

平成 26 年 8 月 19 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659824

研究課題名(和文) 食道閉鎖症モデルの作成および再生医療を応用した食道再建術の開発

研究課題名(英文) Development of animal model with esophageal atresia

研究代表者

小野 滋 (ONO, Shigeru)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00315962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：難治性新生児疾患である先天性食道閉鎖症Gross A型の新たな治療法を開発を目的として、ウサギを用いたレチノイン酸過剰投与による食道閉鎖症の中動物モデルの作成を試みた。異なる妊娠日数、薬剤投与量で、オールトランスレチノイン酸40, 80, 120mg/kg、13-シスレチノイン酸20mg/kgを単回投与した。オールトランスレチノイン酸120mg/kgを投与した母獣に2匹の胎仔溶解を認めたが、他の胎仔には外表奇形や食道閉鎖症を認めなかった。レチノイン酸は、少量の薬剤を連日投与する事で奇形発生が報告されているが、今回の研究からは単回投与では明らかな奇形を得られなかった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is the development of animal model with esophageal atresia to develop a new treatment procedure including surgical technique. We tried to develop rabbit model with esophageal atresia using oral administration of Retinoic acid. Variety of doses of all-trans Retinoic acid were administrated, however no anomaly including esophageal atresia were observed excepting some melting fetus.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：先天性食道閉鎖症 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

先天性食道閉鎖症 Gross A 型は上下の食道盲端の距離が長いため、術後合併症に直面することが多く治療困難であり、新しい治療法の開発のために動物モデルの作成が必要である。新生児と同様の大きさである中動物のウサギを用いた食道閉鎖症モデルを作成することは、新しい手術手技の開発を含めた新たな治療戦略の開発に不可欠であると考えられる。一方、レチノイン酸 (RA) を用いた直腸肛門奇形モデルマウスにおいて、椎体異常や心奇形など他の臓器の合併奇形が認められ、また RA の投与日を早めることで、食道閉鎖症マウスを作成することができると考えた。そこで、難治性新生児疾患である long gap の先天性食道閉鎖症に対する新しい治療法の開発を目的として、臨床応用可能な食道閉鎖症の動物モデルを作成するにあたり、マウスやラットでは手術手技の面から新しい治療法の開発には適応できず、中動物であるウサギを選択することとした。

一方、再生治療に関して幹細胞の臨床での利用価値については、十分に認められているものの、実際組織幹細胞を治療に用いることは一部の幹細胞を除いてまだまだ難しい部分が多い。特に消化管に対する再生医療に関しては、他の臓器に比し遅れていると言わざるを得ない。これは腸管が発生学的に内胚葉、中胚葉、外胚葉由来の細胞群が複雑に絡み合った器官であり、さらには消化・吸収、局所免疫調節、粘膜バリアによる生体防御、腸管運動調節など非常に多彩な機能を有していることに起因している。

また人工構成物質を用いた再生研究は様々な領域でなされているが、自家羊膜を用いた再生の研究は未だ十分にはなされていない。羊膜は上皮細胞層、基底膜層、緻密層の三層からなり、上皮層は上皮由来の幹細胞、緻密層は間葉組織由来の肝細胞の源となる。そこで今回我々は、通常は廃棄されている生体由来材料としての羊膜が、コラーゲンからなる厚い基底膜を持っているが、血管成分を含まず移植に用いても拒絶反応がおこりにくいことに着目し、ウサギの羊膜上で上皮・間葉組織由来の幹細胞ならびに繊維芽細胞を培養して食道を再生し、それを本症モデルウサギに移植し、本症の治療法としての確立を図る。

2. 研究の目的

難治性新生児疾患である Gross A 型食道閉鎖症に対する新たな治療法の開発のため、ウサギを用いたレチノイン酸過剰投与による食道閉鎖症の動物モデルを確立する。

疾患モデルを開発することができれば、手術手技の改良や薬物投与による発生予防などに応用できる可能性が見込まれ、難治性疾患の予後改善に大きく寄与できる可能性がある。

さらに再生治療法の開発として、組織幹細胞源としてウサギの羊膜を足場として用いて食道を再生し、食道閉鎖症の内でも特に上部食道と下部食道が盲端となっている Gross A 型食道閉鎖症に対する再生治療法の確立を目指す。

従来申請者らは直腸肛門奇形の発生メカニズムを解明するため、催奇形物質としてレチノイン酸 (RA) を用いて 95% 以上の高率で直腸肛門奇形モデルマウスを作成し、また、RA の投与日を変えると椎体異常や心奇形など他の臓器の奇形が生じたことを明らかにしてきた。(Kubota Y, Shimotake T, Iwai N et al. Development of anorectal malformations using etretinate. *Journal of Pediatric Surgery* 33(1):127-129, 1998)。またハムスターを用いた実験でも RA の投与日を変えることで様々な奇形が生じることが発表された。(Ray E. Shenefelt. Morphogenesis of malformations in Hamsters caused by retinoic acids: Relation to dose and stage at treatment. *Teratology* 5:103-118, 1972) 一方、アドリアマイシンを用いた本症発症モデルラットやマウスの作成は行われてきた (Michael J. Dawant, Shay Giles, John Bannigan et al. Abnormal separation of the respiratory primordium in the adriamycin mouse model of tracheoesophageal malformations. *Journal of Pediatric Surgery* 42(2):375-380, 2007) が、RA を用いた本症モデルの確立はなされていない。さらに白血病の治療薬としての観点から、ATRA の催奇形性に関してウサギを用いた動物実験では ARM の発症が報告されている。これらの経緯を踏まえ、今回ウサギを用いて催奇形性物質である RA の至適投与量並びに投与日を検討し、食道閉鎖症モデルウサギの作成を確立することとした。

一方、再生治療に関して幹細胞の臨床での利用価値については、十分に認められている

ものの、実際組織幹細胞を治療に用いることは一部の幹細胞を除いてまだまだ難しい部分が多い。特に消化管に対する再生医療に関しては、他の臓器に比し遅れていると言わざるを得ない。これは腸管が発生学的に内胚葉、中胚葉、外胚葉由来の細胞群が複雑に絡み合った器官であり、さらには消化・吸収、局所免疫調節、粘膜バリアによる生体防御、腸管運動調節など非常に多彩な機能を有していることに起因している。

また人工構成物質を用いた再生研究は様々な領域でなされているが、自家羊膜を用いた再生の研究は未だ十分にはなされていない。羊膜は上皮細胞層、基底膜層、緻密層の三層からなり、上皮層は上皮由来の幹細胞、緻密層は間葉組織由来の肝細胞の源となる。そこで今回我々は、通常は廃棄されている生体由来材料としての羊膜が、コラーゲンからなる厚い基底膜を持っているが、血管成分を含まず移植に用いても拒絶反応がおこりにくいことに着目し、ウサギの羊膜上で上皮・間葉組織由来の幹細胞ならびに繊維芽細胞を培養して食道を再生し、それを本症モデルウサギに移植し、本症の治療法としての確立を図る。

3. 研究の方法

異なる妊娠日数(10~14日目)の雌ウサギに過剰のレチノイン酸(13-cis-RA 20mg/kg、)を経口で単回投与し、各々の群で、妊娠 25 日目から 30 日目の母獣を、妊娠満期に帝王切開により胎仔を摘出した。実体顕微鏡下に、胎仔を開胸、開腹し、食道閉鎖発生の有無、他の消化器系、腎・尿路系の合併奇形の発生について検索する。妊娠ウサギは、5~8 月齢の NZW 雌ウサギを交配後 8 日目以降で入手した。レチノイン酸は、オールトランスレチノイン酸、13-シスレチノイン酸を用いた。

また、これらの結果より発生異常を最大限認める至適投与量ならびに至適投与日をそれぞれの群で検討し、ウサギの食道閉鎖症モデル作成を確立する。

さらに作成された本症モデルウサギの羊膜を用いて上皮・間葉組織由来の幹細胞および繊維芽細胞を培養して食道を再生し、それを本症モデルウサギに移植し、食道閉鎖症の治療法としての可能性を検討する。

羊膜上での食道の再生

ウサギ口腔粘膜より上皮層を取り出し、ト

リブシン処理を加え、上皮細胞を得る。

分離培養より自己線維芽細胞を得る。

羊膜を培地とした上皮細胞ならびに繊維芽細胞を 7 日間培養し食道を再生する。

RA 過剰投与群の妊娠 30 日目のウサギを犠牲死させ、胎仔を取り出し、経鼻的に 3Fr. 栄養チューブを挿入し coil up の有無により食道閉鎖の有無を確認する。

食道閉鎖症のウサギには 6Fr. のバルーンカテーテルを用いて胃瘻を造設する。その際瘻孔よりマウス用の経口ゾンデを挿入し、下部食道が盲端か否かを確認することで、A 型食道閉鎖症の有無を確認する。A 型食道閉鎖症のウサギには再生した食道を移植する。栄養は胃瘻より経腸栄養を行なう。

4. 研究成果

それぞれ異なる妊娠日数および薬剤投与量で、9 匹にオールトランスレチノイン酸 40, 80, 120mg/kg、3 匹に 13-シスレチノイン酸 20mg/kg を経口胃管より単回投与した。妊娠率は 12 匹中 8 匹で 66.7%であった。薬剤投与直後に原因不明で死亡した母獣が 1 匹あり、残りの 7 匹の母獣から 1 匹あたり 5~12 匹の胎仔を摘出した。オールトランスレチノイン酸 120mg/kg を投与した母獣に、2 匹の胎仔溶解を認めた。他の胎仔には鎖肛や short tail などの外表奇形は認めず、開胸開腹観察下にて食道閉鎖症をはじめとして、他の消化管奇形、腎・尿路系奇形を認めなかった。

今回の実験結果からは、レチノイン酸の単回投与では、投与量、妊娠投与時期を変更しても、食道閉鎖症を含む明らかな胎児奇形を得られなかった。今後は、少量の薬剤を連日投与するなどの投与量や投与方法の変更を再検討し、さらに胎児の奇形発生についての研究を進めていく予定である。

また実験手技的には全く問題なかったが、薬剤の胎盤移行性を含めた実験動物の選択、薬物の選択、投与量、投与方法など研究デザインについて再検討する必要があると考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

「レチノイン酸過剰投与によるウサギ食道閉鎖モデル作成の試み」

薄井佳子、小野 滋

第 51 回日本小児外科学会学術集会

2014 年 5 月 9 日-11 日、日本、大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 滋 (ONO, Shigeru)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00315962

(2) 研究分担者

佐々木 康成 (SASAKI, Yasunari)

京都府立医科大学・医学研究科・その他

研究者番号：30405253

(3) 連携研究者

()

研究者番号：