

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462018

研究課題名(和文)小腸再生伸長術の前臨床研究

研究課題名(英文)Translational research on small intestinal elongation using tissue engineering technique

研究代表者

上野 富雄(UENO, Tomio)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：70284255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：小腸再生伸長術は、短腸症候群患者の根治的治療法で、再生素材である“小腸粘膜下組織(SIS)”を用い、小腸長と同時に小腸吸収面積を倍加させる手法である。ヒトと同様の腸間膜形態をしている大動物に対して小腸再生伸長術を行い、再生小腸の形態・機能を明確にした。その結果、大動物でも小腸再生伸長術は施行可能であり、SISにより再生させた腸管は、ある程度の機能再生を伴った形態再生をしていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：We concluded that our present study provides the possibility of curative surgical treatment for patients with short bowel syndrome, in which small intestinal submucosa can potentially become more morphologically and physiologically supportive in small intestinal elongation using tissue engineering technique.

研究分野：消化器外科

キーワード：小腸再生医療 小腸再生伸長術 小腸粘膜下組織

1. 研究開始当初の背景

短腸症候群患者とは小腸大量切除のために消化吸収不良となった患者で、半永久的な人工栄養管理が必要で、外科的治療として小腸伸長術 (intestinal loop lengthening) や小腸移植がある。小腸伸張術は、1980年に Bianchi ら (Bianchi A. J Pediatr Surg, 1980) が実験動物に初めて行った術式 (Bianchi 手術) で、小腸を腸間膜とともに長軸方向に二分し、腸間膜をスライドさせて直列に再吻合して小腸を伸長させる手術である。Sudan らは、短腸症候群患者 64 例に本法を実施し、その結果を発表した (Sudan D. Ann Surg, 2007) が、その結果は必ずしも良好とはいえず、この原因は、Bianchi 手術が小腸長のみを単に伸ばすのみで、実際の小腸の吸収面積をまったく増大させない姑息的な治療法であるためと考えられる。一方、小腸移植は根治的治療といえるが、2010 年までの本邦実施例は 15 例のみであり、そのうち 4 例が死亡し (和田基. 日外会誌, 2010)、ドナー不足や強い拒絶反応などのため、未だ普及した治療となっていない。高齢化社会、ストレス社会において小腸大量切除の対象となる血栓症や炎症性腸疾患の発生頻度は増加しており、短腸症候群患者に対する根治的な治療法が求められている。短腸症候群では小腸吸収面積を増加させることが根本治療であり、我々はそれを実現するために、これまでの基礎研究に基づき、外科治療に再生医療を融合させた「小腸再生伸長術」を提案した。

2. 研究の目的

「小腸再生伸長術」は再生医療素材を用い、小腸長と同時に小腸吸収面積を倍加させる手法で、短腸症候群患者の治療法として根治性を目指したものである。本研究では、再生医療の素材として注目されている成長因子を保持した細胞外マトリックスである“小腸粘膜下組織 (SIS)”を用い、大動物にて「小腸再生伸長術」を行い、再生小腸の形態・機能を明確にし、ヒトに適応できるかを検証する。

3. 研究の方法

(1)小腸再生伸長術の実施

ヒト小腸 (図 1) では、腸管を栄養する主幹脈管 (動静脈) から小腸壁まで、Bianchi 手術を可能とする距離を有した腸間膜が形成されている。



図 1

マイクロミニピッグの腸間膜 (図 2) は、ヒト腸間膜と類似し主幹脈管から小腸壁までには距離があり、本研究ではマイクロミニピッグを大動物として使用する。



図 2

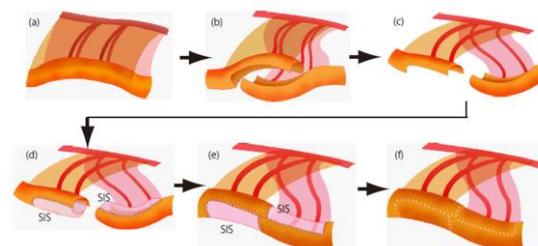


図 3

マイクロミニピッグの小腸および腸間膜を Bianchi 手術の血管処理に準じて間膜を二葉に分け、一側の血流を確保しつつ、間膜ごと腸管を長軸方向にずらす。ずらした小腸は一定の幅で小腸壁同士を吻合し、二か所の小腸壁全層欠損部には等面積の SIS を吸収糸で縫着する。欠損部を SIS にて置換し、小腸を再生させることによって、理論的には、小腸の内腔径を変えることなく、吸収面積を元の二倍に増加できる。マイクロミニピッグ 10 頭に対し、小腸再生伸長術を行い、術後評価を行った。

(2)再生小腸の運動機能の評価

初回手術 6 カ月後に再開腹し、標本を摘出する。手術時にマークされた再生腸管から muscle strip を作製し、現有の tissue-organ bath system を用い、薬理生理学ならびに電気生理学的手法で、muscle strip の収縮性ならびに弛緩性の程度、神経伝達性筋収縮の回復の有無と程度を観察し、in vitro での腸管運動機能を評価する。

(3)再生小腸の消化吸収能の評価

再生部小腸組織中の brush border enzyme activity (Alp, γ -GTP) を測定する。

(4)形態学的観察

H&E、免疫組織染色により、粘膜・平滑筋・神経細胞の再生についても観察する。

4. 研究成果

(1)手術

図3および図4は同一個体で、前葉、後葉にそれぞれ縫着した SIS を示す。前後の腸管と腸管径が変わらないことがわかる。

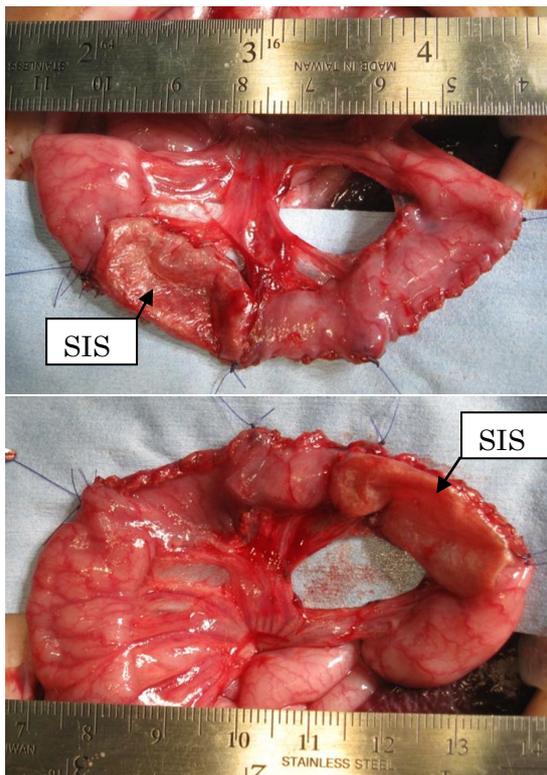


図 4

(2)再開腹所見

再開腹まで全例生存した。図5に初回手術6カ月後に再開腹所見を示す。マーキング糸で手術操作が行われた部位が確認できるが、軽度の癒着を認めるが、狭窄や拡張腸管は認めない。

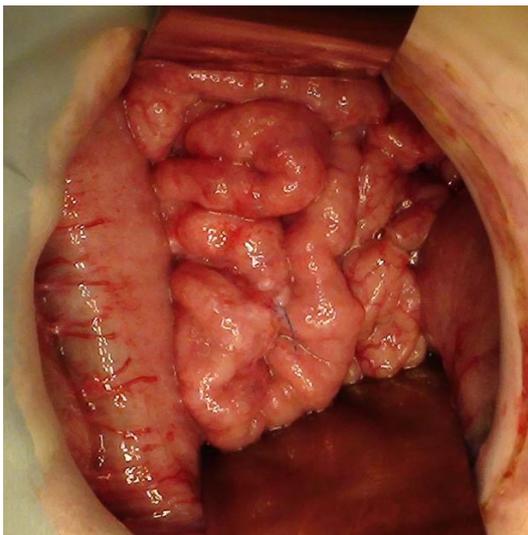


図 5

(3)in vivo 運動機能評価

再生小腸の in vivo 機能評価を行った(図6)。空腹期消化管運動(MMC)を誘発させるヒトモチリンを投与し、消化管運動を観察したが、

ヒトモチリンに対する反応性を認めなかった。恐らく種差によると考えられた。

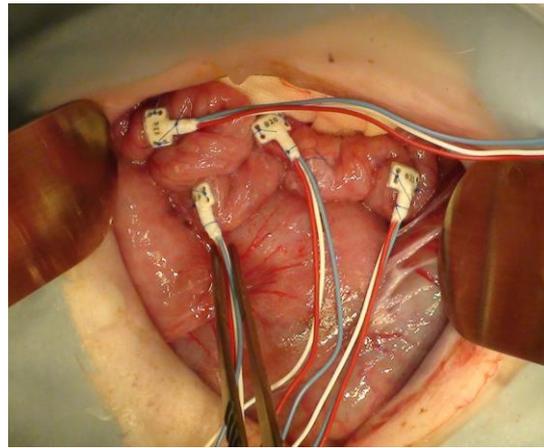


図 6

(4)切除標本

代表的な切除標本を示す。図7は粘膜側、図8は漿膜側である。マーキング糸で再生部が確認できる。

マーキング糸

マーキング糸

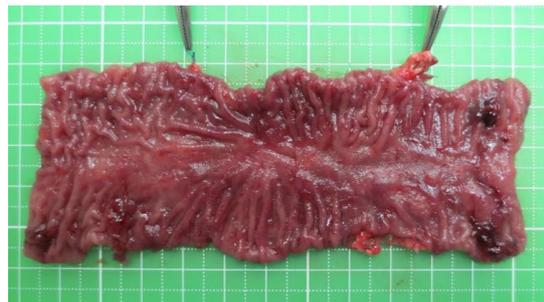


図 7



マーキング糸

マーキング糸

図 8

(5)in vitro 運動機能評価

SIS で再生された組織は、アセチルコリン作動薬 (CCH)により収縮が誘発された(図9: 健常部、図10: 再生部)。

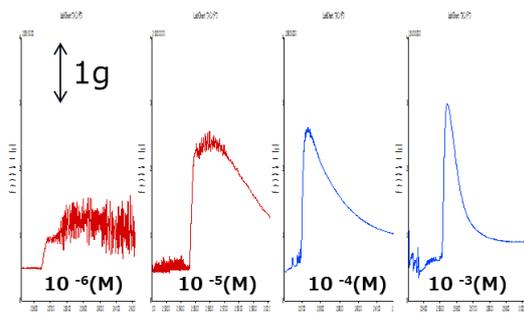


図 9

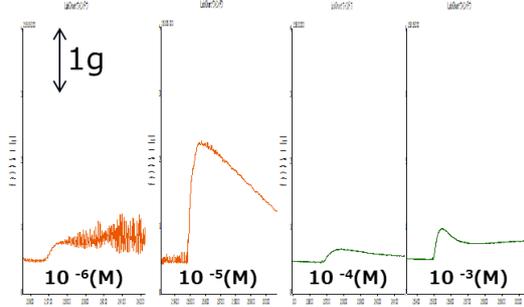


図 10

また SIS で再生された組織は、NO 前駆体 (sodium nitroprusside)により弛緩が誘発された (図 11: 健常部、図 12: 再生部)。

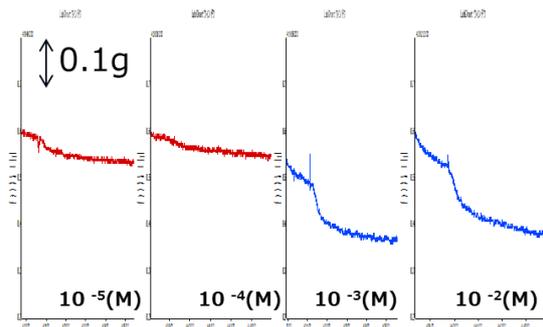


図 11

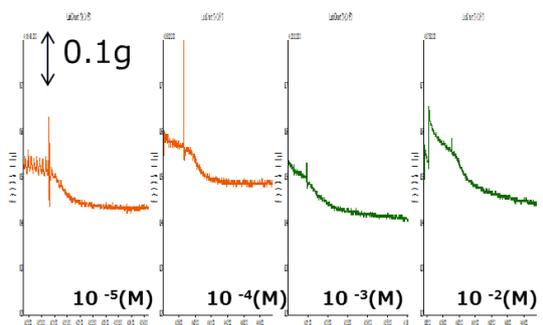


図 12

さらに electrical field stimulation (EFS) 法による神経筋伝導も観察された (図 13: 健常部、図 14: 再生部)。

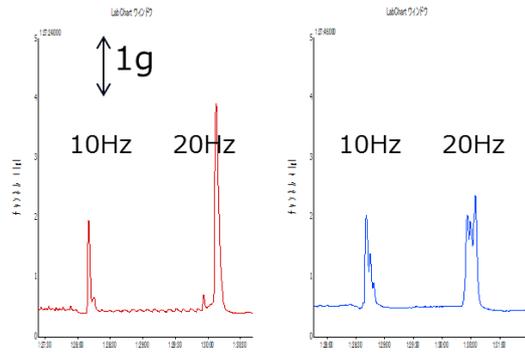


図 13

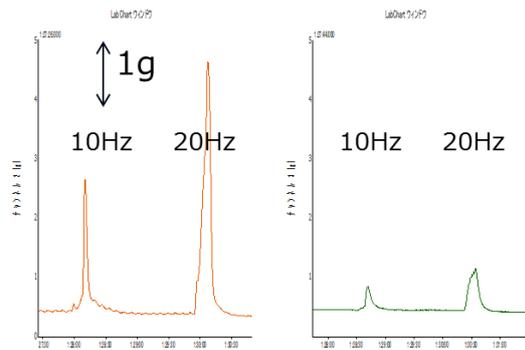


図 14

(6)再生小腸の消化吸収能の評価

Western blot 法では再生部には、ALP の活性を健常部と同様に認めた (図 15)。

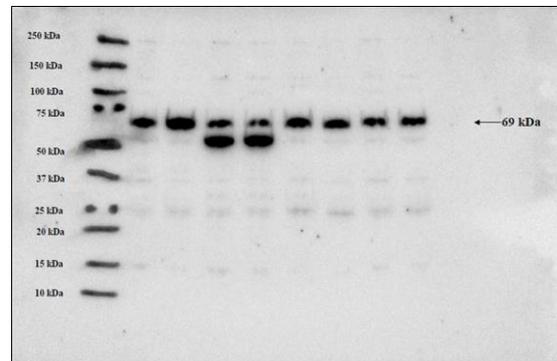


図 15

(7)形態学的観察

形態学的な観察では、粘膜再生部も良好で吸収上皮細胞および Goblet 細胞も認めた (図 16)。さらに抗 α SMA 抗体を用いた再生組織の観察でも、抗 α SMA 抗体陽性細胞細胞を認め (図 17)、抗 S-100 蛋白抗体を用いた再生組織の観察でも、抗 S-100 蛋白抗体陽性細胞を認め (図 18)、平滑筋組織および神経グリア細胞の再生が確認された。

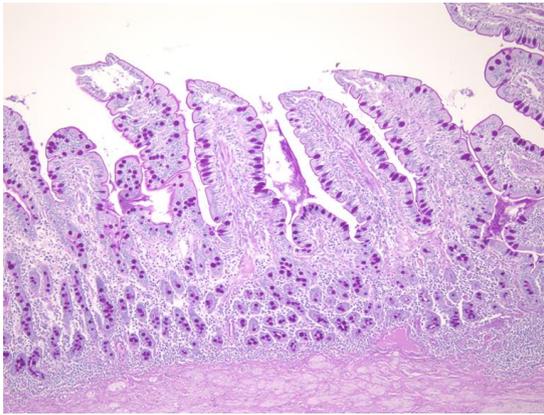


図 16

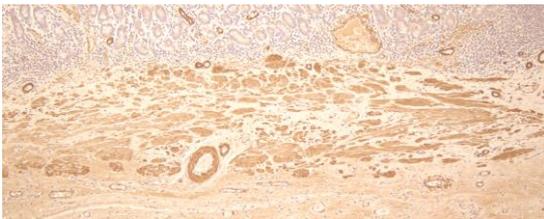


図 17

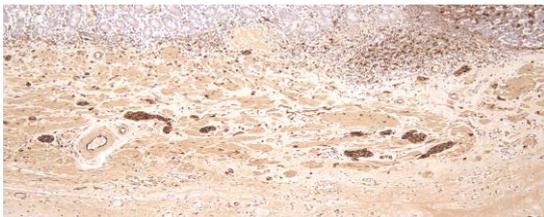


図 18

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1件)

①Mitsuhiro Nakao, Tomio Ueno, Atsunori Oga, Yasuhiro Kuramitsu, Hiroki Nakatsu, Masaaki Oka. Proposal of intestinal tissue engineering combined with Bianchi's procedure. Journal of pediatric surgery. 査読あり 50(4): 573-580, 2015.

〔学会発表〕(計8件)

①上野富雄、他. 短腸症候群患者に対する外科治療法—大型動物を用いた前臨床研究—. 第115回日本外科学会定期学術集会 2015年4月16日 名古屋国際会議場、名古屋

②上野富雄、他. ブタ小腸粘膜下層(SIS)を用いた小腸再生伸長術の評価. 第70回日本消化器外科学会総会 2015年7月17日 アクトシティ浜松 浜松

③藤本拓也, 上野富雄、他. ブタ小腸粘膜下組織 (small intestinal submucosa:SIS) を用いた消化管平滑筋再生. 第57回日本平滑筋学会

総会 2015年8月27日 山口大学小串キャンパス、宇部

④Tomio UENO, et al. Intestinal elongation using small intestinal tissue engineering in combination with Bianchi's procedure. 23rd United European Gastroenterology Week 2015年11月28日 Fira de Barcelona Gran Via North Access - Hall 8 バルセロナ

⑤藤本拓也, 上野富雄、他. ブタ小腸粘膜下組織 (small intestinal submucosa: SIS) を用いた消化管再生. 第15回日本再生医療学会総会 2016年3月17日 大阪国際会議場、大阪

⑥上野富雄、他. 小腸粘膜下組織 (small intestinal submucosa : SIS) を用いた消化管再生医療. 第116回日本外科学会定期学術集会 2016年4月15日 大阪国際会議場、大阪

⑦上野富雄、他. 小腸再生伸長術—再生医療を応用した短腸症候群患者に対する外科治療法. 第102回日本消化器病学会総会 2016年4月22日 京王プラザホテル 東京

⑧上野富雄、他. 幹細胞と小腸組織工学による消化管再生医療とその臨床応用. 第71回日本消化器外科学会総会 2016年7月16日 大阪国際会議場、大阪

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 富雄 (UENO TOMIO)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：70284255