

令和元年6月7日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11356

研究課題名(和文) Direct reprogrammingを用いた短腸症候群の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment for short bowel syndrome using direct reprogramming

研究代表者

小沼 憲祥 (KONUMA, Noriyoshi)

日本大学・医学部・研究医員

研究者番号：50553103

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)：細胞内に存在するexosomeが細胞間伝達に重要な役割を果たし、かつ、腹腔内投与により、腸管組織へ取り込まれることが報告されたことから、遺伝子デリバリーを、DFATのexosomeにて行うことを考えた。DFATからのexosomeは、電子顕微鏡にて100-200nmの小胞体として確認することができ、exosomeのマーカーである、CD69をウエスタンブロッティングにて確認した。脂肪運命の追跡が可能なマウスに対し5%DSSを1週間、自由飲水にて投与し、腸管障害部位に対する脂肪細胞の関与を組織学的に検討したところ、上記条件では腸管再生に対する脂肪細胞の関与は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪は皮下だけでなく、臓器の周囲にも多く存在する。脂肪運命の追跡可能なマウスを用いて、様々な疾患モデルマウスにおいて周囲脂肪組織の脂肪細胞の挙動を確認することは、それらの疾患と脂肪とのかかわりを解明することとなり、疾患の発症予防、新規治療などにつながる。

本研究においてはモデルマウスの作成に難渋したが、今後は腸炎モデル以外にも、肥満と腫瘍のかかわりが指摘されている乳癌などにおいて、脂肪細胞の挙動を同様の手法を用いることで確認し、発症予防や新たな治療戦略の可能性を探る。

研究成果の概要(英文)： We used the exosome derived from DFAT for gene delivery, because exosomes play an important role in intercellular communication, and it was reported that uptake into intestinal tissue can be seen by intraperitoneal administration. The DFAT-driven exosome can be confirmed as an endoplasmic reticulum of 100-200 nm by electron microscopy, and CD69, which is a marker of exosome, was confirmed by western blotting. To produce the model mice, 5% DSS was administered orally for 1 week. The involvement of adipocytes on the site of intestinal injury was examined histologically. Under the above conditions, the adipocytes were not involve for intestinal regeneration.

研究分野：細胞再生

キーワード：Direct reprogramming 短腸症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

短腸症候群とは小児外科領域で扱う疾患の一つであり、その主たる原因として小腸閉鎖、中腸軸捻転による小腸大量切除などに伴い生じる。腸管長の絶対的な不足から生じる病態より、根本治療は小腸移植しかないのが現状である。しかし、強い拒絶反応や絶対的ドナー不足から施行される症例はごくわずかであり、ほとんどの症例では生命維持手段として終生、経静脈栄養に頼らざるを得ず、その長期的管理には問題も多い。

一方小腸移植の抱えるドナー不足や拒絶反応といった問題を克服する画期的な治療法として近年注目を集めているのが再生医療である。1980年代にマウス胚から作成されたマウスES細胞が樹立したことをきっかけに、再生医療に対する需要が高まった。当教室においてもマウスES細胞を無血清培地で培養することにより腸管様構造を作り出すことに成功している (Konuma N, et al, Stem cells Dev, 2009)。その後、Satoらの報告によるとマウス成体から単離した腸管上皮幹細胞を単離培養することで腸管 organoid を作り出した (Sato T, et al. Nature, 2009)。また、近年iPS細胞 (induced pluripotent stem cell) の作製に成功したことを皮切りに、iPS細胞やヒトES細胞を用いて、腸管構造を作り出すことにも成功している。いずれの報告でも腸管上皮の構造並びに機能を保持していることから、再生医療を用いた単腸症候群の治療の可能性を大きくしたが、短腸症候群の患児の栄養を十分に吸収できるだけの腸管長を再生することはできておらず、小腸移植に代わる、もしくは小腸移植の欠点をカバーするには至っていないのが現状である。そこで我々は、短腸症候群の患児に残存している大腸組織に着目した。

Yamanakaらが体細胞 (皮膚) へ未分化マーカー (Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2) を導入することによりES細胞様の多様性幹細胞 (iPS細胞) を作製した。(Takahashi K, et al. Cell, 2006)。一度分化した終末細胞が遺伝子操作により未分化な状態に戻ることが発見されたことをきっかけに、分化した終末細胞を遺伝子操作することで他系統の分化した終末細胞へ直接リプログラミングする方法が開発された。これは、iPS細胞のように一度未分化な状態を経てから、再度終末細胞へ向けて分化させているわけではなく、終末細胞から終末細胞へ分化させていることから、direct reprogramming と呼ばれる。この direct reprogramming はすでに数々行われており、Yamadaらは膵細胞に Pdx1, Ngn3, MafA 遺伝子を導入することで細胞へ (Yamada T, et al. Endocrinology, 2015) Pengyuらは、線維芽細胞に FOXA, HNF1A, HNF4A 遺伝子を導入することで肝細胞へと direct reprogramming を成功している。しかしながら、腸管に関する direct reprogramming の報告はまだ無い。そこで我々は、単腸症候群の患児に存在している大腸に遺伝子導入することで、短腸症候群の患児らに必要不可欠な栄養を吸収できる小腸へ direct reprogramming することを考えた。

大腸と小腸は組織発生上、似た位置に存在していることから、reprogramming 自体は可能であると思われるが、大腸への reprogramming の中で困難であろうと考えられるのは遺伝子導入の方法である。以前、本申請者も腸管に対する遺伝子導入を試みた。しかしながら、膵臓や肝臓のような実質臓器とは異なり、腸管は管腔臓器であるため内腔からの遺伝子導入は困難であった。内腔からの遺伝子導入を行う際、投与経路は経肛門となり、直接粘膜面への投与ができない。また、目的遺伝子が入ったウイルス液を満たすことで遺伝子導入を図るも管腔臓器であるために内腔の圧が上昇すると管腔は膨張し、粘膜に対する圧が減少する。つまり、腸管粘膜に対して遺伝子導入を考えると莫大な量のウイルス量が必要となる。

そこで本申請では、遺伝子導入を腸管内腔から行うのではなく、漿膜面側から遺伝子導入、つまり腹腔内投与により遺伝子導入を行うことを考えた。ただし、腹腔内への遺伝子導入を行う際に、ウイルス液を用いると、腸管内腔化 r の遺伝子導入時と同様に莫大なウイルス量が必要となるために、遺伝子の運び役には細胞を用いることとし、ウイルス量を増やすことを、細胞数を上げることでカバーする。我々は、手術などで破棄された脂肪をコラゲナーゼ処理にて破砕し、低速遠心後、上澄みに分離された脂肪細胞を天井培養という特殊環境に置くことで他分化能と自己増殖能を持つ脱分化脂肪細胞 (DFAT) を作製することができる。この DFAT は骨、軟骨、平滑筋、神経への分化が可能だけでなく、骨髄間葉系幹細胞とほぼ同じ表面マーカーを持つことから当教室では、間葉系幹細胞として様々な研究を行っている (Matsumoto T, et al, J Cell Physiol, 2008)。本研究ではこの DFAT を遺伝子の運び役の細胞に用いる。

また DFAT は脂肪から脱分化した細胞であり、腸管膜脂肪との親和性は高いことが予想される。そこで遺伝子導入する標的を腸管の漿膜ではなく、腸間膜に存在する脂肪に設定した。我々の教室では、生体内における脂肪からの脱分化を証明するために、脂肪細胞の系統追跡が可能マウス (Adipoq - Cre/tdTomato マウス) を用いて組織障害時における脂肪細胞の関与を研究している。本研究では Adipoq - Cre/tdTomato マウスを用い、腸管障害または小腸切除を施し、周囲脂肪組織からの腸管組織再生への関与を立証する。周囲脂肪組織から腸管粘膜への関与が立証されれば、遺伝子導入の標的を腸間膜脂肪に置くことで、間接的に腸管粘膜への遺伝子導入が可能となる。

2. 研究の目的

小児外科主要疾患である短腸症候群は、腸管長の不足から栄養摂取が十分にできないのが主たる病態となる。不足もしくは欠損を補うことを目的とした再生医療の分野では、腸管再生は比較的進んでいる分野である。しかしながら、臨床応用に至らずにいるのは、腸管という構造に

ある。現状の再生研究では、培養皿で腸管様構造を作ることが可能であっても、臓器としての管腔構造を作るに至ってはいない。そこで今回我々は、短腸症候群の患児に残存している大腸組織に着目し、direct reprogramming を用いて小腸化することを目的としている。Direct reprogramming の際に遺伝子導入や、細胞の腹腔内投与を行うため臨床応用にはまだ至らないが、確実に新規治療法としての一步を踏み出すことになる研究と考え本研究を立案した。

3. 研究の方法

Adipoq - Cre/tdTomato マウスを用いた腸管障害時における周囲脂肪組織の関与の証明

近年組織修復や、がん細胞の浸潤の時に周囲組織の脱分化が起こることが報告されている。そこで組織障害後の修復過程に成熟脂肪細胞の脱分化現象が組織再生に関与するか明らかにするために、成熟脂肪細胞の運命追跡ができる遺伝子改変マウス(Adipoq - Cre/tdTomato マウス)を用いる。

このマウスはAdipoq(脂肪細胞特異的マーカー)が発現している脂肪細胞に、エストロゲン刺激が入ることでCre recombinaseが発現するマウスと、Cre recombinaseが作用するとtdTomatoが発現するマウスを交配することで作製される。このマウスの特徴としては、一度脂肪細胞にtdTomato(赤色)が発現すると、その細胞が分化や脱分化を経てもtdTomato(赤色)で標識されていることにある。つまり組織障害を起こした部位に、赤色の細胞が存在すれば、それは周囲脂肪組織から一度脱分化が起こり、その後障害組織に分化したことが証明できるマウスである。このマウスを用い、腸管障害時における周囲脂肪組織の関与を証明する。

組織障害モデルの作製

あらかじめエストロゲンで刺激したAdipoq - Cre/tdTomatoマウスに、DSS(デキストラン硫酸)を用いて腸管障害モデルを作製する。DSSは腸管に化学的に障害を起こすものであり、経口(自由飲水)で投与する。全腸にわたり炎症が起こるため、大腸粘膜だけでなく小腸粘膜の評価も同時に行うことが可能である。DSSの経口を開始してから約1週間ほどして腸管炎症による体重減少が出現する。本研究では、腸管再生に対する周囲脂肪組織の関与を確認するために、体重減少が見られるより前に組織標本を作製する。

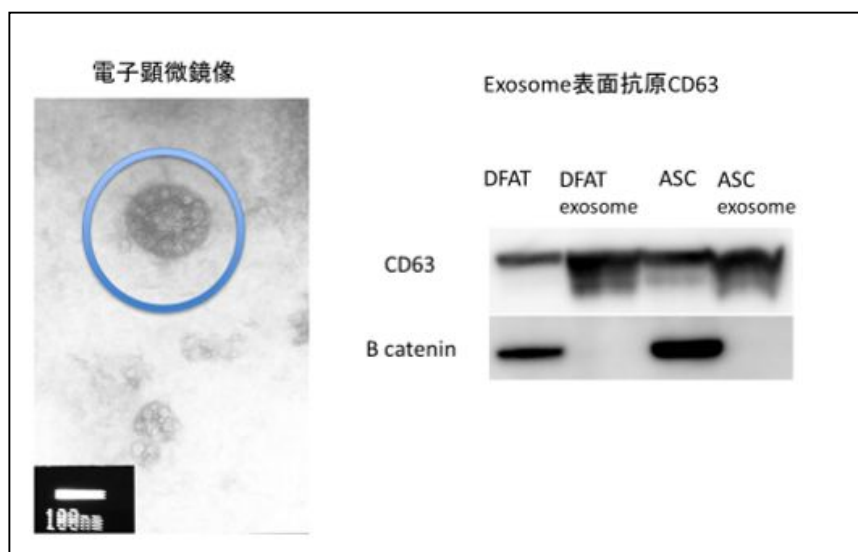
組織評価

再生された腸管組織内のtdTomato陽性細胞(赤色)に対して、免疫組織化学を用い腸管組織内のどの細胞に寄与しているかを確認する。腸管上皮マーカーとして腸細胞(MUC2)、パネート細胞(Lysozyme)、腸内分泌細胞(Chromogranin A)、腸管上皮幹細胞(Lgr5)、腸管上皮前駆細胞(Bmi1)を用いる。

4. 研究成果

腸管障害時、周囲脂肪組織(腸間膜)から再生への寄与を検討するために、当科にて飼育しているAdipoq/CreマウスとROSA26-tdTomatoマウスの繁殖とともに、交配して生まれたAdipoq-Cre/tdTomatoマウスの樹立を行った。次に、4-6週齢のオスAdipoq-Cre/tdTomatoマウスに対して、既報に従い5日間Tamoxifenの腹腔内投与を1mg/bodyで行い、Tamoxifen投与から一週間後に、皮下脂肪と内臓脂肪並びに脂肪組織が存在しない肝臓、脾臓などの実質臓器を摘出した。脂肪組織は、コラゲナーゼ処理を行い、フィルトレーション後、低速遠心にて成熟脂肪細胞を単離した。成熟脂肪細胞に対して、脂肪組織マーカーであるperilipinとHoechst33258にて核染色を行い、成熟脂肪細胞中のtdTomato陽性率(赤色)を検討したところ、97-99%が陽性であった。実質臓器に対しては、Frozen切片を作製し、脂肪組織のない組織では赤色に染まる細胞がないことを確認した。以上より、脂肪細胞の運命を追跡できるモデルマウスの確立とした。

また、腸管組織に遺伝子をデリバリーするmaterialとして、当研究室において使用している脱分化脂肪細胞(DFAT: dedifferentiated



fat cell)を用いる予定であったが、近年、細胞内に存在する exosome が、細胞間伝達に重要な役割を果たし、かつ、腹腔内投与により、腸管組織への取り込みがみられることが報告された。そこで、本実験に用いる遺伝子デリバリーを、DFAT の exosome にて行うことを考えた。DFAT からの exosome は、電子顕微鏡にて 100-200nm の小胞体として確認することができ、exosome のマーカーである、CD69 をウエスタンブロッティングにて確認した。

脂肪運命の追跡が可能なマウスに対し 5%DSS を 1 週間、自由飲水にて投与し、腸管障害部位に対する脂肪細胞の関与を組織学的に検討したところ、上記条件では腸管再生に対する脂肪細胞の関与は見られなかった。DSS 飲水の投与期間や、組織学的評価を行う時期を検討することで、腸管障害部位に対する周囲脂肪細胞の関与が強く表れる時期を凶ったが、マウスの系統維持に時間がかかり、腸管炎症時の上皮再生に脂肪組織が関与していることを証明するための十分な検討が行えなかった。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

「乳癌進展過程における脂肪細胞の形質変換に関する検討」

発表者：土方 浩平、植草 省太、加藤 礼保納、日高 綾乃、小沼 憲祥、越永 従道、松本 太郎

学会名：日本再生医療学会総会

発表年：2019 年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：古屋 武史

ローマ字氏名：FURUYA Takeshi

所属研究機関名：日本大学

部局名：医学部

職名：研究医員

研究者番号(8 桁)：20568539

研究分担者氏名：越永 従道

ローマ字氏名：KOSHINAGA Tsugumichi

所属研究機関名：日本大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8 桁)：70205376

研究分担者氏名：松本 太郎

ローマ字氏名：MATSUMOTO Taro

所属研究機関名：日本大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8 桁)：50366580

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。