

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12658

研究課題名（和文）ホスト血管への早期結合を可能とする積層化腹膜シートの構築・選定と癒着防止への応用

研究課題名（英文）Construction and selection of stacked peritoneal cell sheet for early binding to host blood vessels and its application to prevent adhesion.

研究代表者

崎山 亮一（Sakiyama, Ryoichi）

大阪工業大学・工学部・准教授

研究者番号：30408471

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、24時間以内にホスト血管と結合できる癒着防止膜を開発し、癒着防止を立証することを目的としている。血管網付3次元腹膜組織（3層疑似腹膜組織）は、温度感受性培養皿を用いてヒト中皮細胞株、ヒト線維芽細胞株、ヒト血管内皮細胞（HUVEC）の細胞シートを積層化することで作成し、膜間抵抗、溶質透過試験、遺伝子発現で選定できた。ヌードマウスの癒着モデルを開発し、3層疑似腹膜組織を移植した結果、移植10分で生着した。7日目後には60%の生存率であり、3例中1例で癒着スコア5（重度）からスコア3（軽度）の改善が見られた。本研究により、腹膜に近い組織は癒着防止効果があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、積層化細胞シート技術を用いた独創的研究であり、癒着防止効果が33%であった。これは従来の人工的な癒着防止膜と同程度の成果であったが、今後、癒着防止効果を高めることで医療費の削減と患者のQOL向上の効果が期待できる。血管網を有する積層化技術は、「作製組織の不安定化」と「積層化の厚みと移植後の虚血による酸素・栄養供給不足とそれによる組織の機能低下」の問題を回避する独創的研究であり、その選定方法は治療効果に直結しており、次世代の再生医療移植デバイス構築の研究分野を創造できる。本研究課題の成果は開腹手術に直結したものであり、外科的手術の現場で極めて高い波及効果と社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：The objective of this research project is to develop an anti-adhesion membrane that can bind to host blood vessels within 24 hours and to prove the prevention of adhesion. Three-dimensional peritoneal tissue with vascular network (three-layer pseudo-peritoneal tissue) was created by layering cell sheets of human mesothelial cell line, human fibroblast line, and human vascular endothelial cell (HUVEC) using temperature sensitive culture dishes, and could be selected by intermembrane resistance, solute permeability test and gene expression. A nude mouse model of adhesion was developed, and after transplantation of the three-layer pseudo-peritoneal tissue, the tissue was bound within 10 minutes of transplantation; after 7 days, 60% survival was achieved, and one of three cases showed improvement from adhesion score 5 (severe) to score 3 (mild). This study suggests that tissue close to the peritoneum is effective in preventing adhesions.

研究分野：化学工学、組織工学、再生医療

キーワード：癒着防止 積層化細胞シート 血管網誘導組織 疑似腹膜 腹膜透析液評価

1. 研究開始当初の背景

開腹手術後の90%で癒着が生じ、そのケアに米国では年間13億ドル以上が費やされている。癒着の手術は患者の精神的・肉体的苦痛のみならず、医療経済への圧迫を引き起こしている。本邦ではすでにセプラフィルム®が癒着防止材として使用されており、対称群で癒着患者割合が94%であったのに対し、セプラフィルム®群で51%まで減少した。しかしながらセプラフィルム®は柔軟性に乏しいこと、また癒着防止が完全ではないことが問題である。応募者は、癒着の生理学に基づく再生医学を实践し、2種の細胞から成る腹膜組織を構築した結果、70%の癒着防止効果が得られた。

2. 研究の目的

本研究課題では、*in vitro*で癒着防止に重要な中皮層(中皮細胞)、その足場として間質層(線維芽細胞)、物質交換と移植部位の血管との結合に重要な血管内皮層(血管内皮細胞)の3層を別々に形成する技術として、温度を下げるだけで細胞間接着を壊すことなく回収できる細胞シート工学を用い、別々に作製した細胞シートをゼラチンゲルを用いて生体に模倣して重ねる積層化技術(3次元組織化)で取り組む。本研究では、(1)血管網付3次元腹膜組織の*in vitro* simulatorにより高機能発現の組織を作製・選定する。作製した疑似腹膜組織を用い、腹膜透析液(PD液)の生体適合性を調べるために、疑似腹膜への影響を評価する。(2)移植後24時間以内に宿主血管と結合できることを証明する。次に、その成果に基づき、癒着モデルを用いて90%以上の癒着防止効果を実証し、『生体の癒着解除に適した癒着防止膜』の技術基盤を創出する。

3. 研究の方法

(1) 疑似腹膜組織の作製と選定

ヒト中皮細胞株(Met5A、ATCC)、ヒト線維芽細胞(NHDF、Lonza)をそれぞれUpCell(1.9cm²、Cellseed)に、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC、Lonza)はTranswell(1.12cm²、COSTAR)に播種し、インキュベータ内でそれぞれの培地で72時間培養した。72時間後、*in situ*ゲル化法を用いて2層、あるいは3層にTranswell内で積層し2層、あるいは3層疑似腹膜モデルとした。24時間混合培地で培養後、膜間電気抵抗(TER)測定を行った。その後、basal側に混合培地+0.5%FBSを1.5ml添加し、apical側にPD液+0.5%FBSを0.5ml暴露した。24時間後、再度TER測定を行った後にapical側に4、10、70kDaのFITCデキストラン含有混合培地+0.1%FBSを0.5ml、basal側に混合培地1.5ml添加し(Fig1)、1、2、3、4時間後にapical、basal側の吸光度を蛍光マイクロリーダで測定した。濃度差の時間経過により溶質透過係数Kを算出して評価した。その後、RNAを採取し、細胞密着関連結合遺伝子と障害に関する遺伝子の発現量をRT-qPCRを用いて測定した。加えて、マウス腹膜を採取し、溶質透過試験でKを算出して、3層疑似腹膜モデルと比較した。

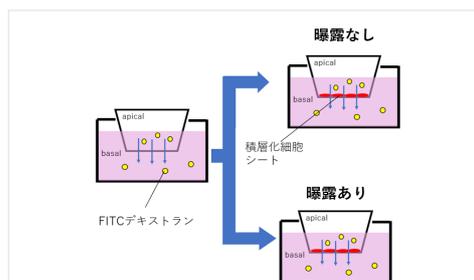


Fig.1 疑似腹膜組織の選定

Transwell上で積層化した疑似腹膜組織を作製し、TER測定で細胞間接着、細胞シートの上下の接着を評価した。溶質透過試験でも組織の接着を評価した。

(2) 癒着モデルの作成と疑似腹膜移植による癒着防止

8週齢ヌードマウスを経口麻酔にかけ、マウスの腹部を正中切開後、腸管を露出させ電気メスで焼灼した。次に腹膜を擦過して障害を与えた。その後3層疑似腹膜組織を腸管の障害部位に移植した(n=5)。移植後10分後に腸管を腹部に戻し腹部を縫合し閉じた。移植後7日目にTable.1に示す癒着レベルスコア0(無)から5(重度)で癒着の度合いを評価した。

表1. 癒着レベルのスコア化

スコア	癒着の度合い
0	癒着なし
1	薄い膜状の癒着が1個
2	薄い癒着が1個以上
3	局所の厚い癒着
4	底に付着した厚い癒着、または局所の厚い癒着が1個以上
5	非常に厚い血管性癒着または底の癒着が1個以上

4. 研究成果

(1) TERによる2層、あるいは3層疑似腹膜モデルの選定

疑似腹膜モデルの細胞間接着を評価するため、TERを測定した。その結果、2層疑似腹膜組織は単層に比べて、TERが増加した。この2層疑似腹膜組織にPD液を暴露すると、24時間後、暴露無ではTERがさらに増加したのに対して、PD液暴露では、TERは83.7%低下し、単層よりも低い値を示した。これは、TERの増加は、細胞間接着の増加と、細胞シートの上下の立体的な接着

を示し、逆に、TERの減少は、細胞間と細胞シートの接着の崩壊を示すと考えられる。このことから、PD液暴露により細胞間と細胞シートの接着の崩壊が示された。また、3層疑似腹膜組織でも単層に比べて、TERが増加し、PD液暴露では、TERが0.006%低下した。TERの低下率は2層疑似腹膜組織(83.7%)に比べて3層(0.006%)では、顕著に低かった。このことから、3層に積層化することで、細胞シートの上下の接着がさらに強まること。細胞が厚みを増すことからTERが増加し、PD暴露に対しても細胞間と細胞シートの接着の崩壊が軽減されたと考えられる。以上より、TERは積層化細胞シートの組織評価として有効であることが示された。このことから、TERにより作製した組織の選定を簡易的に行うことができる。

(2) 溶質透過試験による疑似腹膜モデルの選定

PD液の生体適合性を評価するための2層疑似腹膜組織と3層疑似腹膜組織のKを比較した。4kDaでコントロールの2層疑似腹膜モデルと3層疑似腹膜モデルを比べると3層の溶質透過係数が0.3倍ほど低かった。10kDa、70kDaでもコントロール3層の溶質透過係数が2層よりも低かった。これは3層の方が2層よりも積層化するHUVECシートが1枚多く、組織として厚さが増加したためであると考えた。これは、先のTERから抵抗値が増加することで、Kが低下するとの機序に一致した。また、マウス腹膜のKと3層のKは同程度であった。これは3層にすることでより構造が生体に近づき、腹膜内の溶質透過に対する抵抗が類似しているためと考えた。一方、PD液を添加した場合、4kDaでは、2層と3層ともにcontrolに比べて、イコデキストリン含有PD液、グルコース含有PD液の順でKが増加した。10kDa、70kDaでも同様にPD液でKは増加した。これは、透析液が細胞に障害を与えることにより細胞間の接着が崩されたため透過が大きくなったと考えた。さらに、イコデキストリン含有PD液を暴露したKとグルコースPD液を暴露したKを比べると、グルコースのKが高くなっていた。これは、グルコース分解産物の濃度増加とともに腹膜機能が低下するという報告と一致している。また、イコデキストリン含有のPD液による障害は、イコデキストリン自体の障害よりも緩衝剤として含まれている乳酸による障害が考えられる。このことから、溶質透過試験によっても作製した組織の選定を行うことはできるが、簡易的でないため組織作製技術の評価として使用する。

(3) 遺伝子解析による疑似腹膜組織の選定

3層疑似腹膜組織の遺伝子発現量を比較した結果、PD液無しコントロールでは細胞間接着に関する遺伝子TJP-1とOccludinと障害に関する遺伝子VEGFとTGF- β はともに発現していた。細胞間のタイトジャンクション(密着結合)に関与するTJP-1とOccludinから、3層疑似腹膜組織で密着結合が確認された。また、TGF- β は、腹膜障害により線維芽細胞より分泌され、線維芽細胞が筋芽細胞に変化し、腹膜の肥厚を生じさせる。また、VEGFは血管新生を行い、腹膜を再生へと導くが、障害が続くと血管新生も継続され、組織内に多数の血管が構成されることで溶質透過亢進をもたらす。これらは、障害が生じると増加するが、今回腹膜組織として発現することがわかった。一方、TJP-1とOccludinは、イコデキストリン含有PD液、グルコース含有PD液の順で低下した。このことから、細胞間接着タンパクの発現がPD液により減少することが示唆された。他方、VEGFとTGF- β は、イコデキストリン含有PD液、グルコース含有PD液の順で増加した。このように、作製した3層疑似腹膜組織は、腹膜組織が障害を受けた場合と同様にVEGFとTGF- β の増加を示し、作製した組織が生体に近いことが示唆された。このVEGFの増加は、血管構造の増加を生じることで、溶質透過実験のKの増加に関与しているかもしれない。イコデキストリン含有PD液とグルコース含有PD液を比較するとグルコース含有PD液暴露で細胞間接着関連結合遺伝子の発現が低下し、障害に関する遺伝子の発現量が増加した。これは溶質透過試験の結果とも理論的に一致した。また、イコデキストリン含有PD液に比べてグルコース含有PD液で腹膜への障害が強いことが示唆された。

(4) 術後、腸管と腹膜に強度の癒着(スコア5)が見られ、免疫不全マウスであるヌードマウスの癒着モデルを開発した。癒着モデルへの血管網付3次元腹膜組織を移植した結果、移植10分で腸管の障害部上に生着した。移植したマウスは術後5日以内に5例中2例が死亡し、60%の生存率であった。開腹した結果、死亡したマウス全てで腸管に穿孔が見られた。このことから腸管への焼灼が強いことが考えられた。また、生存した3例中2例でスコア5(Fig.2)、1例でスコア3のわずかな改善が見られた。ヌードマウスの癒着モデルが重度であったことと、移植場所が腸管上であることが、今回改善効果が得られにくかった原因と考える。3層疑似腹膜組織により、わずかな癒着防止効果が示唆された。



Fig.2 ヌードマウスの癒着モデル
腸管と腹膜が癒着し、癒着スコア5が観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 崎山亮一
2. 発表標題 細胞シート工学を用いた腹膜傷害の改善
3. 学会等名 第28回日本腹膜透析医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 崎山亮一
2. 発表標題 細胞シート工学を用いた腹膜傷害治癒組織の開発
3. 学会等名 第60回日本人工臓器学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 崎山亮一、河上遥奈
2. 発表標題 細胞シート工学による治療への展開
3. 学会等名 化学工学会第53回秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 崎山亮一、河上遥奈
2. 発表標題 3層腹膜モデルを用いた腹膜透析液の評価
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 崎山亮一
2. 発表標題 腎不全領域での細胞シート工学の展開
3. 学会等名 第 2回細胞シート工学イノベーションフォーラム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 崎山亮一
2. 発表標題 腹膜傷害改善への細胞シート工学からのアプローチ
3. 学会等名 化学工学会第52回秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河上遥奈、崎山亮一
2. 発表標題 In vitro腹膜モデルの作製と腹膜透析液による傷害評価および構造観察の試み
3. 学会等名 化学工学会第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河上遥奈、崎山亮一
2. 発表標題 腹膜モデルの作製と腹膜透析液による傷害評価の試み
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河上遥奈、崎山亮一
2. 発表標題 In vitro腹膜モデルを用いた傷害評価および 構造観察の試み
3. 学会等名 第60回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河上遥奈、崎山亮一
2. 発表標題 細胞工学を用いたIn vitro腹膜モデルによる腹膜透析液評価
3. 学会等名 第28回日本腹膜透析医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高津大成、河上遥奈、崎山亮一
2. 発表標題 In vitro腹膜組織を用いた腹膜透析液評価の基礎検討
3. 学会等名 第61回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 崎山亮一、河上遥奈
2. 発表標題 細胞シート積層化技術を用いた腹膜組織の作製と医療分野への応用
3. 学会等名 化学工学会第54回秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryoichi Sakiyama, Haruna Kawakami
2. 発表標題 Evaluation of Neutral Peritoneal Dialysate Using An In Vitro Cell Sheets Peritoneal Model
3. 学会等名 The 44th Annual Dialysis Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 崎山亮一、河上遥奈
2. 発表標題 細胞シート工学を用いた腹膜組織の構築と腹膜透析液評価
3. 学会等名 日本医工学治療学会第39回学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 崎山亮一、河上遥奈
2. 発表標題 In vitro腹膜モデルを用いた中性腹膜透析液評価
3. 学会等名 第29回日本腹膜透析医学会 学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 分担執筆 崎山 亮一 (第7章第2節)	4. 発行年 2024年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 482
3. 書名 生体吸収性外科材料の 使い方と新しい材料の有用性	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------