

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09067

研究課題名(和文) 腸上皮オルガノイドと血流温存バイオチューブによる小腸再生の研究

研究課題名(英文) Study of the small intestine reproduction with the bowels epithelium organoid and the bloodstream preservation Biotube

研究代表者

古村 眞 (Komura, Makoto)

東京大学・医学部附属病院・特任教授

研究者番号：10422289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小腸上皮の幹細胞を含む細胞をオルガノイドとして培養する技術が開発された。我々は、鋳型周囲を被包化する被包化線維性組織体(Biotube)と小腸上皮オルガノイドを用いて腸管再生研究を行った。鋳型周囲を被覆する線維性組織(鋳型被包化組織体：biotube)に、小腸上皮オルガノイドを播種し、vitroで接着することを組織学的に確認した。生体内の鋳型被包化組織体に小腸上皮オルガノイドを播種し、線維性組織体と播種した小腸上皮の接触面にE-Cadherinの発現を確認した。皮下の遊離節小腸とバイオチューブの端々吻合に成功したが、バイオチューブに小腸粘膜や平滑筋の自己再生は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小腸上皮オルガノイドが鋳型被包化組織体(Biotube)に接着することは、新たな知見を得ることができた。また、腸液が流れない状況ではあるが、biotubeと腸管が吻合することが可能であることを確認しており、新たな腸管再生の足場材料を見出すことができた。これらの知見と技術は、短小腸に対する新たな腸管再生手法を示唆する。

研究成果の概要(英文)：A technique to culture the cell including the stem cell of the small intestine epithelium as organoid was developed. We performed an intestinal tract reproduction study using encapsulation fiber-related body (Biotube) and small intestine epithelium organoid to encapsulate mold people. Disseminated the small intestine epithelium organoids were adhered to internal lumen of biotube in vitro histologically. Disseminated the small intestine epithelium organoids were adhered to internal lumen of biotube with E-Cadher expression in vivo. We succeeded in an end-to-end anastomosis of the biotube to vascularized isolation small intestine in the subcutaneous, but there is no the self-replication of the small intestine mucous membrane and the smooth muscle.

研究分野：再生医療

キーワード：小腸上皮オルガノイド biotube 遊離腸管節

1. 研究開始当初の背景

腸回転異常症などの腸軸捻転症では、腸管壊死に伴い小腸大量切除を要し短小腸となり、下痢や栄養吸収不良の状態を呈する短腸症候群に至る。軽症例では、高カロリー輸液による栄養管理、薬剤により小腸絨毛上皮の成長促進治療が行われ、高カロリー輸液の離脱が可能である。これは、腸管の自律再生能力が発揮されているからである。中等症以上では、Bianchi 手術などの腸管長手術が施行される。重症例では、小腸移植が適応となるが、リンパ組織豊富な小腸組織では免疫抑制療法が不可欠で、本邦の5年生存率は約70%と報告されている。

我々は、体内異物を隔離するためのカプセル化現象によって形成される線維性組織を摘出し、組織修復剤として移植している。この技術は自己の生体組織によって3次元の組織体を形成する生体内組織形成術(In Body Tissue Architecture: IBTA)として提唱されている。この線維性組織は、線維芽細胞などと、線維芽細胞が産生したコラーゲンで形成され、形状によってバイオチューブ・バイオバルブ・バイオシートと呼称されている。我々研究室では、この自己組織体は細いコラーゲン線維、間葉系幹細胞が多く、両性類四肢再生時の遺伝子発現があり、成長因子が豊富であることを発見した。この組織は個体発生の初期に生じる未分化細胞の集合体である間葉系結合組織と類似しており、組織幹細胞が遊走し、分化・増殖して三胚葉組織の自律再生が誘導されると考えている。また共同研究者らは幹細胞を含む腸上皮細胞を3次元構造(オルガノイド)として培養する独自の技術を開発した。腸上皮オルガノイドに含まれるLgr5+幹細胞は継代操作を経て長期間培養が可能であり、小腸・大腸に固有の全上皮細胞へ分化可能である。中村らはマウスの大腸上皮由来のオルガノイドを作成して移植し、オルガノイドが腸上皮欠損部に生着し、周囲と同様の陰窩構造を構築することを示した。また成体マウス由来の小腸上皮細胞からなるオルガノイドを大腸へ異所移植したところ、異所性に生着し小腸組織に特有な絨毛構造を形成し、すべての小腸型分化細胞を有することを証明した。このように腸上皮オルガノイドは移植により腸上皮組織を構築することが可能であり、炎症性腸疾患などの腸上皮障害が遷延する疾患への臨床応用が期待されている。本研究では、組織の自律再生が可能なバイオチューブに腸上皮オルガノイドを組み合わせて腸上皮組織の形成を促進し、分泌能と吸収能の優れた腸管の自律再生技術を開発する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、発生に有用な遺伝子発現と成長因子を含有し、外・内・中胚葉組織へと自律再生を誘導するバイオチューブを足場とし、腸上皮組織の再生能を有する腸上皮オルガノイドを組み合わせることで、分泌能、吸収能に優れた腸管組織の自律再生技術を開発することである。腸管組織は、粘膜上皮、粘膜下層、筋層、腸管神経節等からなる複雑な形態をしており、蠕動と栄養吸収機能を有している。腸管再生の研究は、未分化なES細胞、iPS細胞など幹細胞から、この複雑な形態と機能を再生しようとする手法が主流である。我々は、個体発生初期の間葉系結合組織に類似した未分化な足場材料を用いて、胎児期の腸管発生環境を模倣し、腸管の自律再生研究を行う。さらに腸管の上皮細胞へ分化し、腸上皮組織を自律構築可能な腸上皮オルガノイドを組み合わせることで、腸上皮の再生を強化し小腸再生が必要な短腸症候群の児に求められる分泌能、吸収能が高い小腸再生が可能となる。

3. 研究の方法

腸上皮オルガノイドのバイオチューブへの生着の検討

EGFP トランスジェニックマウスより小腸上皮細胞を採取して7日間培養し小腸上皮オルガノイドを作成する。これと並行し、異なるマウスの背部皮下に鋳型を埋め込みバイオチューブを作成する。埋め込んだ4週後にバイオチューブが形成されたら鋳型のみを摘出し、適切なタイミングで培養し回収したEGFP(enhanced green fluorescent protein, 緑色蛍光蛋白)陽性マウス由来の小腸上皮オルガノイドをバイオチューブの内腔に注入して両端を閉鎖する。オルガノイド生着後、2週後、4週後にバイオチューブを摘出し、バイオチューブ内腔表面に組織学的に小腸上皮の絨毛構造が形成されることを確認するバイオチューブと腸上皮オルガノイドの遊離腸管への移植

次にマウスを用いてバイオチューブと腸管を吻合し腸管の再生を行う。本研究では木村らの遊離腸管節(Iowa model)モデル(日本小児外科学会雑誌 28:282, 1992)を応用する。形成されたバイオチューブを摘出して使用するのではなく、形成された場所で遊離腸管節と吻合し人工肛門とする。これによりバイオチューブの血流を温存することで腸管組織の自律再生を強化するとともに、腸管再生までの間、バイオチューブが消化液や食物に暴露されるのを防ぐ。このモデルでバイオチューブのみを吻合した場合とオルガノイドを付加して吻合した場合で小腸再生を特に腸上皮再生の違いを中心に比較検討する。

4. 研究成果

in vitro: HE 染色で小腸上皮オルガノイドがbiotube 表面に接しているのを確認した。
in vivo: 移植後、day1、day7 のいずれも HE 染色でbiotube 内腔表面にオルガノイドを認めた。E-Cadherin による免疫組織化学染色でbiotube に接するオルガノイドは陽性を示した。day1 と比較して day7 でオルガノイドの増殖や腸上皮形成は認めなかった。よって、バイオチューブ内で腸上皮細胞の成熟は認められなかった。
biotube と有茎小腸の吻合: 術後、biotube と有茎小腸内腔に分泌物や脱落した粘膜と考えられる残渣が貯留し定期的に切開し排出を要した。4 週後、biotube 内腔は狭小化していたがbiotube と小腸壁は連続性を持って癒合していた。biotube には小腸上皮や平滑筋の形成は確認できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木啓介、古村眞、古村浩子、鈴木完、藤代準、松本有加、中村哲也、 中山泰秀
2. 発表標題 小腸再生を目指した小腸上皮オルガノイドのbiotubeへの接着の研究
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会(2020年5月18日～ 5月29日, Web開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木啓介、古村眞、古村浩子、鈴木完、藤代準、松本有加、中村哲也、 中山泰秀
2. 発表標題 小腸再生を目指した小腸上皮オルガノイドのbiotubeへの接着の研究
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木啓介、古村眞、他
2. 発表標題 小腸再生に向けた小腸上皮オルガノイドを用いた小腸上皮付きbiotubeの開発研究
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木啓介、古村眞、他
2. 発表標題 小腸再生を目指した小腸上皮オルガノイドのbiotubeへの接着の研究
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木啓介、古村眞、他
2. 発表標題 小腸上皮オルガノイドを用いた小腸上皮付きbiotubeの開発研究
3. 学会等名 第2回学術集会 iBTA再生医療研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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	中山 泰秀 (Nakayama Yasuhide) (50250262)	東京大学・医学部附属病院・客員研究員 (12601)	
研究分担者	鈴木 啓介 (Suzuki Keisuke) (50724887)	埼玉医科大学・医学部・客員講師 (32409)	
研究分担者	松本 有加 (Matsumoto Yuka) (50813672)	東京医科歯科大学・医学部附属病院・特任助教 (12602)	
研究分担者	藤代 準 (Fujishiro Jun) (60528438)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	
研究分担者	中村 哲也 (Nakamura Tetsuya) (70265809)	順天堂大学・大学院医学研究科・特任教授 (32620)	

6. 研究組織（つづき）

	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	鈴木 完 (Suzuki Kan) (80598508)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	

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