

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592691

研究課題名(和文)再生医療的アプローチを用いた新しい横隔膜修復術の開発

研究課題名(英文)Development of new procedure of diaphragmatic repair using tissue engineering approach

研究代表者

瓜田 泰久 (URITA, Yasuhisa)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：90361352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：先天性横隔膜ヘルニア(以下CDH)治療における人工膜縫着後の胸郭変形の防止などQuality of lifeの向上をはかるべく、CDHラットモデルを開発した。横隔膜欠損孔にはPLGA-collagen hybrid meshを縫着するが、Sheet縫着の際に、血管系を有茎に残した大網を間置し、「新横隔膜」への栄養血管とする事により筋再生を図ることができるかを検討すべく、新たな横隔膜ヘルニア修復術を開発した。

研究成果の概要(英文)：In order to improve the Quality of life and prevention of the thorax deformation after the introduction of the artificial membrane in congenital diaphragmatic hernia(CDH) treatment, CDH rat model had been development. When the folding sheet was sewing, an omentum leaving a vascular system with its pedicle was interposed between the sheets. We have developed a new CDH repair procedure in order to examine whether it is possible to muscle regeneration by the omentum that is fed by the blood vessels into "new diaphragm".

研究分野：小児外科

キーワード：先天性横隔膜ヘルニア PLGA Hybrid Scaffold 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

(1)小児外科領域において、先天性疾患の治療は重要な位置を占めているが、我が国においては周産期管理技術の向上とともに先天性疾患を持つ児の救命率が向上し、また出生前診断率が向上している。横隔膜ヘルニア(以下CDH)においても重症例の治療成績が向上しているが、近年は、単に究明することのみならず、Quality of lifeの向上が求められるようになってきている。

CDHは先天性に横隔膜の一部が欠損している疾患であるが、その欠損の程度は症例により差があり、直接縫合可能な程度のものから欠損部を補填しなければならないものまで存在する。現在、直接縫合できない欠損の補填には人工膜が使用されている。通常本症に対する手術は新生児期に施行され、術後患児は著しい成長をみせるが、人工膜を使用した場合その使用部の成長は期待できないため、患側の胸郭の形成に影響を及ぼす。

この患側の成長阻害を解決するためには、欠損部に対しても患児の成長に伴い増大する素材の使用が必要であるが、既存の人工物では不可能であり、生体材料の使用が望まれる。生体材料を使用する場合、現在の医療では、同種間の移植、患児自身の他の部位からの移植が考えられるが、前者は現実的ではなく、後者は可能であったとしても患児の負担が大きい。

この問題を解決すべく、我々は、CDHラットモデルを開発し、新しい欠損孔の補填材料の可能性を研究し、臨床応用へつながら一定の成果を得てきた。

(2)片側横隔膜全欠損やそれに準じる巨大横隔膜欠損を有するCDHの究極の治療は筋としての横隔膜の再生であるが、これには血管・神経の再生という大きなハードルが立ちふさがっている。

再生医学においては、骨、軟骨、皮膚、角膜などは研究が進み、一部臨床応用されている。さらに心筋、肝細胞などは多くの施設が研究を進めている分野である。これに対し本研究で扱う横隔膜は骨格筋であるが、その再生は国外でも積極的に行われていない分野である。

さらに、我々の開発したCDHラットモデルは実際に横隔膜を欠損させたものであり、特に国内においては他に例を見ないもので、CDHのリアルな環境を再現させるという意味において他施設に対する大きな優位性があり、比肩するものがないレベルである。本研究においては、上記の優れたCDHラットモデルを使用し、これまでの骨格筋再生の研究のさらなる前進をはかる。

2. 研究の目的

(1)現在、再生医学的手法はかつてのようなin vitroにおいて一から臓器を再生する試みから、失った臓器の機能をin vivoで再生させる方向へとシフトしてきているが、現存する臓器・機能を有効利用して、欠損した臓器の再生をin vivoにおいて図るための新しい手法の開発が本研究の第一の目的である。

(2)また、本研究にて用いるPLGA mesh-collagen sponge hybrid scaffoldに大網を間置する手法は、たとえ筋再生が得られないとしてもscaffold担体を用いる手法に比してより強度が得られることが証明されれば、現在ある人工素材を置き換えるものとして臨床の場にすぐに還元しうる技術である。本研究は早期に臨床応用可能な技術の開発の側面があり、これが第二の目的である。

3. 研究の方法

PLGA-collagen hybrid meshを制作。ラット横隔膜ヘルニアモデルを作成し、そこにPLGA-collagen hybrid meshを縫着するが、Sheet縫着の際は、血管系を有茎に残した大網を間置し、「新横隔膜」への栄養血管とする事により筋再生を図ることができるとを検討する。

また、筋芽細胞を播種したものとそうでないものを組織学的、免疫学的に比較し、筋芽細胞の筋組織への分化誘導がはかれるかを検討する。

(1) PLGA-collagen hybrid meshの制作。

(2)大網間置PLGA-collagen hybrid meshによる横隔膜修復技術の確立
大網血管の走行の解析
有茎にてmesh sheetに間置するための手術法の検討

(3)以下の2種類のsheetをラット横隔膜ヘルニアモデルに縫着し飼育。
PLGA-collagen hybrid mesh sheet
PLGA-collagen hybrid meshに大網を間置したmesh sheet

(4)組織学的・免疫学的検討
ラットよりmesh sheet縫着部を含む左横隔膜を取り出し組織学的検討を行う
また、desminを用いた免疫染色を行い、横隔膜再生の有無や程度を評価する。

(5)GFPラットによる筋芽細胞の培養
(3)の横隔膜ヘルニアモデルへの導入

(6)以下の3種類のsheetをラット横隔膜ヘルニアモデルに縫着し飼育。
PLGA-collagen hybrid meshに大網を間

置したmesh sheet
筋芽細胞を播種した大網間置mesh sheet
大網とともに徐放シートを間置き筋芽細胞を播種したmesh sheet

(9)組織学的・免疫学的検討

ラットよりmesh sheet縫着部を含む左横隔膜を取り出し組織学的検討を行う
また、GFP 細胞の確認をするとともに、免疫染色により横隔膜再生の有無や程度を評価する。

(10)総括（臨床応用への意義の検討）

4. 研究成果

(1) ラットにおける大網血管の走行の解析
すべてのラットにおいて大網は横隔膜まで移動可能であった。

(2) 今回は大網を間置した状態での評価はできなかったが、scaffold下に大網を置いた上で以下の3種類のsheetをラット横隔膜ヘルニアモデルに縫着した際の評価を行っている。

PLGAのみのmesh sheet(Group)

PLGA-collagen hybrid mesh sheet

(Group)

PLGA-collagen hybrid meshに間葉系幹細胞を播種したmesh sheet(Group)

(3)肉眼的所見

いずれのグループも sheet の破損や横隔膜ヘルニアの再発を認めなかった。

「新」横隔膜の最大径の平均はそれぞれ1、2、3 か月後で、Group では 1.8、1.5、1.7cm。Group では 1.5、1.7、1.7cm。Group では 1.7、1.8、1.7cmであった。

(4)顕微鏡的所見

すべての graft は壊死に陥っていなかった。

いずれの Group も膠原線維が、scaffold を裏打ちするように、残存横隔膜から連続して膜状に構成される。

1ヶ月時には Group は mesh の線維構造が失われるのに対し、Group は残存し Group に比べ厚い壁構造を維持する。

3ヶ月後では、Group には縫着部近傍に一部、筋線維の進展(造成)を認め Group に比べ厚い壁構造であるのに対し、Group は筋線維の進展(造成)を認めず薄い壁構造である。

3 か月後における「新」横隔膜の中心における厚さの平均は Group では 200 μm、

Group ではともに 550 μm であり、辺縁における厚さの平均は Group では 600 μm、Group では 1,000 μm、Group では 1,250 μm であった。統計学的には Group と Group 間では有意差が存在した。

免疫学的染色 (desmin) では Group では認めなかったが、Group では「新」横隔膜辺縁に desmin で染色される細胞を認めた。

(5)以上より、Group 間では肉眼的にも組織学的にも差異がなかったが、Group よりも厚い膠原線維に置換することが明らかとなった。

3ヶ月後でもいずれの Group も筋線維の再生は認めなかった。しかし、Group では辺縁の筋細胞が「新」横隔膜に伸張している可能性が示唆された。

いずれの Group も横隔膜ヘルニアの再発は認めなかった

(6)総括

ラットにおいて、横隔膜欠損部に scaffold を縫着する際大網を間置することが解剖学的に可能であることが明らかとなった。よって、手技的、方法的にはヒトにおいても可能と思われる。

一方 scaffold 下に大網を置いた場合の効果は限定的であり、間置した場合の効果についても同様の可能性が類推される。このため、大網間置した scaffold を縫着する手技は、現時点ですぐに臨床応用が可能とは言えない。筋芽細胞を播種した場合の評価が今後の課題となり、さらなる研究が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Takayasu H, Masumoto K, Hagiwara K, Sasaki T, Ono K, Jimbo T, Uesugi T, Gotoh C, Urita Y, Shinkai T, Tanaka H. Increased pulmonary RhoA expression in the nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia rat model. J Pediatr Surg. 2015 Sep; 50(9):1467-71. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2015.02.063. Epub 2015 Mar 7. PubMed PMID: 25783350. (査読有)

Takayasu H, Masumoto K, Jimbo T, Sakamoto N, Sasaki T, Uesugi T, Gotoh C, Urita Y, Shinkai T. Analysis of risk factors of long-term complications in congenital diaphragmatic hernia: A single institution's experience. Asian J Surg. 2015 Apr 30. pii: S1015-9584(15)00042-1. doi: 10.1016/j.asjsur.2015.02.005. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25937583. (査読有)

〔学会発表〕(計6件)

藤井俊輔, 瓜田泰久, 佐々木理人, 千葉史子, 坂元直哉, 五藤周, 中尾真, 新開統子, 高安肇, 田中秀明, 増本幸二
ヘルニア嚢に異所性肝組織の迷入を認めた先天性右横隔膜ヘルニアの1例
第51回日本周産期・新生児学会 2015年7月11日, ヒルトン福岡シーフォーク(福岡県)

千葉史子, 増本幸二, 五藤周, 藤井俊輔, 佐々木理人, 坂元直哉, 瓜田泰久, 高安肇, 中尾真, 新開統子, 田中秀明
救命しえた左心低形成症候群合併、重症先天性横隔膜ヘルニアの一例
第51回日本周産期・新生児学会 2015年7月11日, ヒルトン福岡シーフォーク(福岡県)

瓜田泰久, 小野健太郎, 相吉翼, 藤井俊輔, 佐々木理人, 千葉史子, 坂元直哉, 中尾真, 田中秀明, 宮園弥生, 増本幸二
重症染色体異常児の在宅管理への移行のための外科手術
第52回日本小児外科学会学術集会 2015年5月30日, 神戸国際会議場, (兵庫県)

新開統子, 増本幸二, 萩原幸輝, 高安肇, 田中秀明, 瓜田泰久, 上杉達, 五藤周, 神保教広
臍帯由来間葉系幹細胞を用いた低形成肺に対する分化誘導に関する検討
第51回日本小児外科学会学術集会 2014年5月9日, 大阪国際会議場(大阪府)

瓜田泰久, 増本幸二, 小野健太郎, 佐々木理人, 坂元直哉, 神保教広, 上杉達, 五藤周, 高安肇, 新開統子, 宮園弥生
染色体異常と外科治療 重症染色体異常を合併した患児に対する外科手術
第50回日本小児外科学会学術集会 2013年5月30日, 京王プラザホテル, (東京都)

高安肇, 増本幸二, 新開統子, 瓜田泰久, 五藤周, 上杉達, 神保教広, 坂元直哉, 佐々木理人
新生児外科疾患における Intact Survival を目指した治療戦略 当科における新生児外科疾患の治療成績と中長期予後
第113回日本外科学会定期学術集会 2013年4月12日, マリンメッセ福岡(福岡県)

6. 研究組織

(1)研究代表者

瓜田 泰久 (URITA, Yasuhisa)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：90361352

(2)連携研究者

増本 幸二 (MASUMOTO, Kouji)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：20343329

陳 国平 (CHEN, Guoping)
独立行政法人物質・材料機構・生体材料工学研究所・主幹研究員
研究者番号：50357505