

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462712

研究課題名(和文)細胞放出性鋳型を用いた同種生体内biosheetによる機能的横隔膜の再生研究

研究課題名(英文)Regeneration of diaphragm using biosheet

研究代表者

鈴木 啓介(Keisuke, Suzuki)

埼玉医科大学・医学部・客員講師

研究者番号：50724887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：生体内組織であるbiosheetによる横隔膜の修復、再生の研究を行った。家兔の背部皮下に鋳型を埋め込み4週後に鋳型周囲に形成されるbiosheetを採取した。家兔の横隔膜に欠損孔を作成し自己のbiosheetを移植した。移植3か月後の横隔膜ヘルニアの発生率は既存の横隔膜修復パッチより少ない傾向にあった。biosheetは本来の横隔膜と同等の破断強度を持ち、移植後さらに強度が増大した。さらに移植3か月後に摘出したbiosheet上に免疫組織染色でdesminとSr-1に陽性を示す組織の形成を確認し、筋組織の再生を証明した。本研究によりbiosheetが横隔膜の修復、再生能を有することが示された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the efficacy of biosheet for the regeneration and repair of diaphragm in a rabbit model. Biosheets were prepared by embedding silicon plates in dorsal subcutaneous pouches of rabbits. Defects in the left diaphragm were created in rabbits. Autologous biosheets were transplanted into the diaphragmatic defects. Three months after transplantation of biosheets, herniation of liver was observed in 21% of rabbits, which was less often than prosthetic patches. Biosheets before transplantation had equivalent burst strength as native diaphragm. Their strength was significantly increased after transplantation. Regeneration of muscular tissue was confirmed by immunohistochemical staining with desmin and Sr-1. We confirmed that biosheets can be useful material for diaphragmatic repair and engineering diaphragmatic muscular tissue.

研究分野：再生医療

キーワード：横隔膜ヘルニア 横隔膜 再生 筋肉 biosheet

1. 研究開始当初の背景

(1)先天性横隔膜ヘルニアの治療の現状

先天性横隔膜ヘルニアは、脱出臓器が肺を圧迫し、重度の呼吸不全や肺の低形成に伴う肺高血圧を呈する疾患である。出生後早期に臓器を腹腔内に還納し横隔膜の欠損孔を縫合閉鎖することが必要であるが、欠損孔が大きい場合には、人工のパッチや広背筋、内腹斜筋などの自己筋皮弁を用いた修復が行われる。しかし、人工のパッチは免疫反応や感染を合併するリスクがあり、成長とともに体格とパッチの大きさに不均衡が生じ胸郭の変形や再発を起こすことが問題となる。また人工のパッチであるため欠損孔を塞ぐのみで収縮せず、呼吸筋としての機能を有していない。自己筋皮弁を用いた修復も侵襲が大きく、さらに腹壁に欠損を作ることにより、腹部膨隆などの変形を起こすといった問題がある。

(2)横隔膜の再生の研究

人工のパッチや自己筋皮弁を用いた横隔膜の修復の問題点を解決するために、横隔膜の再生が期待される。過去にはPLGA(poly-lactic-co-glycolic acid)メッシュとコラーゲンスポンジを組み合わせた鋳型を用いて横隔膜を修復し、横隔膜ヘルニアの発生率が少なく、vascularization と desmin 陽性の細胞を含む線維組織が形成された報告されている (Pediatr Surg Int.24:1041-5, 2008)。その他、脱細胞化した羊胎児の小腸粘膜下層 (Acta Biomaterialia 9:6844-6851 2013)、胎児の筋原細胞 (J Pediatr Surg.36:146-51,2001)や羊水中の間葉系細胞 (J Pediatr Surg.41:34-9,2006)など様々な材料を用いて横隔膜再生の研究が報告されているが、筋肉に類似した組織の形成や筋細胞の遊走は認めるものの、免疫組織学的に筋組織の再生は証明されていない。横隔膜の筋組織の再生はいまだ達成されていない課題と言える。

(3)biotube および biosheet の開発

研究分担者である中山らは血管再生の素材とし生体内で作成される自己組織である biotube を開発した (Cell Transplant 13: 439-449, 2004)。この組織は生体内で異物が被包化される現象を利用しており、シリコンやアクリルなどの非吸収性の鋳型を生体内皮下の脂肪組織内に埋め込むと鋳型表面に膠原線維に富んだ結合織からなる biotube が形成される。採取した biotube を目的となる臓器に移植して再生に用いる (図 1)。中山らは biotube を Rat 血管と吻合して移植し、12週間後に内腔が内皮細胞に覆われ、平滑筋細胞が遊走されることを証明した (J Artif Organs 16:59-65 2011)。

この生体内組織は鋳型の形状を変えることで、必要に応じた形状に設計することができる。シート状にしたものが biosheet であり、角膜に移植することで、角膜上皮細胞が遊走

することが報告されている (人工臓器 2013)。3D プリンターで作成した鋳型を用いて弁の形状をした biovalve を作成し、ヤギの大動脈弁に移植すると弁として機能し SMA 陽性細胞が遊走してくることが確認された (J Artif Organs 2013)。また、biotube の技術を応用した、再生軟骨を付与した複合的気管再生の研究も行われており、bioairtube として特許申請されている (特願 2013-1773289)。

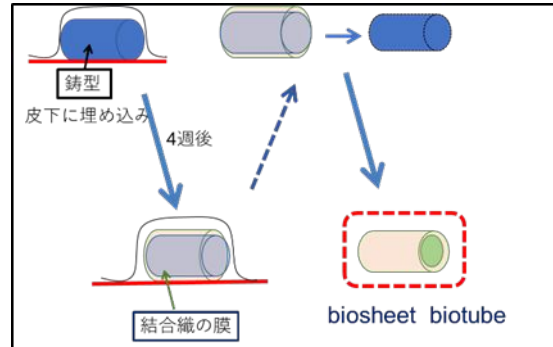


図1 biosheet の作成

2. 研究の目的

本研究では自己の生体内で作成した biosheet を用いて横隔膜の欠損孔に移植して修復し、呼吸筋としての機能を有した横隔膜の再生を行うことを目的とした。家兔の横隔膜ヘルニアモデルを用いて biosheet の横隔膜の修復および再生能を検証した。

3. 研究の方法

(1)biosheet の作成

4週齢の家兔に麻酔をかけて背部に皮膚切開をおき、皮下に 3cmx3cm のシリコン製の鋳型を埋め込んだ。4週後に鋳型を摘出し、周囲に形成された biosheet を摘出した。

(2)研究デザイン

8週齢の家兔を用意し3つのグループに分けた。group1(n=11)では横隔膜の修復に既存の非吸収性の横隔膜修復シートである Gore-Tex シートを、group2(n=11)では吸収性の素材として人工硬膜であるシームデュラを用いて横隔膜の欠損孔を修復した。group3(n=14)では自己の体内で作成した biosheet を用いて修復し、3群間で横隔膜ヘルニアの発生率や組織学的所見を比較検討した。

(3)シートの移植および摘出

8週齢の家兔を開腹し、左横隔膜に 1.5cmx1.5cm の欠損孔を作成した。Group1,group2 ではそれぞれ 1.8x1.8cm 大の Gore-tex シートとシームデュラを用いて欠損孔を修復した。Group3 では二重にした 1.8x1.8cm の自己の biosheet を移植して横隔膜を修復した。

3ヵ月後に再開腹し横隔膜ヘルニアの発生

の有無を観察した。さらに、横隔膜および移植したシートを摘出し、力学的強度の測定と、組織学的検討を行った。

4. 研究成果

(1)横隔膜ヘルニアの発生率

移植 3 ヶ月後の横隔膜ヘルニアは gorup1 で 45% (11 例中 5 例)、gorup2 で 73% (11 例中 8 例)、group3 で 21% (14 例中 3 例)であった。group3(biosheet)は group2(シームデュラ)よりもヘルニアの発生が有意に少なく、group1(Gore-Tex)と比較しても少ない傾向にあった。

(2)力学的強度

移植前の biosheet は自己の横隔膜と比較して同等の破断強度を有した。移植 3 ヶ月後には移植前と比較して破断強度が有意に増大した。さらに、biosheet は横隔膜と類似した弾性率を有していることもわかった。

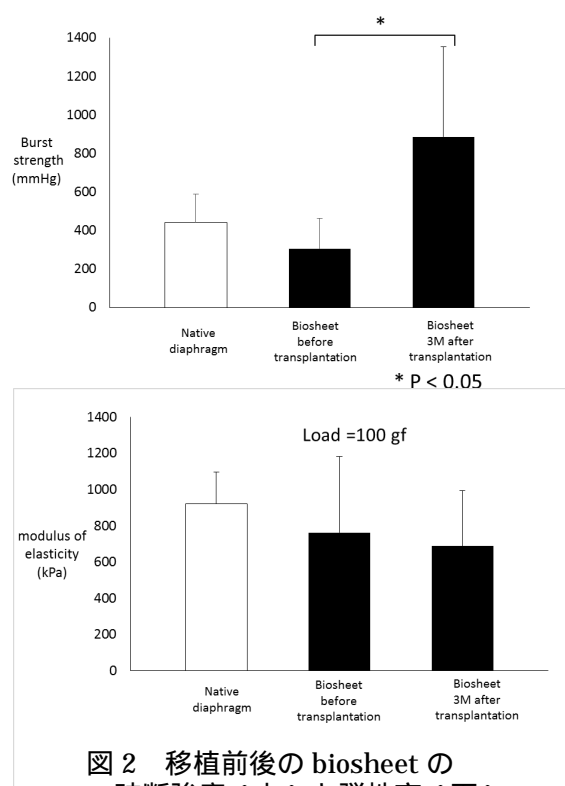


図2 移植前後の biosheet の破断強度(上)と弾性率(下)

(3)組織学的評価

移植 3 ヶ月後に摘出した biosheet 上には HE 染色で横隔膜と類似した組織が形成されており、Elastica von Gieson 染色でこの組織が筋線維から構成されていることがわかった。さらに筋組織に特異的な Sr-1 と Desmin による免疫組織染色を行ったところ、この組織は陽性を示し、筋組織が再生されていることが証明された。Gore-Tex やシームデュラには筋組織の再生は認めなかった。

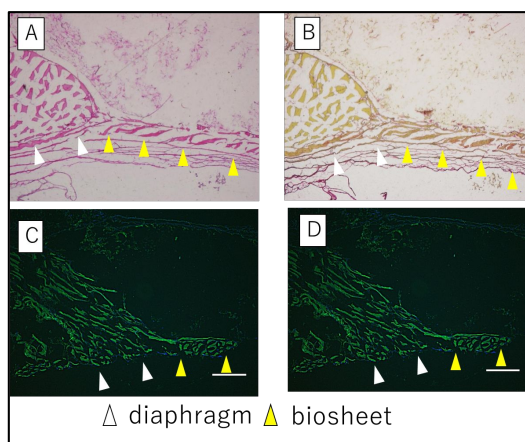


図3 移植 3 ヶ月後の biosheet の組織所見 (A. HE 染色 B. Elastica van Gieson 染色 C. desmin D. Sr-1)

(4)まとめ

自己の体内で作成した biosheet による横隔膜の修復では既存の人工パッチと比較して横隔膜ヘルニアの発生が少なく、biosheet が本来の横隔膜と類似した力学的特性を備えていることを示した。また横隔膜への移植 3 ヶ月後に biosheet 上に筋組織が再生されることを免疫組織染色で証明し、biosheet が横隔膜の筋組織の再生能を有していることを示した。

今後、より大きな横隔膜の欠損孔に対する移植や、同種の他の個体の体内で作成した biosheet を用いた横隔膜の再生研究を進めていく予定である。これが実現すれば出生前診断がついた先天性横隔膜ヘルニアの児に対し、親の体内で作成した biosheet を移植して横隔膜の修復、再生を行うことができ、臨床応用が可能となる。

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)

Keisuke Suzuki, Makoto Komura, Kan Terawaki, Tetsuro Kodaka, Takumi Gohara, Hiroko Komura, Yasuhide Nakayama, Engineering and repair of diaphragm using biosheet, a collagenous connective tissue membrane, in rabbit, J Pediatr Surg, 査読有, 53 巻, 2018, 330-334

[学会発表](計3件)

鈴木 啓介, 古村 眞, 寺脇 幹, 小高 哲郎, 合原 巧, 中山 泰秀, Evaluation of diaphragmatic engineering using biosheet, a collagenous connective tissue membrane to repair congenital diaphragmatic hernia in rabbit, BAPS(British Association of Pediatric Surgeons) 2017, 2017.7.21、ロンドン(イギリス)

鈴木 啓介, 古村 眞, 寺脇 幹, 小高 哲

郎、合原 巧、中山 泰秀、バイオシートを用いた先天性横隔膜ヘルニアに対する横隔膜の修復と再生の研究、第 53 回日本小児外科学会学術集会、2016.5.24、ヒルトン福岡シーホーク（福岡）

鈴木 啓介、古村 眞、寺脇 幹、小高 哲郎、合原 巧、古村 浩子、中山 泰秀、Repair and regeneration of diaphragm using biosheets for congenital diaphragmatic hernia in a rabbit model、PAPS(Pacific Association of Pediatric Surgeons) 2016、2016.4.27、ハワイ（アメリカ）

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 啓介 (SUZUKI, Keisuke)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：5 0 7 2 4 8 8 7

(2)研究分担者

古村 眞 (KOMURA, Makoto)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：1 0 4 2 2 2 8 9

佐竹 亮介 (SATAKE, Ryouzuke)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：7 0 5 9 7 5 2 5

寺脇 幹 (TERAWAKI, Kan)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：0 0 3 7 2 3 8 4

小高 哲郎 (KODAKA, Tetsuro)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：8 0 4 4 2 9 6 1

中山 泰秀 (NAKAYAMA, Yasuhide)
独立行政法人国立循環器病研究センター
一・生体医工学部・室長
研究者番号：5 0 2 5 0 2 6 2

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

古村 浩子 (KOMURA, Hiroko)
東京大学・医学部・登録研究員