

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08600

研究課題名(和文) ヒト由来幹細胞と脱細胞技術を用いた蠕動する機能的人工腸管作成の試み

研究課題名(英文) Attempt to create a peristaltic functional artificial intestine using human-derived stem cells and decellularization technology

研究代表者

藤村 匠 (Takumi, Fujimura)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：80573443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：短腸症候群や腸管運動不全に対する新規治療として、脱細胞化技術を用いて作製した腸管scaffoldにヒト歯髄細胞を用いて再細胞化を施し、機能的な人工小腸グラフトを構築することを目標とした。脱細胞技術によりラット小腸Scaffoldを作製でき、移植するヒト歯髄細胞の性質も確認できた。しかし、経血管循環培養(2週間)による再細胞化では移植細胞の多くが循環培養経路途中の腸間膜部分に留まり、免疫組織化学では腸管scaffold内の移植細胞を証明できず、電子顕微鏡でごく僅かに確認できたのみであった。ヒト細胞であるため、4週間の循環培養の延長も試みたが生着率向上にはつながらなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

短腸症候群や腸管不全症例に対する根本的治療は小腸・多臓器移植であるが、厳しい免疫抑制を要する治療とドナー不足の問題を抱えている。蠕動しない腸管はうっ滞性腸炎の温床になる危険性を高めるだけであり、これらの問題点を解決するためには自家細胞を用いた免疫抑制を必要としない、蠕動機能を備えた人工臓器の作成を脱細胞技術を用いて作製する必要があると考えた。脱細胞技術を用いる利点は移植時に吻合する血管や腸管内の微細な血管構造を備えており、移植医療に最適と考えたためであるが類洞のようなもともと細胞通過を許容するような構造を備えた肝臓とは異なり、腸管では血管経由以外の再細胞化の方法を検討する必要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：As a new treatment for short bowel syndrome and intestinal dysmotility, we aimed to construct a functional artificial small intestinal graft which made by decellularization technology and human dental pulp cells. A rat small intestine scaffold could be prepared by decellularization technology, and the properties of the human dental pulp cells to be transplanted could be confirmed. However, in recellularization by transvascular circulation culture (2 weeks), most of the transplanted cells stayed in the mesenterica in the circulation culture route. Immunohistochemistry could not prove the transplanted cells in the intestinal scaffold. Only a few cells could be confirmed by scanning electron microscope. We tried to extend the circulation culture for 4 weeks, but it did not lead to an improvement in the engraftment rate.

研究分野：腸管運動不全

キーワード：腸管運動不全 人工腸管 歯髄細胞 神経堤細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成人では絞扼性イレウスや上腸間膜動脈閉塞症により、小児では壊死性腸炎、中腸軸捻転、腸管運動不全により腸管大量切除を余儀なくされ、短腸症候群として生存していく症例が存在する。症例は生涯にわたり中心静脈栄養が必要となり、カテーテル感染による敗血症や胆汁うっ滞性肝障害による肝硬変といった致命的合併症の危険性を抱えて過ごす。現在この状況を打破できる治療は小腸・多臓器移植しか存在しない (Abu-Elmagd et al, Ann Surg, 2009)。小腸は最も難しい固形臓器の移植である。1980年代に20%以下だった5年生存率が2000年代後半に40-50%台となり、最多症例数の米国ピッツバーグ大学では5年生存率は75%に上昇した (Ueno et al, Surg Today, 2010; Abu-Elmagd et al, Ann Surg, 2012) と報告されているが、標準治療の肝・腎の移植と異なり小腸移植後晩期でも拒絶・感染によるグラフト不全・患者死亡は高率で長期成績は不良である。慢性的なドナー不足も課題であり、脳死移植が積極的に行われている米国ですら常時200人以上待機中であり (Mazariegos et al, Am J Transplant, 2010)、脳死移植が議論の渦中にある日本の状況はさらに深刻である。

2. 研究の目的

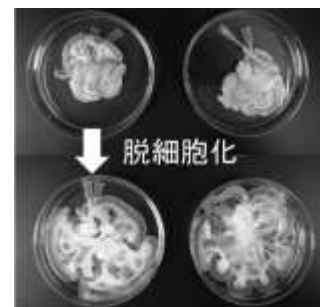
本研究は短腸症候群や腸管運動不全に対する新規治療として、脱細胞化技術を用いて作製した腸管 Scaffold にヒト歯髄細胞もしくはヒト iPS 細胞由来神経堤細胞を用いた再細胞化を施し、機能的な人工小腸グラフトを構築することが目標である。

近年の臓器再生研究ではオルガノイド、シート培養、3D プリンター、そして脱細胞による Scaffold を利用したものが主流である。それぞれに利点があるが本法では将来的な人工臓器移植を見据えた際に絶対に必要となる微細なものも含めた血管構造を有していることが最大の利点と考えている。培養液の中で存在するだけでは臓器としては不完全であり、血管を介した血流で臓器が維持されなければならない。また、腸管として成立するための細胞の足場になる因子が残されており、そこに未分化な細胞を移植することで然るべき細胞が、然るべき要素に分化して腸管を再形成することを期待するものである。腸管のような微小な構造の中に血管、神経、平滑筋などの様々な要素を配置する際に各々の環境で分化させた細胞を共存させることは困難と考え、本法による人工臓器再生の可能性を探る必要があると考えた。

3. 研究の方法

(1) 脱細胞腸管作成の至適プロトコールの確立

慶應義塾大学医学部一般外科教室で取り組んでいる肝臓の脱細胞化法 (Yagi, Cell Transplant, 2013) を応用し、採取した小腸を凍結・融解の後に Trypsin/Triton X-100 を用いた脱細胞化ラット・マウス小腸グラフト作製する。脱細胞化したサンプルは免疫組織化学染色を行う。

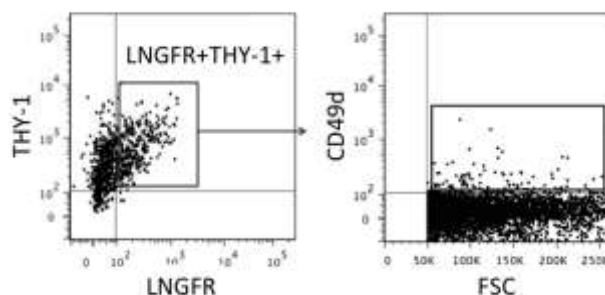


(2) 再細胞化に用いる細胞の有用性 (ヒト歯髄幹細胞とヒト iPS 由来神経堤細胞細胞)

腸管の構成要素は主に筋・間質・粘膜上皮であり、蠕動のためには神経が必要である。これらの要素に同時に分化し得る細胞としてヒト歯髄幹細胞、ヒト iPS 細胞由来神経堤様細胞 (神経堤幹細胞マーカー LNGFR+ (CD271+)、間葉系幹細胞マーカー THY-1+ (CD90+)) を選択した。フローサイトメトリ解析で Sorting を行い、免疫組織化学染色を用いて分化能の評価を行う。

歯髄幹細胞は神経堤細胞と間葉系細胞両方の性質を持つとされ (Shi et al, Orthod Craniofacial Res, 2005)、頭頸部神経堤細胞は治療ソースとして期待されている (Morikawa et al, Stem Cell International, 2016)。

ヒト iPS 細胞由来神経堤様細胞の中でも過去に報告のある純化間葉系幹細胞マーカーである LNGFR, THY-1 (Mabuchi et al, Stem Cell Reports, 2013) を発現したヒト iPS 細胞由来神経堤様細胞は間葉系幹細胞として機能することを我々の研究グループが明らかにした (Ouchi et al, Differentiation, 2016) こと、Studer らが CD49d+ iPS 由来神経堤細胞を用い、致死的腸管運動不全モデルマウスを救命できることを



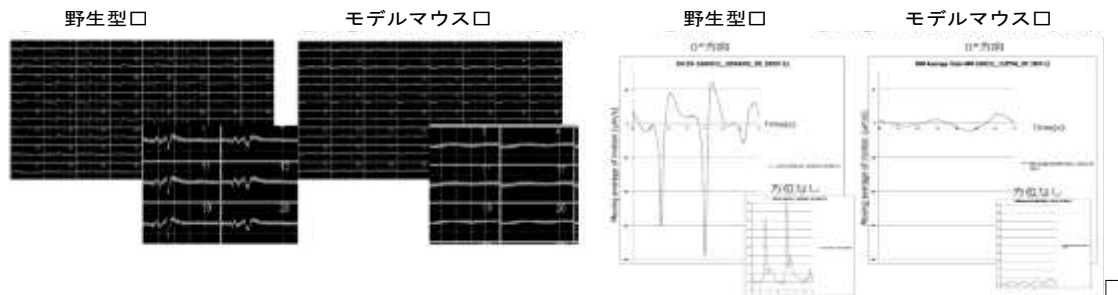
報告しており (Fattahi et al, Nature, 2016)、我々が用いる LNGFR+THY-1+ 細胞も CD49d を発現 (図2) していることから、同様に腸管蠕動に寄与すると考えた。

(3) 作成された人工小腸の蠕動機能の検証

再細胞化に用いる細胞は発光・蛍光融合蛋白を Virus により導入し、in vitro で発光イメージングシステムを用いて Scaffold への生着状況を経時的に観察する。生着した細胞の分化傾向は免疫組織化学染色で評価する。再細胞化した脱細胞化小腸の運動機能は画像解析や電気生理評価法によりに評価する。

運動機能は心筋の神経シグナル伝達評価に活用されている多点平面電極システム：MED64 system を用いた腸管の細胞外電位を測定する方法 (Nakayama et al, Biosens Bioelectron, 2009, Odani et al, submitted) を検討している。さらに MED64 と同時に運動機能の評価できるシステムとして SONY Japan セルモーションイメージングシステム：SI-8000 がある。野生型マウスと無神経筋腸管モデルを用いた予備実験では、無神経筋腸管モデルマウスでは神経がないために神経活動が電氣的に測定されず、セルモーションカメラで蠕動自体が認められないことが分かっている。

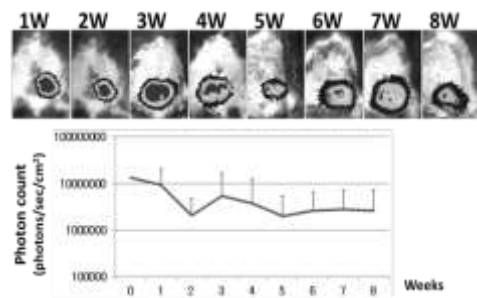
セルモーションカメラでは運動の方向や速さの定量解析も可能であり、再細胞化腸管運動機能を正常腸管と定量的に比較することが可能である。



(4) 免疫不全動物への人工小腸移植

バイオイメージングを用いた細胞生着の評価、免疫組織学による分化能の評価、臨床的・電気生理学的機能評価を in vivo で検証する。

発光・蛍光融合蛋白を導入した細胞で再細胞化した脱細胞化小腸を免疫不全動物に血管吻合を用いて移植する。In vivo で発光イメージングシステムを用いて移植個体生存下に人工小腸の生着状況を経時的に観察する。一定期間の観察の後、摘出した腸管は免疫組織化学染色で分化傾向を評価する。摘出した人工小腸の運動機能は画像解析や電気生理的に評価する。



(1)-(4)の研究計画の全体の流れは右図のとおりである。

本研究は短腸症候群もしくは腸管機能が失われている症例を対象としており、脱細胞に用いる臓器は同種別個体もしくは異種からの提供になることを想定し、脱細胞に用いる腸管は lewis ラットを用い、再細胞化にもちいる細胞はヒト細胞を用いることとした。

今回、血管を経由した再細胞化が最も困難と想定される。再細胞化が本プロトコルでは達成できない場合にも、再細胞化のソースとなりうる細胞の有用性に関する検討は行われる。



4. 研究成果

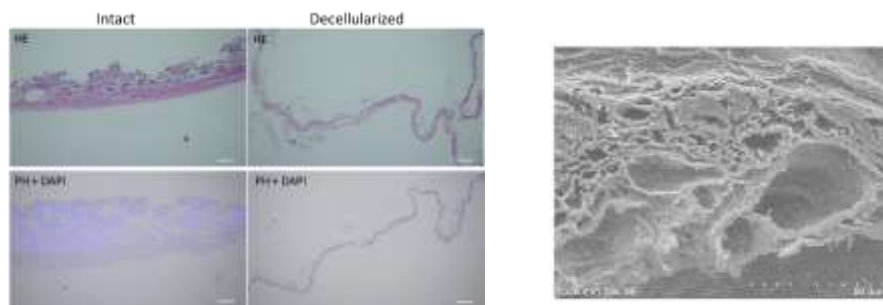
(1) 脱細胞腸管作成の至適プロトコールの確立

Lewis ラット(オス)7 週齢の全小腸を門脈と大動脈、腸間膜を含めて摘出し、1% PBS でよく還流した後に -80°C で冷凍保存した。解凍した後に、大動脈を流入路、門脈を流出路として 1% PBS で還流、続いて 0.05% EGTA とタンパク分解酵素である 0.05% Trypsin を用いて還流、さらに 0.05% EGTA と非イオン界面活性剤である 0.5% Triton X で還流を行うことで図のように脱細胞化を行った。最後に 1% PBS で還流し、臓器内に残ったタンパク分解酵素や非イオン界面活性剤をできるだけ除去し、再細胞化に用いる細胞への影響が少なくなるよう処置を行った。



免疫組織化学での評価は核染色 (DAPI) を用いて行い、脱細胞化腸管では明らかに核が減少していることが確認できた。

同時に電子顕微鏡での観察も行っているが、脱細胞化腸管では正常腸管で認められた粘膜構造などは消失しており、筋層部分の筋束を認めるのみとなっていた。今回注目している血管構造に関しては内腔が維持されていることも確認できた。



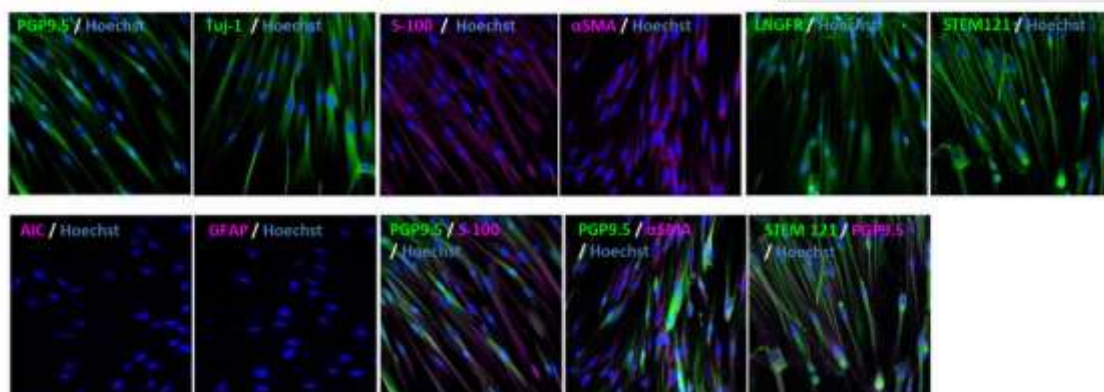
(2) 再細胞化に用いる細胞の有用性(ヒト歯髄幹細胞とヒト iPS 由来神経堤細胞)

我々が入手した再細胞化に用いるヒト歯髄細胞 (VERITAS 社から購入) の分化実験を行った。

神経堤細胞と間葉系幹細胞の両方の性質を持つことから、神経、グリア、平滑筋に分化する神経堤細胞の分化傾向と骨、軟骨、脂肪に分化する間葉系幹細胞の分化傾向を示すことがこれまでも報告されており、同様の分化傾向を示すことが確認できた。

ヒト iPS 細胞由来神経堤細胞も同様の分化傾向を示した。

分化した神経は神経マーカーを発現していたが形状は体性幹細胞から採取した神経堤細胞と比較すると spindle 形状であり、樹状突起構造があまり認められなかった。また、分化実験では平滑筋マーカーも同時に発現している細胞が存在し、分化実験開始から 3 日目と 7 日目でもその発現に変化はなく、更に長期の分化実験でマーカーが 1 つに定まるか確認する必要があると思われた。



(3) 作成された人工小腸の蠕動機能の検証

レンチウイルスを用いて蛍光発光タンパクを導入したヒト歯髄細胞を神経堤細胞の神経分化培地で懸濁液にし、脱細胞したラット小腸に対して2週間の期間に渡って循環させ、再細胞化を試みた。循環は血管経由で専用の培養器を用いた。神経培地はヒト歯髄細胞が神経堤細胞の神経分化培地で神経・グリア・平滑筋に分化することを予備実験で確かめていたために選択した。

発光タンパクを導入した細胞は循環培養を行ったままに In vivo イメージングシステムで細胞の生存と位置を観察することが可能であった。ヒト歯髄細胞 1.0×10^5 個、ラット全小腸を用いた実験ではほぼ全ての細胞が腸間膜に留まっており、腸管 scaffold に到達していないことが確認された。

懸濁液で循環させる細胞数を 1.0×10^6 個とし、小腸のサイズは2cm程度と小さなサンプルとして、再度、2週間の循環培養を行ったが同様に多くの細胞が腸間膜に留まり、腸管 scaffold に到達する細胞が少ないという結果であった。免疫組織化学染色でも腸管内の細胞を示す染色結果が得られなかった。4週間の培養も試みたが、真菌感染のリスクが上昇する結果となったのみで、細胞生着率の増加は得られなかった。

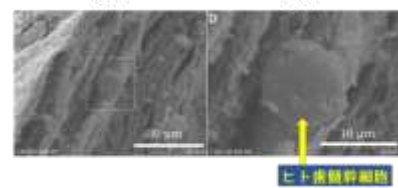
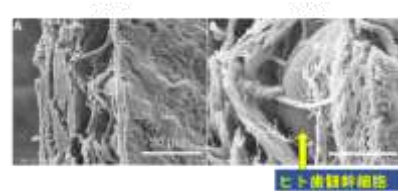
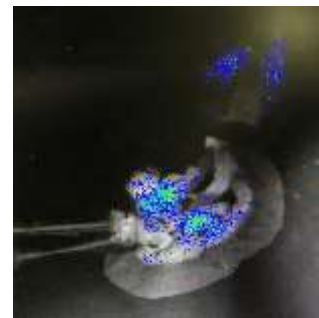
しかしながら、電子顕微鏡による観察では僅かであるが、脱細胞化腸管内にもともと合ったものとは異なる形状の細胞が認められた。これは循環培養によって腸管 scaffold に到達したものと考えられた。本法は脱細胞化肝臓の再細胞化を目的とした循環培養プロトコルを用いて行ってきたが、肝臓においては胆管を用いた培養を用いており、もともと細胞通過がありうる類洞などの構造があるために細胞が scaffold 内に侵入できるが、腸管ではそのような構造はなく、血管内皮を通した scaffold への細胞生着は困難である可能性が示唆された。

(4) 免疫不全動物への人工小腸移植

バイオイメージング、分化能の免疫組織学的評価、臨床的・電気生理学的機能評価も予定していたが、(3)の実験より先には進めず、免疫不全動物への移植とその後の機能評価には至らなかった。

以上より、臓器の形状を形成するのみならず、人工臓器移植後に血流を維持し、運動機能を発揮する脱細胞化技術を用いた人工小腸を作成するには至らなかった。血管経由の循環培養では scaffold 内への効率的な細胞侵入は得られない事がわかり、今後は①脱細胞腸管を浮遊させている液体自体も細胞懸濁液として細胞生着を促す、②scaffold 内に必要な因子が不足している可能性の見直し、③細胞生着を促す因子の追加、等を検討する必要があると考えられた。

また、循環培養の流入路となっていた血管にも有効な細胞生着は認められておらず、本法のメリットと考えられていた移植時の吻合に耐える血管のコンディションも得られていなかった。上記①-③の検討とともに血管内皮によりしやすい細胞を用いる必要もあると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takumi Fujimura	4. 巻 9(19)
2. 論文標題 Maintenance treatment with infliximab for ulcerative ileitis after intestinal transplantation: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World Journal of Clinical Cases	6. 最初と最後の頁 on line
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12998/wjcc.v9.i19.0000	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤村 匠
2. 発表標題 幹細胞と脱細胞技術を用いた人工小腸作成の試み
3. 学会等名 第50回消化管機能研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤村 匠
2. 発表標題 幹細胞と脱細胞技術を用いた人工小腸作成の試み
3. 学会等名 第31回小腸移植研究会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 藤村 匠	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 10
3. 書名 小児外科(小児外科医が習得すべき検査 手技と診断 ヒルシュスプルング病・ヒルシュスプルング病類縁疾患(注腸検査, 腸管生検, 直腸肛門反射))	

1. 著者名 藤村 匠	4. 発行年 2018年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 4
3. 書名 小児外科(【私の施設の術前・術後管理(ICから退院指導まで)】Hirschsprung病(Soave法)(解説/特集))	

1. 著者名 Takumi Fujimura	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 292
3. 書名 Hirschsprung ' s Disease and the Allied Disorders: Status Quo and Future Prospects of Treatment	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	黄地 健仁 (Takehito Ouchi) (30803564)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教 (32612)	
研究分担者	黒田 達夫 (Tatsuo Kuroda) (60170130)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授 (32612)	
研究分担者	芝田 晋介 (Shinsuke Shibata) (70407089)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・訪問教授 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------