

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08786

研究課題名(和文)非抗原性ブタ気管細胞外マトリックスを用いた異種気道手術材料の開発

研究課題名(英文)Development of heterologous airway surgical material using non-antigenic porcine tracheal extracellular matrix

研究代表者

呉 哲彦 (Go, Tetsuhiko)

香川大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50313656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：イヌ頸部気管を切除し、脱抗原化したブタ気管細胞外マトリックスを管状にして移植した。グラフトの低剛性のため、グラフトのみでは内腔の開存を維持することが困難であった。内腔にステントを留置することで内腔の開存を維持することが可能となった。全例免疫抑制剤を使用しなかったが最長2年の経過で明らかな拒絶反応は認めなかった。摘出標本の病理組織としてはグラフトの上皮化は不十分であった。b-FGFを用いても明らかな上皮化の改善は認めなかった。今後の課題として、グラフトの剛性保持、上皮化、血流の回復が挙げられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

呼吸器系手術において生じる気管、気管支レベルでの気道欠損は治療が困難であり、結果として生命の危機を引き起こしかねない。手術での欠損部または過切除範囲を補填しこれを可能にする医療材料、技術の開発がなされてきたが未だ十分とは言えない。本研究にてDetergent enzyme method (DEM) により作製された管状のブタ気管細胞外マトリックスが気道修復材料として実臨床にて使用できるようになれば、ブタは安定供給が可能であるため、材料生産という意味での供給面での問題は解決されることになる。また異種移植であるが、材料は脱抗原化しており免疫抑制剤を用いる必要性がないことも大きな利点である。

研究成果の概要(英文)：The canine cervical trachea was resected and the deantigenated porcine tracheal extracellular matrix was tubularized and transplanted. It was difficult to maintain the patency of the lumen with the graft alone, probably because of the low rigidity of the graft. By placing a stent in the lumen, it became possible to maintain the patency of the lumen. All patients did not use immunosuppressants, but no obvious rejection was observed after a maximum of 2 years. The epithelialization of the graft was insufficient as the histopathological tissue of the excised specimen. No obvious improvement in epithelialization was observed with the use of b-FGF. Future tasks included maintaining the rigidity of the graft, epithelialization, and restoration of blood flow.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：気管移植 気管再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

呼吸器系手術において生じる気管、気管支レベルでの気道欠損は治療が困難であり、結果として生命の危機を引き起こしかねない。手術での欠損部または過切除範囲を補填しこれを可能にする医療材料、技術の開発がなされてきたが未だ十分とは言えない。研究代表者は Detergent enzyme method (DEM) により作製されたブタ気管細胞外マトリックス (extracellular matrix : ECM) (Conconi MT, et al. Transpl Int 2005) が抗原性を有さずかつ臨床応用の可能性 (柔軟性、気密性、組織適合性に優れる点) があることに注目し、平成 24 年度の科研研究を通して、このブタ由来 ECM が気道修復材料として使用可能であることを示した。この時点で問題であったのは上皮化の促進であった。一方、修復材料はパッチとしてのみならず、管状構造 (tubular) としての材料も実臨床では必要とされている。本研究で問われるのは、前回課題であった ECM 上の上皮化の促進が図れるのか、かつ管状材料としての ECM が臨床で応用可能であるのかどうかである。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は臨床応用可能な気道手術材料の開発であり、前回のパッチとしての形態から管状の材料へとさらに実臨床に則した形態を考えている。実際の気道手術に応用する材料としては、生体適合性、手技での使いやすさ、気道上皮化の促進、材料としての供給安定が課題となる。国内外において人工気管や気道補填材料の開発がなされ報告されているが、その材料上での上皮化の不十分さや、材料自体の気密性の不足と過度の剛性が実臨床への応用がすすまない理由である。本研究で用いる ECM は生体材料から作製したブタコラーゲン基質を基礎としたものであり、その伸縮性を含めた取り回しの良さや、気密性はすでに実証済である (Jungebluth P, Go T, et al. JTCVS 2009 ; Go T, et al. JTCVS 2010)。管状とした場合課題は剛性となるが これは短期のステント留置で解消が可能性である。また用いる ECM は抗原性を有さないため移植材料として考えた場合も免疫抑制剤等を用いる必要がない。本研究ではブタからイヌへの異種移植となるが、これが可能であればブタは安定供給が可能で材料生産という意味での実臨床における供給面での問題は解決される。

3. 研究の方法

(1) tubular ECM の作製

Detergent enzyme method (DEM ; Conconi MT, et al. Transpl Int 2005;18:727-734) によりブタ由来の気管マトリックスを作製する ; 採取したブタ気管を 4% sodium deoxycholate で 4 時間 ならびに DNase (1M NaCl, 2000KU DNase) にて 3 時間さらに 1 日の精製水内での保存の計 2 日を 1 サイクルとし、この DEM 17 サイクルにて脱細胞されたブタ由来の気管細胞外マトリックス (ECM) が作製される (図 1a、図 1b)。



図 1a

図 1b

このマトリックスの非抗原性ならびに柔軟性、強度については検証済みでありブタの native trachea と比べその物理的伸展強度については遜色ないことが証明されている

(Jungebluth P, Go T, et al. JTCVS 2009)。

(2) tubular ECM を用いた気管吻合術

全身麻酔下にイヌ頸部気管を 4cm 切除し 2cm の tubular ECM を移植する。切除気管と ECM の長さが異なるのはイヌの気管の伸展性から移植した ECM に適度な緊張が加わり呼吸に伴う陰圧からの内腔狭窄が起きないようにするためである。経時的に気管支鏡にて同移植 ECM を観察し生着の成否、狭窄の有無を評価する。

(2)-a 移植 tubular ECM の狭窄がない場合

気管支鏡観察下に ECM 上の組織生検を行い宿主の反応、マトリックス上の上皮化を検討する。同時にイヌを犠牲死 (1, 3, 6, 12, 24 ヶ月) させ組織学的にマトリックス上の反応、変化 (粘膜再生、血管新生など) を評価する。

(2)-b tubular ECM の狭窄が生じる場合; 下記のス TENT 留置へ実験手順を変更

イヌ頸部気管を 4cm 切除し 2cm の tubular ECM を移植する。その際イヌ気管と ECM の末梢側を吻合後、吻合部を超えるようにシリコンス TENT を気道内に留置し、気管前壁を通してス TENT を縫合固定、その後 ECM 中枢側を縫合する。その後 (2)-a と同様に気管支鏡にて ECM 上の組織生検を行い宿主の反応、マトリックス上の上皮化を検討する。同時にイヌを犠牲死 (1, 3, 6, 12, 24 ヶ月) させ組織学的にマトリックス上の反応、変化 (粘膜再生、血管新生など) を評価する。

(3) bFGF、自己骨髄液にて ECM 上での気道の上皮化の促進

(3)-1 bFGF シートにて ECM 上での気道の上皮化の促進が図れるか

当初は血管新生、上皮化の促進因子である bFGF (basic fibroblast growth factor) をマイクロスフェア内に封入し使用する予定であったが、同程度の徐放が期待でき、作成のしやすさ、扱いやすさからマイクロスフェアではなくゼラチンシートへ変更した。

bFGF 徐放ゼラチンシートの作成

酸性ゼラチンに蒸留水を加え、室温で 30 分膨潤させる。40℃ で 30 分攪拌して溶解させ、5%ゼラチン水溶液を作成する。20ml ずつとりわけ、それぞれに 40ul のグルタルアルデヒドを加える。バランスディッシュ (80mm × 80mm) に 20ml ずつ流延し、室温で約 30 分静置してゲル化させる。12 時間以上 4℃ で冷却したあと、20mm × 80mm に切り分けて 0.1M グリシン水溶液 500ml 中に移し、1 時間静かに攪拌する。グリシン水溶液を蒸留水に置換し、室温で 1 時間ずつ 2 回攪拌したあと -80℃ で凍結乾燥させてゼラチンシートが完成する。EOS ガス滅菌したゼラチンシートに、2ug/uL の basic FGF 溶液を室温で 3 時間浸漬させ、bFGF 徐放ゼラチンシートを作成する。

bFGFゼラチンシートを管状ECMへ縫着

作成した bFGF 徐放ゼラチンシートを移植部位をほぼ全周性に覆うように管状 ECM の気管前壁、およびイヌ気管の口側、尾側の気管側壁へそれぞれ縫合固定を行う。その後、経時的に気管支鏡で内腔に狭窄を来していないか観察、確認を行う。上皮化の程度を評価するために以下の如くイヌを犠牲死させ、組織学的に ECM 上の評価 (粘膜再生、血管新生など) を行う。

(3)-2 上皮化を促進するもう一つの方法として宿主であるイヌの骨髄を用いる。

全身麻酔下に手術直前にイヌ腸骨骨髄を 15-20ml 採取しこれにパッチ状 ECM を浸し、このパッチをイヌ気管に作製した欠損部に縫着し、ECM の上皮化を肉眼、組織学的に検討する。上皮化が十分でない場合これに 2- 同様に bFGF を封入したマイクロスフェアの局注を加える。これは、骨髄中間葉系幹細胞と種々のサイトカインとの反応により細胞分化ならびに血管新生が促進され創傷治癒が促進される現象 (Bader A, et al. Rejuvenation Res

2010)に着目し、サイトカイン等による気道上皮の再生促進を期待して行う。

4. 研究成果

(1)tubular ECM の作成

DEM 法によるブタ気管の処理により長さ 6cm の細胞外マトリックスが作成した(図 1a)。これは平成 24 年度の科学研究と同様の ECM が得られており実験グラフトとして有効であった。

(2)tubular ECM を用いた異種同所移植

全身麻酔下にイヌ頸部気管を 4cm 切除し(図2a)欠損部位を作成し(図2b)、同部位へ2cmの tubular ECMを移植した(図2c)。

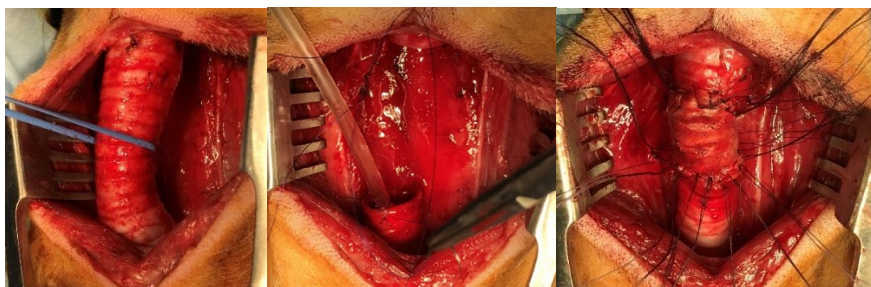


図 2a

図 2b

図 2c

コントロール群として 2 匹に対して上記移植後にステントを留置せずに経過をみたが、いずれも術後 7 日目に死亡していた。術直後から死亡まで特に症状は認めなかった。死亡後に気管支鏡にて確認した所、移植部位が完全に閉塞しており(図 3a : 移植手術直後、図 3b : 死亡時、いずれも気管支鏡下)、低剛性、マトリックスの脆弱性から気管閉塞に至り、窒息死したと考えられた。

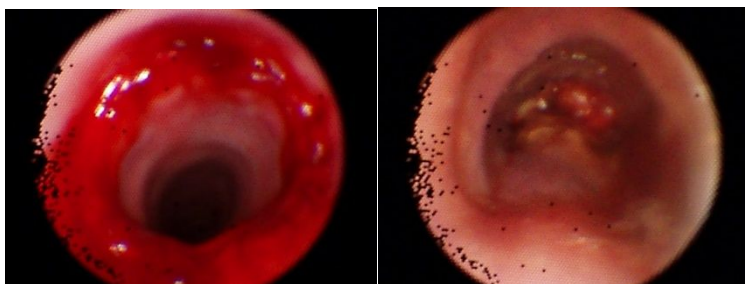


図 3a

図 3b

それ以後は実験を重ねても同様の結果になると判断し、いずれの実験にも内腔にシリコンステントを留置した。ステント留置群においてはステントによって剛性を保つことができ、内腔が狭小化することなく経過していた(図 4a : 術直後ステント留置口側、図 4b : 術後 4 か月ステント留置口側、図 4c : 術後 4 か月ステント留置尾側)。しかしながら、偶然ステントが喀出されたと考えられた 1 匹は術後 1 か月に突然死しており、ステントがなければグラフトの剛性を保つことができず、ステントなしでは気道が閉塞し生存が困難であると推定された。

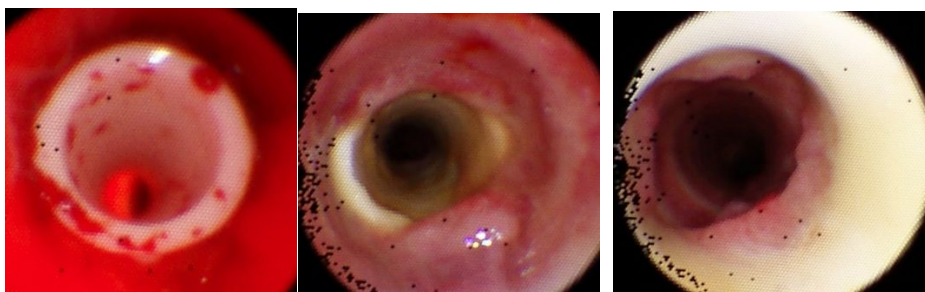


図 4a

図 4b

図 4c

脱抗原化したブタ気管をグラフトとしてイヌ気管への異種移植であったが、上記理由にて死亡した以外は経過は特に問題なく、最長2年間の観察期間内において明らかな拒絶反応と考えられるイベントは認めなかった。ホルマリン固定後の標本においてはグラフトは移植時2cmと比較して1cm程度にいずれも縮小していた(図5a: 矢印の範囲内がグラフト)。またHE染色では明らかな気道上皮の再生を軽度認めたが十分ではなかった(図5b)。

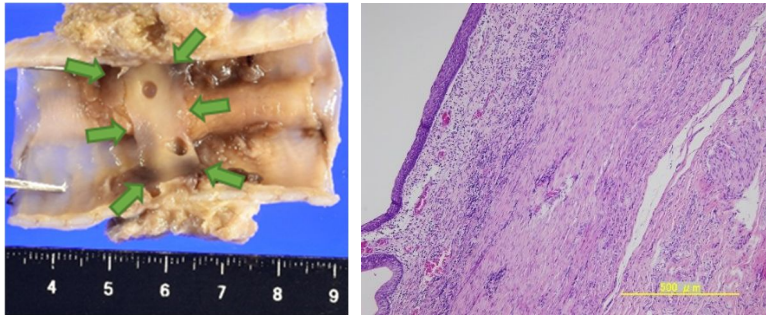


図 5a

図 5b

(3)-1 bFGFにてECM上での気道の上皮化の促進

作成したbFGF徐放ゼラチンシート(図6a)を移植部位を膜様部を除き全周性に覆うように管状ECMへ固定した(図6b)。3か月後のHE染色では上皮化をわずかに認めたが十分ではなく、ECM単独移植と比べてグラフト上の上皮化の促進は確認されなかった(図6c)。

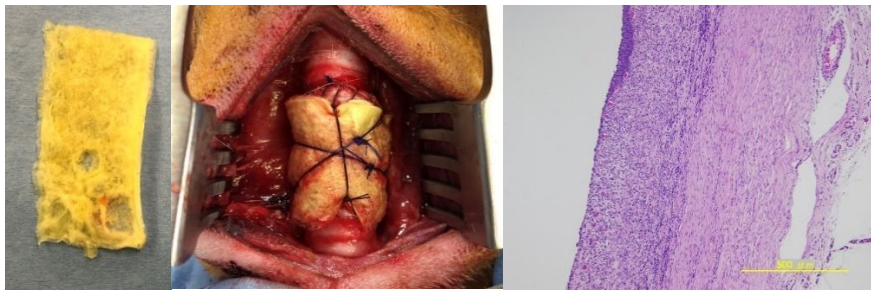


図 6a

図 6b

図 6c

(3)-2 イヌの骨髄液を用いた上皮化の促進について

上記実験は行わなかった。理由としてはステントなしで開存が維持できず、骨髄のみでは剛性の改善が得られないと判断中止した。

以上より、DEM法によって作成した管状ECMが免疫抑制剤を使用せず、明らかな拒絶反応を認めないことから気道修復材料として可能性が示唆された。ただし実臨床として使用するにあたり当初から懸念していた管状ECMの剛性保持、および上皮化が課題として残った。また血流の回復も課題であるが、ECMを異所移植(腹腔や腹膜内)した後に気管へ移植し血流と血流促進が促進されるか等について検討する。また自己骨髄幹細胞や脂肪幹細胞を用いた上皮化の促進も検討することを考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	張 性洙 (Chang Song Soo) (00419508)	香川大学・医学部・助教 (16201)	
研究分担者	藤原 敦史 (Fujiwara Atsushi) (00748642)	香川大学・医学部附属病院・助教 (16201)	
研究分担者	横田 直哉 (Yokota Naoya) (10636492)	香川大学・医学部附属病院・病院助教 (16201)	
研究分担者	松浦 奈都美 (Matsuura Natsumi) (20572853)	香川大学・医学部附属病院・助教 (16201)	
研究分担者	横見瀬 裕保 (Yokomise Hiroyasu) (80231728)	香川大学・医学部・教授 (16201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------