

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15742

研究課題名(和文) 生体小腸由来3次元scaffoldを用いた移植可能人工小腸作製

研究課題名(英文) Bioengineering of transplantable small intestine using decellularized intestinal scaffold

研究代表者

岡本 晋弥 (Okamoto, Shinya)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：00329377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：小腸不全に対する唯一の根本的治療は小腸移植であるがその成績は不良であり、新たな治療戦略の探求が必要とされる。本研究は脱細胞化技術を用いて作製した小腸3次元構造を鋳型として小腸グラフトを作製し、生体内に移植して小腸を再生することを目的としている。ラットから小腸を摘出し、血管から薬液を灌流することで脱細胞化小腸を作製した。得られた脱細胞化小腸をラット生体に移植し組織を観察すると、移植した脱細胞化小腸グラフトが足場となり、移植された生体からの血管新生に加え、腸管粘膜上皮や平滑筋細胞の浸潤が認められた。脱細胞化小腸グラフトは生体の小腸成分が浸潤する足場として小腸再生を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although small bowel transplantation is the only curative treatment for patients with irreversible intestinal failure, graft failure rate remains high. Therefore, a new treatment strategy for intestinal failure is required. The aim of this study is to fabricate a transplantable and functional small intestine using 3-dimensional decellularized intestinal scaffold. After removal of the small intestine from Lewis rat, the decellularized small intestinal scaffold was prepared by perfusing detergent solution via the vessel. We implanted the decellularized small intestinal scaffold to rat, and histological analysis was performed. Infiltration of intestinal mucosal epithelium and smooth muscle cells in addition to angiogenesis into the decellularized intestinal scaffold could be observed. It was suggested that the decellularized small intestinal scaffold might promote regeneration of the small bowel with infiltration of small intestinal components from recipient.

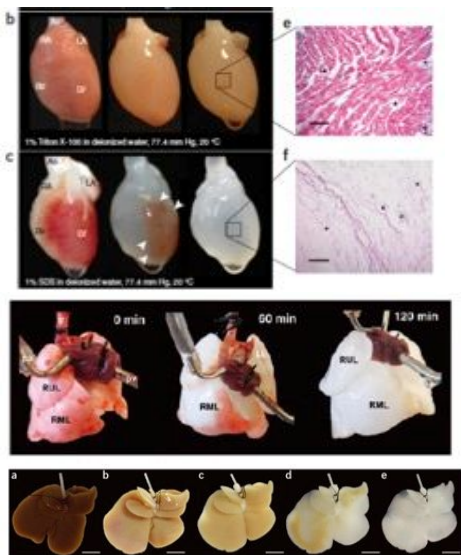
研究分野：小児外科

キーワード：小腸移植 小腸再生 脱細胞化小腸

1. 研究開始当初の背景

小腸不全は短腸症候群や腸管機能不全に起因する難治性の疾患である。その唯一の根本的治療となる小腸移植の成績は、拒絶反応によるグラフト不全の割合が未だ高率であり不良である。そのため、小腸移植に代わり得る有効な治療法開発の必要性は高い。近年になり、組織の細胞成分を薬剤によって除去した組織特異的な細胞外基質を得る脱細胞化技術が立体臓器に応用され、心臓や肺、肝臓といったさまざまな臓器において報告された(下図1)(Ott et al. Nat Med 2008, Ott et al. Nat Med 2010, Uygun et al. 2010)。

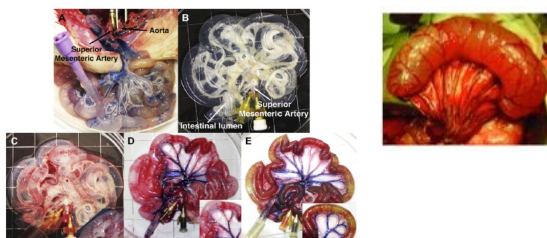
図1



この脱細胞化臓器を鋳型として任意の細胞を生着(再細胞化)させることで人工臓器を作製する試みが研究されている。

脱細胞化臓器の優れている点は、細胞外基質から細胞への生存・増殖シグナルや、細胞外基質に蓄えられている成長因子も保持されており、人工臓器内での細胞の生着や生存、機能に有利に働くことである。さらに臓器の3次元微細構造が保持されているため、栄養・ガス交換のための血管ネットワークも維持され、3次元立体臓器として移植が可能となる。脱細胞化技術は小腸においても応用され、人工小腸として生体への移植が試みられている(下図2)(Totonelli et al. Biomaterials 2012, Nowocin et al. J Tissue Eng Regen Med 2016)。

図2



しかし、脱細胞化技術を応用して作製された人工小腸を生体に同所性に移植して腸管機能を再現し得た報告はこれまでにない。

2. 研究の目的

そこで、脱細胞化された3次元小腸を鋳型として患者由来iPS細胞を用いてex vivoにおいて小腸を再構築すること、これを小腸移植のグラフトとして用いることで小腸不全患者の救命率向上を図り小腸移植を代替し得る再生医療に結びつくことを最終目標とし、この目標に対する基盤研究として、本研究では脱細胞化小腸組織に小腸オルガノイドおよび血管内皮細胞を生着させて培養維持し、消化・吸収といった腸管上皮機能を発現させ、さらに作製した人工小腸を生体内に移植して機能を維持させることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 動物はLewisラットを使用し、ラット小腸を腸間膜と共に全摘出後、血管から薬液を灌流することにより脱細胞化小腸を作製する。

(2) 幼若ラットの近位小腸から小腸オルガノイドを作製して培養維持し、特性解析を行う。次にそれを細胞源として脱細胞化小腸を再細胞化する。脱細胞化小腸の管腔内表面からの再細胞化(Totonelli et al. Biomaterials 2012)と腸間膜血管からの再細胞化を行い、組織標本において生着した細胞の分布とviabilityを比較する。これにより、小腸オルガノイドの再細胞化方法としていずれのアプローチが優れているか検討する。小腸オルガノイドを生着させた再細胞化小腸は細胞培養器内でポンプに接続することにより腸間膜の血管から培地を灌流して培養を行う。

(3) 脱細胞化小腸内で培養された小腸オルガノイドが絨毛と陰窩といった極性を持つ腺組織を構築するかどうか、組織標本の免疫染色(アシアンブルー:杯細胞、リゾチーム:パネート細胞、クロモグラニンA:腸管内分泌細胞、ピリン:微絨毛)を用いて評価する。上皮細胞間の物質輸送に重要なtight junction関連タンパク質(Zonula Occludens-1(ZO-1), ZO-2, Occludin, Junctional adhesion molecule (JAM)-A, Claudin-1, Claudin-3, Claudin-4)の発現量と細胞骨格への結合量をWestern blot analysisによって検証する。

(4) 血管内皮細胞を上腸間膜動静脈に注入して血管内腔に生着・被覆させる。組織像にて血管内皮細胞の被覆率とviabilityを評価し、血管内皮の再細胞化条件の最適化を図る。血管内皮を生着させた小腸に血液を灌流することで血管内皮細胞の血栓抑制

効果について検証する。

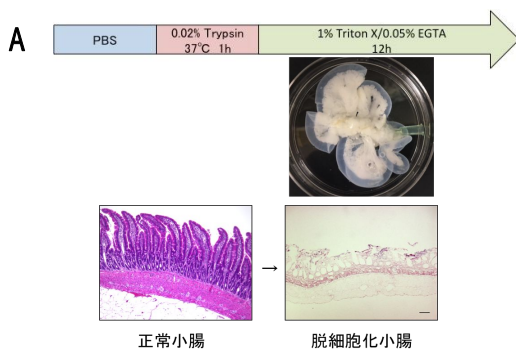
(5) 小腸オルガノイドと血管内皮細胞で再細胞化した人工小腸を *ex vivo* にて培養継続し、臓器としての成熟化を図る。培養 2 日後、4 日後、7 日後の組織像を評価し、循環培養に伴う生着細胞の変化を評価するとともに、長期培養の可能性を評価する。

(6) レシピエントラットの小腸を切除し、その切除断端と再細胞化小腸を縫合して消化管再建を行うとともに、上腸間膜動静脈の吻合により血行再建を行う。移植後 4 時間、8 時間、24 時間、48 時間の再細胞化小腸を摘出し、組織標本にて腸間膜血管の開存性および生着した小腸オルガノイドの生存率とタンパク発現を評価する。また、腸管反転サック法にて蛍光ラベルデキストラン透過速度を指標として tight junction 機能を評価し、再細胞化小腸の移植後機能を定量評価する。

(7) 再細胞化小腸移植後のレシピエントラットを長期に観察し、長期生存が可能か観察するとともに、栄養吸収が可能かどうか体重量変化を追跡する。

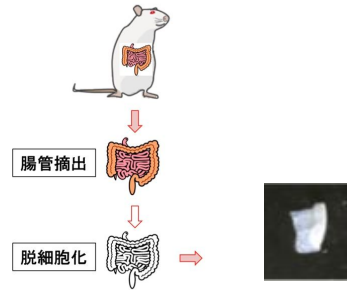
4. 研究成果

(1) 門脈より逆行性に灌流を行うことで小腸の脱細胞化を試みた。まず PBS を灌流し 0.02% トリプシンを 37℃ で 1 時間、その後 1% Triton X-100/0.05% EGTA 溶液を 12 時間灌流して脱細胞化小腸を作製し、組織像を評価した。HE 染色では核や細胞質の成分は認められないが、小腸の微細構造は維持されていることが確認できた(下図 A)。この方法により、ラット小腸から再現性をもって安定的に脱細胞化小腸を得ることができた。



(2) 次に、脱細胞化・再細胞化小腸の生体への移植手技確立のため、まずは細胞を生着させていない脱細胞化小腸骨格のみを移植することとし、脱細胞化小腸から管腔グラフトを作製してレシピエントの消化管断端と吻合して移植した。管腔グラフトとして移植を行うと吻合部の縫合不全が問題となり、当初はレシピエントラットを長期的に生存させることが困難であった。そこで、脱細胞化小腸からパッチグラフトを作製し、生体ラット

の小腸欠損部に移植することとした。

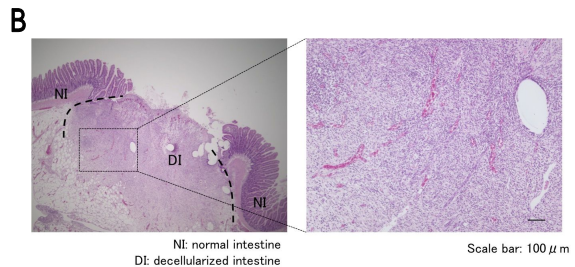


これによりラットは長期的に生存し、移植した脱細胞化小腸グラフトの生体内での組織変化を経時的に追うことができた。

(3) 以下、脱細胞化小腸パッチグラフト移植後の組織像を示す。

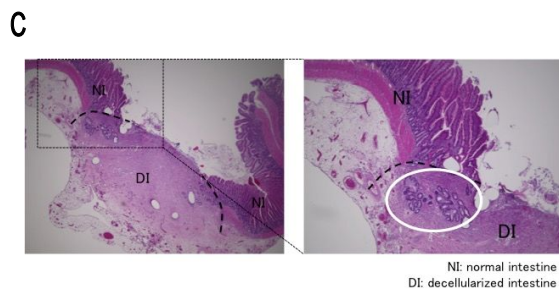
1 週後

脱細胞化小腸骨格内には、周囲からの血管新生が豊富に認められた(下図 B)。



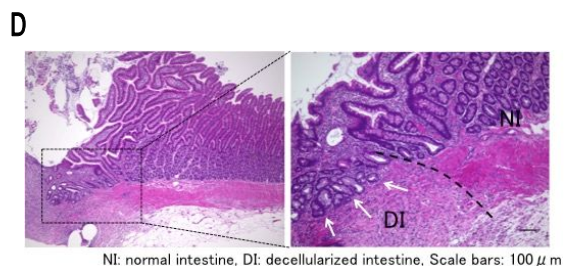
2 週後

脱細胞化小腸骨格内に、レシピエント由来の腸管粘膜成分の浸潤が認められた(下図 C)。

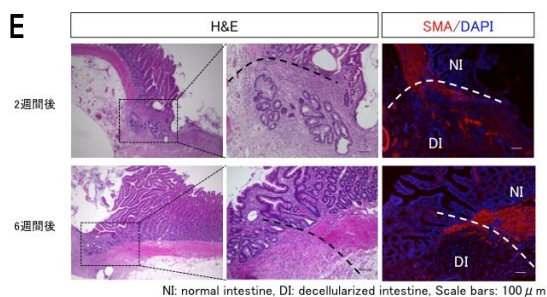


6 週後

粘膜成分の浸潤は持続的に認められた。一部では筋成分が浸潤していると考えられる部位も観察できたが、HE 染色による観察では明らかではなかった。(下図 D)。

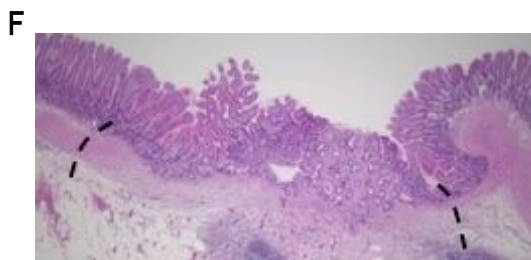


平滑筋細胞の浸潤を評価するため抗平滑筋抗体による免疫染色を行ったところ、脱細胞化小腸骨格内に平滑筋細胞が浸潤していると考えられる組織像を確認できた（下図 E）。



12 週後

粘膜成分は腸管欠損部を覆う程度まで浸潤が持続しており、平滑筋細胞の浸潤も持続的に認められた（下図 F）。



以上の結果から、移植した脱細胞化小腸グラフトが足場となり、レシピエント生体からの血管新生に加え、腸管粘膜上皮や平滑筋細胞の浸潤が認められることが示された。脱細胞化小腸グラフトは生体の小腸成分が浸潤する足場として小腸再生を促進する可能性が示唆され、再細胞化を施行しなくとも生体において消化・吸収・輸送を含めた機能を有する小腸を再生できる可能性が示された。

今後は移植された脱細胞化小腸に浸潤する細胞において、神経成分や細胞増殖能、幹細胞マーカーの発現についても評価する予定である。また、移植手技を改良することで脱細胞化小腸管腔グラフトとしての移植も現在では可能となりつつあり、試みているところである。管腔グラフトとして再生された脱細胞化小腸の生体内での機能についても評価する予定としている。

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）

〔学会発表〕(計 1 件)

小島秀信、石井隆道、福光 剣、大島 侑、川本浩史、南 貴人、宮内雄也、山岡竜也、河合隆之、岡本晋弥、上本伸二、脱細胞化小

腸グラフトを使用した、生体内での小腸再生の試み、第 30 回日本小腸移植研究会、2018、仙台

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 晋弥 (OKAMOTO Shinya)
京都大学医学研究科・客員研究員
研究者番号：00329377

(2) 研究分担者

石井 隆道 (ISHII Takamichi)
京都大学医学研究科・助教
研究者番号：70456789

安近 健太郎 (YASUCHIKA Kentaro)

京都大学医学研究科・客員研究員
現 日本赤十字社 和歌山医療センター
肝胆膵外科部長
研究者番号：00378895

上本 伸二 (UEMOTO Shinji)

京都大学医学研究科・教授
研究者番号：40252449