

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007-2008

課題番号：19791306

研究課題名（和文） PLGA-collagen hybrid mesh を用いた横隔膜の再生

研究課題名（英文） Evaluation of diaphragmatic hernia repair using PLGA-collagen hybrid mesh

研究代表者

瓜田 泰久 (URITA YASUHISA)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：90361352

研究成果の概要：

PLGA mesh-collagen hybrid scaffold は PLGA のみの scaffold 同様自己の膠原線維を誘導するが、PLGA のみのものより厚い壁構造を保つため、ヘルニアの再発を防ぎ、成長障害や異物反応を起こさない scaffold として横隔膜ヘルニアの治療に有用である可能性が高い。間葉系幹細胞の有無は肉眼的にも、組織学的にも差異がない。筋組織の再生、誘導が今後の課題である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	1,400,000	0	1,400,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,200,000	540,000	3,740,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：再生医療、先天性横隔膜ヘルニア、PLGA、PLGA-collagen hybrid scaffold、間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 小児外科領域においては、先天性疾患の治療は重要な位置を占めているが、近年、その治療成績が向上するに従い、疾患を救命することのみならず、術後の Quality of life の向上が求められるようになってきている。

横隔膜ヘルニア（以下本症）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、患側の成長障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。

(2)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、その再生はとりわけ国内においては積極的に行われていない分野であり、本邦初の試みとなり、PLGA-collagen hybrid meshを使用した横隔膜再生の研究は国内外とも未だ行われていないため、本研究が世界初のものとなる

2. 研究の目的

(1)生体材料を用い、しかも患児の負担を少なくするためには再生医学を用いて組織再生をはかり欠損部を補填する方法が必要であり、その開発が本研究の目的である。

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り、国内での研究はなされていない。このため本研究は本邦としては初めてのものである。なお、poly-DL-lactic-co-glycolic-acid (PLGA) scaffold は生体内吸収性担体であるが、加工しやすい反面細胞接着作用に乏しい。そこで PLGA に高い細胞接着・増殖促進作用をもつ天然高分子コラーゲンスポンジをハイブリッドさせたシート状担体が PLGA-collagen hybrid mesh である。

(2)本研究で扱う生体吸収性材料は人体にとっても無害であり、間葉系幹細胞は本人のものを使用できることから本 strategy は臨床応用するうえにおいて同様の手法で倫理的にも問題なく可能な技術である。

(3)横隔膜の再生が可能となれば、現在人工膜縫着が唯一の方法であった欠損孔の大きい横隔膜ヘルニアの術後の生活の質を含む治療成績の向上が期待できるのみならず、他の先天性、後天性の骨格筋欠損を有する疾患

の治療などに応用可能であり、医療全体の発展に寄与できるものと思われる。

(4)本研究で扱う横隔膜は骨格筋であるが、その再生はとりわけ国内においては積極的に行われていない分野であり、PLGA-collagen hybrid mesh を使用した横隔膜再生の研究は国内外とも未だ行われていないため、本研究が世界初のものとなる。

3. 研究の方法

(1)PLGA-collagen hybrid meshの制作。

(2)間葉系幹細胞の導入。

①幼若ラット骨髄より間葉系幹細胞の採取及び培養。

②PLGA-collagen hybrid meshへの間葉系幹細胞の播種および生着状況の検討

(3)人工的な横隔膜ヘルニアラットへのmesh sheet縫着技術の確立。

①ラットへの気管内挿管及び人工呼吸管理

②ラット左横隔膜に人工的に欠損孔を作り、横隔膜ヘルニアモデルを作成

③mesh sheetの欠損孔への縫着

(4)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。

①PLGAのみのmesh sheet (Group I)

②PLGA-collagen hybrid mesh sheet (Group II)

③PLGA-collagen hybrid meshに間葉系幹細胞を播種したmesh sheet (Group III)

(5)組織学的・免疫学的検討

上記(4)のラットより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。

(6)総括（臨床応用への意義の検討）

4. 研究成果

(1)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 I では 1.8、1.5、1.7cm。Group II では 1.5、1.7、1.7cm。Group III では 1.7、1.8、1.7cm であった。

(2) 顕微鏡的所見

①すべての graft は壊死に陥っていなかった。

②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。

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

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

④3 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 I では $200\ \mu\text{m}$ 、Group II, III ではともに $550\ \mu\text{m}$ であり、辺縁における厚さの平均は Group I では $600\ \mu\text{m}$ 、Group II では $1,000\ \mu\text{m}$ 、Group III では $1,250\ \mu\text{m}$ あった。統計学的には Group I と Group II, III 間では有意差が存在した。

⑤免疫学的染色 (desmin) では Group I では認めなかったが、Group II, III では「新」横隔膜辺縁に desmin で染色される細胞を認めた。

(3) 以上より、Group II, III 間では肉眼的にも組織学的にも差異がなかったが、Group I 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 II, III 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。

(4) PLGA mesh-collagen hybrid scaffold は PLGA のみの scaffold 同様自己の膠原線維を誘導するが、厚い壁構造を保つため、ヘルニアの再発を防ぎ、成長障害や異物反応を起

こさない scaffold として横隔膜ヘルニアの治療に有用である可能性が高い。今回 PLGA-collagen hybrid mesh sheet をもちいた横隔膜修復の研究は本邦初となるが、今後、より大きな動物への導入やより広範囲な欠損の修復を検討することにより比較的早期に臨床導入が可能であるといえよう。

一方残念ながら、間葉系幹細胞の有無は肉眼的にも、組織学的にも差異がなかった。間葉系幹細胞導入により差異が認められれば、筋線維そのものの再生の足がかりや、そのヒントとなり得たであろう。

今回 PLGA-collagen hybrid mesh sheet は横隔膜の役割のなかで胸腔と腹腔を隔てる自己組織由来の構造を構築することが証明され、その意味では有意義な結果を出せたが、究極の課題は筋組織のそのものの再生、誘導である。

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 1 件)

- ① Urita Y, Komuro H, Chen G, Shinya M, Saihara R, Kaneko M; Evaluation of diaphragmatic hernia repair using PLGA mesh-collagen sponge hybrid scaffold: an experimental study in a rat model. *Pediatric Surgery International*, 24:1041-1045, 2008, 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① 瓜田泰久 小室広昭 堀哲夫 楯川幸弘 工藤寿美 星野論子 金子道夫; 腹腔鏡補助下根治術を行った胸骨後ヘルニアの 1 例、*Pediatric Surgery Joint Meeting* 2008、2008 年 11 月 21 日、大阪
- ② Urita Y, Chen G, Kaneko M, Saihara R, Komuro H; Evaluation of diaphragmatic hernia repair using PLGA mesh-collagen sponge hybrid scaffold: an experimental study in rats, *1st Asian Biomaterials Congress*, Dec 6, 2007, Tsukuba

- ③ 小室広昭 瓜田泰久 金子道夫；ラット羊膜細胞を用いた神経再生の試み、第 43 回周産期新生児医学会総会、2007 年 7 月 9 日、東京
- ④ 瓜田泰久、小室広昭、陳国平、金子道夫；PLGA mesh-collagen hybrid scaffoldを用いたラット横隔膜の再生、第 44 回日本小児外科学会学術集会、2007 年 5 月 31 日、東京
- ⑤ Komuro H, Shinya M, Saihara R, Urita Y, Kaneko S Kaneko M, Liu Y; Neural differentiation potentials of rat amniotic cells. International Society for Stem Cell Research, Jun 18, 2007 Australia

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瓜田 泰久 (URITA YASUHISA)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：90361352