

令和元年6月20日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11343

研究課題名(和文)家兎気管大欠損モデルにおける自然修復機構の組織生化学的解析と自然修復調節法の確立

研究課題名(英文)Histochemical analysis and modification of the natural healing process of the large defect of rabbit trachea.

研究代表者

窪田 正幸 (Kubota, Masayuki)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50205150

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)：本研究は、家兎気管大欠損モデルを用いて、気管欠損部被覆組織の修復過程を免疫組織学的に検索し、治癒機転に關する修飾因子を調整することで肉芽を来さないより生理的な創傷治癒機転の確立を目的とする。

気管欠損部は、1週目に炎症組織が発生し、2週目に炎症組織内に肉芽が発生しその内側が気管上皮で覆われる。組織障害因子であるTNF- $\alpha$ をモノクローナル抗体投与により阻害したが、免疫反応抑制効果による易感染性が惹起される重篤な副作用が発生した。ソマトスタチンとラパマイシンの投与量と投与時期を慎重に調節した併用療法では、重篤な副作用がなく肉芽組織形成を伴わないより生理的な気管上皮再生機転を誘導することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創傷治癒の初期過程は線維組織と血管組織からなる肉芽形成で、治癒機転には不可欠の過程であるが、一方で肥厚性癒痕やケロイドを来し、血管や消化管などの管腔臓器では吻合部狭窄や閉塞の原因となる。今回の研究により、治癒過程に關する諸因子を外因性に投与した薬剤により微調節することが可能であり、より合併症の少ない治癒機転を誘導する方法を確立できた。整容性と機能に優れた治癒機転とすることで、皮膚切開や各種管腔臓器の吻合操作の合併症の発生が抑制され、その臨床的恩恵は外科系のあらゆる分野に波及する汎用性のあるもので、新しい臨床分野開発に繋がり、医療経済的波及効果と社会的意義は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study is to establish a technique to induce more physiological healing process without a granulation formation in the large tracheal defect of rabbits. Firstly, a natural healing process was examined histochemically. Tracheal defect was covered with inflammatory tissue one week after operation, and granulation tissue created inside was covered with tracheal epithelium two weeks after operation. Exogenous application of TNF monoclonal antibody induced general and local inflammatory responses probably due to suppression of natural immune system. Then, combined application of somatostatin analog (an inhibitor of growth hormone) and rapamycin (an inhibitor of intracellular mTOR signal pathway for fibrosis) were tried with a careful consideration of their dosages and timing of application. As a result, more physiological healing process without granulation formation could be induced.

研究分野：小児外科

キーワード：気管欠損 気管再生 創傷治癒 ラパマイシン ソマトスタチンアナログ 肉芽 上皮再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 家兎を用いた気管大欠損モデル実験では、欠損部を放置すると2~4週の間気管上皮で裏打ちされた薄い線維性組織で被覆されるが、この線維性組織は、気管軟骨や平滑筋の再生を伴うことはなく、高度の気管狭窄(気管断面面積率  $54.7 \pm 12.7\%$ )を伴っている。

(2) 申請者は、気管内に適切なステントを留置することで、狭窄のない気管欠損部修復が可能と考え、長期間剛性を保つチタン・ニッケル形状記憶合金ワイヤーに注目し、同ワイヤーを紡錘形コイルに整形し、さらに気管欠損部を充填する中心部を二重コイルとすることで、長期生存可能な代用気管開発に成功した(Kubota M, et al: Tracheoplasty using a metallic fusiform centrally-doubled coiled stent for a major tracheal defect in rabbits. J Pediatr Surg 47:2234-2238, 2012)。しかしながらコイル周辺には肉芽が不可避免的に発生するため、より理想的な代用気管とするため、平成24年から26年の挑戦的萌芽研究において、肉芽組織のmTOR活性とラパマイシンの効用を検討した(Kubota M, Matsuda Y, et al: Effects of rapamycin on granulation formation in response to centrally-doubled coiled stents as a tracheal substitute. J Pediatr Surg 48: 2416-2424, 2013)。

(3) また、欠損部をそのまま放置した場合、気管狭窄を伴うものの家兎はこの状態で長期生存し、しかも線維性組織自体は呼吸の圧変動に耐える強靱な組織のため、自然治癒機構を調節し気管内狭窄をきたさないような治癒機構導出ができれば、代用気管を用いず自然治癒機構を利用した気管欠損の新たな治療法を確立できるとの発想に至り、今回の研究を想起した。

## 2. 研究の目的

気管に大欠損(気管径の倍にあたる6軟骨輪の長さ亘って気管前半周を切除)を作成し、気管を放置しそのまま閉創し放置すると、2~4週で気管欠損部は軟骨や平滑筋形成を伴わない薄い線維性組織で被覆され、同時に気管狭窄が発生する。被覆上皮の細胞増殖活性能と基底膜形成は、正常気管上皮に比べ有意に低下し、気管狭窄の原因と考えられた。即ち、自然治癒過程は完全でなく急場をしのぐための不完全な再生機構と結論された。

(1) 本研究は、家兎気管大欠損モデルにおける自然治癒機構を免疫組織検査、PCR、Western blotを用いて解明し、再生に関連する成長因子やサイトカインを明らかにする。

(2) これら成長因子やサイトカインを調節することで肉芽形成を予防し、不完全な上皮化や基底膜再生を改善し、狭窄を来さないより健全な再生組織構築法の開発を行う。

(3) 気管での知見を腸管、胆管、血管など他の臓器にも拡充し、生体臓器全てにおいて狭窄や癒痕収縮を来さない自然治癒機構調節を目指す。

## 3. 研究の方法

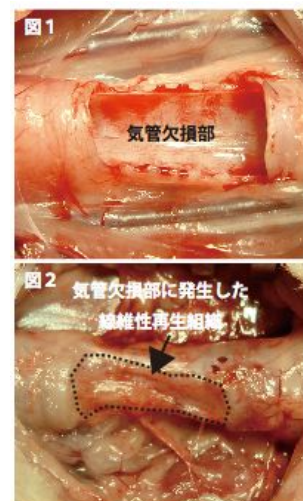
### (1) 家兎における気管欠損モデルの作成

実験計画は既に新潟大学実験計画専門委員会で承認を得ている(平成27年8月7日承認27新大研157号2)。実験動物には、体重2.5kgの白色家兎(Kbl:JW rabbits (Kitayama Labes, Ina, Nagano, Japan))を用いる。ケタミン(35mg/kg)とキシラジン(5mg/kg)を筋注しすることで2時間程度の自発呼吸を維持した全身麻酔を得る。頸部気管を露出し、6軟骨輪の長さによって気管前半部を摘出し、気管大欠損モデルとする(図1)。予備実験では、欠損部をそのまま放置し頸部筋群と皮膚を縫合するだけで調べた最長6ヵ月までは生存可能で、欠損部は1~2週で線維性再生組織により被覆され、術後2ヶ月の段階で欠損部には平均50%程度の気管狭窄が発生する(図2)。今回は、この過程を詳細に検討するために、術後1,2,3,4,6,8週毎に家兎を犠牲させ気管欠損部被覆組織を採取し、次の生化学的実験を行う。

### (2) 摘出標本の免疫組織学的ならびに生化学的検索

気管欠損部修復過程に関与する成長因子としてbFGF, TGF- $\beta$ , VEGF-A, EGF, p70S6K (mTORシグナル系)などの発現を免疫組織学的に検索し、各摘出時期別に発現している成長因子を同定する。免疫組織染色で発現があった因子に関しては、PCRとWestern blotでその発現の程度を検索する。被覆部の肉芽や線維組織は様々な細胞成分で構成されていることにも留意し、F4/89染色(マクロファージ)、pan reicular染色(線維芽細胞)、CD4/8染色(リンパ球)、サイトケラチン8染色(気管支由来上皮細胞)、平滑筋アクチン、CD10、あるいはカルポニン染色(気管支由来平滑筋)なども適宜追加検索する。vimentinによる基底膜形成状態、RAM11によりマクロファージ浸潤も検討する。

### (3) in vivoにおける自然修復機構調節法の確立



前述の家兎気管大欠損モデルを用いて、修復機構に關与する成長因子や阻害因子の抗体などを外因性に投与し、全身的副作用、自然修復機構への影響を検討する。家兎は、薬剤投与後2週目に犠死させ狭窄の評価と摘出標本の免疫組織学的ならびに生化学的検査を行い、薬剤の効果を検討し、最適な修復過程導出法を確立する。

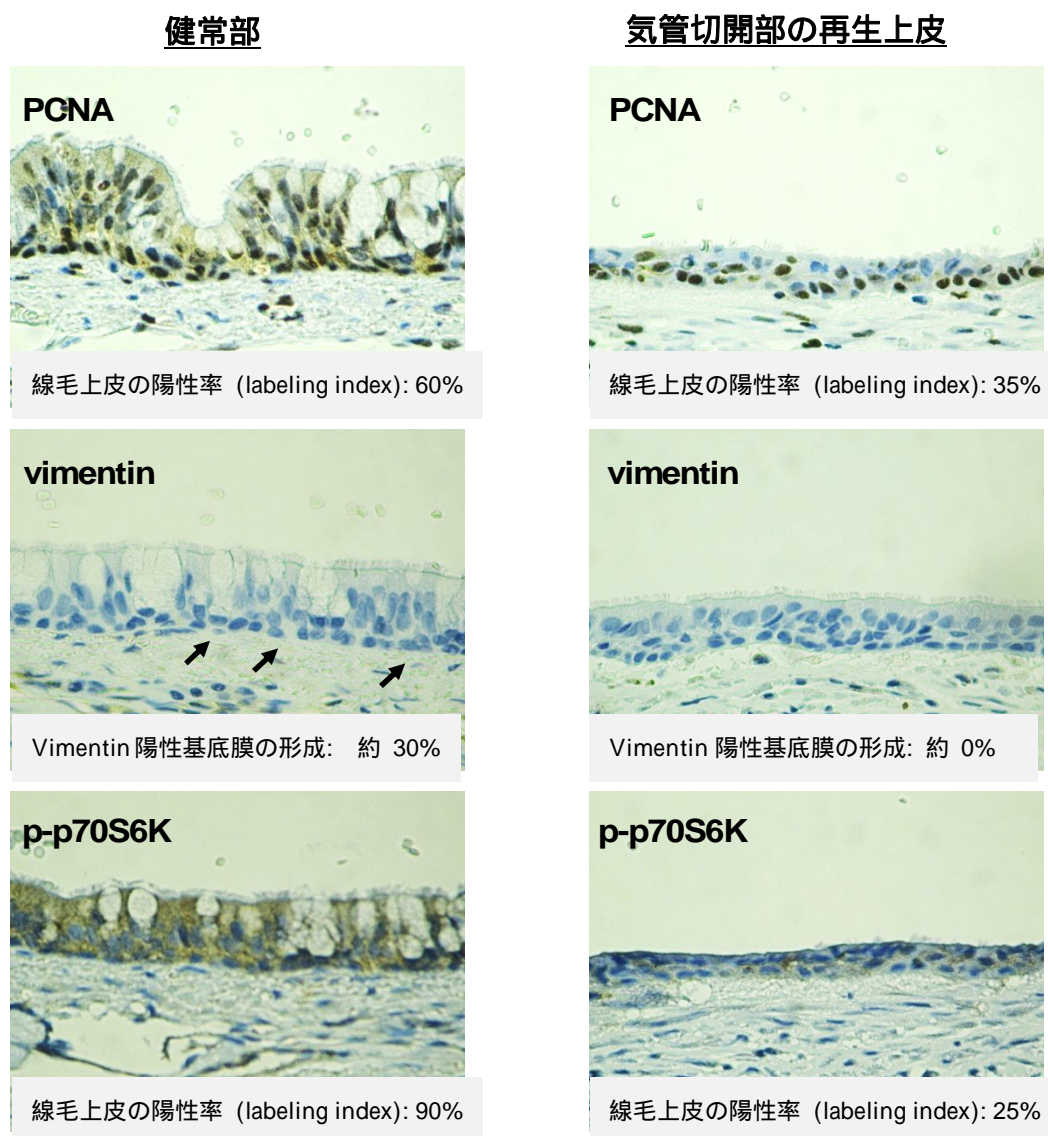
#### 4. 研究成果

##### (1) 自然修復過程の免疫組織学的ならびに生化学的検査

1週後の気管切開部には炎症組織のみを認め肉芽形成はなく、炎症組織の気管上皮再生率は $5.8 \pm 10\%$ と非常に乏しい状態で、粘膜下組織(基底膜)の再生も認められなかった。一方、2週後になると、8割で炎症組織の中に肉芽形成を認め、気管上皮の再生は極めて良好で、気管切開部の殆どの領域が上皮で被覆され、上皮被覆率はほぼ100%であった。3週後の状態は、同じく上皮被覆率は100%であるが、肉芽組織は消失し、急性期の治癒過程がほぼ終了している状態と考えられた。

一方、免疫組織学的検討では、PCNA(増殖細胞マーカー)、Vimentin(間葉系細胞マーカー)、P-p70S6K(mTORシグナル経路因子)を用いてそれぞれ細胞増殖、基底膜形成、mTOR活性を調べたが、上皮化の完成する2週後の健常部と再生部のlabelling index(LI)は、PCNA、vimentin、p-p70S6Kのそれぞれにおいて、 $70 \pm 14\%$  vs.  $40 \pm 4\%$  ( $p=0.011$ )、 $33 \pm 5\%$  vs.  $4 \pm 5\%$  ( $p=0.006$ )、 $93 \pm 5\%$  vs.  $31 \pm 23\%$ と有意に低値を示した。このことは、正常上皮に比べ細胞活性が低下した状態で気管欠損部修復が営まれているものと結論された。

図3. 手術後2週目の摘出標本のPCNA、vimentin、p-p70S6Kを用いた組織免疫染色。



##### (2) TNF の阻害効果とソマトスタチン単独投与の効果

抗ヒトTNFモノクローナル抗体投与群(A群: 3mg/kgを1時間で静脈内投与し2週後に気管開窓)とソマトスタチン類似作用化合物投与群(B群: 30μg/kg筋注し4週後に開窓、開窓時に50μgを皮下追加投与)では、両群ともに肉芽形成は抑制されるものの、A群では局所炎症



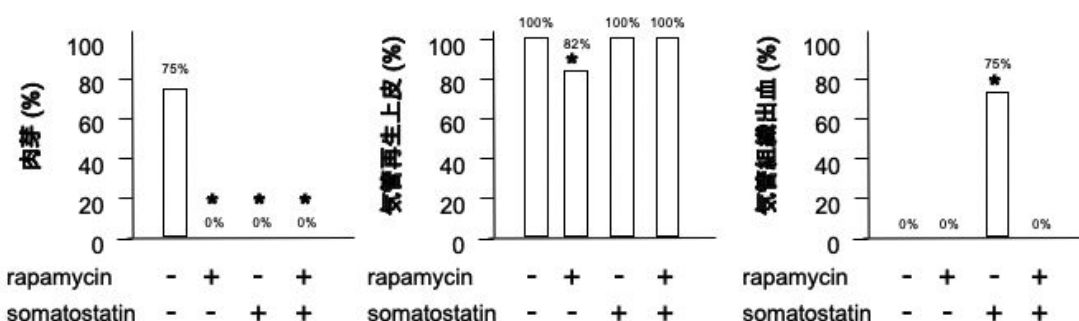
細胞浸潤と炎症組織が開窓部に発生し、免疫抑制効果による易感染性が惹起され、B 群では、75%に気管内出血という重篤な副作用が発生した。

### (3) ソマトスタチンとラパマイシンの併用投与の効果

ソマトスタチン類似作用化合物(前年の半量)とラパマイシン(細胞内 mTOR シグナル活性を抑制し肉芽形成を阻害する; 0.5 mg/kg を開窓 1 週後より隔日 3 回投与)の併用療法を試みた。ラパマイシン単独投与では、肉芽の発生は抑制できるが、気管上皮の再生率も低下した。ラパマイシンとソマトスタチンの単独投与では、肉芽発生は完全に抑制できた。ラパマイシンは、mTOR-p70S6K 経路を抑制することで、間葉系細胞の増殖を抑えたものと考えられる。ソマトスタチンは上皮系細胞の有意な増殖を促進したと考えられる。一方、ラパマイシン単独投与は組織の脆弱化と治癒機転の遷延化をもたらされ、ソマトスタチン単独投与では、75%において気管組織からの出血という重篤な副作用が生じた。ソマトスタチンとラパマイシンの併用投与は、肉下発生もなく、気管上皮の再生率も低下せず、単独投与時の重篤な副作用もなく、気管上皮の再生を促すことができる手法と考えられた(図4)。

二剤の使用量を減少させた投与法は、副作用の発生を抑え、肉芽形成のない気管上皮再生機構修復が可能と結論され、薬剤による安全な治癒機転誘導が可能と結論された。

図4 . ラパマイシン、ソマトスタチンの単独投与と併用投与の効果



## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Masayuki Kubota, Yutaka Osuga, Kiyoko Kato, (他 22 名), Treatment guidelines for persistent cloaca, cloacal exstrophy, and Mayer-Rokitansky-Küster-Häuser syndrome for the proper transitional care of patients, Surgery Today, 査読有, 2019, epub ahead,

DOI: 10.1007/s00595-019-01810-z

Masayuki Kubota, The current profile of persistent cloaca and cloacal exstrophy in Japan: the result of a nationwide survey in 2014 and a review of the literature, Pediatr Surg Int, 査読有, vol.33, 2017, 505-512

DOI: 10.1007/s00383-016-4053-4

[学会発表](計 5 件)

窪田 正幸、松田 康伸、家兔気管大欠損モデルにおける代用気管と欠損部再生様式、特別企画 気管再生研究 up-to-date、第 28 回日本小児呼吸器外科研究会、2017.10.27、川崎市

Masayuki Kubota, Current status of vaginoplasty in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Häuser syndrome incidentally diagnosed in childhood due to other diseases, 50th Annual Meeting of Pacific Association of Pediatric Surgeons, 2017.5.30 Seattle, USA

Masayuki Kubota, Treatment guidelines for persistent cloaca, cloacal exstrophy and Mayer-Rokitansky-Küster-Häuser syndrome for the proper transitional care of the patients, 50th Annual Meeting of Pacific Association of Pediatric Surgeons, 2017.5.30 Seattle, USA

窪田 正幸、総排泄腔遺残症と総排泄腔外反症の円滑な成人期医療移行に向けて：全国調査とガイドライン作成、第 52 回日本周産期・新生児医学会、2016.7.17、富山市

Masayuki Kubota, The current profile of persistent cloaca and cloacal exstrophy in Japan. The result of a nationwide survey in 2014, 24th Congress of the Asian Association of Pediatric Surgeons, 2016.5.24, Fukuoka

〔図書〕(計 1 件)

窪田 正幸、先天性難治性稀少泌尿器疾患群（総排泄腔遺残症、総排泄腔外反症、MRKH 症候群）におけるスムーズな成人期医療移行のための分類・診断・治療ガイドライン、メジカルビュー社、東京、2017、pp. 1-117  
ISBN978-4-7583-1265-3 C3047

〔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：  
国内外の別：

取得状況(計 1 件)

名称：代用気管  
発明者：窪田 正幸  
権利者：国立大学法人新潟大学  
種類：特願  
番号：2013-556226  
取得年：平成 29 年 2 月 17 日  
国内外の別：国内外

〔その他〕

ホームページ等

[https://www.med.niigata-u.ac.jp/psu/psu/yan\\_jiu\\_huo\\_dong/yan\\_jiu\\_huo\\_dong.html](https://www.med.niigata-u.ac.jp/psu/psu/yan_jiu_huo_dong/yan_jiu_huo_dong.html)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：松田 康伸  
ローマ字氏名：MATSUDA, yasnobu  
所属研究機関名：新潟大学  
部局名：医歯学系  
職名：准教授  
研究者番号(8桁)：40334669

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。