

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462713

研究課題名(和文)biotubeを足場とした自己再生能力を用いた機能的小腸再生の研究

研究課題名(英文)Renegerate intestine using biotube which has ability of self-regenerate capacity

研究代表者

寺脇 幹 (Terawaki, Kan)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：00372384

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)：本研究は、自己の背部皮下組織に留置したシリコンチューブ周囲に形成される円筒状の自家結合組織(=biotube)を材料として腸管再生を試みるものであった。ES細胞やiPS細胞など幹細胞を用いないという新規性があり、成功すれば短小腸症となった患児への臨床応用につながる、重要な研究である。ラットを用いた実験は、移植手術後3日以内に縫合不全を生じることが続き、最終的にはbiotubeを用いた場合は成功しなかった。今後は、腸管として小腸ではなく食道を利用することや、腸管壁の全周ではなく一部をbiotubeで置換することで腸管内皮や腸管平滑筋の再生が生じるかを確認することを計画している。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to regenerate intestine using collagenous connective tissue membranes (=named Biotube) which were prepared by embedding silicon tube as a mould in subcutaneous pouches in dorsal skin. The novelty of this study was not to use stem cells such as ES cells or iPS cells. It was quite difficult to keep the anastomosis lesion of the intestine in abacterial condition because the generation of intestinal endothelial cells was rather slow and the leakage of intestinal fluids stream could not be stopped. In order to do this experiment successfully, we are planning to use esophagus alternatively and try to evaluate whether endothelial cells and muscles of esophagus can regenerate or not.

研究分野：小児外科、再生医療

キーワード：再生医療 腸管不全

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究が target とする小児外科領域の疾患

小児の外科領域では、腸回転異常症に合併した軸捻転症によって大量腸管壊死に陥り小腸大量切除を要し、短小腸となる患児が稀ならずみられる。治療としては次のようなものが行われてきた。

短小腸症全般に対してまずは、中心静脈カテーテルを用いた高カロリー輸液による栄養管理を行い、またアミノ酸製剤あるいは漢方薬投与にて、小腸の絨毛上皮の成長を促す治療が行われている。

短小腸症の軽症例では、成長とともに中心静脈による栄養管理を離脱することが可能である。これらは、自己再生能力で小腸の機能が亢進され吸収機能が十分となったためと考えられる。

短小腸症の中等症以上では中心静脈の離脱が困難なために、拡張した小腸を縦割りにして腸管を延長する Bianchi 手術 (*J Pediatr Surg.15: 145-151,1980*) や腸管をジグザグに形成して腸管の長さを延長する STEP 手術 (*J Pediatr Surg.38: 425-429,2003*) が施行されている。

短小腸症の重症例では、小腸移植が必要となるケースがある。

以上、これらの治療についてまとめると、いずれも、治療は長期化し侵襲的な外科治療あるいは移植治療が必要となる。さらに、小腸はリンパ組織に富むため移植後の拒絶反応のコントロールが難しく、他の臓器よりも長期生存率が低い。本研究は、これらの問題を解決するために、短小腸症例への臨床応用を目指した、自己再生能力を活かした小腸再生法について研究することを計画した。

(2) 研究開始時点までに分担研究者らによって明らかにされてきた成果

分担研究者の古村らは気管狭窄症の再生

について研究を行っている。再生軟骨の力学的強度 (*Int J Artif Organs.33:775-781,2010*)、ステント系気道用足場を開発、軟骨細胞増殖因子徐放化による軟骨再生の有用性、粘膜上皮の自律再生 (*J Pediatr Surg.43:2141-2146,2008*) 再生軟骨プレートの気管軟骨断端との軟骨による接合 (*Laryngoscope.123:1547-1551,2013*) について確認した。

分担研究者である中山は、biotube を開発した。これは、人工物を生体内に埋入した際に、生体防衛機能によって人工物周囲に線維芽細胞とその細胞が産出するコラーゲン線維から構成されるカプセル状の組織であり、代用血管としての研究が行われずでに成果を上げつつあった (*J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 98:120-126, 2011*)。biotube は自己組織であって密閉性・柔軟性に富んでおり、長さ、内径、壁厚をコントロールすることが可能である。また、血管内皮細胞の遊走、壁内平滑筋が再生されることを確認されていた。またこの biotube をシート状にして角膜欠損部に移植すると角膜が再生されることも確認されていた。

古村らは biotube に再生軟骨を付与させ、管状型の複合的再生気道 (bioairtube) を開発し、また、分担研究者の佐竹らは、気管欠損孔に biosheet を移植すると、気道壁の組織が再生されることを確認するなど、biotube を用いた自己組織再生が多くの臓器で実証されつつあり、小腸再生への応用が十分に期待できる状況と考えられた。

2. 研究の目的

(1) ラット皮下組織で作成された biotube を小腸に自家移植し、蠕動運動と吸収能力を兼ね備えた機能的な小腸再生 (bio-alimentary-tube) を研究開発する。

(2) 腸管の神経組織の再生が促進される (*Neurogastroenterol*

Motil.22,806-813,2010)と報告されているクエン酸モサブリドを biotube に投与して、神経組織のネットワークの再生を促進させ、再生腸管に筋肉組織を再生させる。

3. 研究の方法

(1)ラット皮下に biotube を作成し、力学的強度測定、組織学的に検討

ラット皮下にシリコンチューブを移植し、biotube を作成する。チューブ移植4週後に biotube を摘出し、力学的強度測定および組織学的検討を行う。

(2) biosheet による腸管欠損孔の縫合被覆後の再生組織の検討

biotube は血管や気管に縫合できるので、腸管にも同様の方法で縫合する。ラット皮下で作成した biotube をシート状(biosheet)にして腸管欠損孔を被覆縫合する。移植後1,2,4週に摘出し、biosheet上に腸管組織が再生されているか、組織学的に確認する。

(3) biotube による腸管吻合後の再生組織の検討

小腸を切離し、上記2の方法で腸管と biotube を端々吻合する。吻合部の状態と biotube の組織が腸管様の組織(bio-alimentary-tube)に再生しているかを移植後1,2,4週に検討する。

(4) bio-alimentary-tube の栄養(糖、アミノ酸)吸収能の検討

再生された bio-alimentary-tube を摘出し、3cm ずつの短い tube として片端を結紮して閉じる。開いている端から代用液を注入して断端を結紮して閉じて腸管嚢を作成する。これを、A: デンプン 1%、B: マルトース 5mM、C: D-グルコース 10mM をそれぞれ入れたフラスコ(37度恒温槽)内に入れて1時間

incubate したのち、腸管嚢外および腸管嚢内の液体に glucose-oxidase 試薬を10分間反応させ、分光光度計によって glucose 濃度を測定する。

4. 研究成果

ラット皮下にシリコンチューブを留置することで、biotube は期待通り作成された。

ラットの上部小腸を一旦離断して端々吻合の形で biotube を移植したが、数日後に死亡することが相次いだ。再開腹して確認すると、腸管吻合部からの消化液の漏れが原因と考えられた。

biotube と腸管の吻合方法につき、間隔を密にする、縫合の数を増やすなどの改良を加えたが、最長で3日までしか生存が得られなかった。

biotube を用いたこれまでの先行研究においては、たとえば血管吻合に biotube を用いる場合、血管内皮細胞再生のための因子が血液中に大量に流れていると考えられるのに対し、本研究の腸管については腸管内を通る腸液中にそのような再生のための因子が含まれているわけではなく、腸管組織の断端に存在する微小な血管を介して腸管粘膜組織再生のための因子がやってくるものと考えられる。それらが吻合部という局所に定着し再生が進むまでの間に、腸管吻合部分の接着が不十分なため消化液が腸管外へ漏れ出てしまうことが、移植手術後早期死亡の主因であると考えられた。

上記理由から、当初計画した方法では、biotube を用いた腸管再生の実験は根本的な変更を余儀なくされると判断し、消化液に胃液や膵液、胆汁などタンパク質や脂肪成分を融解させる作用のない、食道を用いた実験に変更することを考えた。

食道を一旦離断して biotube を吻合する手術を行うには中部食道・下部食道か、頸部食道の利用が考えられる。前者では開胸が必要であり、後者では気管切開などを併用した呼吸補助が必要であることから、現実的には非常に困難であった。

以上のように当初計画した、腸管吻合を成功させ、組織学的な検討や力学的な強度の検討、さらには栄養吸収能の検討などまで進むことができず、成果を論文発表することができなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

寺脇 幹 (TERAWAKI, Kan)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：00372384

(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：10422289

中山 泰秀 (NAKAYAMA, Yasuhide)
国立研究開発法人
国立循環器病研究センター・研究所・室長
研究者番号：50250262

小高 哲郎 (KODAKA, Tetsuro)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：80442961

佐竹 亮介 (SATAKE, Ryosuke)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：70597525

鈴木 啓介 (SUZUKI, Keisuke)
埼玉医科大学・医学部・客員講師