

ティッシュエンジニアリング治療 4 気道の再生治療

中村達雄 大森孝一 金丸眞一

なかむら たつお：京都大学再生医科学研究所 臓器再建応用分野，おおもり こういち：福島県立医科大学 耳鼻咽喉科，かねまる しんいち：京都大学医学部 耳鼻咽喉科

● 気道の再生治療と *in situ* ティッシュエンジニアリング

従来の組織工学（ティッシュエンジニアリング）では培養室のシャーレの中で細胞を培養増殖させて目的とする組織を作り、それを体内に移植してきた。これに対し、欠損した組織を体内のその場所（*in situ*）で再生させる方法は *in situ* ティッシュエンジニアリングとよばれる。現在、臨床研究が進んでいる自己組織再生型人工気管は、この *in situ* ティッシュエンジニアリングを応用したものである。

● 人工気管開発の歴史

気道は中枢の気管と末梢の気管支・細気管支によって構成されるが、外科的な再生（再建）治療は気管支より中枢が対象になる。気管支よりさらに末梢の気道や肺胞レベルの再生は内科治療の対象である。

外科的な気道再建の対象となる疾患は、腫瘍の気道浸潤や外傷や気管チューブのカフによる瘢痕狭窄などである。病変部気管を切除して、ゴム管などの人工チューブで欠損部を再建しようとする研究が1940年代より始まった¹⁾。しかしながら、人工血管とは対照的に、人工気管開発は遅れ、60年以上経った現在でも市販されている人工気管はないのが現状である。

一方、合成吸収性縫合糸をはじめとするバイ

オマテリアルの進歩に伴い、気管外科学は1970年代から大きく発展した。米国ハーバード大学の Grillo 博士のグループは、6 cm 以下の気管切除に際しては端々吻合で気管再建が可能であることを明らかにした。以来、気管の端々吻合は気管外科の標準術式となっている。しかし、広範囲の切除や、さまざまな理由で気管の端々吻合ができない症例も多い。また、端々吻合は術後1か月間の頸部前屈位の保持が必要で、患者の負担がきわめて大きい。しかも臨床で症例の多い左主気管支狭窄に対しては、端々吻合では再建できない。安全に使用できる人工気管の開発が待たれるゆえんである。

縫合輪付きのシリコンチューブ型のノンポラス人工気管は、1970年代に一度米国で商品化されたものの、その後吻合部が離解してしまうことが判明し、使われなくなった。一方、日本では内腔面に上皮が再生する新しいタイプの人工気管研究が進められた。

● 人工気管の構造とその生体親和性の向上

自己組織再生型的人工気管は、円筒状にしたファインマーレックスメッシュ（現 BIRD[®] mesh）にポリプロピレン製のモノフィラメントステントを外側に巻き付けた支持構造（フレーム）にコラーゲンを複合化させてある（図1）。コラーゲン部分には自己の細胞が入り込み自己組

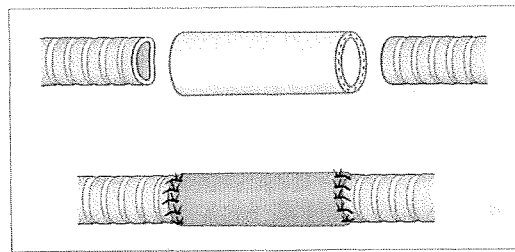


図1 自己組織再生型的人工気管手術のシエマ
人工気管はポリプロピレン製のフレームの周囲に豚皮由来のアテロコラーゲンが複合化されている。切除した気管を人工気管で置換して、そこに自己組織を再生させる。埋入手術時に気管壁のコラーゲンを自己血液、穿刺骨髄液、間葉系幹細胞で浸潤させることにより、人工気管は気密になる。生体気管端を人工気管に挿入するが、吸収性縫合糸を用いて縫合固定する。

織になるため、結果としてフレームは生体に取り込まれる。

フレームのプラスチックは、表面を分子修飾することにより、生体親和性が飛躍的に向上する。この新しい技法は1977年に開発された。プラスチックの表面にプラズマ処理をして反応基を作り、その反応基にコラーゲン分子を共有結合させる方法である²⁾。

● 気道の力学強度と人工気管の構造設計 ●

内部が中空である気管は、解剖学的にみると気管壁内の軟骨構造に支えられている。この軟骨輪が、外部からの圧迫や咳嗽時の陰圧に抗して内腔を保持している。

1970年代に硬いポリエチレン製のヘビーマーレックスメッシュ (heavy Marlex Mesh) が気管再建用材料として米国で発売されたことがある。この気管再建用ヘビーマッシュは筒状に巻いて気管再建に用いられた。しかしながら、この気管再建用ハードメッシュは硬すぎて隣接する血管からの大出血を起こす事故が発生し³⁾、患者が死亡したため使われなくなった。そこで、新しい自己組織再生型人工気管では力学強度と剛性を考慮した設計が行われた。

人工気管に用いたファインメッシュの力学強度はそれだけではきわめて弱く、内腔保持はできない。そこで、気管軟骨に相当する支持材と

して弾性のあるステントを巻き付ける必要があった。この気管軟骨の代わりにステントとして、細く弾性のあるモノフィラメント繊維をメッシュチューブに一体化した。用いられた繊維は医療用のメディカルグレードポリプロピレン製で、メッシュと繊維は熱融合で固定し、さらに補強のために7-0プロリン (外科用縫合糸) で2mm間隔に結節固定した。

● ビーグル犬を用いた動物実験による安全性の確認と機能評価

体重10kg程度のビーグル犬は人間と気管の太さが近いので、気管の再生実験にはビーグル犬が用いられる。ビーグル犬の頸部気管で4~6気管軟骨輪分を切除した後にこのメッシュ状人工気管で置換すると、再建部の人工気管内腔面は気管上皮に覆われることがまず確かめられた⁴⁾。次に広範気管切除時の臨床応用を想定して10~16軟骨輪を切除して、吻合部に抗張力が900~1000g重加わった状態を作り、この欠損を人工気管で再建した。その過酷な条件下でも人工気管は生体に取り込まれ、抗張力下でも吻合不全は生じなかった⁵⁾。

さらに、7~9気管軟骨輪に相当する長い人工気管を用いた置換実験が行われた。この実験では、置換手術後、内腔保持のために一時的にメッシュ管の内側にシリコンチューブを挿入した。この管状置換でも人工気管は宿主気管と術後速やかに一体化して、メッシュ内に生体組織が再生し内腔の上皮化が進んだ。22か月後に病理組織学的検討を行うと、連続した上皮再生が口側から尾側端まで認められた⁶⁾。

● コラーゲンの足場と自己組織の再生

体内に埋入されたアテロコラーゲンにはまず線維芽細胞が侵入し、そこでコラーゲンを分泌する。人工気管のアテロコラーゲンは、自己のコラーゲンと置き換わる。そのコラーゲンを足場に自己組織が再生し、最終的には密集した線毛に覆われた上皮が再生部を覆うが、この過程は1~6か月で起こる。

● 人工気管に用いる新しい工夫

頸部気管から縦隔内気管へと再建実験が進められた。合計 24 頭のビーグル犬縦隔内気管に 5 cm 長の人工気管を埋め込んだ。この実験では、内腔狭窄やメッシュの露出は大網被覆を行うと減少することが判明した⁷⁾。

組織再生の足場となるコラーゲンの改良も続けられた。それまで人工食道に応用されて良好な成績を上げていたコラーゲンスポンジを人工気管に用いると、6~24 か月に屠殺するまで全頭経過良好に生存した。手術時にもスポンジに自己の血液を含潤させることにより、針穴からのリークが起こらず気密となる⁸⁾。現在、臨床で用いられている自己組織再生型人工気管では、薄フィルム多房構造という微細構造のコラーゲンをを用いることにより、組織再生を促進させている。

分岐部用の Y 字型人工気管⁹⁾や左側主気管支再建¹⁰⁾においても、再建部気道内面は完全に上皮が再生し、安全に使用可能であることが確かめられた。

● 気管再建における軟骨再生の試み

整形外科領域では近年、軟骨の再生治療が始まっている。気管再建においても軟骨再生の研究が進められている¹¹⁾。しかし、気管軟骨の場合は力学的強度が低下すると、気道が虚脱し、ただちに生命に関わる。このため、再生軟骨を気管で臨床応用する前に、少なくとも 10 年間は再生軟骨の強度低下がないことを確認する必要がある。しかし、大型動物を使ったこのような長期観察はなかなか困難なのが実情である。その点、長期に安定であるポリプロピレンメッシュを芯にした自己組織再生型人工気管は、力学強度の低下を起こさない。5 年にわたる長期観察でも逸脱することなく安全であることが、動物実験で確認されている¹²⁾。

● 組織再生型人工気管の日本での臨床応用

自己組織再生型人工気管は京都大学医学部附属病院、福島県立医科大学において倫理委員会の審査を経て、2002 年より臨床使用が世界に

先駆けて始まっている¹³⁾。2009 年 3 月現在で 13 例の頸部気管壁欠損（甲状腺腫瘍の気管浸潤）や癩痕性気管狭窄症例に使用され、良好な組織再生と内腔面上皮化をみている。

● 現状と今後の展望

さらに、コラーゲン上における組織再生を促進させるために穿刺骨髄液や、骨髄から分離培養した間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell : MSC）を併用する手法も検討された¹⁴⁾。ビーグル犬を用いた検討では、自己の MSC は、再建部位のコラーゲン上に散布すると気管壁の組織に分化することが判明した。

また 2008 年には、allograft を用いた気道再建の臨床報告がされ、注目を集めた。これはスペインの Macchiarini らが死体気管の軟骨構造を用いたもので、そこに組織工学的手法で患者由来の上皮細胞と軟骨細胞を播種し、それを 30 歳女性患者に移植した。その報告では 4 か月後にも内腔を保持している¹⁵⁾。しかしながら、長期に気道を支えるに足る軟骨の再生は検証されておらず、安全性の評価には慎重を期す必要があると考えられる¹⁶⁾。

● おわりに

iPS (induced pluripotent stem) 細胞を代表とする再生医学研究は急速に進められているが、実際に臨床に応用されているものはまだ少ない。そのなかで、本稿で紹介した *in situ* ティッシュエンジニアリングを用いた気道の再生治療はすでに臨床応用が始まっており、今後さらに一般医療として普及する期待が高まっている。

文献

- 1) Daniel RA Jr. The regeneration of defects of the trachea and bronchi : an experimental study. J Thorac Surg 1948 ; 17 : 335-49.
- 2) Hirai K, Shimizu Y, Hino T. Epithelial regeneration in collagen-coated and uncoated patch grafts into dog tracheas. J Exp Pathol 1990 ; 71 : 51-60.
- 3) Moghissi K. Tracheal reconstruction with a prosthesis of marlex mesh and pericardium. J Thorac Cardiovasc Surg 1975 ; 69 : 499-506.
- 4) Okumura N, Nakamura T, Shimizu Y, et al. Experimental study of a new tracheal prosthesis made from

- collagen-grafted mesh. *ASAIO Trans* 1991 ; 37 : M317-9.
- 5) Okumura N, Nakamura T, Takimoto Y, et al. A new tracheal prosthesis made from collagen-grafted mesh. *ASAIO J* 1993 ; 39 : M475-9.
 - 6) Okumura N, Nakamura T, Natsume T, et al. Experimental study on a new tracheal prosthesis made from collagen-conjugated mesh. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994 ; 108 : 337-45.
 - 7) Teramachi M, Okumura N, Nakamura T, et al. Intrathoracic tracheal reconstruction with a collagen-conjugated prosthesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997 ; 113 : 701-11.
 - 8) Teramachi M, Nakamura T, Yamamoto Y, et al. Porous-type tracheal prosthesis sealed with collagen sponge. *Ann Thorac Surg* 1997 ; 64 : 965-9.
 - 9) Sekine T, Nakamura T, Matsumoto K, et al. Carinal reconstruction with a Y-shaped collagen-conjugated prosthesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000 ; 119 : 1162-8.
 - 10) Sato T, Tao H, Araki M, et al. Replacement of the left main bronchus with a tissue-engineered prosthesis in a canine model. *Ann Thorac Surg* 2008 ; 86 : 422-8.
 - 11) Igai H, Yamamoto Y, Chang SS, et al. Tracheal cartilage regeneration by slow release of basic fibroblast growth factor from a gelatin sponge. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007 ; 134 : 170-5.
 - 12) Nakamura T, Teramachi M. Artificial trachea and long term follow-up in carinal reconstruction in dog. *Int J Artif Organs* 2000 ; 23 : 718-24.
 - 13) 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* 2004 ; 113 : 623-7.
 - 14) Nakamura T, Sato T, Araki M, et al. In situ tissue engineering for the tracheal reconstruction using a luminal-remodeling type of artificial trachea. *J Thorac Cardiovasc Surg* (in press)
 - 15) Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 2008 ; 372 (9655) : 2023-30.
 - 16) Sato T, Nakamura T. Tissue-engineered airway replacement. *Lancet* 2008 ; 372 : 2003-4.

頭頸部癌と癌幹細胞説

末廣 篤・金丸 眞一

Cancer Stem Cell Theory and Head & Neck Cancer

Atsushi Suehiro and Shin-ichi Kanemaru

(Kyoto University)

Cancer stem cells (CSCs) are a sub-population of cancer cells that are the main tumorigenic cells in tumors. These cells possess characteristics normally associated with stem cells. CSCs have stem cell properties such as self-renewal and the ability to differentiate into multiple cell types, therefore these cells are supposed to be derived from normal adult stem cells or progenitor cells. The cancer stem cell theory suggests that only CSCs within the tumor can self-renew and proliferate extensively to form new tumors. In several different types of cancer, it has been demonstrated that a distinct subset of cells initiates tumors *in vivo*, whereas the remaining cells do not. Development of flow cytometry, *in vitro* bioassay, and immunodeficiency mice have contributed to rapid progress in CSC research. CSCs were identified for the first time in human acute myeloid leukemia, in 1997. Thereafter, CSCs have been identified in breast cancer, brain cancer, colon cancer, and pancreatic cancer. As for the head and neck region, in 2007, Prince et al. reported that all cells that have tumorigenic potential were contained within the CD44⁺Lin⁻ population in head and neck squamous cell carcinoma. To date, CSCs have not been found in thyroid cancer, or salivary cancer. Tumors often respond to chemotherapy initially, but frequently recur, suggesting that residual stem cells remaining after therapy are responsible for tumor recurrence. CSC-targeting chemotherapy should lead current cancer treatment to a new stage.

Key words : cancer stem cell, head and neck cancer, chemotherapy

はじめに

癌組織が、単なるモノクローナルな細胞の集合体ではなく、幹細胞的性格を持つ少数の細胞から生じるという概念は、100年以上前から存在していた¹⁾²⁾。近年の幹細胞研究のめざましい進歩により、組織幹細胞や前駆細胞が癌化することで「癌幹細胞」と呼ばれる細胞に変化し、それらの細胞が自己複製しながら癌細胞を分裂・産出し、癌組織を構築していくという「癌幹細胞説」を裏付ける実験結果が、この10年間に次々と報告されている。図1に従来の癌モノクローナル増殖説：分化した細胞が多段階的発癌をきたす、および癌幹細胞説：組織幹細胞または前駆細胞が癌化して癌幹細胞となり、自己複製しながら癌細胞を生み出していく、のシエマを示した。

初めて癌幹細胞が分離されたのは、1997年、急性骨髄性白血病においてである³⁾。Bonnetらは急性骨髄性白血病患者から得たあらゆる分面の腫瘍細胞を免疫不全マウスに移植し、表面マーカーCD34⁺CD38⁻を持つ腫瘍細胞はごく少数の細胞でもマウスに白血病を発症させることができる一方、それ以外の腫瘍細胞はマウスに移植しても白血病を発症させることができないことを示した。さらに表面マーカーCD34⁺CD38⁻を持つ腫瘍細胞は、造血幹細胞と表現型が類似していることものに確認された。正常な造血系幹細胞システムとの比較から、正常な組織幹細胞と癌幹細胞との相違点を標的とした化学療法の実現が期待されている。固形癌においても、Bonnetらと同じ手法を用いて次々と癌幹細胞の分

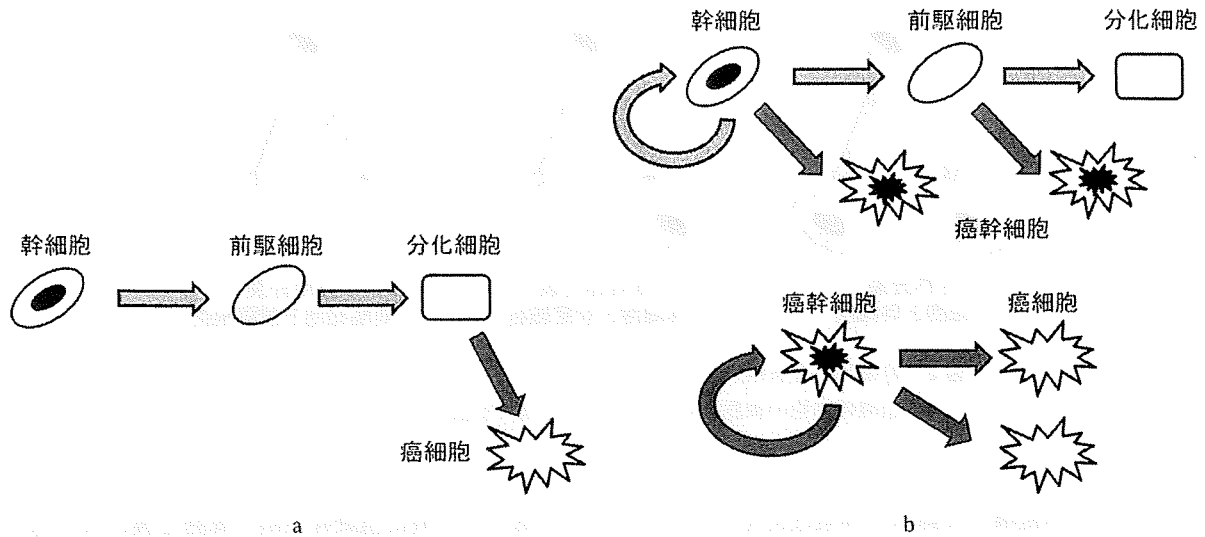


図1 a モノクローナル増殖説：分化した細胞が多段階的発癌をきたす。
 b 癌幹細胞説：組織幹細胞または前駆細胞が癌化して癌幹細胞となり、自己複製しながら癌細胞を生み出していく。

離・同定がなされている。2003年には乳癌において、CD44⁺CD24^{-/low}Lineage⁻の発現型を持つ腫瘍細胞のみが免疫不全マウスへの移植で腫瘍を形成し、その腫瘍からは同じ発現型の癌細胞が採取でき、かつ別のマウスに移植してもやはり腫瘍を形成することが報告された⁴⁾。同じく2003年に脳グリオーマ⁵⁾、2004年に前立腺癌⁶⁾、2007年には大腸癌⁷⁾、膵臓癌⁸⁾などで癌幹細胞の分離・同定に成功しており、頭頸部扁平上皮癌においても2007年、その存在が報告された⁹⁾。甲状腺癌においては、その存在が推測はされているが同定されるには至っていない¹⁰⁾¹¹⁾。現段階で報告のある癌幹細胞を表1に示す。頭頸部扁平上皮癌と甲状腺癌における癌幹細胞に関しては、後で項を設けてその詳細を説明する。

癌幹細胞の研究はこの2、3年で急速に進展しており、現在の癌研究の中心となりつつある。本稿では、国内外

における癌幹細胞研究の現状と臨床応用の展望について解説する。癌組織の幹細胞についての理解を深めるため、まず正常組織の幹細胞、および最近のトピックスであるES細胞とiPS細胞について概説する。

組織幹細胞

生体の各臓器にはその組織の恒常性を保つための細胞分化のシステムが存在する。各組織のなかには、長期的に生存し続ける組織幹細胞 (adult stem cell) が少数存在し、必要に応じて分裂し、分化細胞を補充する¹²⁾。すなわち正常組織は、組織幹細胞、そこからわずかに分化した前駆細胞 (progenitor cell)、さらに分化・増殖した種々の組織細胞から細胞階層性に構成されている。

組織幹細胞は分化細胞を補充する頻度によって、造血幹細胞や上皮幹細胞、生殖幹細胞のように定期的に細胞

表1 現在までに癌幹細胞が同定された癌と特異的細胞表面マーカー

癌	報告された年	細胞表面マーカー
急性骨髄性白血病	1997 ³⁾	CD34 ⁺ CD38 ⁻
乳癌	2003 ⁴⁾	CD44 ⁺ CD24 ^{-/low} ESA ⁺
脳腫瘍	2003 ⁵⁾	CD133 ⁺
前立腺癌	2004 ⁶⁾	CD44 ⁺ インテグリン $\alpha_3\beta_1$ ^{hi} CD133 ⁺
大腸癌	2007 ⁷⁾	CD133 ⁺
膵臓癌	2007 ⁸⁾	CD44 ⁺ CD24 ⁺ ESA ⁺
頭頸部扁平上皮癌	2007 ⁹⁾	CD44 ⁺

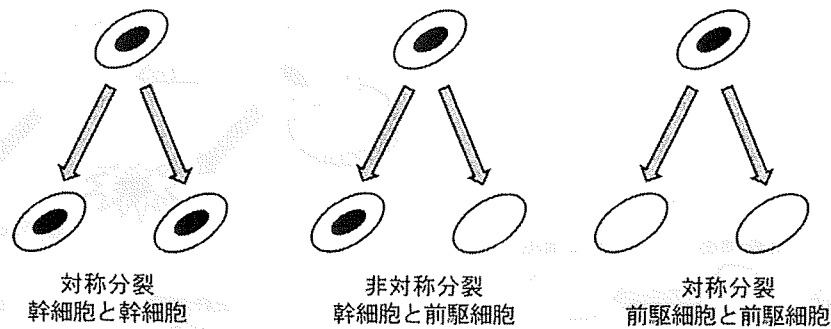


図2 幹細胞の分裂様式

組織幹細胞の細胞分裂には3通りの様式があると考えられている。

の補充を必要とする組織の幹細胞（周期性再生を行う幹細胞）と、神経幹細胞や骨格筋幹細胞、肝幹細胞のように組織が損傷を受けた場合に細胞補充を行う幹細胞（誘導的再生を行う幹細胞）に分類することができる。現在のところ、血球系¹³⁾、筋肉¹⁴⁾、神経¹⁵⁾等の臓器では組織幹細胞は同定されており、造血幹細胞ではCD34⁺、Flk1/VEGFR2/KDR⁺が¹³⁾、神経幹細胞ではNestinが組織幹細胞の特異的な表面マーカーとして同定されている。甲状腺等、組織幹細胞がまだ同定されていない臓器も多数存在する。

組織幹細胞を特徴づける性質として、以下の二つの性質が挙げられる。

①未分化性維持と多分化能

未分化性 (undifferent state) とは、細胞の運命が決定されていない状態のことであり、分化した細胞と異なり、分化マーカーを発現していない。一般に分化細胞よりも細胞質が少なく、細胞内小器官に乏しい。

多分化能 (pluripotency) とは、文字通りいくつかの種類の細胞に分化する能力を持っているということである。たとえば、脳室下層に存在する神経幹細胞はニューロン、グリア細胞等の神経細胞に分化することが知られており¹⁵⁾、また骨髓内に存在する造血幹細胞はあらゆる血球系細胞に分化するだけでなく、血管内皮細胞にも分化することが知られている¹⁶⁾。骨髓内のもう一つの幹細胞である骨髓間葉系幹細胞 (bone marrow derived mesenchymal stem cell) は培養方法を変えることで骨芽細胞、筋細胞、神経細胞など、異なった系統の細胞に分化誘導させることができる¹⁷⁾。

②自己複製能

自己複製能 (self-renewal) は幹細胞の持つ最大の特徴

である。一般に組織幹細胞の細胞分裂には3通りの様式があると考えられている。すなわち、対称分裂により二つの幹細胞ができる場合、対称分裂により二つの前駆細胞ができる場合、非対称分裂により幹細胞と前駆細胞ができる場合である (図2)。生体内の組織では、組織幹細胞が枯渇しないよう、これら3つの分裂様式が内外からのシグナルによって使い分けされていると考えられている。

幹細胞のこれらの性質は、Notch シグナル系、Wnt シグナル系などのシグナル系、gap junction からの接着刺激、成長因子などのパラクライン因子によってコントロールされていることが知られている¹⁸⁾。これらの情報をスムーズに受け取るため、組織幹細胞は生体組織内において特定のポジションに存在していることがわかっている。このような組織幹細胞の存在部位あるいは周囲の細胞そのものをニッチ (niche) とよぶ。たとえば、腸上皮幹細胞は絨毛と絨毛の間の陰窩の最底部付近に数個存在し、分裂した上皮細胞を絨毛先端に次々と送り出している¹⁹⁾。気管上皮幹細胞のニッチは気管軟骨リング間の膜様部であり²⁰⁾、毛包のバルジと呼ばれる部位には上皮幹細胞と色素幹細胞が存在する²¹⁾²²⁾。

胚性幹細胞

ES細胞 (Embryonic stem cells: 胚性幹細胞) は胚盤胞期の胚の一部に属する内部細胞塊より作られる幹細胞細胞株のことである。適切な培養環境下において、内胚葉、中胚葉、外胚葉系すべての細胞に分化しうる多分化能を持ちつつ、無限に分裂増殖させることができ、再生医療への応用が注目されている。しかし、ヒトの初期胚からES細胞を採取することは、生命の萌芽を刈り取ってしま

うことになるため、世界的に倫理的論議を呼んでいる。この倫理的問題を克服するため、Takahashi ら²³⁾²⁴⁾ はマウス、およびヒト皮膚から採取した線維芽細胞にウイルスベクターを用いて4つの遺伝子を導入し、ES細胞と同等の能力を持つ細胞を作成した。これが人工多能性幹細胞とも呼ばれるiPS細胞(induced pluripotent stem cells)である。再生医学と癌研究は表裏一体のものであり、飛躍的な進歩を遂げているiPS細胞に関する研究は、癌研究の進歩にも貢献するであろう。

癌幹細胞の概念

癌幹細胞説の概念は、

- ・癌組織内には幹細胞の性質をもつ細胞が存在し、自己複製しながら癌細胞を分裂・産出している
 - ・そのような細胞はおそらく、組織幹細胞や前駆細胞が変化してできる
- という二つの要点にまとめることができる。

癌幹細胞の基礎となる概念は、大腸腺癌の発癌に対する疑問から生まれた¹⁾²⁾。分化した大腸の粘膜上皮細胞は、約1週間でターンオーバーが完了するが、腺癌の発生には数個の癌遺伝子と癌抑制遺伝子が関与し、少なくとも10年程度の期間が必要である(多段階発癌説)。そのため、7日間程度でターンオーバーされる分化細胞がたとえ癌細胞化しても、癌腫の形成までには至るはずがなく、長期間粘膜に存在している細胞(組織幹細胞)が癌細胞化するのではないか、というのが癌幹細胞の基本的な考え方である。現在では、組織幹細胞だけでなく、前駆細胞も癌幹細胞に変化しうると考えられている²⁵⁾。すなわち、ニッチにおいて厳密な分化・増殖のコントロールを受けていた組織幹細胞が変異により自律増殖能を得ただけでなく、ニッチからすでに脱出した前駆細胞が変異により自己複製能を再獲得した場合でも、癌幹細胞に変化しうると考えられている。

さらに、癌幹細胞が血流あるいはリンパ流に乗り他臓器やリンパ節に定着することで転移が成立する、すなわち、癌の転移とは癌幹細胞の転移である、と現在推測されている²⁶⁾が、その詳細ははまだ解明されていない部分が多い。

癌幹細胞に対する研究

このように癌幹細胞研究が近年急速に進歩してきた背景には、以下の3つの分野の進歩がある。

①フローサイトメトリーの発達

フローサイトメトリーとは、蛍光標識した細胞を水流の中に一定の間隔で流し、レーザー光等を照射して細胞から出てくる散乱光や蛍光の強度を測定することで、細胞の種類や大きさを分析する方法である。分析のみができる装置をセルアナライザー、細胞を種類ごとに分取できる装置をセルソーターと呼ぶ。近年の装置は、複数のレーザーと複数の検出器を持っているため、同時に複数の抗体による蛍光染色が可能である。密度勾配遠心法による分離法やマグネティックビーズによる分離法よりも高価ではあるが、簡便で、細胞を生きたまま回収できるため、現在では細胞分離法の主流となっている。

②幹細胞研究の進歩

幹細胞研究の進歩には、基礎研究に関係するあらゆる実験テクニックが貢献しているが、最大の貢献は前述のフローサイトメトリーの進歩、および幹細胞培養法の確立、これら二つである。幹細胞を未分化な状態で維持するためには生体内での環境、つまりニッチを反映したin vitroの培養系が必要である。癌幹細胞も正常組織の幹細胞の培養条件に近い条件で培養が可能であることが多い。急性骨髄性白血病の癌幹細胞は、造血幹細胞の培養系とほぼ同様の培養条件で培養できることが分かっている²⁷⁾。

③癌移植モデルマウスの確立

ヒト癌細胞を移植・生着させることのできる免疫不全マウスとして、下記のマウスが利用されている。

- ・ヌードマウス：先天的に体毛がなく、胸腺が欠損しているマウス、T細胞を持たないため、細胞性免疫が機能しない。
- ・NOD/SCID マウス (Non-obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency mouse)：B/T細胞ともに持たない重症免疫不全マウス。ヒト細胞の生着が非常に良い。他の免疫不全マウスとの交配で、さらにヒト細胞の生着が良いマウスの開発も行われている。

癌幹細胞の同定法

癌組織、または癌細胞株から癌幹細胞を抽出するには、いくつかの方法がある。

①既知の細胞表面マーカーで分類

既知の細胞表面マーカー(CD133など⁵⁾)で染色した細胞をcell sorting可能なフローサイトメトリーによって分類していく。多大な時間と費用とを必要とするが、現

在のところ、もっとも有効な方法であり、これまでに同定されてきた癌幹細胞の多くはこの方法で同定されてきた。

② SP 細胞 (色素排出能による分類)

一般に幹細胞は長期生存を維持するため、細胞内に侵入してきた異物を排泄する能力に優れている。幹細胞の細胞膜には ABC (ATP-Binding Cassette) トランスポーターと呼ばれる排泄ポンプが非常に発達している。DNA 結合色素である Hoechst33342 で染色すると、幹細胞は理論上染色されない (実際にはいったん染色されてもすぐに色素が排泄される) ので、その他の染色された細胞から染まらない分画の細胞のみを cell sorting 可能なフローサイトメーターを用いて分離回収する。この分画は linear な細胞集団からずれた位置に存在することから、SP (Side Population) 細胞と呼ばれる²⁸⁾。ただし、ABC トランスポーターは前駆細胞をはじめ、幹細胞以外の細胞にも発現しているため、SP 細胞群がそのまま幹細胞群というわけではなく、SP 細胞群はあくまで stem cell enriched な細胞群でしかない¹¹⁾²⁸⁾。

の患者の癌組織を切除手術施行時に採取し、まずフローサイトメリーを用いて癌組織を構成する細胞が表面マーカーで数種類に分けられること、すなわち頭頸部扁平上皮癌の癌組織に細胞階層性があることを証明した。さらに彼らは CD44 抗原に注目し、癌組織を構成する細胞群を CD44⁺ 癌細胞と CD44⁻ 癌細胞に分別し、NOD/SCID マウスにそれぞれの細胞群を移植したところ、CD44⁺ 癌細胞を移植した方は高確率で腫瘍を形成したが、CD44⁻ 癌細胞を移植した方はほとんどが腫瘍を形成しなかった。免疫組織化学では、CD44⁺ 癌細胞では上皮基底細胞のマーカーである Cytokeratin 5, 14 が発現している一方で CD44⁻ 癌細胞では上皮分化細胞のマーカーである involucrin が発現していることを示した。さらに、RT-PCR 法では、CD44⁺ 癌細胞群で、BMI1 遺伝子 (他領域の幹細胞において、自己複製に関与されるとされている²⁹⁾) の発現を認めた。

以上より、CD44⁺ 癌細胞が幹細胞の特徴である自己複製能と多分化能を持っていることが証明され、これらが頭頸部扁平上皮癌の癌幹細胞であると結論付けられた。

頭頸部癌における癌幹細胞

2007 年、Prince ら⁹⁾ により、ヒト頭頸部扁平上皮癌の癌幹細胞が同定された。彼らは、外科治療時に摘出されたヒト扁平上皮癌を検討し、癌腫を形成する細胞のうち、CD44⁺ 癌細胞 (全癌細胞の数%) がヒト扁平上皮癌の癌幹細胞である可能性が高いと証明した。口腔癌、咽頭癌

甲状腺癌における癌幹細胞

甲状腺には数種類の癌が発生するが、そのいずれにおいても癌幹細胞は分離・同定されていない。Zhang ら¹⁰⁾ は、甲状腺癌発癌のメカニズムとして、甲状腺の組織幹細胞が癌化すると未分化癌癌幹細胞に、濾胞細胞系の前駆細胞が癌化すると乳頭癌や濾胞癌の癌幹細胞に、C 細

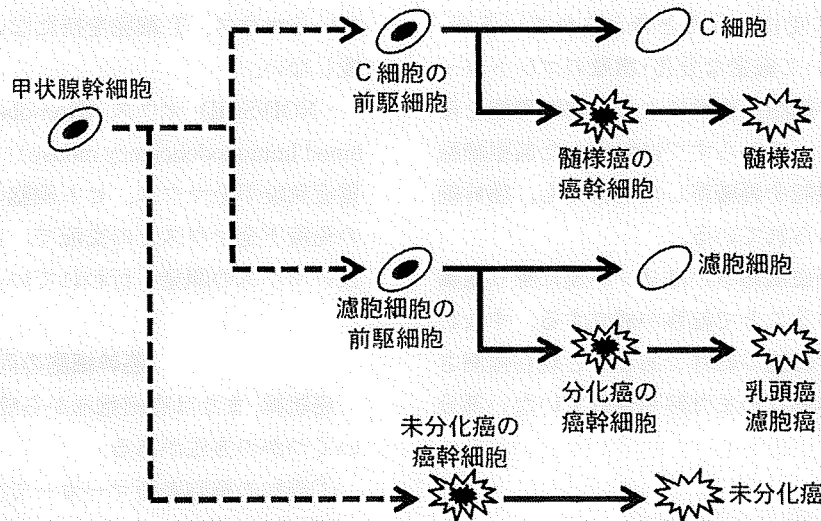


図3 甲状腺における癌幹細胞仮説 (文献8より改訂)

甲状腺では幹細胞や前駆細胞は見つかっていないが、癌幹細胞説を当てはめると、図のような細胞系譜が予想される。

胞系の前駆細胞が癌化すると髄様癌の癌幹細胞になるという仮説を述べている(図3)。Mitsutakeら¹¹⁾はSP細胞の検討から甲状腺癌幹細胞の同定を試みた。彼らは数種の癌細胞株(乳頭癌2株, 濾胞癌1株, 未分化癌2株)をフローサイトメトリーを用いてSP細胞とnon-SP細胞に分類した。5株中4株でSP細胞の分離は可能で, SP細胞群の方がnon-SP細胞よりも高い分裂能を示した。ヌードマウスへのそれぞれの移植では, 腫瘍形成能に有意差は認められなかった。non-SP細胞群でも腫瘍形成がみられたものもあった。さらに未分化癌細胞株をフローサイトメトリーを用いてSP細胞とnon-SP細胞に分類したのち, RT-PCR法で両群の遺伝子発現の違いを評価したところ, Notchシグナル系に関する*hes1*, *jag1*と, Wntシグナル系に関する*myc*, *jun*, *fzd5*すべてでSP細胞群の方が高発現を示した。以上よりSP細胞内に癌幹細胞が豊富に存在していることは示唆されたが, 分離・同定するには至っていない。さらに, 甲状腺においては正常組織の組織幹細胞が未だ同定されていないため, 癌幹細胞をターゲットとした化学療法の実現は, まだ先のことになりそうである。

癌幹細胞と創薬

前述のとおり, 組織幹細胞の細胞膜には長期生存という目的のために, 薬剤(細胞にとっては毒素)を排泄するABCトランスポーターが高発現しており, 癌幹細胞でも同様である。現在臨床で使用されている抗癌剤の多くは癌細胞のDNAを標的としているが, 癌幹細胞にお

いてはそれらの排泄ポンプのために薬剤が核に到達することなく排泄される³⁰⁾(図4)。また, 癌幹細胞の大半は細胞周期における休止期(G0期)におり³¹⁾, 細胞分裂を阻害することを目的とした抗癌剤も癌幹細胞には効果が乏しいと考えられている³²⁾。すなわち, 現在臨床で用いられている抗癌剤は癌細胞を死滅させることはできても癌幹細胞を死滅させることはできない可能性が高い。癌腫に対して化学療法を行った際に, 投与直後に一時的に縮小した腫瘍が時を待たずして再増大してしまったという症例をしばしば経験するが, これは腫瘍の大半を占める癌細胞が死滅しても, 癌幹細胞が残存しているためであると考えると理解しやすい。

以上より, 今後の化学療法としては, 癌幹細胞を標的とした抗癌剤, 癌幹細胞を死滅させることのできる抗癌剤の開発が必要となる。現段階で, 癌幹細胞を標的とした抗癌剤の開発は, 以下の二つに集約される。

① 幹細胞自己複製因子を標的とした治療薬の開発

正常な幹細胞の自己複製に働くNotchシグナル系, Wntシグナル系などは, 癌の原因因子となりうる事が分かっている³³⁾。Imatinibはヒト大腸癌において, Wntシグナル系を抑制することで腫瘍増殖を抑制する³⁴⁾ことが, また, γ セクレターゼ阻害剤はNotchシグナル系を阻害することでT細胞性急性リンパ芽球性白血病細胞を抑制する³⁵⁾ことが実証されている。

② 癌幹細胞を分化させる治療薬の開発

ATRA(all-trans retinoic acid)で分化誘導をした急性骨髄性白血病は誘導しないものより抗癌剤に対する感受性

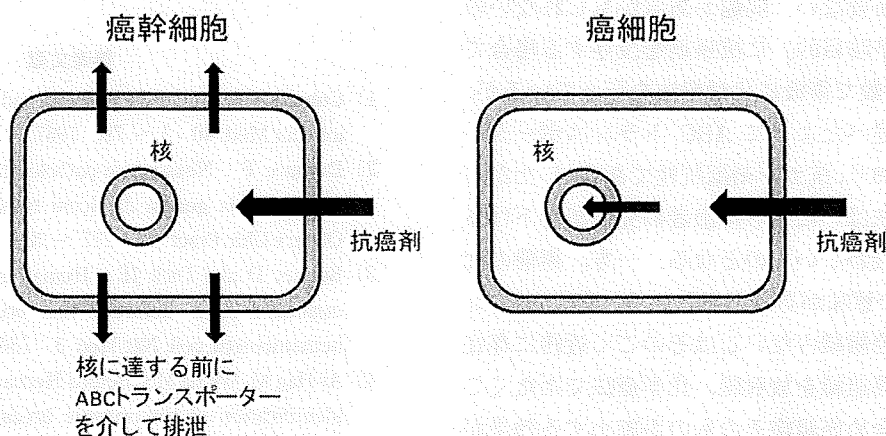


図4 癌幹細胞における抗癌剤耐性

癌細胞では抗癌剤が核内に移行し効果を発揮するが, 癌幹細胞においては核に達する前にABCトランスポーターを介して細胞外へ排泄される。

が上昇する³⁶⁾。しかし、固形癌に対する効果は限定的である。

このように、癌幹細胞を標的とした抗癌剤の開発は着々と進んでいるが、開発上の課題もある。

癌幹細胞は培養条件によって容易に分化してしまうため²⁷⁾、癌組織の細胞階層構造を維持したまま培養する技術の開発が必要である。さらに、前述したとおり、組織幹細胞と癌幹細胞は細胞表面マーカーが類似しているため、癌幹細胞のみを攻撃ターゲットとするには、癌幹細胞だけに特異的なターゲットを確立しなければいけない。正常組織の幹細胞も攻撃するような抗癌剤では、副作用が懸念され、患者には投与できない。癌幹細胞と正常幹細胞との表面マーカーの相違点はいまだ不明である。

おわりに

現在わが国で行われている癌治療法は、一般に手術、放射線、化学療法などであるが、これらをいかに組み合わせるかは、主治医（チーム医療を含む）の考えに一任されている。とくに放射線療法や化学療法はどれだけのドーズをいつどのタイミングで施行するかによって、患者の予後が大きく変わってくるため、数多くの文献からの情報を取り入れ、チーム内で議論を重ね、少しでも新しい治療法を取り入れてゆくことが肝要である。

そこで、癌幹細胞という観点から既存の治療法を見直してみると、いくつかの点で問題がある可能性がある。

手術によって癌幹細胞を含め癌が完全に摘出された場合、その時点で遠隔転移がなければ完治する。その場合、術後の化学療法は必要ない。問題があるかもしれないのは、術後に「再発予防目的」に抗癌剤を投与する場合である。現在多くの施設で術後に化学療法を行っているが、癌幹細胞は、先に述べたように ABC トランスポーターが高率に発現しており、抗ガン剤抵抗性である。したがって、術後の化学療法はいたずらに患者の免疫能を下げるばかりで、効果は疑わしいものとなる。一方、術前の化学療法には、大きな意味があると思われる。癌幹細胞は、遠隔転移の前には癌組織内ないしはそのごく近傍に存在するはずである。癌組織を放射線、化学療法でたたくことは、癌幹細胞を含め癌組織そのものが縮小する効果があり、周辺組織を含めて癌を手術的に完全摘出することを容易にし、癌完治の可能性を高くすることになる。

放射線治療に関しては、癌幹細胞に対する効果の研究

が不足しているため、推測になってしまうが、放射線治療のみで根治できる癌があることから、癌幹細胞を死滅させることができると考えられる。ただ、多くの癌幹細胞は細胞増殖の休止期にあるため放射線感受性は低いはずである。

以上のように、癌幹細胞という概念からの発想では、術前の化学療法および術前後の放射線治療は大いに有効性が期待できるが、術後の化学療法は効果がない（さらには有害ですらある）可能性がある。

癌幹細胞がどの腫瘍にどの程度含まれているのかに関して不明である現在において、癌幹細胞説をすべての癌に拡張して議論することは時期尚早かもしれないが、現在の癌治療の問題点を検討し、新しいストラテジーを開発するうえで、この概念は非常に有用である。癌幹細胞に対する研究は日進月歩で進んでおり、その成果を医師が臨床の現場で利用できる日も遠からず来るであろう。その時点で迅速に実際の癌患者にその成果を還元するため、癌治療に携わる医師は、癌幹細胞説はもちろん、他の癌基礎研究の進展具合に絶えず目を向けておく必要がある。

医学がめざましく進歩した今日において、小児の白血病や転移のない乳癌など、治療成績が顕著に向上した癌もある。しかし癌による死亡者数は高齢化社会に伴い徐々に増加しており、日本国内だけで年間 30 万人以上が癌で死亡している。現在、行きづまり感のある癌治療において、癌幹細胞に対するさらなる研究と癌幹細胞を標的とした新しいストラテジーの開発が、大きなブレークスルーとなると信じている。

参考文献

- 1) Cohnheim J: Ueber entzündung und eiterung. Path Anat Physiol Klin Med 40: 1~79, 1867.
- 2) Durante F: Nesso fisio-pathologico tra la struttura dei nei materni e la genesi di alcuni tumori maligni. Arch Memor Observ Chir Pract 11: 217~226, 1874.
- 3) Bonnet D and Dick JE: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med 3: 730~737, 1997.
- 4) Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al.: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA 100: 3983~3988, 2003.
- 5) Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al.: Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res 63: 5821~5828, 2003.

- 6) Richardson GD, Robson CN, Lang SH, et al. : CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci* 117 : 3539 ~ 3545, 2004.
- 7) Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. : Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445 : 111 ~ 115, 2007.
- 8) Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. : Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67 : 1030 ~ 1037, 2007.
- 9) Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. : Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 : 973 ~ 978, 2007.
- 10) Zhang P, Zuo H, Ozaki T, et al. : Cancer stem cell hypothesis in thyroid cancer. *Pathol Int* 56 : 485 ~ 489, 2006.
- 11) Mitsutake N, Iwao A, Nagai K, et al. : Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively. *Endocrinology* 148 : 1797 ~ 1803, 2007.
- 12) Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, et al. : In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 3120 ~ 3125, 1999.
- 13) Till JE and McCulloch EA : A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14 : 213 ~ 222, 1961.
- 14) Cornelison DD and Wold BJ : Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol* 191 : 270 ~ 283, 1997.
- 15) Lendahl U, Zimmerman LB and McKay RD : CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60 : 585 ~ 595, 1990.
- 16) Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al. : Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408 : 92 ~ 96, 2000.
- 17) Friedenstein AJ, Chailakhjan RK and Lalykina KS : The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3 : 393 ~ 403, 1970.
- 18) Jones DL and Wagers AJ : No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 : 11 ~ 21, 2008.
- 19) Potten CS : Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353 : 821 ~ 830, 1998.
- 20) Borthwick DW, Shahbazian M, Krantz QT, et al. : Evidence for stem-cell niches in the tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24 : 662 ~ 670, 2001.
- 21) Fuchs E and Raghavan S : Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet* 3 : 199 ~ 209, 2002.
- 22) Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, et al. : Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 416 : 854 ~ 860, 2002.
- 23) Takahashi K and Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 : 663 ~ 676, 2006.
- 24) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 : 861 ~ 872, 2007.
- 25) Wang JC and Dick JE : Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol* 15 : 494 ~ 501, 2005.
- 26) Li F, Tiede B, Massagué J, et al. : Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res* 17 : 3 ~ 14, 2007.
- 27) Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, et al. : Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 9 : 391 ~ 403, 2006.
- 28) Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al. : Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183 : 1797 ~ 1806, 1996.
- 29) van der Lugt NM, Domen J, Linders K, et al. : Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene. *Genes Dev* 8 : 757 ~ 769, 1994.
- 30) Gottesman MM, Fojo T and Bates SE : Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2 : 48 ~ 58, 2002.
- 31) Graham SM, Jørgensen HG, Allan E, et al. : Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 99 : 319 ~ 325, 2002.
- 32) Dean M, Fojo T and Bates S : Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 5 : 275 ~ 284, 2005.
- 33) Bailey JM, Singh PK and Hollingsworth MA : Cancer metastasis facilitated by developmental pathways: Sonic hedgehog, Notch, and bone morphogenic proteins. *J Cell Biochem* 102 : 829 ~ 839, 2007.
- 34) Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, et al. : Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 351 : 657 ~ 667, 2004.
- 35) Miele L : Notch signaling. *Clin Cancer Res* 12 : 1074 ~ 1079, 2006.
- 36) Ohno R, Asou N and Ohnishi K : Treatment of acute promyelocytic leukemia: strategy toward further increase of cure rate. *Leukemia* 17 : 1454 ~ 1463, 2003.

原稿受付 : 平成20年 8月21日

原稿採択 : 平成20年11月27日

別刷請求先 : 末廣 篤

〒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

総説

日耳鼻 112: 104-109, 2009

「第109回日本耳鼻咽喉科学会シンポジウム」

耳鼻咽喉科臨床の進歩

—喉頭・気管の再生医療—

大森 孝一
 中村 達雄*
 多田 靖宏
 野本 幸男
 鈴木 輝久
 金丸 眞一**
 安里 亮**
 山下 勝**
 岡野 渉

福島県立医科大学医学部

耳鼻咽喉科学講座

*京都大学再生医科学研究所・

臓器再建応用分野

**京都大学医学部耳鼻咽喉科・

頭頸部外科

気道は呼吸、嚥下、発声、構音という生命維持や社会生活を送る上で必須の機能を持つ。癌や外傷などで気道の組織が侵された場合、これらを切除した後に機能障害なく再建することは難しい。

臓器再生には足場、細胞、成長因子が必要とされている。これらを組み合わせで臓器を再生させようとする研究が数多く展開されているが、臨床に到達した分野はまだ少ない。気管については、Tissue Engineering の概念を提唱した Langer, Vacanti が、動物実験で体外での気管様の管腔組織再生を報告したが、体内に移植すると吸収されるため臨床応用に用いるのは難しい。

一方、われわれは、生体内で組織を再生させる *in situ* Tissue Engineering の概念に基づいて、生体内で自己の組織再生を誘導する人工材料（ポリプロピレンメッシュ+コラーゲンスポンジ）を開発した。犬を用いて人工材料を足場として移植し、気管、輪状軟骨弓部などの組織再生に成功した。電子顕微鏡での観察で内腔面に線毛上皮の再生を認め、機械的圧縮試験で再生組織は正常組織と同等の支持力を示した。最長5年の観察期間で狭窄などの合併症を認めず良好な組織再生が得られ、安全性が確認された。

2002年より、世界に先駆けて喉頭・気管の再生医療のヒトへの応用を開始した。頸部気管、輪状軟骨の欠損例を対象として、甲状腺癌気管浸潤の即時再建3例、喉頭・気管狭窄の気道再建5例に行い、9カ月から最長4年の観察期間では経過良好である。再建時には気管孔を同時に閉鎖し早期に日常生活に復帰できた。喉頭・気管の再生医療は部分欠損に対してではあるが臨床応用段階に到達しており、日本発の治療技術といえる。今後の課題は、より広い範囲の欠損例への対応、上皮化の加速や声帯隆起再生のための新規技術開発であり、線維芽細胞や脂肪組織由来幹細胞を用いたハイブリッド型人工材料の開発状況を紹介する。

キーワード：気道再建、再生医療、人工気管、足場

はじめに

気道は呼吸、嚥下、発声、構音という生命維持や社会生活を送る上で必須の機能を持つ。癌や外傷などで気道の組織が侵された場合、これらを切除した後に機能障害なく再建することは難しい。

われわれは気道領域の再生医療技術を開発しており、輪状軟骨や気管の部分欠損に対してではあるが臨床応用段階に到達している¹⁾²⁾。そこで、本稿ではまず再生医学研究の進歩と臨床到達分野について述べた上で、「喉頭・気管の再生医療」について、その基礎となる材料開

発、臨床応用の現状、さらに新規技術開発の展望についてまとめてみたい。

1. 再生医学研究の進歩と臨床到達分野

1990年代になって、組織工学 (Tissue Engineering) の発展と幹細胞の発見により臓器再生の可能性が現実味を帯びてきた。1993年、M.I.T. の Langer と Harvard 大学の Vacanti は工学的手法により細胞を三次元的に組み上げ、臓器や組織に近いものを再生させる Tissue Engineering という概念を提唱した³⁾。彼らはマウスの背中

に人の耳介の形をした軟骨を再生させ、そのセンセーショナルな映像が世界に配信された。彼らの方法は体外で細胞を培養して目的とする組織をつくりこれを体内に移植するもので (ex vivo Tissue Engineering)、実際はこの方法では移植後に組織が吸収されるなどの問題があり臨床応用へのハードルは高い。

一方、1995年以降、中村らは目的とする組織を体内で再生させるという方法 (in situ Tissue Engineering) で、コラーゲンスポンジを主体とした足場を移植して気管、食道、胃、小腸、末梢神経などの組織再生を報告してきた⁷⁾。さらに著者らは輪状軟骨弓部の切除後の欠損モデルに足場を移植し、再生組織は正常と同等の硬さを持ち、かつ良好な上皮化が得られることを報告した⁸⁾。2002年より著者らは本技術を用いた「喉頭・気管の再生医療」を世界に先駆けて行っている¹²⁾。

臓器再生を考えるに当たっては、足場 (scaffold)、細胞 (cell)、調節因子 (regulatory factor) の三要素が必要で、そこに血流が入って臓器再生が実現する。これらの三要素は植物栽培における土壌、種子、肥料にたとえ

られる。足場としてはコラーゲン、Polyglycolic Acid (PGA) などが、細胞としては骨髄間葉系幹細胞、血管内皮前駆細胞、角膜上皮幹細胞、口腔粘膜上皮細胞などが、調節因子としては basic Fibroblast Growth Factor、Hepatocyte Growth Factor、Bone Morphogenetic Protein、Insulin-like Growth Factor 1 などが臨床に用いられている (図1)。これらを組み合わせて臓器再生をめざした研究が数多く展開されているが、臨床に到達した分野はまだ少なく、皮膚、骨、軟骨、歯周組織、血管、末梢神経、角膜、および本稿で紹介する気管などがある (表1)。

2. 人工気管の開発と動物実験による検証

1) 気道の再建方法

気道の再建には、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建する必要がある。従来、硬性組織には各種の軟骨、骨、人工材料などが⁹⁾、内腔面組織には皮膚や粘膜などが用いられたが、二期的にしかも複数部位の手術が必要であった。気管切除後の端々吻合術は手技的に容易な手術ではなく、術後の縫合不全の可能性、術後の管理など患者への負担が大きい。人工気管には、シリコン、チタン、マーレックスメッシュなどの材料が用いられたが安定した成績を上げることができなかった¹⁰⁾。

2) 生体内で自己組織の再生を誘導する人工気管

気道としての管状の枠組みを保持するため、ポリプロピレン製メッシュを管状にし、同素材のリングで補強した。ポリプロピレン製メッシュは特定保険材料として従

表1 再生医療における臨床到達分野

皮膚
骨・軟骨
歯周組織
血管 (小血管、静脈)
角膜
末梢神経
輪状軟骨・気管

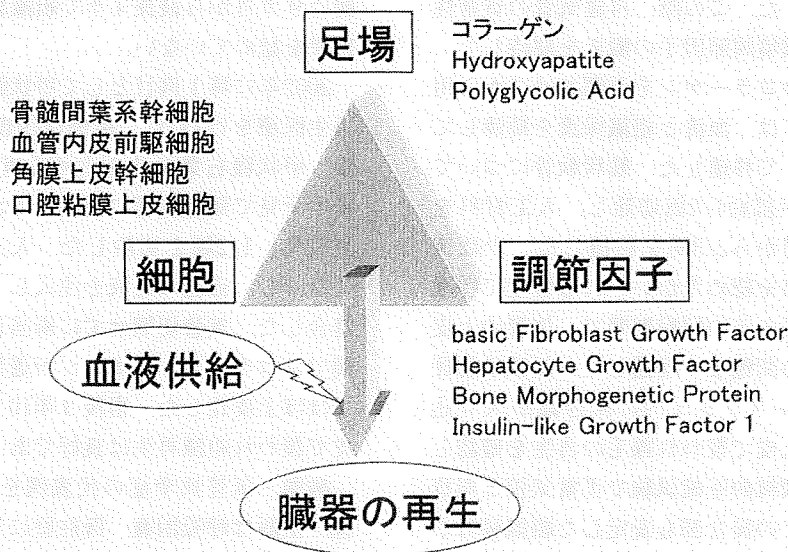


図1 臓器再生の三要素

三要素について、それぞれ臨床応用されている代表的なものを示した。

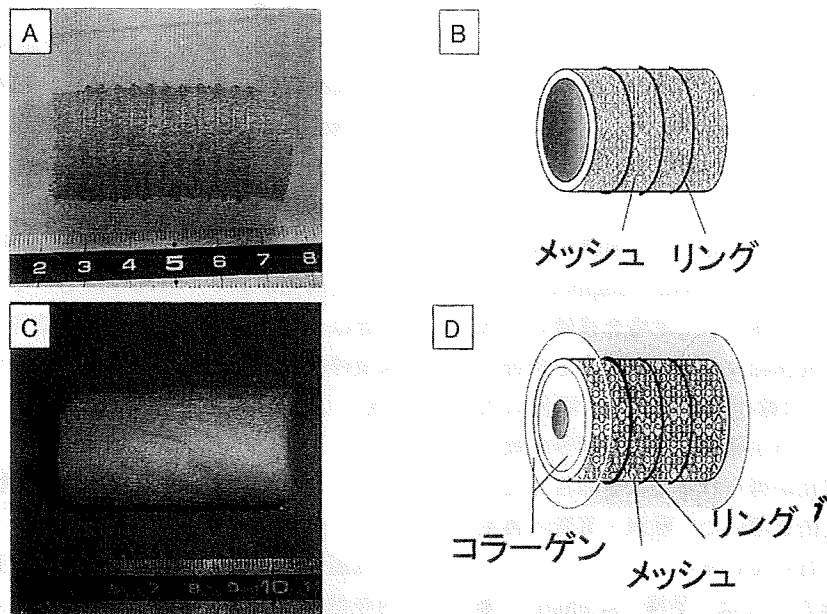


図2 生体内で自己組織の再生を誘導する人工気管の構造

- A: ポリプロピレン製のメッシュとリングによる枠組み (外観)
 B: ポリプロピレン製のメッシュとリングによる枠組み (シェーマ)
 C: 枠組みにコラーゲンスポンジを付加 (外観)
 D: 枠組みにコラーゲンスポンジを付加 (シェーマ)

来から胸壁や腹壁の補強に臨床に使われている。組織再生の足場として、ポリプロピレン管の表面にコラーゲンスポンジをグラフト化、重層コーティングして厚く付着させた。コラーゲンスポンジは医療用のブタ皮膚由来のⅠ型、Ⅲ型コラーゲンを用いた(図2)。

3) 動物実験による有効性、安全性の検証

頸部気管については、犬の頸部気管を全周性に切除した後人工材料を移植した。この際、再建気管の気密性を保つことと血液内の環境調節因子の働きを期待して、自己の血液で人工材料のコラーゲンを湿潤させてから用いた。胸部気管については、血流と組織保護を期待して大網で人工材料を被覆して移植した。輪状軟骨については、犬の輪状軟骨の前半部約1/2周切除し、人工材料を欠損範囲に応じて1/2周から2/3周を移植した。少数例で肉芽、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。最長5年の観察期間で、気管の上皮再生は良好で狭窄などの問題なく経過した。組織学的評価では、ポリプロピレンメッシュ内に結合織が入り込み、内腔面は再生した上皮で覆われ線毛の再生を確認した。再生気管の強度は機械的圧縮試験で正常気管と同程度であった。正常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^{4,6,8}。なお、動物の愛護および管理に関する法律および所属施設の動物実験委員会の指針に従って実験を行った。

3. 喉頭・気管の再生医療

動物実験にて有効性、安全性を検証した上で、施設内倫理委員会の承認を得て、ヘルシンキ宣言に則り、患者・家族には治療内容を十分に説明し同意を得て、「喉頭・気管の再生医療」のヒトへの応用を開始した。現在までに甲状腺癌気管浸潤の即時再建3例、喉頭・気管狭窄5例の合わせて8例に気道の再生医療を行い、観察期間は9カ月から最長4年で組織再生はほぼ良好な経過で狭窄を認めていない。

2002年に第1例目として甲状腺進行癌の気管浸潤例に再生医療を行った¹⁾。症例は79歳女性。主訴は前頸部腫脹。甲状腺右葉全体を占める直径約5cmの腫瘍を認め術中所見で頸部気管に浸潤しており、安全域を付けて3気管輪、1/2周を切除した。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、欠損部を被覆する形で縫合した。気管切開せずに術当日に抜管した。術後2週間ではコラーゲンスポンジが透見されたが、術後2カ月でほぼ上皮化した。術後3年10カ月では気管内腔面は上皮で覆われ組織再生は良好であった。

喉頭・気管狭窄症の代表例を示す²⁾。症例は73歳、男性。主訴は呼吸困難。既往歴に気管切開術がある。喉頭内視鏡所見では声門下に癒着性狭窄を認め、気道としては約10%のみ開存していた(図3-A、B)。気管切開術を行い、後日創部感染が無いことを確認した上で、全身

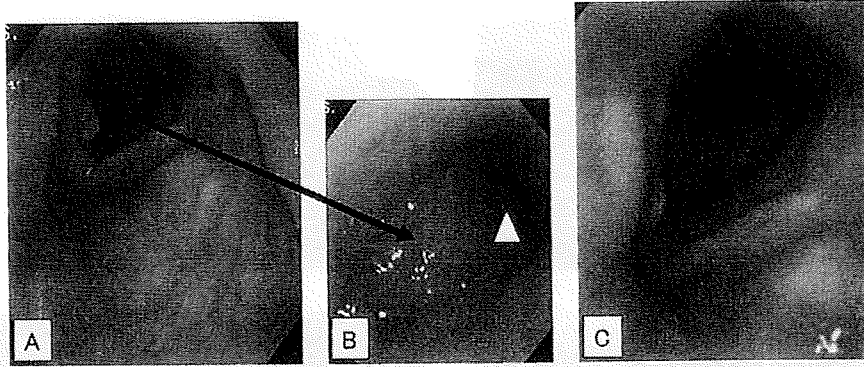


図 3 喉頭・気管狭窄例の内視鏡所見 (文献2)より改変)

A: 声門レベル (術前)

B: 声門下レベル (術前)

←→: 声門下の癒痕性狭窄

△: 気道は通常の10%程度のみ開存している

C: 声門～声門下レベル (術後)

声門下の狭窄を認めず、上皮化も良好である。

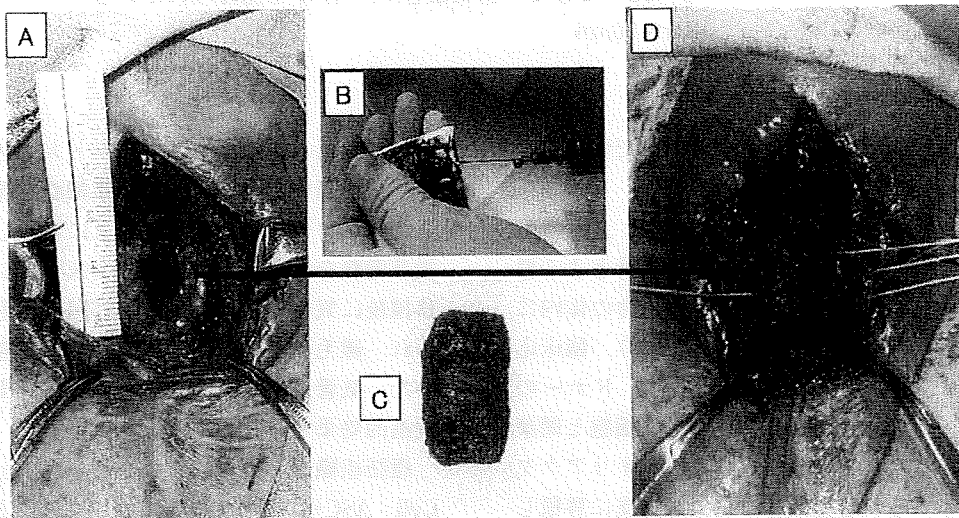


図 4 喉頭・気管狭窄例に対する気道再建 (文献2)より改変)

狭窄部の癒痕切除後の輪状軟骨および頸部気管の前壁欠損に対して (A)、人工材料に自己の血液を湿潤させて (B, C)、前方から被覆して気道を再建した (D)。

麻酔下に頸部外切開し、甲状軟骨下縁、輪状軟骨弓部、頸部気管の前壁および気道内の癒痕組織を切除した。前壁欠損に対して、人工材料を自己の血液で湿潤させて、前方から被覆する形で気道を再建した (図4)。術後2週間ではコラーゲンスポンジが透見されたが、術後2カ月で上皮化した。術後8カ月の内視鏡像では声門下狭窄を認めていない (図3-C)。

4. 喉頭・気管再生における課題と新規技術開発

われわれが開発した喉頭・気管の再生医療は、部分欠

損に対してではあるが臨床応用段階に到達しており、日本発の治療技術といえる。輪状軟骨については、弓部の再建は可能で、声門下狭窄の癒痕切除後の気道再建などに十分使用できる。頸部気管については、現時点では部分欠損の再建に用いられているが、動物実験の成果もあわせて5cm程度の全周性欠損の再建にも使用できるものと思われる。胸部気管については、動物実験からは大網を用いて血流を補うことで全周性の気管再建が可能と思われるが、いまだヒトには使用されていない。分岐部気管については、動物実験でまだ安定した成績を得てい

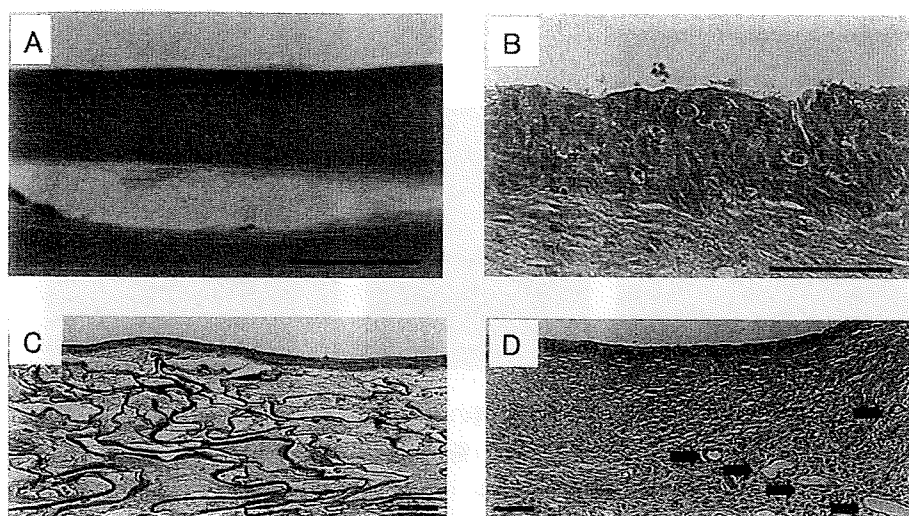


図5 人工材料移植後1週間の再生気管上皮 (文献17)より改変)

A, C: コラーゲンスポンジのみ (コントロール)

B, D: コラーゲンスポンジ+ 脂肪組織由来幹細胞

Aに比べてBで, 上皮細胞の再生が得られている。

Cに比べてDで, 新生血管(→)が多く認められている。

Bar=50 μ m

ないことから、臨床応用可能なレベルにはまだ到達していないといえる。

Vacantiらのグループは、羊の鼻中隔軟骨と上皮細胞を培養して体外で軟骨管を作製し、正常の気管とよく似た管腔組織を再生させたが¹¹、現時点では動物の体内に移植すると吸収されてしまうなどの問題があり、臨床応用されていない。2008年、Macchiariniらは、ドナーの気管を脱細胞し、そこにレシピエントの上皮細胞と間葉系幹細胞から誘導した軟骨細胞を入れてバイオリクターを用いて培養し、その培養気管を左主気管支に移植して、術後4カ月有効であったという症例を報告した¹²。この方法については長期間の観察の上で有効性、安全性の評価が待たれるところである。

披裂軟骨については、輪状披裂関節を有しており、再建は最も難しい部位である。甲状軟骨および声帯については、声帯の隆起を作るのが難しく、筋膜と足場を用いた方法などさまざまな試みが行われているが、決定打は出ていないのが現状である。声帯内に幹細胞を注入する方法として、骨髄由来間葉系幹細胞、胚性幹細胞の移植実験が行われているが^{13,14}、細胞数の問題や免疫拒絶、倫理的な問題など解決すべき問題が多く残っている。

喉頭・気管の再生医療においては、われわれの臨床例での経験から気道の内腔面上皮化に2カ月以上かかることが判明した。感染のリスクを軽減するには上皮化の加速が必要である。解決策の一つとして人工材料へ線維

芽細胞を組み込んだハイブリッド人工材料を開発した。ラットを用いた実験で、線維芽細胞を混合したコラーゲンゲルをコラーゲンスポンジ上に重層した移植片は、線維芽細胞を含まないコラーゲンスポンジの移植片より、移植後に気管の正常構造と同じ円柱線毛上皮が多数認められ、線毛や上皮細胞の形態など上皮層の分化が進んでいた。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確認した^{15,16}。

脂肪組織から得られる幹細胞 (Adipose-derived Stem Cell: ASC)は様々な組織に分化することが可能で、ASCを組み込んだハイブリッド人工材料をラット気管欠損モデルに移植すると、ASCを含まないコントロールに比べて、再生気管の上皮化を促進させるとともに上皮下組織に血管新生を誘導することがわかった (図5)¹⁷。ASCは比較的簡便に採取することができ、自家移植も可能であることから、臨床応用に近い移植細胞ソースであるといえる。また、細胞を用いず人工材料の改良による上皮化促進の方法として、vitrigel (ゲル薄膜)をコラーゲンスポンジの内腔面に付加した人工材料を開発した。従来のコラーゲンゲルと比較して約20倍の強度を持ち、さらにその表面が平滑であり、気管内腔の上皮再生促進に有効であることがわかった¹⁸。これらの新規技術を確立することで、喉頭・気管の再生医療をより安全で効果的な治療法に高めることが可能となるものと期待される。

5. ま と め

再生医学研究の進歩と臨床到達分野について解説し、生体内で自己組織の再生を誘導する *in situ* Tissue Engineering の手法による喉頭・気管の再生医療を中心に述べた。輪状軟骨弓部、頭部気管の再建に応用し良好な結果を得ており、部分欠損に対してではあるが臨床応用段階に到達しており、日本発の治療技術といえる。

しかしながら、現時点ではまだ臨床応用の端緒に着いたばかりで、上皮化を加速する効果的再生技術や声帯の隆起を安定して再生させる技術の開発が次の重要課題である。また、より広い欠損への対応、胸部気管再建への応用など課題は多い。今後は、喉頭・気管の再生医療研究が広く行われ、基礎実験の成果を臨床応用に結びつけるトランスレーショナルリサーチにより、これらの課題の解決が期待される。

参考文献

- 1) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Asato R, Yamashita M, et al: Regenerative medicine of the trachea: The first human case. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2005; 114: 429-433.
- 2) Omori K, Tada Y, Suzuki T, Nomoto Y, Matsuzuka T, et al: Clinical application of *in situ* tissue engineering using a scaffolding technique for reconstruction of the larynx and trachea. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008; 117: 673-678.
- 3) Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* 1993; 14: 260: 920-926.
- 4) Teramachi M, Kiyotani T, Takimoto Y, Nakamura T, Shimizu Y: A new porous tracheal prosthesis sealed with collagen sponge. *ASAIO J* 1995; 41: 306-310.
- 5) Yamamoto Y, Nakamura T, Shimizu Y, Takimoto Y, Matsumoto K, et al: Experimental replacement of the thoracic esophagus with a bioabsorbable collagen sponge scaffold supported by a silicone stent in dogs. *ASAIO J* 1999; 45: 311-316.
- 6) 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 Artificial Organs* 2000; 23: 718-724.
- 7) Hori Y, Nakamura T, Matsumoto K, Kurokawa Y, Satomi S, et al: Experimental study on *in situ* tissue engineering of the stomach by an acellular collagen sponge scaffold graft. *ASAIO J* 2001; 47: 206-210.
- 8) Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Kojima H, Magrufov 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.
- 9) Cotton R: Management of subglottic stenosis. DeJong, Koppersmith (eds). *Otolaryngologic Clinics of North America*; 2000; 33: pp 111-130.
- 10) Neville WE, Bolanowski JP, Kotia GG: Clinical experience with the silicone tracheal prosthesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990; 99: 604-613.
- 11) Kojima K, Bonassar LJ, Roy AK, Vacanti CA, Cortiella J: Autologous tissue-engineered trachea with sheep nasal chondrocytes. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123: 1177-1184.
- 12) Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, et al: Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 2008; Nov 18. [Epub ahead of print]
- 13) Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, Kojima H, Magrufov A, et al: Regeneration of the vocal fold using autologous mesenchymal stem cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003; 112: 915-920.
- 14) Cedervall J, Ahrlund-Richter L, Svensson B, Forsgren K, Maurer FH, et al: Injection of embryonic stem cells into scarred rabbit vocal folds enhances healing and improves viscoelasticity: short-term results. *Laryngoscope* 2007; 117: 2075-2081.
- 15) Kobayashi K, Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Miyake M, et al: Effect of fibroblasts on tracheal epithelial regeneration *in vitro*. *Tissue Eng* 2006; 12: 2619-2628.
- 16) Nomoto Y, Kobayashi K, Tada Y, Wada I, Nakamura T, et al: Effect of fibroblasts on epithelial regeneration on the surface of a bio-engineered trachea. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008; 117: 59-64.
- 17) Suzuki T, Kobayashi K, Tada Y, Suzuki Y, Wada I, et al: Regeneration of the trachea using a bioengineered scaffold with adipose-derived stem cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008; 117: 453-463.
- 18) Tada Y, Takezawa Y, Suzuki T, Nomoto Y, Kobayashi K, et al: Regeneration of tracheal epithelium utilizing a novel bi-potential collagen scaffold. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008; 117: 359-365.

本論文の一部は第109回日本耳鼻咽喉科学会シンポジウム「耳鼻咽喉科臨床の進歩—喉頭・気管の再生医療—」(平成20年5月17日)で講演した。

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金により行われた。

連絡先 〒960-1295 福島県福島市光が丘1
福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科学講座 大森孝一

ORIGINAL ARTICLE

In situ tissue engineering of canine skull with guided bone regeneration

HIROO UMEDA¹, SHIN-ICHI KANEMARU¹, MASARU YAMASHITA¹,
TSUNEHISA OHNO¹, ATSUSHI SUEHIRO¹, YOSHIHIRO TAMURA¹,
SHIGERU HIRANO¹, TATSUO NAKAMURA², KOICHI OMORI³ & JUICHI ITO¹

¹Department of Otolaryngology–Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine and, ²Department of Bioartificial Organs, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto and ³Department of Otolaryngology, Fukushima Medical University, School of Medicine, Fukushima, Japan

Abstract

Conclusion: Calcium alginate (CA) membrane prevents excessive fibrous tissue intrusion and/or dislocation of a bone scaffold. However, CA membrane did not always accelerate cranial bone regeneration. **Objective:** We previously reported skull regeneration using a bone substitute material (BSM), which consisted of collagen-coated beta-tricalcium phosphate and autologous bone fragments, and bone marrow-derived stromal cells (BSCs). However, excessive fibrous tissue intrusion or dislocation of the BSM occasionally interrupted bone regeneration. To avoid such problems, we examined CA membrane, which is useful for guided bone regeneration (GBR), to investigate whether this material maintains the bone regenerative space. **Materials and methods:** Bone defects (2 × 2 cm) were created in the skulls of 12 adult beagle dogs using the same clinical procedure. Four experimental models were tested with or without BSM plus BSCs or CA membrane. In group I, the original free bone flap was replaced at the defect. In group II, after replacing the bone flap, the defect was covered with CA membrane. In group III, BSM plus BSCs were used as a gap filler. In group IV, BSM plus BSCs and CA membrane were applied. Histological examinations were performed 3 and 6 months after the operation. **Results:** In groups I and II, bone regeneration was not observed but fibrous tissue intrusion was prevented in group II. Bone neogenesis was more observed in group III than in group IV at 3 months ($p < 0.05$). At 6 months, the regenerated areas were larger than those observed at 3 months, but the differences between groups III and IV were not statistically significant.

Keywords: Cranial bone regeneration, in situ tissue engineering, beta-tricalcium phosphate, calcium alginate membrane, guided bone regeneration

Introduction

We have previously reported attempts at cranial bone regeneration with tissue engineering techniques to resolve difficulties in conventional skull repair [1,2]. Conventional skull repairs have been performed by fixing the bone flap to surrounding bone with artificial devices such as metal plates or meshes. These repairs cause deformation of the reconstructed site after surgery and have the additional disadvantage of creating imaging artifacts in computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), and radiographs. We have previously found that when we apply bone regeneration techniques in a clinical setting, bone regeneration should be assured.

In our previous experiments, cranial bone regeneration was confirmed using a bone substitute material (BSM), which consisted of collagen-coated beta-tricalcium phosphate (β -TCP) and autologous bone fragments [1,2], and bone marrow-derived stromal cells (BSCs) [2] with in situ tissue engineering techniques [3]. However, cranial bone regeneration was not seen in every case. In these failures, dislocation of the scaffold and intrusion of fibrous tissue into the regenerative site were observed, preventing bone regeneration. Moreover, the volume of regenerated bone was <70% of that of original bone. To resolve these disadvantages, the packed BSM needs to be kept in place, especially given the incipient volume decrease.

Correspondence: Shin-ichi Kanemaru, Kyoto University-Otolaryngology and HNS, 54 Kawara-chyo Syogoin Sakyo-ku Kyoto 606-8507, Japan. E-mail: kanemaru@ent.kuhp.kyoto-u.ac.jp

(Received 1 December 2008; accepted 18 January 2009)

ISSN 0001-6489 print/ISSN 1651-2251 online © 2009 Informa UK Ltd. (Informa Healthcare, Taylor & Francis As)
DOI: 10.3109/00016480902801212

RIGHTS LINK

There is a tissue-engineered concept known as guided bone regeneration (GBR), which is popular for alveolar bone regeneration in oral surgery and dentistry [4]. The objective of GBR is to promote bone formation by offering a suitable environment for bone regeneration using a barrier membrane. A barrier membrane is designed to maintain the regenerative space [4,5] and to prevent fibrous tissue intrusion [5,6] and infection of the bone defect [7]. If the barrier membrane works properly in cranial bone regeneration, it would be possible to resolve the problems encountered in the previous study. Therefore, we applied the concept of GBR to cranial bone regeneration.

In cranial bone regeneration, the barrier membrane should be biodegradable because it is difficult to remove after surgery. Calcium alginate (CA) has been reported to be an effective material for GBR [8–10]. CA, which is abundant in brown algae, is biodegradable, safe, and cheap. It is widely used as a food additive, such as a thickening agent for soups, jellies and ice cream, and in the health-care industry for antacid preparations and burn dressings [11]. In this study, we investigated whether a CA barrier membrane could function as a barrier membrane in canine cranial bone regeneration.

Materials and methods

Bone substitute materials

β -TCP (Osferion; Olympus Co. Ltd, Tokyo, Japan) was used in this experiment (Figure 1A). This bioceramic has interconnected pores with a porosity of approximately 75%. There are two types of pores – microscopic and macroscopic. The macroscopic pore diameter is 100–400 μm (Figure 1B) and microscopic pore size is $<5 \mu\text{m}$ (Figure 1C). The composite scaffold was made of β -TCP and collagen (Figure 1D–F). Two milliliters of 1% v/w collagen hydrochloride solution and 1 g of granular β -TCP were mixed and cast into sheet shape, then the mixture was freeze-dried. To control the rate of bioabsorption, the mixture was subjected to dehydrothermal (140°C, 24 h) treatment in vacuo, which resulted in cross-linking of the collagen molecules [12]. β -TCP was coated with collagen that was extracted from porcine skin by enzymatic treatment with pepsin (Nippon Meatpackers, Ibaraki, Japan). The collagen consisted of 70–80% type I and 20–30% type III [12]. Removal of the telopeptide from the collagen eliminated its antigenicity. The dry weight ratio of β -TCP and collagen was 98:2. A mixture of bone shavings obtained by drilling burr holes in the skull and fibrin glue (Bolheal; Kaketsuken, Kumamoto, Japan) was used as bone putty. The

same amounts of autologous bone putty and composite scaffold were mixed and used as a BSM [2].

Bone marrow-derived stromal cells (BSCs): isolation and cultivation

Under general anesthesia with ketamine and xylazine, an initial 2 ml of bone marrow was aspirated from each dog's humerus. The bone marrow cells were placed in a 200 cm^3 flask with 15 ml Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and an antibiotic-antimycotic mixture (Gibco, Invitrogen Co.). The cells were cultured at 37°C (MCO-17AIC carbon dioxide incubator, Sanyo Co., Osaka, Japan) for 48 h to allow the BSCs to adhere to the bottom of the flask. The medium was subsequently changed twice a week until the cells reached confluence. Non-adherent cells were removed during the medium change procedure. When BSCs were confluent, the cells were detached enzymatically from the flask with 0.25% trypsin with ethylen diamine tetra-acetic acid (EDTA; Gibco, Invitrogen Co.), and passaged twice to further expand the BSC culture in 500 cm^3 flasks. Just before transplantation, the BSCs were again detached from the bottom of the flasks with 0.25% trypsin with EDTA. After neutralization of the trypsin solution and thorough washing of the cells with DMEM containing 10% FBS and antibiotic-antimycotic mixture, the BSCs were counted with a hemacytometer (Bright-Line; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and collected by centrifugation at 3500 rpm for 3 min (LX-120 centrifuge; Tomy Co., Tokyo, Japan), and then diluted by adding 0.2 ml PBS for the operation. The average number of BSCs used in the operation was 15 million (range 6–24 million). The number of implanted BSCs was not statistically different in groups III and IV.

Preparation of CA membrane

A 3 ml aqueous 2% sodium alginate solution (31131-85, Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) was prepared and was spread evenly onto a petri dish (10 cm diameter). A 3 ml aqueous 3% calcium chloride solution (039-00475, Wako Pure Chemical Industries Ltd, Osaka, Japan) was added to the solution of sodium alginate for 3 min. The reaction liquid was removed and the generated membrane was washed with distilled water. Both solutions for this reaction were sterilized by ultraviolet exposure for 30 min. The CA membrane was cut to size to cover the whole defect gap in one sheet. The approximate size of the membrane was 3.5 \times 3.5 cm (Figure 2A, B).