

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659773

研究課題名(和文) 家兔気管欠損ステント治療モデルにおける周囲肉芽と細胞増殖 / mTORシグナル解析

研究課題名(英文) Effects of rapamycin on granulation formation in response to centrally-doubled coiled stents as a tracheal substitute.

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： 独自開発した超弾性代用気管コイルの有用性を高めるため、コイル周辺に形成される肉芽組織を抑制する方策を検討した。線維化に関する細胞内mTORシグナルに注目し、家兔気管欠損モデルで肉芽組織内発現を検討したところ、20～40倍にmTOR活性は亢進し、mTORシグナルを抑制するラパマイシ投与により、5～15倍程度に発現が抑制された。しかし、術前からの投与では肉芽組織は病的な半液性に変化し呼吸器感染等を惹起するため、投与方法を検討し術後2週より投与することで、この問題を克服できた。また、気管欠損部の修復機転には、細胞増殖活性低下など障害された機転が存在し、これらを改善することが次の方策と考えられた。

研究成果の概要(英文)： In order to prevent a formation of granulation tissue around the original artificial trachea, made of super-elastic wire, mTOR signal system in the granulation tissue was examined using rabbit tracheal defect model. In granulation tissue, mTOR activity was increased up to 20-40 folds in comparison with tracheal epithelium. Application of rapamycin, which blocked the mTOR signal system, partially blocked the mTOR activation. At the same time, the granulation tissue changed into the pathological condition, which induced respiratory infection. We have examined the proper method of application of rapamycin and it was found that the application of rapamycin starting from the 2 weeks after operation induced the favorable results. It is also suggested that the natural healing process of the tracheal wall defect is compromised and obtaining an improvement in this healing process should be one of the treatment strategies for tracheal pathologies.

研究分野：小児外科

キーワード：mTOR rapamycin trachea tracheal substitute coil tracheal defect granulation

## 1. 研究開始当初の背景

小児外科領域において適切な気管形成術は未解決な領域で、今後の新たな展開が求められている。

気管欠損モデルにおいて人工物を用いた気管形成実験は、人工ポリマーが開発された1950年代から1970年にかけてマーレックスメッシュ、ナイロン、テフロン、シリコンなど種々の素材を用いたチューブが試され、さらにガラスやステンレスチューブなどの金属が試されたが、肉芽形成に伴う感染を克服できず、それ以降 bio-material や tissue engineered material に研究がシフトしている。

一方、家兎を用いた気管欠損モデル実験では、欠損部をそのまま放置した場合、欠損孔は1~2週のうち繊毛上皮で裏打ちされた薄い線維性被膜で覆われ治癒し、気漏や呼吸障害を来すことはない。しかし、気管軟骨や平滑筋の再生はなく、欠損孔の大きさに比例した気管狭窄が問題となる。そこで、気管内に代用気管ステントを留置することで狭窄を来さず線維性被膜で欠損孔を被覆させることができれば新しい治療法の開発に繋がると考え、長期間弾性を保つチタン・ニッケル形状記憶合金ワイヤーに注目し、種々の形状のワイヤーを代用気管として用い、その効果を検討してきた。これらの研究は、平成20年度「シーズ発掘試験」「チタン形状記憶合金ステントを用いた気管欠損閉鎖法の開発」と研究成果最適展開支援事業 A-STEP FS ステージ探索タイプ平成22年度「家兎における代用気管としての形状記憶合金コイルの有用性の検討」の課題で研究助成を受けた。

継続したこれら研究を通じて家兎の気管欠損モデルにおいて、チタン・ニッケル合金ワイヤーを用いた紡錘形コイル(図1)による代用気管内ステント治療法を開発したが、ステント周囲の肉芽形成のため内腔の狭窄または閉塞が不可避免的に発生した。現在まで、種々に工夫することで生存率の改善が得られてきたが、未だに長期生存率は60%程度に留まっている。



図1. 超弾性コイルを用いた紡錘形コイル・プロトタイプモデル。出荷時の状態を示す。実際の実験には、両端のワイヤーを切除して用いる。

これらの研究を通じて金属代用気管のような異物の存在下では、ステントの形状を工夫しても、肉芽の形成を完全に予防することは不可能と結論された。そこで新しい戦略として、近年肉芽形成に関与しているとされる細胞内 mTOR シグナル系の解析を行い、肉芽組織の産生に mTOR シグナルが関与しているのであれば、活性化されたシグナルを mTOR 阻害薬であるラパマイシンで抑制することで、肉芽形成のない代用気管を用いた自然欠損孔閉鎖が可能であるとの発想に至った。

## 2. 研究の目的

今回は、肉芽形成に関与すると考えられている細胞増殖 / mTOR シグナル系に注目し、家兎気管大欠損モデルにおいて mTOR シグナル解析を行い、肉芽形成における mTOR シグナル系の関与を明らかにする。次に、mTOR 阻害薬であるラパマイシンを投与し、どの投与方法が最も効果的な肉芽予防効果を有するかを検討し、最終的に、最も臨床応用可能な代用気管ステントの理論と手技を提唱する。

## 3. 研究の方法

### (1) 家兎気管大欠損モデルの作成

体重 2.5kg 前後、週齢 12-13 の白色家兎 (Kbt: JW rabbit, Biotik Company, Tosu, Japan) を、動物用ケタラール (35 mg /kg) とキシラジン (5 mg /kg) を筋注し、自発呼吸の維持された全身麻酔状態とする。頸部気管を露出し、6 軟骨輪の長さで渡って気管前半部を摘出し、気管大欠損モデルとする。欠損部に留置するコイルステントは、直径 0.4mm のチタン・ニッケル合金超弾性ワイヤーで、ソルブ社に依頼し、中心最大系 6mm 両端径 4mm、長さ 2cm の家兎にあったコイル形状としている。動物実験では、コイルの形状をさらに工夫し、生存率の向上がえられるか否かも検討する。実験計画は、学内倫理委員会の審査と承認を受けている。

### (2) 生化学的実験方法

この気管大欠損部に発生する肉芽組織を用いて次の免疫組織染色、Westernblot 解析、PCR 解析を行う。

免疫組織染色：プロテアーゼ・フォスファターゼ阻害剤添加パラホルムアルデヒドに肉芽組織を 18 時間固定後、以下の蛍光免疫組織染色を行う。

i) 細胞周期の解析:PCNA(細胞周期 G2-S 期)、サイクリン D1・リン酸化サイクリン依存性キナーゼ 4/6 (G2 期)、サイクリン B (G2/M 期)、リン酸化 cdc2(M期)の組み合わせを行う。肉芽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(繊維芽細胞)、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、あるいはカルボニン染色(気管支由来平滑筋)で各々 2 重染色を行い、各細胞における増殖の差異を検討して、気管ステントによる肉芽反応に最も関与する可能性のある細胞群の同定に努める。

ii) mTOR シグナル系の解析: mTOR を構成するキナーゼ因子群のリン酸化状態を免疫染色によって観察する。次の因子が染色可能である。phospho-Akt (Thr308), phospho-Akt (Ser473), phospho-m-TOR (Ser2448), phospho-STAT3 (Tyr705), phospho-S6RP (Ser240-244)。

Western blot 解析: 家兎気管の一部を輪切りにして、サクリファイス時に直ちに液体窒素に凍結し、柔プラスチック小容器内でハンマー破碎し、タンパク抽出を行う。小動物においては、軟骨成分や肉芽の繊維組織は、同操作によって容易にタンパクを抽出できる。得られたサンプルは Western blot 解析を行い、phospho-Akt (Thr308), phospho-Akt (Ser473), phospho-m-TOR (Ser2448)のリン酸化レベルを計測することによって、肉芽が出現する前後の、どの時期から mTOR 経路が活性化されるのかを観察する。

PCR 解析: 上記の実験で、免疫染色・Western blot で発現量の変化が確認された因子について、遺伝子レベルから増減しているのかを観察する目的で、得られた組織・器官培養サンプルから RNA 抽出を行い、RT-PCR 解析を行う。

#### 4. 研究成果

(1) コイルの形状工夫による生存率の向上  
気管大欠損部モデルにおいて、気管欠損部に相当する中心部分に、コイル外部にさらにコイルをまきつけ中心部二重紡錘形コイルを開発した(図 2)。欠損部を二重とすることで、コイルに接触する部分に発生する肉芽組織の内腔への落ち込みを防止するためであるが、この二重コイルにおいては、術後 2 ヶ月の生存率を 100%に向上させることができた。

さらに、気管欠損部に相当する部分にこの二重コイルがフィットすることで、コイルを気管に縫着する必要がなくなり、結紮糸に発

生する肉芽を抑制することができた。この縫合操作を省略できたことも、生存率の向上に大きく関与していた。



図 2. 中心部二重コイル・出荷時の状態。実験においては、コイルの両端に伸びるワイヤーを切除して用いる。

次の組織学的実験には、この二重コイルにおいて気管欠損部に発生する肉芽組織を検討した。

#### (2) 肉芽組織における mTOR の発現

肉芽組織における mTOR (Ser2248)活性、その下流に位置する p70S6K、S6RP 活性は、気管と比較して 20-40 倍にリン酸化が上昇し、肉芽組織内において mTOR シグナル系が活性化されていることが明らかにした(図 3)。同時に、免疫組織検査で、肉芽組織内の線維芽細胞に mTOR 活性が高発現していた。

#### (3) ラパマイシン投与による影響

次に、ラパマイシン 0.5mg/kg を術前 1 週間前より週 3 回に渡り筋肉内投与を行い、その効果を検討した。

ラパマイシンを投与された家兎では、1 ヶ月後の内視鏡検査では、欠損部に相当する部分に半月状の肉芽形成がラパマイシン非投与ラットと同様に観察されたが、術後 2 ヶ月時に両群で肉芽組織の性状に相違が認められた。ラパマイシン非投与家兎では、陳旧化し乾燥した肉芽という陳旧化した病変となるが、2 ヶ月時においても柔らかい液状の肉芽組織のまま、同時に呼吸器感染が 60%で認められた。創感染を示唆する皮下膿瘍組織も 60%に認められた。

一方、肉芽組織における mTOR 発現は、5~15 倍に低下していた(図 3)。

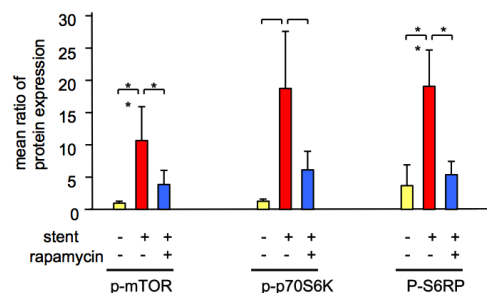


図 3. 肉芽組織における mTOR 活性. 気管組



織における発現（黄色） 肉芽組織における発現（赤） ラパマイシン投与時（青）。

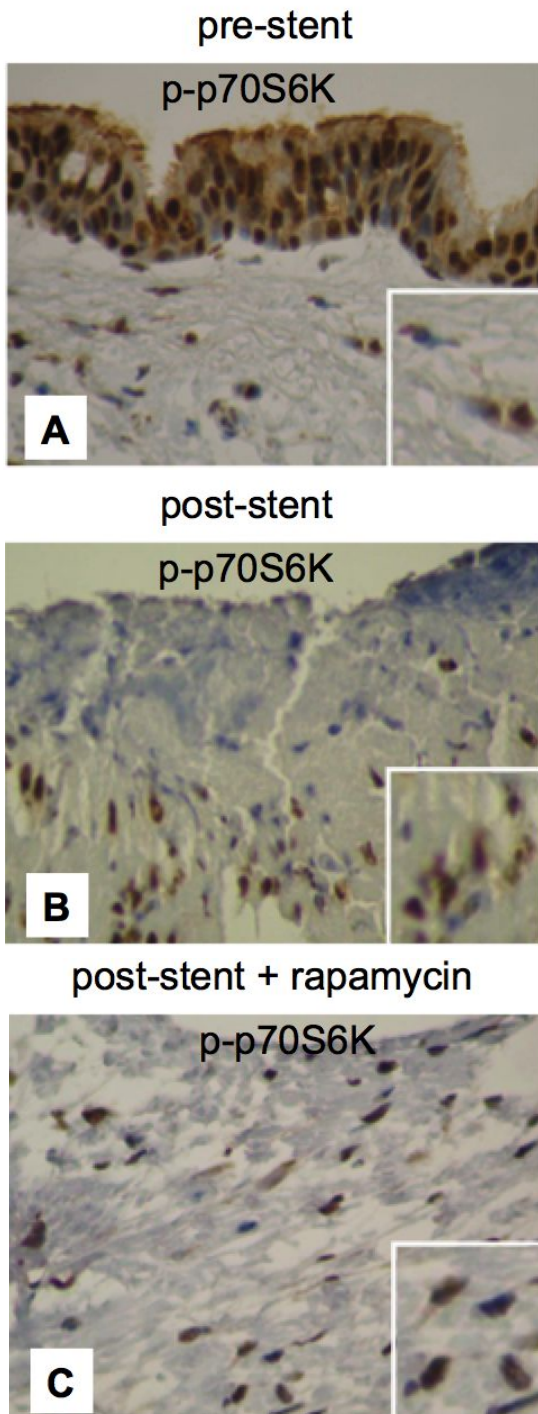


図4 . p-p70S6K (mTOR の下流シグナル) 染色を用いた mTOR 活性局在 . A . 正常気管、B . 気管欠損部肉芽組織、C . ラパマイシン投与後の肉芽組織。正常気管では、気管上皮に発現があり、肉芽組織内にも高発現している。ラパマイシン投与により、肉芽組織内の染色 (+) 細胞が減少している。

(4) ラパマイシン投与時期・投与法の検討  
ラパマイシン投与により、肉芽組織が固形化しない変化した肉芽組織となることより、投与時期により影響を検討した。

心移植で免疫抑制剤としてラパマイシンを用いる場合は、縫合不全や深部感染を予防するため術後2週以降に投与されている。そこで、ラパマイシンを術後2週より投与したところ、呼吸器感染と肉芽形成は抑制され上皮化も良好で、投与時期を術後2週間後からとすることで、ラパマイシンの肉芽予防効果が易感染性を惹起することなく、獲得できることを明らかにした。

また、代用気管コイルにラパマイシンを浸漬させラパマイシンの局所応用を検討したが、欠損部を被覆する肉芽組織の繊毛上皮化がおきず、局所投与における問題点を明らかにできた。

従って、今回の家兔を実験において、人工代用気管コイルを用いる場合、術後2週間経過した後に、全身投与することが、肉芽組織抑制、肉芽組織の上皮化に有用と結論された。

(5) 気管欠損部の自然修復機構の検討

気管欠損部をそのまま残して閉鎖した場合、家兔は問題なく生存し、欠損部は薄い線維性被膜で被覆される。この被膜の組織学的検索も行ったが、PCNA 染色による labeling index は低下し、vimentin 染色でも基底膜の形成不良が確認された。mTOR 活性には変化がなく、自然修復過程には、改善の余地があり、今後の研究課題であると考えられた。

## 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12件)

Kubota M, Nakaya K, Arai Y, Ohyama T, Yokota N, Nagai Y.

The area and attachment abnormalities of the gubernaculum in patients with undescended testes in comparison with those with retractile testes.

Pediatr Surg Int 査読有 30, 2014, 1149-1154

DOI: 10.1007/s00383-014-3597-4

Matsuda Y, Sanpei A, Wakai T, Kubota M, Osawa M, Hirose Y, Sakata J, Kobayashi T, Fujimaki S, Takamura M, Yamagiwa S, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y.

Hepatitis B virus X stimulates redox signaling through activation of ataxia telangiectasia mutated kinase.

Int J Clin Exp Pathol 査読有 7, 2014,

2032-2043  
DOI: 無  
Matsuda Y, Wakai T, Kubota M, Osawa M, Hirose Y, Sakata J, Kobayashi T, Fujimaki S, Takamura M, Yamagiwa S, Aoyagi Y.  
Valproic acid overcomes transforming growth factor-beta-mediated sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 査読無, 7, 2014, 1299-1313  
DOI: 無  
Kubota M, Matsuda Y, Fujimaki S, Osawa M, Wakai T, Nakaya K  
Effects of rapamycin on granulation formation in response to centrally-doubled coiled stents as a tracheal substitute. *J Pediatr Surg* 査読有, 48, 2013, 2416-2424  
DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2013.08.013  
Matsuda Y, Wakai T, Hirose Y, Osawa M, Fujimaki S, Kubota M.  
p27 Is a critical prognostic biomarker in non-alcoholic steatohepatitis-related hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Sci* 査読有, 14, 2013, 23499-23515  
DOI: 10.3390/ijms141223499  
Matsuda Y, Wakai T, Kubota M, Osawa M, Sanpei A, Fujimaki S.  
Mycotoxins are conventional and novel risk biomarkers for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 査読有, 19, 2013, 2587-2590  
DOI: 10.3748/wjg.v19.i17.2587  
Matsuda Y, Wakai T, Kubota M, Osawa M, Takamura M, Yamagiwa S, Aoyagi Y, Sanpei A, Fujimaki S.  
DNA damage sensor -H2AX is increased in preneoplastic lesions of hepatocellular carcinoma. *Scientific World Journal*, 査読有, 2013, 597095  
DOI: 10.1155/2013/597095  
Matsuda Y, Wakai T, Kubota M, Takamura M, Aoyagi Y, Osawa M, Fujimaki S, Sanpei A, Genda T, Ichida T.  
Clinical significance of cell cycle inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Med Mod Morphol*, 査読有, 46, 2013, 185-192  
DOI: 10.1007/s00795-013-0047-7  
Ohashi T, Wakai T, Kubota M, Matsuda Y, Arai Y, Ohyama T, Nakaya K, Okuyama N, Sakata J, Shirai Y, Ajioka Y: Risk of

subsequent biliary malignancy in patients undergoing cyst excision for congenital choledochal cysts. *J Gastroenterol Hepatol*, 査読有 28, 2013, 243-247  
DOI: 10.1111/j.1440-1746.2012.07260.x  
Sato M, Matsuda Y, Wakai T, Kubota M, Osawa M, Fujimaki S, Sanpei A, Takamura M, Yamagiwa S, Aoyagi Y.  
P21-activated kinase-2 is a critical mediator of transforming growth factor-b-induced hepatoma cell migration. *J Gastroenterol Hepatol*, 査読有, 28, 2013, 1047-1055  
DOI: 10.1111/jgh.12150  
Kubota M, Wakai T, Okuyama N, Kobayashi K, Sato K, Nakaya K, Arai Y, Ohyama T.  
Tracheoplasty using a metallic fusiform centrally-doubled coiled stent for a major tracheal defect in rabbits. *J Pediatr Surg*, 査読有, 47, 2012, 2234-2238  
DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2012.09.01  
Fujimaki S, Matsuda Y, Wakai T, Sanpei A, Kubota M, Takamura M, Yamagiwa S, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y.  
Blockade of ataxia telangiectasia mutated sensitizes hepatoma cell lines to sorafenib by interfering with Akt signaling. *Cancer Letters*, 査読有, 319, 2012, 98-108  
DOI: 10.1016/j.canlet.2011.12.043

[学会発表](計10件)

Kubota M, Matsuda Y, Osawa M, Wakai T, Kobayashi T.  
Compromised natural healing process of large tracheal wall defects in rabbits. 48th Annual Meeting of Pacific Association of Pediatric Surgeons. Jeju (Korea) May 17 - 21, 2015 (Oral poster presentation on May 18)  
窪田正幸.  
筑波大学「ITを利用した小児周産期の高度医療人養成」小児外科シリーズ第15弾 家兔における超弾性合金コイルを用いた代用気管と周囲肉芽組織内mTOR活性. 筑波大学医学臨床講義室(茨城県・つくば市)平成27年2月6日  
窪田正幸, 松田康伸, 藤巻 隼, 大澤まみ, 若井俊文, 仲谷健吾.  
家兔における代用気管としての中心部二重コイルと周囲肉芽形成に対するラパマイシンの効果.  
第25回小児呼吸器外科研究会、秋葉原コ

ンベンションホール(東京都・千代田区神田)

平成 26 年 10 月 25 日(口演)

Kubota M, Nakaya K, Arai Y, Ohyama T, Yokota N.

The area and attachment abnormalities of the gubernaculum in patients with undescended testes.

47th Annual Meeting of Pacific Association of Pediatric Surgeons. Banff(Canada) May 25 - 29, 2014.

(Full oral presentation on May 29)

Kubota M, Matsuda Y, Fujimaki S, Osawa M, Wakai T, Nakaya K.

Effects of rapamycin on the granulation formation in response to using a centrally-doubled coiled stent as a tracheal substitute.

46th Annual Meeting of Pacific Association of Pediatric Surgeons.

Hunter Valley (Australia), April 7 - 11, 2013 (Full oral presentation on April 11)

Kubota M, Okuyama N, Sato K, Nakaya K, Arai Y, Oyama N.

Clinical outcomes of I-cyst BA patients based on the findings of intraoperative cholangiography.

46th Annual Meeting of Pacific Association of Pediatric Surgeons.

Hunter Valley (Australia), April 7 - 11, 2013 (Poster presentation on April 8)

Kubota M, Okuyama N, Kobayashi K, Sato K, Nakaya K, Arai Y, Ohyama N.

Longitudinal anterior wall approximation to reduce tension in end-to-end anastomosis of the esophagus during TEF surgery.

23rd Congress of Asian Association of Pediatric Surgeons. Seoul (Korea), October 8 - 10, 2012 (Oral presentation on October 8)

Kubota M, Okuyama N, Kobayashi K, Sato K, Nakaya K, Arai Y, Ohyama N.

Intrathoracic kidney as a postoperative complication in patients with left congenital diaphragmatic hernias.

23rd Congress of Asian Association of Pediatric Surgeons.

(Seoul) Korea, October 8 - 10, 2012, (Oral presentation on October 8)

Kubota M, Okuyama N, Kobayashi K, Sato K, Nakaya K, Arai Y, Oyama N.

Tracheoplasty using a fusiform metallic coil with a centrally double coiled for a major tracheal defect in rabbits.

45th Annual Meeting of Pacific

Association of Pediatric Surgeons. Shanghai (China), June 3 - 7, 2012 (Full oral presentation on June 7)

Kubota M, Okuyama N, Kobayashi K, Sato K, Nakaya K, Arai Y, Oyama N.

Maternal issues accounting for the increasing tendency of low birth weight patients in neonatal surgery.

45th Annual Meeting of Pacific Association of Pediatric Surgeons.

Shanghai (China), June 3 - 7, 2012 (Poster presentation on June 3)

〔図書〕(計6件)

窪田正幸, E. 全身疾患の消化管病変・その他の消化管疾患 8 その他の良性・悪性腫瘍, 小児栄養消化器肝臓病学, 診断と治療社, (松井 陽編), 363-366, 2014 年

窪田正幸, F. 腸間膜・腹壁疾患 6 腹壁破裂, 臍帯ヘルニア, 小児栄養消化器肝臓病学, 診断と治療社, (松井 陽編), 363-366, 2014 年

窪田正幸, 低出生体重児の術後合併症と術前術後管理. 低出生体重児の外科, 永井書店, 窪田昭男編, 92-97, 2013 年

窪田正幸, 梨状窩瘻・嚢胞の手術, スタンダード小児外科手術, メジカルビュー社 (田口智章, 岩中 督) 監修, (猪俣裕紀洋, 黒田達夫, 奥山宏臣) 編集, 72-73, 2013 年

窪田正幸, 第 12 章外科治療 小児慢性機能性便秘症診断ガイドライン, 日本小児栄養消化器肝臓学会, 日本小児消化管機能研究会, 64-67, 2013 年

窪田正幸, Hirschsprung 病, Hirschsprung 病類縁疾患, 標準小児外科 第 6 版, 伊藤泰雄, 高松 英夫, 福澤 正洋 (編集), 医学書院, 190 - 200, 2012 年

## 6. 研究組織

### (1) 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: 5 0 2 0 5 1 5 0

### (2) 研究分担者

松田 康伸 (MATSUDA, YASUNOBU)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号: 4 0 3 3 4 6 6 9