

町野隆介 論文内容の要旨

主 論 文

Replacement of Rat Tracheas by Layered, Trachea-Like, Scaffold-Free Structures of Human Cells Using a Bio-3D Printing System

バイオ 3D プリンターによるヒト細胞を用いた人工気管のラットへの移植

町野隆介, 松本桂太郎, 谷口大輔, 土谷智史, 武岡陽介, 田浦康明, 森山正章, 鎌尾智幸, 小山正三朗, 高木克典, 宮崎拓郎, 畑地 豪, 土肥良一郎, 下山孝一郎, 松尾直門, 山崎直哉, 中山功一, 永安 武

Advanced Healthcare Materials, 2018

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員: 永安 武 教授)

緒 言

これまで生体内組織再生誘導型の人工気管や、脱細胞・再細胞化による人工気管の生体移植の報告が見られるが、これらの手法で使用される細胞の足場 (scaffold) は生体にとって異物であり、感染や炎症性狭窄、scaffold の劣化のリスクが付きまとう。我々は、気管軟化症、気管切除や肺移植後の縫合不全に対する新たな治療法として、細胞凝集体 (spheroid) を用いて、複雑な立体構造を作成する技術バイオ 3D プリンター Regenova® を用いて、細胞と細胞から分泌される細胞外基質 (ECM) のみで構成した、scaffold を使用しない人工気管を作製し、ラットへの移植における生体内での機能の評価・検討を行った。

対象と方法

基礎構造体の作製

気管様三次元構造体を作製するにあたり、気管軟骨部分をヒト軟骨細胞 (NHACs)、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs)、ヒト骨髄間葉系幹細胞 (MSCs) で構成された spheroid で、軟骨間靭帯部分をヒト線維芽細胞 (NHDFs)、HUVECs、MSCs で構成された spheroid で作成することとした。様々な細胞比率で作成した spheroid を用いて NHACs、NHDFs をそれぞれ主成分とした基礎構造体 (Cartilaginous tube、Fibrous tube) を作製し、検討を行った。

気管様構造体 (Trachea like tube) の作製

至適と思われた細胞比率で 2 種類の spheroid を作製、交互に 3 次元積層し、5mm 程度の長さの生体の気管の形状を模した tube 状構造体を作製した。

気管様構造体の移植

気管様構造体をシリコンステント補助下、免疫抑制剤投与下にラット頸部気管に移植し、移植後の組織学的変化などを解析した。

力学的強度試験

Cartilaginous tube、Fibrous tube、Trachea like tube、9週齢のラット気管の破断強度を測定、またそれぞれに含まれるグリコサミノグリカン (GAG) 量を測定し、比較検討した。

組織学的検査

Cartilaginous tube、Fibrous tube、Trachea like tube、移植後グラフト（移植後7、35日）を対象とし、hematoxylin-eosin(HE)染色、Masson's trichrome 染色、Alcian blue 染色、Fast Green and Picrosirius Red 染色、免疫染色（抗 CD31 抗体、抗 collagen II 抗体、抗 collagen IV 抗体、抗 pan Cytokeratin 抗体）にて評価を行った。

結 果

力学的強度試験

Cartilaginous tube において NHACs : HUVECs : MSCs = 7 : 2 : 1 で構成された spheroid で作成した tube が、Fibrous tube でも同様に NHDFs : HUVECs : MSCs = 7 : 2 : 1 で構成された spheroid で作成した tube が最も破断強度が高かった。

この結果を元に、上記細胞構成の spheroid を交互に三次元積層し trachea like tube を作製した。その破断強度、GAG 含有量ともに単一の spheroid で構成された tube を上回ったが、9週齢のラット気管には及ばなかった。

組織学的検査

Trachea like tube では交互に2種類の spheroid を三次元積層したにも関わらず、抗 collagen II 抗体、抗 collagen IV 抗体では tube 内は一様に染色された。微小血管様管腔構造は軟骨間靭帯を模した部位にのみ認められた。

ラット移植

ステント補助下にラットは1か月以上の長期生存が可能であった。移植後期間に比例し、軟骨組織が増加、微小血管様管腔構造の増大が見られた。移植後35日目には、気管上皮の移植グラフト内腔への進展が確認された。

考 察

バイオ 3D プリンターを用いて、ヒト細胞のみを材料として作製された構造体の基礎データを解析し、人工気管の作製に成功した。さらには、ラットへの移植を行い、移植グラフトとして機能し、長期間生着することが確認された。scaffold を用いない人工臓器は強度に問題があることが指摘されているが、我々が作製した人工気管は、ステント補助下での気管移植が可能であった。これには ECM の産生による強度増加や血管内皮細胞によって形成された新生血管による周囲組織への生着、血流形成の促進が関与していると考えられた。本研究により、ヒト細胞のみからなる人工気管作製の可能性が示唆され、臨床応用へとつながることが期待される。