

Tissue engineeringによる人工臓器作製 —生体吸収性材料を用いた胃，食道，胆管の復元—

*¹帝京大学医学部附属溝口病院外科， *²埼玉医科大学国際医療センター消化器外科

宮澤 光男*^{1,2}， 合川 公康*²， 岡田 克也*²， 渡邊 幸博*²

Mitsuo MIYAZAWA, Masayasu AIKAWA, Katsuya OKADA, Yukihiro WATANABE



1. はじめに

生体内にインプラントする，溶けない物質で作製された人工臓器は，必ず異物反応が生じ，血管などでは血栓の問題も生じる。人工臓器として理想的なことは，人工臓器を必要とする個体自身の細胞を利用し，人工的に元通りの臓器を作製することである。

このようにある程度広い範囲の再生を可能とするのは，足場 (scaffold) を利用した tissue engineering (TE) のみである。iPS (induced pluripotent stem) 細胞が京都大学の山中伸弥教授らによって作製され¹⁾，各種消化器領域の細胞にも分化誘導させようという試みが盛んに行われている。これら分化誘導された細胞を利用することも考えられるが，組織は微小かつ精巧な3次元構造をもった scaffold に，多種類の細胞集合体が機能を維持し存在している。それゆえ，単に細胞だけを注入しても，それら細胞群が臓器の構築要素である細胞外マトリックスを再生し，適材適所に遊走していくことは現時点では不可能である。幼弱な細胞の3次元構造物内への注入においても，その細胞環境のコントロール法が不明であり，目的の臓器が再生できると思えない。現在，再生医療の臨床応用を実現するために最も重要なことは，実際の臨床の医療を鑑み，再生させたい臓器を既存の臓器と縫合し，固定することによって，その再生臓器の体内における環境を再生可能となるように整えることである (臓器が欠損している場合には，その部分に scaffold を縫合し，固定することによって修復する)。つまり，人工的に作製する scaffold の形状，硬さ (縫合可能でな

ければならない)，溶けやすさ (生体吸収性の場合) が臓器再生の成否を決定することとなる。

本稿においては，我々が研究している TE による消化管再生 (特に，胃，食道，胆管の再生) から，人工臓器と再生医療との融合について述べたい。

2. 消化器再生における TE の基本的概念

TE である程度大きな組織を再生させるためには，3つの要素が必要である。それは，①組織の phenotype を司る細胞，②細胞が接着する scaffold，③細胞が生存するための環境である²⁾。組織の機能を発現する細胞の研究は iPS 細胞を含め，加速度的に発展してきている。また，scaffold としての細胞外マトリックス，人工マトリックスの作製研究も 3D プリンティング技術などの進歩で自由にナノレベルの3次元微小構造構築が可能となっている³⁾。一方，組織再生のために最も重要であり，最も遅れている分野が，3次元構造物の内でその組織としての phenotype を細胞が発現するための環境の研究である。特に，消化器領域の再生においては，臓器が本来維持している複雑な血管網，蠕動運動，消化液の流れ，神経配列，蛋白合成，免疫機能など，様々な環境が再生する複合体に影響する。これら全ての環境を *in vitro* で再現するのは現時点では困難であろう。まずは，実際の組織の骨格に近い scaffold に細胞を播種し，組織を模倣することの方が組織再生への近道と考えられる。この場合，組織を構築する細胞に対してどのような scaffold が適当か，どこまで細胞以外のものを模倣する必要があるか，また可能であるかを検討する必要があるが，現状ではまだまだ多くの解明すべき点がある。

材料の選択のためには，生体内埋め込み型の組織 (*in vivo*) を作るのか，あるいは生体外での作製 (*ex vivo*) になるのかということも関係してくる。特に，*in vivo* において

■ 著者連絡先

帝京大学医学部附属溝口病院外科
(〒213-8507 神奈川県川崎市高津区溝口3-8-3)
E-mail. mmiyazawa@med.teikyo-u.ac.jp

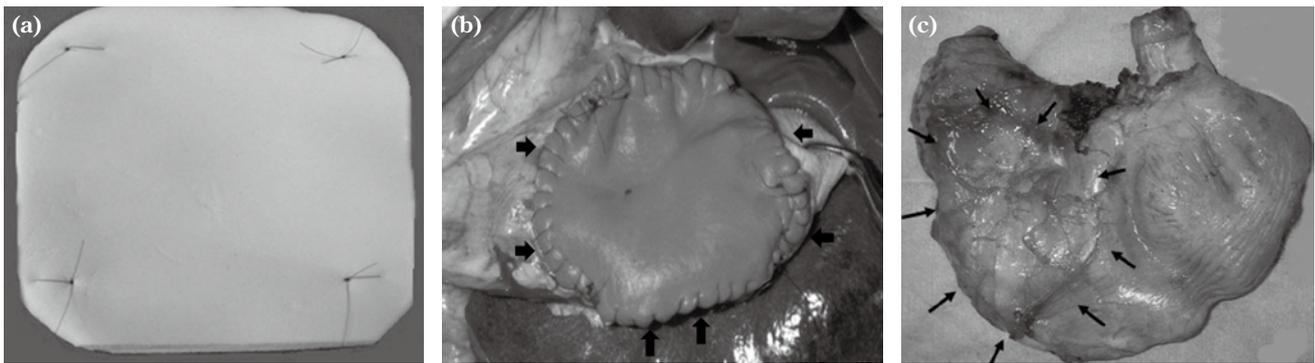


図1 TEによる胃の再生⁶⁾

- (a) 乳酸：カプロラクトン (50 : 50) の共重合体をポリグリコール酸の繊維で補強したスポンジ状の生体吸収性ポリマー (生体内にて、6～8週で吸収されるように設計されている) で人工胃壁を作製。
 (b) ブタの胃の前壁に8 cm×8 cmの人工胃壁を移植 (黒矢印)。
 (c) 人工胃壁の移植12週後。人工胃壁を移植した部位はnativeの胃と同様に再生できていた (黒矢印)。

は、宿主による免疫反応と栄養の供給源である血管構築が問題となる。血管形成は宿主に行わせるのか、あるいは血管まで組み込んだscaffoldを考慮するのか、どのような構造を作製することが可能であり、その構造に対して宿主はどう反応するのかなど、scaffoldと細胞を組み込んだ集塊を宿主体内で元通りの臓器に復元するためには、越えなければならないハードルが多数ある。

3. 消化器領域におけるTEの必要性

21世紀の外科的治療の方向性は低侵襲、機能温存とされているが、内視鏡下手術⁴⁾、ロボット手術⁵⁾で体表破壊を最小としても、体腔内での治療は、疾患部を切除し、切除欠損部を縫い縮める治療法であり、十分な機能的低侵襲性は達成されていない。胃を例にとると、たとえ「早期胃癌でリンパ節転移なし」と診断されても、広範囲の癌であると胃全摘の治療法となり、患者は少なからず食事量の減少を来しQOL (quality of life) は低下する。術後の機能的低侵襲性を獲得するためには、いかに元通りの機能を保持した組織・臓器を切除欠損部に再生させるかである。このような現況において、消化器を代替する元通りの形を保持した物体 (人工臓器) が必要である。しかし、消化器は単なる管ではなく、その管が多くの機能を発揮し、多数の物質を分泌しなければならない。そこで、形を保持するためには、scaffoldが必要であるが、多数の機能は、その臓器自体の細胞が司らなければならない。つまり、人工物であるscaffoldと細胞が臓器の存在する環境下で、その細胞が組織を形成するように再生させるTEの技術が、機能する人工臓器作製には必須である。

4. TEによる胃の再生

TEの基本的概念を考慮しながら胃を再生させるためには、胃の形を生体吸収性材料によって作製し、さらにそのscaffoldに付着した細胞がnativeの胃壁を形成する細胞に成熟していかなければならない。そのためには、scaffoldに付着した細胞の環境を、実際の胃が働いている環境、つまりscaffoldが蠕動運動している状態とすることが必要であり、この状態の維持によってはじめてscaffoldに付着した幼若な細胞が胃壁を形成する細胞に成熟してくる。現時点において我々は、この蠕動運動を生体内で模倣する手段をもっていない。それゆえ広範囲ではあるが、胃の半周程度の再生の成功にとどまっている。

TEによる胃の再生に関して我々の研究を紹介する。TEによる胃壁の再生に用いるscaffoldは、京大名誉教授の篠義人先生と協同開発した「乳酸：カプロラクトン (50 : 50) の共重合体をポリグリコール酸の繊維で補強したスポンジ状のポリマー」 (図1a) を用いた。これは、細胞が接着しやすく、早期 (6～8週) に生体内で加水分解されるように設定されている。雑種ブタを全身麻酔下に開腹し、胃体中部前壁を8×8 cm切除し (ブタ胃体中部の約1/3周)、ここに同サイズの人工胃壁 (artificial gastric wall: AGW) をパッチ状に移植し欠損を閉鎖した (図1b)。移植4週後、8週後、12週後に、胃を全摘出し、移植部を肉眼的、組織学的に観察した。ブタは全例、食事量の減少なく犠牲死させるまで生存した。再開腹時のAGW移植部は4週後、8週後には、周囲臓器との癒着が認められたが、12週後にはほとんど癒着は認められず、肉眼的にnative同様の形状になっていた (図1c)。内腔面の肉眼所見ではAGW移植部は潰瘍となっており、移植4、8週後と小さくなり、12週では潰瘍は認め

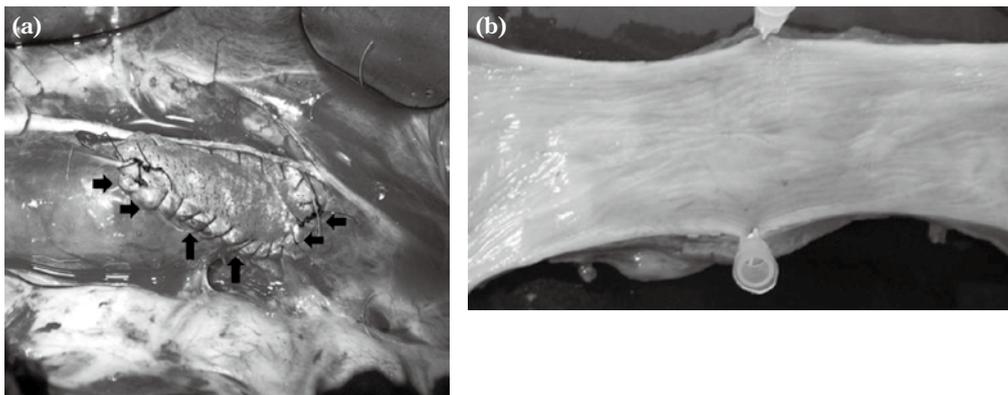


図2 TEによる食道の再生⁷⁾

(a) 生体吸収性のシートで食道壁欠損部を修復(黒矢印)。

(b) 生体吸収性のシート移植8週後。シートを移植した部位の上皮面は潰瘍形成なく治癒していた。

られなかった。AGW移植により再生した胃壁は、native同様の胃壁が全層性に再生したことが確認できた⁶⁾。

これらの研究は、胃を完全に再生する段階には至っていないが、胃穿孔あるいは小範囲の胃癌切除後の欠損部修復のような病態においては、十分低侵襲医療に寄与できるところまでは来ている。

5. TEによる食道の再生

食道はその解剖学的特徴のため、壁の一部に欠損が生じた場合でも、亜全摘術や他臓器による再建が必要となる。臨床的に、このような過大な侵襲を回避するために、食道欠損部を修復しうる材料の開発が望まれている。TEによって食道を再生するためには、胃と同様に、蠕動運動を考慮しなければならないが、現時点においては、十分に蠕動を模倣する手段がない。

TEによる食道の再生について我々の研究を紹介する。ブタを全身麻酔下に開胸し、食道壁を長軸4 cm、短軸2 cmの楕円形に切除し、欠損部と同サイズに形成した人工食道パッチ (artificial esophageal patch: AEP) (この生体吸収性材料の組成は人工胃壁と同一) を移植し、欠損を閉鎖した(図2a)。経口摂取は術翌日から流動食を開始、5日目に通常食とした。AEP移植2週後に上部消化管内視鏡を施行し移植部を観察した。AEP移植4週後、8週後、12週後、それぞれブタを再開胸、食道を亜全摘し、AEP移植部を肉眼的、組織学的に観察した。結果としては、ブタは全例、著明な体重減少なく、犠牲死させるまで生存した。AEP移植2週後、AEP部は約1 cm径の肉芽を形成していたが、狭窄は認められなかった。AEP移植4週後、正常粘膜と同様の扁平上皮が再生していたが、筋層は再生していなかった。8週では粗造な構造であるが筋層が出現していた。12週後は、

筋層構造も正常構造に近づき、native同様の食道壁が再生していた(図2b)。結果としては、食道欠損に対するAEP移植術は、狭窄なく食道壁全層の修復再生が可能であると考えられた⁷⁾。

これらの研究は、食道を完全に再生する段階には至っていないが、食道穿孔、狭窄のような病態においては十分臨床応用できる段階にある。

6. TEによる肝外胆管の再生

肝外胆管は免疫機能を含め、様々な機能を有していることが解明されてきているが、最も基本的な機能は、胆汁を肝臓側から十二指腸側へ輸送する経路である。この機能を満たすため、現在までにいくつかのものを代替物として利用する試みがなされてきた⁵⁾。しかし、結局は胆汁が流れる内腔側あるいはnativeの胆管との吻合部に上皮が形成されないことにより閉塞がおり、長期的に使用可能なものは開発できなかった。そこで我々はTEを応用し、生体吸収性ポリマーで作製したチューブ(人工胆管)を利用して胆管を再生させる研究を開始した。方法としては、胆管を再生させる土台となるscaffoldを生体吸収性ポリマー(組成は人工胃壁と同一)でチューブ状に作製し、肝外胆管に移植する検討をした。雑種ブタをTEで作製した人工胆管のレシピエントとした。胆嚢管合流部付近の総胆管を切断後、総胆管の十二指腸側を結紮、肝側のnative総胆管断端と人工胆管を吻合した。さらに、十二指腸下降脚に5 mm大の穴をあけ、人工胆管のもう一方の断端とその十二指腸の穴を縫合した(図3a)。人工胆管移植部は移植後6ヶ月で採取し、肉眼的、組織学的に観察した。結果としては、移植したブタは、移植後6ヶ月後に犠牲死させるまで生存し、術後、黄疸は示さず体重も増加した。Neo-bile ductは肉眼

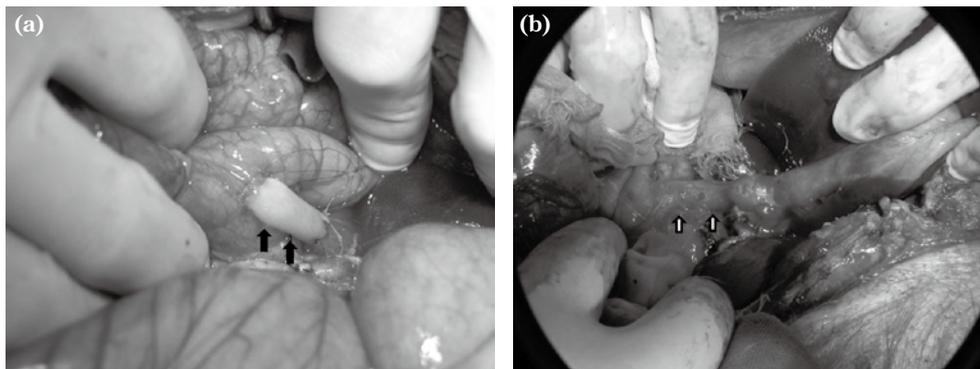


図3 TEによる肝外胆管の再生⁸⁾

(a) 生体吸収性ポリマーチューブ(人工胆管)で肝外胆管をバイパスした(黒矢印)。

(b) 人工胆管移植6ヶ月後の再生胆管。Nativeの胆管と肉眼的に同様の胆管が再生してきた(白矢印)。

的にも組織学的にも native 総胆管とほぼ同様の形態を示し(図3b), nativeの胆管と同様に胆管上皮細胞と思われる部分がCK19陽性となった。生体吸収性ポリマーで作製したチューブ状の人工胆管が分解吸収した後, 再生した neo-bile ductは6ヶ月間, 胆管として十分機能した。これらの結果は, 移植初期には, 肝外胆管と置換したチューブ状の人工胆管は, チューブ状の形状を保ちながら管として胆汁を腹腔内に漏らさず, 胆汁を十二指腸に流すことが可能であったことを示し, さらに, 人工胆管が生体内で分解吸収された後は, その移植部位に nativeと同様の肝外胆管が再生し, 狭窄なく胆管として機能したことを示していた⁸⁾。

肝外胆管を再生させる研究は, 臨床の要求に応えられる段階に達しており, この同一の材料を用いて胆管狭窄部を拡張させること⁹⁾, さらに nativeの胆管と胆管の間をバイパスすること¹⁰⁾も可能となっている。現在は, 胆管損傷の場合, 安易に胆管-腸吻合が行われるが, 損傷部をこの材料で修復することにより, 低侵襲医療に寄与可能と考えられる。

7. おわりに

人工臓器を生体吸収性材料(scaffold)とすると, TEこそが人工臓器と再生医療の融合の産物である。消化器領域においては, いまだ十分な工学的分野と医学的分野の融合がなされておらず, TEが機能しているとは言えない。近未来においては, これらのギャップが埋められ, 十分な融合が起こり, 臨床応用可能となるような臓器が作製されるこ

とを期待している。

本稿のすべての著者には規定されたCOIはない。

文 献

- 1) Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, et al: Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc* **2**: 3081-9, 2007
- 2) Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* **260**: 920-6, 1993
- 3) Gaetani R, Doevendans PA, Metz CH, et al: Cardiac tissue engineering using tissue printing technology and human cardiac progenitor cells. *Biomaterials* **33**: 1782-90, 2012
- 4) Jeong GA, Cho GS, Kim HH, et al: Laparoscopy-assisted total gastrectomy for gastric cancer: a multicenter retrospective analysis. *Surgery* **146**: 469-74, 2009
- 5) Berlinger NT: Robotic surgery—squeezing into tight places. *N Engl J Med* **354**: 2099-101, 2006
- 6) Miyazawa M, Aikawa M, Watanabe Y, et al: Extensive regeneration of the stomach using bioabsorbable polymer sheets. *Surgery* **158**: 1283-90, 2015
- 7) Aikawa M, Miyazawa M, Okamoto K, et al: A bioabsorbable polymer patch for the treatment of esophageal defect in a porcine model. *J Gastroenterol* **48**: 822-9, 2013
- 8) Miyazawa M, Torii T, Toshimitsu Y, et al: A tissue-engineered artificial bile duct grown to resemble the native bile duct. *Am J Transplant* **5**: 1541-7, 2005
- 9) Aikawa M, Miyazawa M, Okamoto K, et al: A novel treatment for bile duct injury with a tissue-engineered bioabsorbable polymer patch. *Surgery* **147**: 575-80, 2010
- 10) Aikawa M, Miyazawa M, Okamoto K, et al: An extrahepatic bile duct grafting using a bioabsorbable polymer tube. *J Gastrointest Surg* **16**: 529-34, 2012