この三要素に加えて血流が供給されると臓器再生が得られるとされている。我々は自己組織の再生を誘導するようにデザインしたスキャフォールドを移植することで、気道の組織再生を図った。

組織工学(tissue engineering)は、工学的手法を使って細胞を二次元的、三次元的に組み上げ、本物の臓器や組織に近いものを再生させようというもので、Vacanti, Langerらによって始められた。彼らのtissue engineeringは、体外で細胞を培養して目的とする組織を作り、これを体内に移植する方法である⁹⁾。

幹細胞や前駆細胞を移植することで組織再生を図ろうという研究が数多く行われている。自己由来の細胞移植としては、循環器領域で下肢や心筋の血管再生を目指した血管内皮前駆細胞の移植⁹⁾、整形外科領域で骨関節疾患の治療に骨髄間葉系幹細胞の移植¹⁰⁾、眼科領域で角膜再生を目指して角膜上皮幹細胞や口腔粘膜細胞を羊膜上や温度応答シート上で培養した移植などがある^{11) 12)}。

一方、我々の研究グループでは、体内の、再生を目的とする臓器の場所で組織を再生させる「*in situ*-

sue engineering」という新しい概念に基づいて、1995年以後、動物実験で自己組織再生型の人工材料を移植し気管、小腸、胃、輪状軟骨などが再生することを報告してきた^{1)-6) 13) 14)}。これらの実験では細胞移植や増殖因子は使わずにスキャフォールドの移植のみでの組織再生を行ってきた。Vacantiらのように体外で組織を再生してから移植する方法や、自己由来であっても細胞移植を伴うと、生きた細胞や組織を取り扱うので感染症対策や細胞の品質管理など臨床応用へのハードルが高い。これらの方法に比べて、我々の行っている*in situ* tissue engineeringによりスキャフォールドのみを移植する手法は、臨床応用に近いといえる。

甲状腺癌による正中部の隣接臓器浸潤において、気道は上方では輪状軟骨、披裂軟骨、甲状軟骨、声帯、下方では頸部気管から胸部気管をどう取り扱うかが重要課題であり、安全域をどの程度とるかが問題となる。進行甲状腺癌の喉頭・気管浸潤例では、喉頭温存を図りながら鋭的治癒切除と機能的再建を積極的に行うことで、呼吸、嚥下、発声の機能障害を生じることなくQOLを維持して、治療成績の向上が期待される。現在、本再生治療は頸部気管・輪状軟骨の部分欠損に対する再建法としては、手技が容易であること、気管切開を回避できること、再建材料のサイズをあまり考慮しなくても切除範囲を決定できるなど、有望な治療法といえる⁷⁾。

一方、臨床応用の経過から被覆した人工材料内腔面の上皮化には最低でも2ヵ月を要することが判ってきた⁷⁾。上皮化の遅延は創部感染を惹起する危険性があり、次のステップとして解決すべき課題は、上皮化を加速する方法の開発であり、我々は気管上皮細胞や線維芽細胞と人工材料からなるハイブリッド型のスキャフォールド材料の開発に力を注いでいる。さらには形態の複雑な喉頭、特に声帯の再生も重要課題であり、喉頭内腔を型どりした材料を作製して基礎実験を進めている。また、現在はまだ部分切除例のみにしか臨床応用されていないが、今後は切除範囲がより大きな例

にも本再生治療を適応とし、手術手技を確立する必要がある。これらの問題点を克服することで、さまざまな気道欠損に対してより効果的な再生治療を実現できると考えられる。



まとめ

甲状腺癌の気道浸潤例に対する即時再建において、スキャフォールドの移植による組織工学的手法を用いた「気道の再生医療」について紹介した。筆者らは体内で自己組織の再生を誘導する *in situ* tissue engineering の考え方でやっている。スキャフォールド材料を開発し動物実験で良好な気道の組織再生が得られた成果をもとにして、2002年、筆者らは「気道の再生医療」を世界に先駆けて行い、現時点では良好な結果を得ている。解決すべき次の重要課題としては、上皮化を加速、喉頭の内腔形態の再現、より大きな切除範囲への対応などがあげられる。

癌の治癒切除後のQOLの向上は国民の健康福祉の大きな目標である。組織工学的手法による「気道の再生医療」を癌治療後の機能的再建に応用することで、より効果的でより安全性の高い革新的な治療法を提供することが可能となるであろう。

記 本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)の助成を受けて行った。

●文献

- 1) 永原國彦, 森谷季吉, 浅井俊一郎, 他: 甲状腺癌治療の成績向上にむけて. 頭頸部腫瘍 **25**: 9-13, 1999
- 2) Cotton R: Management of subglottic stenosis. DeJong, Kupper-Smith, eds. Otolaryngologic Clinics of North America **33**: 111-130, 2000
- 3) Neville WE, Bolanowski JP, Kotia GG: Clinical experience with the silicone tracheal prosthesis. J Thorac Cardiovasc Surg **99**: 604-613, 1990
- 4) Teramachi M, Kiyotani T, Takimoto Y, et al: A new porous tracheal prosthesis sealed with collagen sponge. ASIO J **41**: 306-310, 1995
- 5) Nakamura T, Teramachi M, Sekine T, et al: Artificial trachea and long term follow-up in carinal reconstruction in dogs. Int J Artificial Organs **23**: 718-724, 2000
- 6) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, et al: Cricoid regeneration using *in situ* tissue engineering in canine larynx for the treatment of subglottic stenosis. Ann Otol Rhinol Laryngol **113**: 623-627, 2004
- 7) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, et al: Regenerative medicine of the trachea: The first human case. Ann Otol Rhinol Laryngol **114**: 429-433, 2005
- 8) Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. Science **260**: 920-926, 1993
- 9) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science **275**: 964-947, 1997
- 10) Ohgushi H, Kitamura S, Kotobuki N, et al: Clinical application of marrow mesenchymal stem cells for hard tissue repair. Yonsei Med J **45** (Suppl): 61-67, 2004
- 11) Tsubota K, Satake Y, Kaido M, et al: Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. N Engl J Med **340**: 1697-1703, 1999
- 12) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al: Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. N Engl J Med **351**: 1187-1196, 2004
- 13) Hori Y, Nakamura T, Matsumoto K, et al: Tissue engineering of the small intestine by acellular collagen sponge scaffold grafting. Int J Artif Organs **24**: 50-54, 2001
- 14) Hori Y, Nakamura T, Matsumoto K, et al: Experimental study on *in situ* tissue engineering of the stomach by an acellular collagen sponge scaffold graft. ASAIO J **47**: 206-210, 2001

<p>総説</p>

日耳鼻 109: 1-7, 2006

「第106回日本耳鼻咽喉科学会総会シンポジウム」

耳鼻咽喉科疾患治療の最前線

頭頸部領域の再生医療

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

既存の医療の限界から再生医療に対する期待が高まっている。再生医療は、疾患、外傷、先天奇形など不可逆的な損傷を受けた組織・器官を細胞を用いて治療する医療である。再生医療の元になる再生医学の基盤は、医学と工学とが融合して生まれた組織工学にある。組織の再生には細胞、足場、調節因子の3要素が適切な生体環境の下に置かれることによって可能となるといわれている。したがって、いかにこれらの要素を組み合わせてゆくかが組織再生の鍵となるが、これを工学的手法で可能にするのが組織工学である。

組織工学における組織再生のアプローチのひとつとして、上記の再生の3要素を生体内に直接移植するという *in situ* tissue engineering の概念が登場した。この概念によれば、特定臓器の局所再生にあつては生体から供給される以外の要素のみの投与でも再生が可能である。

華々しい再生医学研究の進歩にもかかわらず、現在、再生医療として臨床応用されているものはまだ少ない。*in situ* tissue engineering の概念によって臨床応用へのハードルがやや下がったとはいえ、頭頸部領域での臨床応用ではとくに少ないのが現状である。

本稿では、頭頸部領域の再生研究と臨床応用の現状とについて紹介する。

キーワード：再生医療，細胞療法，組織工学，生体内組織工学

はじめに

再生医学の登場は、現代医学・医療を根本から変える可能性を示し、それに伴い再生医療に対する社会の関心も高まっている。とくにわが国のように急速に高齢化が進んでいる社会では、既存の医療の限界から未来型の医療とでも言うべき再生医療に対する期待は非常に高い。

一般に高齢化が進むにつれて、人口に占める有病者の割合（有病率）が高まる。臓器の機能障害が軽度なレベルにあるときには、投薬や既存手術により機能回復が可能となるが、不可逆的損傷にまで陥ると臓器移植ないしは人工臓器による代替が必要となる。しかし、臓器移植はドナーの問題から絶対的供給量の不足と移植に伴う拒絶反応など大きな障壁あることから、現実的にはほとんど機能していない。また、人工臓器については、人工内耳、ペースメーカーや人工透析など特定の領域を除きその応用範囲に限界がある。これらを背景に、細胞なかでもさまざまな種類の細胞に分化できる能力を有する幹細胞を利用して、機能不全に陥った臓器を再構築すると

いう再生医学に注目が集まった。

再生医学の概念の源は、1950年代に欧米を中心に行われた人工臓器開発のための研究にある。人工臓器を体内に移植するという観点から組織親和性の高い素材の研究開発が行われ、工学と融合した組織工学という新しい医学の分野が生まれるに至り、これが現在の再生医療の基盤をなしている。また、再生医療の発想そのものは非常にシンプルなもので、拒絶反応のない自己の細胞を用いて人工的に作り出した臓器を部品として、機能不全に陥った臓器の修復を行うというものである。

本稿では、再生医療を支える組織工学の概念と頭頸部領域への臨床応用の現状を取り上げて概説する。

I. 組織工学

再生医療の基盤ともいえる組織工学 (Tissue engineering)¹⁾²⁾³⁾ は、(組織)再生医工学とも呼ばれる。組織・臓器を再生させるためには、図1に示したように、組織再生のもとになる細胞とともに、それが分化・成長

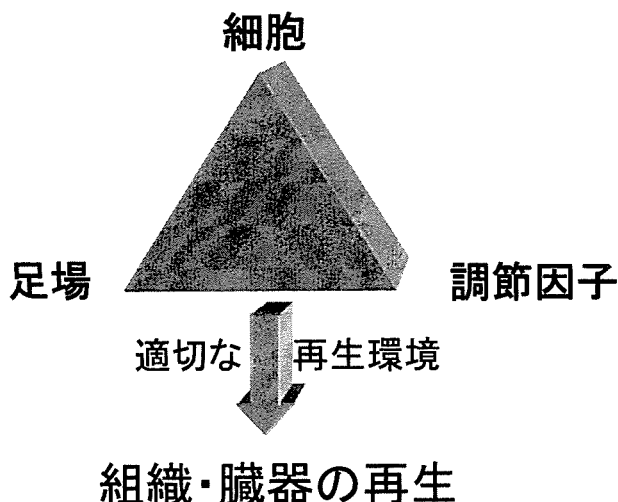


図1 組織工学の3要素

組織再生に要する3要素で、組織再生の元になる細胞（幹細胞）、細胞が成長する足場、足場における細胞の成長を調節する因子の3つが、豊富な血流などの良好な再生環境におかれたときに組織再生が可能であるというもの。

するための足場と、それらを調節する因子を適切な環境におくことが必要となる。この細胞、足場、調節因子の3つの要素を組織工学の3要素と呼んでいるが、これらをいかに用いるかが再生の要となる。この3要素についての詳細は、参考文献を参照していただきたい⁴⁾。

組織再生のアプローチには、主として2種類の方法がある。すなわち上記の3要素を用いて、あらかじめ体外（培養器）で組織再生を進めた後、体内に移植する方法と、はじめから再生を目的とする場に3要素を移植して生体内で組織再生を図る方法とである。

前者はハーバード大学のJ. VacantiとMITのR. Langerらが提唱した組織工学のオリジナルの考え方で、この概念が確立されたのは1980年代の後半から90年にかけてである¹⁾²⁾³⁾。彼らは組織工学の概念を分かりやすく示すために、ヒトの外耳がネズミの背中に生えている衝撃的な写真を論文に掲載した。すなわち、体外（培養器内）で作製した人工的な外耳をネズミの背中に移植して見せたのである。これは世界中の研究者の注目を集め、今日の再生医学研究の隆盛をもたらした。一方後者は、近年わが国を中心に発展してきた概念で、*in situ* tissue engineeringと呼ばれるものである^{5)~8)}。この考えの根幹を成すのは、再生すべき組織を体外で創るのではなく、必要な材料を供給することによって生体内で再生を図ろうとするものである。再生を目的とする組織・臓器にもよるが、生体内では再生に必要な要素のうち自ずと供給される要素が想定される場合には、必ずしもすべ

ての要素が必要なわけではない。すなわち再生の場から供給されるもの以外の要素を移植（供給）すればよいと考えられる。たとえば、神経の再生などでは切除された神経の中核側から再生神経が伸張してくるために、再生のための細胞の移植は必要ないと思われる。したがって、再生神経線維が伸張できる良好な環境としての足場あるいは、足場と神経成長因子などの投与のみで神経再生が可能であると考えられる。

II. 臨床応用の現状

再生医学は、近年の組織工学、分子生物学、発生遺伝学などのめざましい進歩によって支えられ発展してきたが、これを臨床に応用する段階となると、たとえば細胞移植の安全性、採取する細胞の出所や拒絶反応など、医学的のみならず倫理的、社会的問題が山積しているため、現在はまだ一部の領域でしか進んでいない。現在実際に再生医療として組織再生法が確立しているのは、皮膚、粘膜、角膜、骨、軟骨など一種類の細胞から構成される単純な構造物としての組織のみである。複数の細胞で構成された機能的な臓器たとえば肝臓や膵臓などの再生はこれまでの技術だけでは不十分である。

耳鼻咽喉科・頭頸部領域では内耳再生などの一部の分野でのみ旺盛な研究が行われているがまだ臨床応用には至っていない。一方、下顎骨⁹⁾¹⁰⁾、気管⁵⁾⁷⁾、神経⁶⁾¹¹⁾など極く限られた領域では、*in situ* tissue engineeringに基づく足場のみあるいは足場と成長因子の移植による臨床応用が開始されている。

今後、現在の手法で再生医療が定着し治療の大きな柱となるか否かは未知であるが、数多くの研究で組織・臓器が再生するということの糸口は見つかっている。おそらくさほど遠くない将来には、再生医療が現行の医療を変える新しい医療のひとつとなると思われる。

III. 頭頸部領域の再生研究の現状

先にも述べたが頭頸部領域の再生として研究されている対象臓器は非常に限られており、そのほとんどが骨と神経の再生に集中している。しかも、骨の再生は口腔外科や整形外科が神経の再生は脳外科や整形外科が研究を行い、骨再生研究の一環としてそれを顎・顔面骨に應用、あるいは末梢神経再生研究の一環としてこれを顔面神経に應用するなどといったものがほとんどで、世界的にも耳鼻咽喉科・頭頸部外科が主体で研究を行っている施設は、非常に限られている。

現在、頭頸部領域で再生研究が行われているものを表1に示した。このうち臨床応用が開始されているものはわずかに*印で示した眼窩底¹⁰⁾、気管⁵⁾⁷⁾、顔面神経、

鼓索神経, 反回神経など末梢神経⁶⁾¹¹⁾, 乳突蜂巣¹²⁾¹³⁾, 鼓膜¹⁴⁾¹⁵⁾ などである。しかし, 近い将来臨床応用される可能性が高い研究として頭蓋骨, 頭蓋底, 声帯, 喉頭 (甲状軟骨), 顎下腺などがある。

ここでは, 骨再生の一例として頭蓋骨再生と軟組織再生の一例として声帯の再生についての研究を紹介する。

1. 骨再生の研究

骨再生は, 最も早くから研究が進んだ分野である。骨そのものはある程度自然な再生力を有しているが, 欠損が小さく豊富な血流があり, 結合組織が欠損部分に侵入しないことなどが条件となる。しかし, 臨床的に骨再生が必要となるのは, 自然な再生が望めない大きな欠損に対してである。また形態維持や運動のために大きな荷重がかかり, 再生骨がこの負荷に耐える必要がある。これまで自家骨移植やさまざまな人工骨が考案されてきた。前者は, 侵襲の大きさや移植後の生着の問題, 後者は感染や親和性さらに不十分な骨形成能と強度など大きな問題点があった。

これに対して, 組織工学的手法による骨再生は, これらの弱点を補う新しい方法として研究され, 一部はすでに臨床応用が開始されている。現在, 主流となっている組織工学的骨の再生の方法は, 細胞として自己骨髄由来間葉系幹細胞, 足場としてはリン酸三カルシウム (β -TCP: β -tricalcium phosphate), 自家骨やセラミック, 調節因子としては, TGF- β (transforming growth factor- β) ファミリーをはじめとする増殖因子や複数の増殖因子を含むといわれる血小板濃厚血漿 (PRP: Platelet rich plasma) などが使用されている。また下顎骨の再生などは, 下顎の構造を形成するためにポリグリコール酸のメッシュで構成された構造物に自家骨髄と自家骨, PRP などを入れ, 悪性腫瘍や外傷に伴って欠損した下顎骨の再生が臨床に応用されはじめている⁹⁾¹⁰⁾。

先ほども述べたように, 現時点では培養細胞移植の安全性の確立が不十分であることから, 臨床応用としては足場のみあるいは足場と調節因子のみによる骨再生が主流である。

2. 頭蓋骨再生の研究

脳腫瘍や外傷などで頭蓋骨の一部が損傷を受けた場合あるいは, 開頭手術のための骨弁形成に伴う頭蓋骨の欠損などの場合にその部位を再生させることが目的である。頭蓋骨は, 血流の豊かな長管骨と比較して再生能力が乏しい骨組織であるため, 現在, 外傷や手術により頭蓋骨が損傷を受け欠損を生じた場合, それを再生させる手段はなく, 長期的には骨弁が吸収され線維性結合組織に置き換わり変形が生じる。また骨弁固定のための金属の使用がCT, MRIなどの画像描出の妨げになるにた

表 1

喉頭周辺	: 喉頭枠組み (甲状軟骨, 輪状軟骨*) 気管*, 声帯
末梢神経	: 顔面神経*, 鼓索神経*, 反回神経*, 副神経*, 嗅神経
腺組織	: 甲状腺, 顎下腺, 涙腺
上皮	: 粘膜, 表皮*
筋組織	: 舌, 各臓器内の筋組織
骨	: 頭蓋骨, 頭蓋底, 眼窩底*, 上顎骨 (口蓋), 下顎骨*, 側頭骨*
鼻	: 鼻中隔
耳	: 耳介, 鼓膜*, 乳突蜂巣*, 内耳

*: 現在すでに再生医療として臨床応用されている組織。一方, 無印の組織は現時点では研究段階で, 臨床応用には至っていない。

め, 脳腫瘍などのフォローアップには不適切である。これに対して, さまざまな角度から研究が行われている。DDS (drug delivery system) を利用した手法もその一つで, 成長因子を徐放性剤を利用して骨再生を行う試みが報告されている¹⁶⁾。用いられている成長因子はbFGF (basic fibroblast growth factor), TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1), BMP (bone morphogenetic protein) などである。ここで使われているゼラチンハイドロゲルは, 化学処理の仕方によって違った成長因子を接着させることができ, ゼラチンハイドロゲルの分解に伴って成長因子が放出される仕組みになっている。また, その分解速度も調節可能で, 再生を目的とする局所に効率よく長時間成長因子を持続的に投与できる利点がある。

また, われわれの研究チームでは, 通常の開頭手術と同様の手順で作製した骨弁を元の位置に戻した後, 自家骨粉とその表面をコラーゲンで被覆した顆粒状 β -TCPをfibrin glueとともに欠損部に充填することにより, 金属による固定を行わず頭蓋骨の完全な再生が可能であることをイヌを用いた実験で明らかにした¹⁷⁾。ここで用いられている β -TCPは自家骨置換型骨補填材料であり, 骨形成とともに生体内から消失する。すなわち, この人工材料は骨組織の構成成分である燐酸カルシウムを主成分とするもので, 生体内の骨形成過程では β -TCPの周囲にosteoblastが集まり, β -TCPがCa, Pの供給源として骨新生がなされるため徐々に骨と置換されてゆく。歯科, 整形外科領域ではすでに骨の再生に臨床応用され効果を挙げているものである¹⁸⁾¹⁹⁾。また, 同様にコラーゲンで被覆した顆粒状 β -TCPを用いて上顎骨 (口蓋骨) についても, イヌによる実験でその再生を確認しており, この組織工学的手法は口蓋裂や種々の口蓋骨欠損の

治療法としても有望であると考えられる²⁰⁾。さらに将来的には、間葉系幹細胞の培養・移植を用いた骨再生のほうがより効率がよいことはさまざまな動物実験結果から判明しているため、細胞培養と移植の安全性が確認できれば、細胞移植を含めた骨再生の臨床応用が主流になると思われる。

3. 声帯再生の研究

萎縮や癒痕といった障害声帯に対する治療として、近年さまざまな方法がなされている。この治療の多くは、何らかの物質を声帯に充填する方法である。充填するものとしては、生体組織と人工材料とに分けられ、生体組織としては、自己の脂肪、筋膜、異種組織としてのコラーゲンなどがあり、人工材料にはゴアテックス、ハイドロキシアパタイトなどが用いられている。

声帯は大きくは3層構造をなしている。すなわち浅い部位から上皮層、粘膜固有層、筋層である。このうち声帯の振動において最も重要な働きをしているのは、粘膜固有層である。声帯萎縮、癒痕などのおもな障害部位はこの粘膜固有層で、ときにその下層の筋層にまで及ぶ。

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癒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、われわれは傷害された声帯にコラーゲン内で3次元培養した自己骨髄由来間葉系細胞(BSCs)を移植した²¹⁾。これはコラーゲンが、再生の場を確保しかつ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。実際に、電気メスで声帯の筋層にまで及ぶ傷害を与えたイヌの声帯モデルで、コラーゲン内で3次元培養したBSCsの移植を行った側とコラーゲンだけを投与した側では、約9カ月の観察期間で、声帯の形態面から両者に非常に大きな差が生じ、コラーゲン内で3次元培養したBSCsの移植の有効性が確認された。また、High speed videoによる声帯振動の観察から、形態的再生のみならず機能的にも良好な再生が得られていることが確認できた。さらに、移植した細胞が声帯およびその周辺の上皮系細胞や筋系細胞に分化していることが認められ、間葉系幹細胞移植が傷害声帯の有効な治療法として期待できると考えられる²²⁾。この研究の意義は、これまでは単一の細胞でできた組織の再生が主体であったが、声帯のよ

うな複数の細胞で構成された組織が、組織学的手法で再生しうることが証明されたことにある。

また、上記の細胞移植のほかにHGF(hepatocyte growth factor)などの成長因子の投与やヒアルロン酸の投与による癒痕声帯の治療などの試みもなされている²³⁾²⁴⁾。

IV. 臨床応用されている頭頸部臓器・組織の再生医療

先にも述べたが、現在臨床応用されている頭頸部領域の対象臓器は非常に限られており、足場を生体内に移植する *in situ* tissue engineering の手法が中心である。われわれの行っている臨床応用もこの概念に基づいている。ただし、すべての組織・臓器がこの手法で再生可能であるわけではなく、特定臓器の局所再生にのみ適応できる手法である。われわれが現在再生の対象として臨床応用を行っているのは、末梢神経⁶⁾¹¹⁾、気管⁵⁾⁷⁾、輪状軟骨²⁶⁾、乳突蜂巣¹²⁾¹³⁾である。このうち、末梢神経再生、気管再生を以下に紹介する。

1. 人工神経チューブによる末梢神経の再生

傷害された神経再建に最も有効な手段とされているのは、直接吻合か自家神経移植である。前者は吻合に際して神経に余分な張力がかからないことが前提となり、そのギャップが非常に小さいごく少数の症例に限られる。後者では、再建の対象となる神経の多くは運動神経で、移植の材料として採取される神経の多くは感覚神経であり、適切な太さの神経を選択する必要がある。再建材料としての感覚神経の切除によって、支配領域の感覚脱出という後遺症は必発である。また、複数の神経を再建する場合、採取する神経の範囲とそれに伴う後遺症も広範囲に及ぶ。さらに、移植吻合部位に神経腫瘍が発症することもあり、疼痛のために再度神経切除術を施行する場合すらある。これに加えて、自家神経移植による、運動機能の回復成績はさほど良好とは言えず、特に過誤支配の予想される反回神経などでは、良好な再生はほとんど望めない。したがって、これらの神経で再建が行われる場合も、機能回復というよりは支配筋の萎縮防止を目的にしているのが現状である。

これに対してわれわれは、これまで *in situ* tissue engineering の基本概念に立脚してPGA(poly-glycolic acid)チューブという人工神経を用いて、切除した犬の反回神経が機能的に再生しうることを報告してきた⁶⁾¹¹⁾。PGAチューブは、ポリグリコール酸を主成分とした管状構造物の表面を豚皮由来のI型、III型コラーゲンをそれぞれ70%、30%の比率で混合したもので被覆し、さらに管腔内に同じコラーゲンのスポンジを充填したものである。ポリグリコール酸は、最も簡単な構造式

を持つ高分子化合物で、生体内で加水分解され約4カ月で完全に消失する一方で、一定期間その形状を保持している。これまでにわれわれは、数種類のPGAチューブを作製し実験を重ねてきたが、臨床応用を念頭に置き、大量生産が可能でかつ物理的強度にすぐれたものとして現在のタイプに至った。

末梢神経は切断されるとそのシグナルが中枢側の神経細胞体に伝達され、再生が開始される。数時間以内にその切断端のRanvier絞輪が膨大化して形成される先端膨大部から発芽し、成長円錐を先頭に裸の軸索が末梢に伸長する。その後schwann細胞が再生軸索に沿って遊走し、さまざまな因子を放出しながら神経線維の伸長をリードする。これらの神経再生の過程においてもっとも重要なことは、発芽した成長円錐やその後の軸索の伸長が妨害を受けることなく、目的とする末梢標的器官に最短時間で達することである。

これまで、犬を用いた動物実験のデータから、自家神経移植では非常に高率に再建部分に神経腫瘍が形成されることがわかってきた。これは、移植神経がwaller変性を起こして再生軸索の通路を提供する以前に中枢側神経切断端からの再生が開始されるため、移植神経が再生軸索の伸長の通路を塞ぐ障害物となるためではないかと考えられる。すなわち、行き場を失った再生軸索やそれに続くschwann細胞、神経線維はその周囲で腫瘍を形成する。このような環境の下では、標的臓器に到達できる神経線維は非常に少なく、運良く到達できてもそれまでに非常に時間がかかり、標的臓器の萎縮や過誤支配のために機能的回復が不可能となることも予想される。とくに反回神経などは、①径が非常に小さい、②中枢から標的臓器までの距離が長い、③一束の神経内に声帯の開閉という拮抗する運動を支配する神経線維が混在する、④標的臓器である筋が非常に小さい、といった再生に不利な条件がそろっている。

Unoら²⁵⁾は、末梢神経が傷害されたシグナルを受けた中枢側の神経細胞体における代謝活動の変化を検討し、再生において重要な役割を果たすと考えられるGAP-43(growth factor associated protein-43)の産生の変化に注目している。それによるとラット反回神経切除後の疑核運動神経細胞体ではGAP-43 mRNA発現増加が認められるが、1週間をピークに約2週間程度しか持続せず、その他の末梢神経のGAP-43 mRNA発現増加の持続期間と比較して反回神経の再生能力が非常に弱いことを指摘している。したがって、障害を受けた早い時期にできる限り良好な再生環境を提供することが重要であると考えられる。

以上の研究成果を踏まえ、われわれは、2002年3月よ

表2

神経:	顔面神経	鼓索神経	反回神経
症例:	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5 6 7	1 2 3
結果:	◎×◎×-	×◎○○×--	○--

◎: 極めて良好, ○: 良好, ×: 不良, -: 判定不能

りPGAチューブによる神経再生の臨床応用を開始した。まだ評価できる症例数は少ないが、その一部を表2に紹介した。

2. 気管再生

2003年に倫理委員会の承認を経たのち、気管再生を行ったのは2例でいずれも甲状腺癌の気管浸潤で気管の部分的切除を余儀なくされた症例に対してである⁷⁾。この臨床応用に先立ちビーグル犬を用いた動物実験では、10数頭で気管区域切除(最大5気管輪)を行い、人工気管の移植により再生が成功している⁹⁾。人工気管は、ポリプロピレンのスパイラルステントとメッシュを骨組みにコラーゲンスポンジを内外に巻きつけた環状構造物で、実際に使用する際には血液を浸潤させる。再生した気管部位は、この構造体に侵入した結合組織が気管としての強度を維持し、内腔面は線毛を有する呼吸上皮に覆われ、通常の気管と同様の形態であった。しかし、軟骨の再生は極くわずかに認められるのみであった。このことが今後の研究課題である。

臨床応用を行った2名の患者はいずれも順調な術後経過で約20日後に退院した。これまでの治療では、気管欠損部を再建するのに皮膚、骨・軟骨あるいは人工材料などを用いるため、気管切開、二期的手術などを施行する必要があり、人工材料以外では再建材料採取部位に副損傷が生じる。創面や皮膚の変形のため、美容面での問題のほか再発がわかりにくくなること、入院期間の長期化、患者の精神的・経済的負担の増大など数多くの難点があり、しかも再建された気管欠損部位はあくまで正常の気管ではなく、線毛はないため痰が溜まりやすいなどの後遺症もある。これに対して、*in situ* tissue engineeringの手法で人工気管を用いて再生された気管の欠損部分は、内腔面に線毛を有した呼吸上皮が再生し、欠損部分が周囲と区別できないほどに再生している。頸部の傷も通常の甲状腺腫瘍の手術と変わらないもので、気管切開も不要で手術は一期的で済む。気管の再生が可能であることは癌浸潤の安全域を大きく取ることができ、結果として癌の再発率を下げる事が可能であると考えられる。これは、既存の悪性腫瘍に対する外科治療を変革する画期的な進歩であるといえる。

さらにOmoriらは、気管に続き輪状軟骨の再生の臨

床応用へと研究を進め、治療に難渋するこの部の狭窄に新しい治療法を見出している²⁶⁾。

おわりに

再生医学・医療は、研究と臨床応用が非常に近いところに位置する分野である。組織工学をベースに、動物実験を通じた再生研究はすぐさま臨床応用へと反映できる。この臨床応用の結果からのフィードバックが新たな研究の課題を提供し、よりよい臨床応用へのトランスレーショナルリサーチとなる。自らが考案した新しい治療法が、動物実験などの再生研究を通じて再生医療として反映され、患者に大きな恩恵をもたらすことは、医師として研究者としてこの上ない幸せである。頭頸部領域の再生医療はまだ始まったばかりである。他の領域の再生医療が進むにつれて頭頸部領域でもさまざまな臓器での再生研究が進むとともにそれが再生医療へと応用されると思われる。しかし、耳鼻咽喉科・頭頸部外科領域での再生研究に従事する研究者は極めて少ない。一人でも多くの耳鼻咽喉科医師がこのエキサイティングな再生研究・再生医療に参加されることを期待する。

参考文献

- 1) Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. Science 1993; 260: 920-926.
- 2) Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, et al: Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. J Pediatr Surg 1988; 23: 3-9.
- 3) Vacanti CA, Kim W, Upton J, Vacanti MP, Mooney D, et al: Tissue-engineered growth of bone and cartilage. Transplant Proc 1993; 25: 1019-1021.
- 4) 金丸眞一: 再生医療を支える基本概念. 耳鼻臨 2005; 98: 515-527.
- 5) Nakamura T, Teramachi M, Sekine T, Kawanami R, Fukuda S, et al: Artificial trachea and long term follow-up in carinal reconstruction in dogs. Int J Artif Organs 2000; 23: 718-724.
- 6) Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, Kojima H, Magruffov A, et al: Recurrent laryngeal nerve regeneration by tissue engineering. Ann Otol Rhinol Laryngol 2003; 112: 492-498.
- 7) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Asato R, Yamashita M, et al: Regenerative medicine of the trachea: The first human case. Annals Otol Rhinol Laryngol 2005; 114: 429-433.
- 8) Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E, Kuremoto K, Matsuno T, et al: In situ tissue engineering of periodontal tissues by seeding with periodontal ligament-derived cells. Tissue Eng 2004; 10: 537-544.
- 9) 木下鞠彦, 山崎 正: 再生医療の実際. 田畑泰彦 編, 羊土社; 2003: 47-53頁.
- 10) 山崎 正, 木下鞠彦: 再生医療工学の最先端. 筏 義人 編, シーエムシー出版; 2002: 86-91頁.
- 11) Nakamura T, Inada Y, Fukuda S, Yoshitani M, Nakada A, et al: Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube. Brain Res 2004; 1027: 18-29.
- 12) Magruffov A, Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, Yamashita M, et al: Tissue engineering for the regeneration of the mastoid air cells: a preliminary in vitro study. Acta Otolaryngol 2004; 124: 75-79.
- 13) Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, Magruffov A, Yamashita M, et al: Regeneration of mastoid air cells in clinical applications by in situ tissue engineering. Laryngoscope 2005; 115: 253-258.
- 14) Fishman AJ, Marrinan MS, Huang TC, Kanowitz SJ: Total tympanic membrane reconstruction: AlloDerm versus temporalis fascia. Otolaryngol Head Neck Surg 2005; 132: 906-915.
- 15) Fina M, Baird A, Ryan A: Direct application of basic fibroblast growth factor improves tympanic membrane perforation healing. Laryngoscope 1993; 103: 804-809.
- 16) Yamada K, Tabata Y, Yamamoto K, Miyamoto S, Nagata I, et al: Potential efficacy of basic fibroblast growth factor incorporated in biodegradable hydrogels for skull bone regeneration. J Neurosurg 1997; 86: 871-875.
- 17) Kishimoto M, Kanemaru S, Yamashita M, Nakamura T, Tamura Y, et al: bone regeneration using a composite scaffold of beta-tricalcium phosphate, collagen, and autologous bone fragments with fibrin glue. Laryngoscope (in press)
- 18) Metsger DS, Driskell TD, Paulsruud JR: Tricalcium phosphate ceramic—a resorbable bone implant: review and current status. J Am Dent Assoc 1982; 105: 1035-1038.
- 19) Szpalski M, Gunzburg R: Applications of calcium phosphate-based cancellous bone void fillers in trauma surgery. Orthopedics 2002; 25: 601-609.
- 20) Tamura Y, Kanemaru S, Nakamura T, Yamashita M, Magruffov A, et al: The palatal bone regeneration by *in situ* tissue engineering. Laryngoscope (投稿中)
- 21) Kanemaru S, Nakamura T, Kojima H, Magruffov A, Omori K, et al: Regeneration of the vocal cord using autologous mesenchymal stem cells. Ann Otol Rhinol Laryngol 2003; 112: 915-920.
- 22) Kanemaru S, Nakamura T, Yamashita M, Magruffov A,

- Kita T, et al : The Destiny of the Autologous Bone Marrow Derived Stromal Cells Implanted in the Vocal Fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol* (in press)
- 23) Hirano S, Thibeault S, Bless DM., Ford CN, Kanemaru S : Hepatocyte growth factor and its receptor c-met in rat and rabbit vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002 ; 111 : 661-666.
- 24) Hirano S, Bless DM, Nagai H, Rousseau B, Welham NV, et al : Growth factor therapy for vocal fold scarring in a canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004 ; 113 : 777-785.
- 25) Uno T, Shogaki K, Bamba H, Koike S, Naruse Y, et al : Growth associated protein-43 mRNA expression in nucleus ambiguus motoneurons after recurrent laryngeal nerve injury in the rat. *Acta Otolaryngol* 2003 ; 123 : 292-296.
- 26) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Kojima H, Magruffov A, et al : Cricoid regeneration using in situ tissue engineering in canine larynx for the treatment of subglottic stenosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004 ; 113 : 623-627.

連絡先 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54

京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科

金丸眞一

Regenerative Medicine in the Fields of Otolaryngology, Head and Neck Regions

Shin-ichi Kanemaru, M.D.

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto

Because of the limitations of the present medicine, regenerative medicine has greatly been hoped. Regenerative medicine is an exciting emerging branch of medicine in which cell and tissue based therapies are applied to the treatments of disease. This has been supported by the development of tissue engineering that was a complex of medicine and engineering. Tissue engineering applies the principles and methods of engineering, material science, and cell and molecular biology toward the development of viable substitutes which restore, maintain, or improve the function of human tissues.

According to the doctrine of tissue engineering, tissues and organs can be regenerated by manipulating three elements : cells, scaffolds and regulation factors. Understanding and manipulating the complex relationship among these elements, however, represents the great challenge for researches and doctors who engage in regenerative medicine.

On the other hand, clinical applications of it have not made progress yet except limited tissues and organs. Especially, few clinical studies have reported in the fields of otolaryngology, head and neck regions. In our research group, clinical applications in these fields based on the new concept of *in situ* tissue engineering have been started from 2002 after approval of the ethical committee. Tissues and/or organs for clinical applications at present are trachea, cricoid cartilage, mastoid air cells, and, peripheral nerves including facial nerve, recurrent laryngeal nerve, chorda tympani nerve and so on.

This article describes the researches and clinical studies at present and in the near future of regenerative medicine in the fields of otolaryngology, head and neck regions.

Keywords : regenerative medicine, cell therapy, tissue engineering, *in situ* tissue engineering

Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho (Tokyo) 109 : 1-7, 2006

Regenerative Medicine of the Trachea: The First Human Case

Koichi Omori, MD; Tatsuo Nakamura, MD; Shinichi Kanemaru, MD;
Ryo Asato, MD; Masaru Yamashita, MD; Shinzo Tanaka, MD;
Akhmar Magrufov, MD; Juichi Ito, MD; Yasuhiko Shimizu, MD

Objectives: The objective of the present study was to demonstrate regenerative medicine of the tracheal tissue by using an in situ tissue engineering technique for airway reconstruction.

Methods: Based on the previous successful experimental animal studies, the current regenerative technique was applied to repair of the trachea of a 78-year-old woman with thyroid cancer. A Marlex mesh tube covered by collagen sponge was used as a tissue scaffold. The operative intervention included right hemithyroidectomy, resection of the trachea, and tracheoplasty using the scaffold. The right half of three rings of the trachea was resected, and the scaffold material was sutured to the defect of the trachea.

Results: After 2 weeks, the mesh collagen structure of the artificial material could be seen with endoscopy in most of the implanted area. The artificial material was covered with epithelial growth after 2 months. Epithelialization continued to cover the artificial material completely for 2 years without any complications.

Conclusions: The current regenerative technique avoided tracheotomy, a second operation, and deformity. Good epithelialization has been observed on the tracheal luminal surface without any complications for 2 years. Although long-term observation is required, regenerative medicine of the tracheal tissue appears feasible for airway reconstruction.

Key Words: airway reconstruction, in situ tissue engineering, regenerative medicine, trachea.

INTRODUCTION

Airway reconstruction after resection of malignancies or stenotic inflammatory lesions is one of the most difficult treatments. Ideally, both the airway framework and the endotracheal surface should be reconstructed. Cartilage grafts, muscle grafts, bone grafts, and skin grafts have been placed in the defect after resection of lesions of the trachea.^{1,2} These techniques require several complicated procedures. Post-operative airway stenosis sometimes occurs because of scar, granulation tissue, and submucosal fibrosis.

Various types of artificial trachea have been used; however, almost all of these trials have ended unsuccessfully.³ Our group has developed a porous type of artificial trachea coated with collagen sponge designed to induce tissue invasion into the Marlex mesh scaffold, thus assisting reepithelialization of the lumen and helping to avoid the formation of granulation tissue and dehiscence at the interface between the prosthesis and the host tissue.⁴⁻⁷

Recently, progress in tissue engineering has made it possible to fabricate some tissues or organs such as skin, bone, cartilage, and muscle.⁸ Tissue engi-

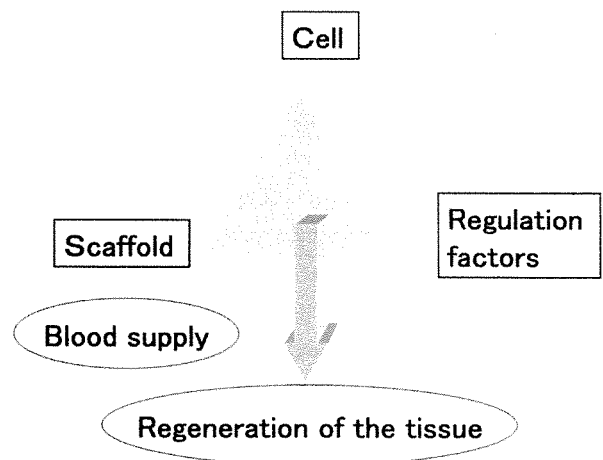


Fig 1. Three factors necessary for tissue regeneration.

From the Department of Otolaryngology, Fukushima Medical University, School of Medicine, Fukushima City (Omori); and the Department of Bioartificial Organs, Institute for Frontier Medical Sciences (Nakamura, Shimizu), and the Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Postgraduate School of Medicine (Omori, Kanemaru, Asato, Yamashita, Tanaka, Magrufov, Ito), Kyoto University, Kyoto; Japan. This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (B) from the Japan Society for the Promotion of Science and in part by a grant of Health and Labor Science Research Grants for Research on Human Genome, Tissue Engineering, from the Ministry of Health, Labor and Welfare.

Presented at the meeting of the American Laryngological Association, Phoenix, Arizona, April 30-May 1, 2004.

Correspondence: Koichi Omori, MD, Dept of Otolaryngology, Fukushima Medical University, 1 Hikarigaoka, Fukushima City, 960-1295, Japan.