

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10119

研究課題名(和文) 臨床応用に十分な長さで蠕動運動機能を持つ全周性食道の再生：犬を用いた研究

研究課題名(英文) Regeneration of circumferential esophagus with peristalsis and enough length for clinical use, in canine experiments

研究代表者

萩原 明郎 (HAGIWARA, Akeo)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：90198648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：消化管上皮性組織である消化管粘膜は粘膜の移植再生は非常に困難である。本研究では、一つの変法として、消化器上皮性組織である肝細胞を用いた再生を行った。すなわち肝臓細胞を播種した再生足場を大網で裏打してロール状チューブを作成し、これを腹腔内共培養し、大網から隣接再生足場へ早期に血管新生させて上皮層を再生維持し、肝細胞を消化管に見立てた全周の層に断続的に再生させることに成功した。この場合、大網からの血管の浸潤・新生が非常に良好であることも、病理組織学的検討により確認された。

研究成果の概要(英文)：Transplantation of mucosal epithelial tissues of the digestive canal is difficult. In the present research hepatic cells were used instead of the epithelial cells of the mucosal cells. The scaffolds where liver cells were disseminated were rolled with the greater omentum into a shape of tube, and then the tube was incubated in the peritoneal cavity of the animal. Microscopically it was confirmed that the blood vessels infiltrated into the scaffolds from the omentum and the liver cells grew successfully in the layers of the scaffolds.

研究分野：消化器外科学、再生医学

キーワード：消化管再生 動物実験 再生医学

1. 研究開始当初の背景

従来、全周性で蠕動運動を持つ様な消化管再生が不可能であった理由は、(ア)消化管再生足場に口腔粘膜等の上皮細胞を播種しても、4cm以上の長さの足場の中央部では**血流が不足**し、播種細胞が徐々に萎縮・消失、粘膜上皮は**長期的な再生・定着をしない**。(イ)体組織の再生修復(=創傷治癒)が必ず炎症反応・癒痕化(線維化)を残し治癒するのと同様、再生消化管壁も徐々に**線維化・癒痕化**する。これら(ア)(イ)が原因で、4cm以上の再生消化管は、徐々に壁内の癒痕(線維)化・硬化が進行し、長くとも1年以内に消化管機能を喪失する。

実際、1年以上の長期間、粘膜上皮を維持し蠕動運動する4cm以上の長さの消化管の再生は、国内外の何れでも成功報告がない。嚢状腸管、消化管壁の一部(全周性でない)、全周性でも4cm以下の短い消化管再生や、イヌ腸管再生の報告も、後の追試研究で1年以内には壁の癒痕化(線維化)と粘膜消失とを起こすことが判るなど、4cm以上で1年以上の長期成功はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、臨床応用可能な十分な長さ(20cm以上)を持ち、蠕動運動を行う全層・全周性の消化管、特に食道をイヌで再生することである。臨床応用の可能な再生消化管には、(1)十分な長さ、(2)蠕動運動が、最低限必要で、この様な消化管の再生は従来不可能であった。その理由は、(1)血流不足と(2)線維(癒痕)化、の克服の困難性に要約される。応募者らは、H20年度までの科学研究費助成研究で上記(2)をほぼ解決し、線維化・癒痕化しない食道の再生を行った。次にH21-23と24-26年度科学研究費助成研究で(1)の一部を解決する血流豊富な消化管壁を持つ消化管を再生した。本研究ではこれを更に発展させ、未だ成功報告のない臨床応用可能な(つまり十分な長さ蠕動運動を持つ)全周性食道を、大動物で再生する。

3. 研究の方法

応募者の研究方法に関し、これまでの研究による方法を、次の(1)と(2)で、またそれらの方法による本研究の実施方法を(3)において述べる。

(1) **「癒痕化」の解決方法** 癒痕化の解決につき、応募者の着想と方法を述べる。一旦子宮外へ生れ出た個体の創傷は、たとえ1次癒合創でも、創傷の治癒=修復再生の過程である炎症反応を経て、何らかの癒痕を形成して治癒する。一方、子宮内で羊膜に包まれた胎児の皮膚や皮下組織は、癒痕を全く形成せず完全な再生修復により治癒する例が、胎児手術等でも報告されている。これをヒントに、「羊膜を再生足場に用いれば、あたかも胎児皮膚の再生と同様に癒痕形成の無い再生が起こるのではないか?」との着想を得た。これに基づき、**羊膜シート**を再生足場に用い、癒痕を生じない消化管の再生・修復に成功した(以下の研究a・研究b)。

(研究a) 羊膜シートによる癒痕・癒着を生じない小腸の腸管壁再生

腸管壁の損傷は、再生修復の過程である炎症反応の後、線維化・癒痕化や腸管癒着を残して治癒する。この対策として、羊膜を再生足場に用いて腸管壁の損傷の修復実験を行い、癒着・癒痕を全く伴わない治癒再生が可能となった。つまり「羊膜を腸管壁の再生足場に用い、癒痕形成の無い再生・修復ができる」という研究であり、特許を取得している(過去の研究業績)。

(研究b) 羊膜シートを用いた食道の再生

H19-20年度科学研究費助成研究「羊膜を用いた非癒着性で蠕動運動を持つ食道の再生」で、再生足場の羊膜シートにイヌ自己口腔粘膜細胞を播種し体内に埋植し、1年以上の長期間、癒痕形成・硬化をせず、その結果、蠕動運動と食物運搬能を保持する食道の再生に成功した。本研究は全周性消化管再生の唯一の成功報告であるが、その長さは4cm以下に限られている。

(2) **「播種粘膜細胞の萎縮・消失と血流不足」の解決方法** 播種した粘膜上皮細胞の萎縮・消失と血流不足も、応募者らはこれまでの研究での解決の見通しを得た。即ち、(i)上皮細胞と脂肪由来幹細胞(ADSC)や線維芽細胞(FB)との**腹腔内共培養(腹腔内インキュベート)**、と()大網と羊膜シートの**四重ロール状重ね巻きチューブ**による再生

足場への豊富な血流供給である（以下の研究 c・研究 d）。

研究 c） 粘膜層の委縮防止・保持には ADSC や FB との **腹腔内共培養**が重要

不死化消化管粘膜細胞を消化管由来 FB と In Vitro 三次元共培養すると、各種腸粘膜細胞へ分化して粘膜層様立体構造を構成し、長期間粘膜状態で維持できる。ADSC が再生足場の PGA 不織布上で増殖し、各種細胞へも分化する。消化管由来平滑筋細胞を PGA 不織布に播種し遊離小腸壁上で腹腔内培養すれば、粘膜上皮層や消化管支配神経等が再生される。つまり再生足場に ADSC、消化管由来平滑筋細胞や FB を播種して **腹腔内共培養**すれば腸粘膜上皮層の再生・維持が可能となる。

（研究 d） 早期の血管再生のための **PGA ロール状四重巻きチューブ**の有用性

第二の重要課題は、再生足場への豊富な血流供給である。血管分布層から 400 μ 以内では、播種平滑筋細胞の筋層形成と正常腸管粘膜の再生維持を認め、PGA 不織布が血管新生促進することに着目し、ADSC 播種 PGA 不織布をラット大綱で裏打ちし、これでロール状四重巻きチューブを作成して腹腔内培養した結果、重層する大綱血管分布層から隣接 PGA 層へ早期に血管新生し、血管豊富な増殖層が形成される。

(3) 以上の研究の方法の発展による本研究の実施方法

上述のこれまでの研究成果とそれによる研究方法の確立を基に、大動物を用いて、(1)の再生消化管の線維化癒痕化に対しては、肝細胞、ADSC、FB と口腔粘膜細胞を播種した **羊膜** + PGA 不織布の再生足場を用い、(2)の血流不足と粘膜層委縮・消失に対しては、再生足場を大綱で裏打ちして **ロール状四重巻きチューブ**を作成した。これを **腹腔内共培養**し、四重の血管分布層(大綱)から隣接再生足場へ早期に血管新生させて、癒痕化せず粘膜層を再生維持するべくおこない、全周性消化管の再生を試みた。

またそのための血管再生を、腹部大動脈と頸動脈を利用して行った。すなわちエレクトロスピン法で作成した細い繊維径と微細な繊維間隔の構造を持つ内筒、大きな繊維径の構造を持つ外筒、両者の中間の構造を持つ

つ中間層の三層からなるチューブ状の血管再生足場（血管再生デバイス）を作成した。この血管再生足場は、事故細胞が浸潤する再生の足場として作用し、自己血管に移植すると徐々に自己血管の類似構造を持つ組織へと変化し、最終的には自己血管と同様の機能を果たすように設計されている。実験では、この血管再生デバイスを腹部大動脈、頸動脈などへ移植し、自己血管と同様の機能を果たすか否かを、2年以上の長期にわたって検討した。

4. 研究成果

消化管上皮性組織である消化管粘膜の再生は非常に困難であった。本研究では、一つの変法として、消化器の上皮性組織である肝細胞を用いた再生を行った。すなわち肝臓細胞を播種した再生足場を大綱で裏打ちして **ロール状四重巻きチューブ**を作成し、これを **腹腔内共培養**し、四重の血管分布層(大綱)から隣接再生足場へ早期に血管新生させて、癒痕化せず粘膜層を再生維持するべくおこない、肝細胞を消化管に見立てた全周の層に断続的に再生させることに成功した。この場合、大綱からの血管の浸潤・新生が非常に良好であることも、病理組織学的検討により確認された。

栄養血管の再生は、1年以内の短期的成果としては、ほぼ100%再生させることが出来た。特に、これまでは困難であった大動物（イヌ）でもこれが可能となった。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Torii T, Kanemitsu K, Hagiwara A
Sialic level is significantly elevated
in IgM enriched protein fraction in
sera of cancer patients, J Immunoassay
Immunochem. 査読有 38(2), 127-139,
2017 doi:10.1080/15321819. 2016.
1224973

Torii H, Hagiwara A and 6 others
Anti-adhesive effects of a newly

developed two-layered gelatin sheet in dogs Obstetrics and Gynecology Research 査読有 43 (8) 1317-1325, 2017

Miyamoto H, Hagiwara A, and 6 others, The influences of a novel anti-adhesion device, thermally cross-linked gelatin film on peritoneal dissemination of tumor cells J Biomedical Materials Research B 査読有 1-9, 2017

Doi:10.1002/jbm.b.34017

Horii T, Hagiwara A and 9 others Physical and biological properties of a novel anti-adhesion material made of thermally cross-linked gelatin film: Investigation of the usefulness as anti-adhesion material J Biomedical Materials Research B 査読有 689-696, 106(2), 2018/05/25

Doi:10.1002/jbm.b.33880

Takagi T, Hagiwara A and three others New polyglycolic acid fabric for the prevention of postoperative pancreatic fistulas Asian J Surgery 査読有 41-59-64, 2018

〔学会発表〕(計 2 件)

Hiroyuki Tsujimoto, Tsunehisa Horii, Hiroe Miyamoto, Hiroko Torii, Yuki Ozamoto, Toshitaka Takagi, Hideki Takamori, Shuko Suzuki, Shinichiro Morita, Yoshito Ikada, Akeo Hagiwara Novel anti-adhesion devices using scaffold material for regenerative medicine: Development of thermally cross-linked gelatin film and its application. 40th World Congress of the International College of Surgeons 2016

Hiroe Miyamoto, Hiroyuki Tsujimoto, Koki Yamanaka, Han Pei, Tsunehito Horii, Hiroko Torii, Yuki Ozamoto, Toshitaka Takagi, Akeo Hagiwara The influences of thermally cross-linked gelatin film for intraperitoneal dissemination of tumor cells. 40th World Congress of the International College of Surgeons 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等:なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

萩原 明郎 (HAGIWARA, Akeo)

同志社大学・医生命システム研究科・教授

研究者番号: 9 0 1 9 8 6 4 8

(2)研究協力者

鳥井 裕子 (TORII, Hiroko)

(3)研究協力者

小座本 雄軌 (OZAMOTO, Yuki)

(4)研究協力者

辻本 洋行 (TSUJIMOTO, Hiroyuki)