

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09155

研究課題名(和文) 非培養自己ヒト皮下脂肪組織由来再生幹細胞を用いた便失禁治療の開発

研究課題名(英文) Development of treatment for fecal incontinence using non-cultured human adipose derived mesenchymal stem cells.

研究代表者

石塚 満 (Ishizuka, Mitsuru)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20382963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：バルーンによる膣過伸展(vaginal distension; VD)を行い、作成した肛門括約筋障害モデル雌ラットの肛門括約筋に、ラットの鼠径部皮下組織から分離した間質細胞血管群(stromal vascular fraction; SVF)を注入し移植し、肛門内最大静止圧の測定は、それぞれ移植後4日後と10日後に、エアバルーンカテーテル法で測定した。4日後の肛門内最大静止圧はVD群に比べVD+SVF群では有意に改善しコントロール群と同レベルまでの改善を認めたことから動物実験において、ADSCsの移植により肛門機能障害の改善が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果から下部尿路障害の治療モデル動物で行われた結果と同様の結果を得ることができた。腹圧性尿失禁の治療に実際に患者さんの脂肪組織由来間葉系幹細胞が治療として用いられており、近い将来保険収載される可能性も予想されることから脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた肛門括約筋障害に基づく便失禁の新たな治療方法として今回の研究の成果は今後発展していくと考えられ、再生医療に基づく新たな便失禁の治療方法の誕生を予見できたことについては国内外に与えるインパクトは極めて大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Vaginal distension (VD) rat was used as a model of damaged anal sphincter function (ASF). The adipose SVF was separated from the inguinal fat of syngeneic green fluorescent protein (GFP) transgenic rats and delivered into the internal anal sphincter (IAS) of VD rats. The maximum resting pressure (MRP) was evaluated after VD treatment. GFP-transfected human-adipose derived mesenchymal stem cells (ADSC) were transplanted into the IAS of nude rats. The mean MRP (during catheter withdrawal) of VD rats was significantly lower than that of control rats, and SVF injection normalized it 4 days after treatment: Control: 5.66 ± 0.98 , VD: 4.04 ± 1.28 , VD+SVF: 5.92 ± 1.28 (mmHg, control vs. VD: $P = 0.039$; VD vs. VD+SVF: $P = 0.007$). The transplanted syngeneic SVF survived for 10 days. Transplanted xenogeneic human-ADSCs survived in the IAS of nude rats for 4 and 10 days. Syngeneic and heterotopic transplanted ADSCs engrafted in the IAS and ameliorated damaged ASF in a rat model of VD.

研究分野：下部消化管治療

キーワード：再生医療 便失禁 脂肪組織由来再生幹細胞 間質血管細胞群 内肛門括約筋 肛門括約筋障害モデル動物

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

便失禁は生活の質を低下させる大きな要因であり、投薬やバイオフィードバック療法が対症療法として行われてはいるが、未だ根本的な治療法は存在しない。一方腹圧性尿失禁に目を向けてみると、患者さんから分離した脂肪組織由来再生幹細胞 (Adipose-derived regenerative cells: ADRCs) を下部尿路括約筋に移植することにより、尿失禁の改善を認め、実臨床への応用が期待されるようになってきた。

尿失禁における再生医療で培われたこれらの経験や技術を元に、肛門括約筋障害による便失禁患者においても同様に障害を受けた肛門括約筋に ADRCs を移植することで、括約筋の機能を改善させ、便失禁を改善できるのではないかと推測された。

そこで動物実験を実施することで、再生医療を用いた便失禁の改善効果を検討する試みが立案された。

名古屋大学大学院医学研究科泌尿器科学主導の臨床研究「非培養ヒト皮下脂肪組織由来再生幹細胞を用いた腹圧性尿失禁治療の開発」に獨協医科大学病院として参加しており、現在までに有害事象の報告はなく安全に施行できている。このため、本研究も安全かつ有効性をもって実施できると考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は便失禁に対する新たな治療法の確立を目指すことである。そのため肛門括約筋障害モデル動物を使い、脂肪組織由来間葉系幹細胞 (adipose derived mesenchymal stem cells; ADSCs) を含有する間質血管細胞群 (stromal vascular fraction; SVF) を障害された内肛門括約筋 (internal anal sphincter; IAS) へ移植し、肛門機能の改善効果を調べることを目的とする。

3. 研究の方法

バルーンによる膣過伸展 (vaginal distension; VD) を行い作成した肛門括約筋障害モデル雌ラットの IAS に、同系 Lewis Green fluorescent protein (GFP) トランスジェニックラットの鼠径部皮下組織から分離した SVF を注入し移植した。肛門内最大静止圧 (maximum resting pressure; MRP) の測定は、それぞれ移植 4 日後と 10 日後に、エアバルーンカテーテル法にて、挿入時と引き抜き時で測定した。また GFP 導入ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞 (GFP-hADSCs) のヌードラット IAS への移植を行い、移植後の hADSCs の生着状況と括約筋の障害の程度を免疫組織学的に評価した。

4. 研究成果

4 日後の引き抜き時の平均 MRP 値は VD 群ではコントロール群に比べて有意に低値であるのに対し、VD+SVF 群では正常レベルまで改善を認めた Control: 5.66 ± 0.98 , VD: 4.04 ± 1.28 , VD+SVF: 5.92 ± 1.28 (mmHg, control vs. VD: $P = 0.039$ and VD vs. VD+SVF: $P = 0.007$)。組織学的評価では VD により明らかに IAS は断裂し障害を受けており、移植された SVF は 10 日後での生着が確認できた。さらに hADSCs も移植されたヌードラット IAS で同様に 4 日後での生着が確認

された。以上のことから同系、異系ともに移植された ADSCs は IAS での生着を認め、障害を受けた VD ラットの IAS の機能を改善した。

本研究の成果から下部尿路障害の治療モデル動物で行われた結果と同様の結果を得ることができた。腹圧性尿失禁の治療に実際に患者さんの脂肪組織由来間葉系幹細胞が治験として用いられており、近い将来保険収載される可能性も予想されることから脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた肛門括約筋障害に基づく便失禁の新たな治療方法として今回の研究の成果は今後発展していくと考えられ、再生医療に基づく新たな便失禁の治療方法の誕生を予見できたことについては国内外に与えるインパクトは極めて大きいと考えられる。

以下に今回の実験の流れを図表を用いて示す。

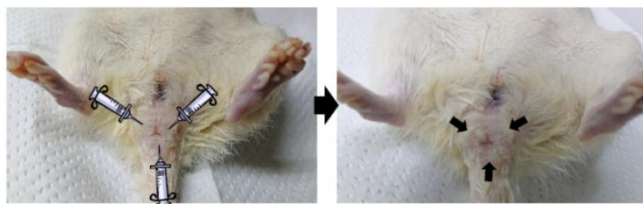


Fig. 1a

細胞移植は経肛門的に図のごとく 3 方向から内肛門括約に注入した。

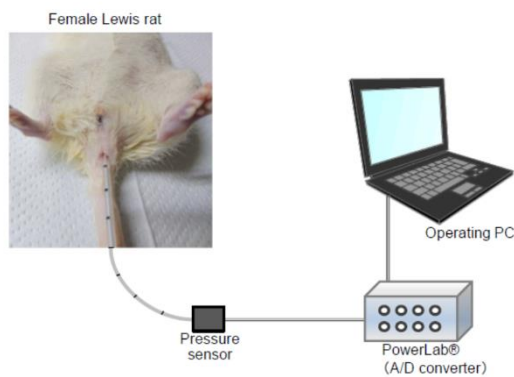


Fig. 1b

経肛門的に圧トランスデューサーを挿入し、肛門内圧測定を行った。

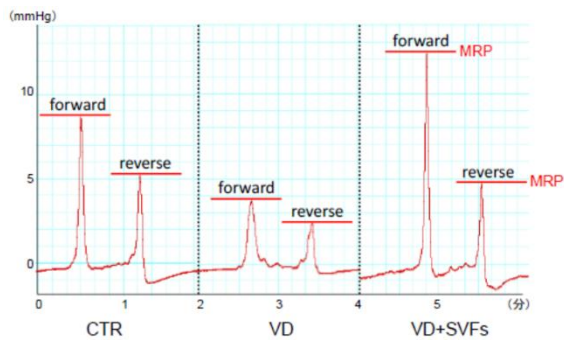


Fig. 1c

内圧側的には挿入時と引き抜き時に行い、コントロール群 (CTR)、VD 群、VD+SVF 群に対してそれぞれ施行した。

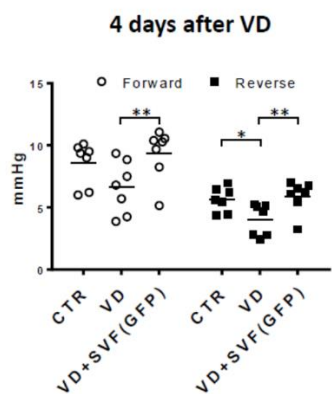


Fig. 2a

VD 施行後 4 日目の圧測定の結果である。挿入時、引き抜き時ともに VD+SVF 群では VD 群に比べて有意にコントロール群と同レベルまでの内圧の改善を認めた。

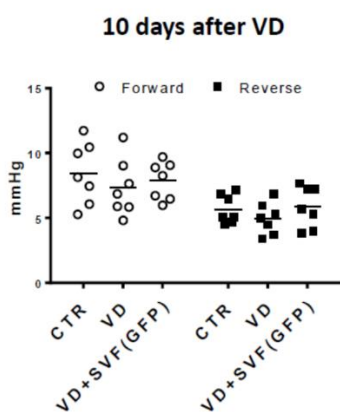


Fig. 2b

VD 施行後 10 日目の圧測定の結果である。挿入時、引き抜き時ともに VD+SVF 群、VD 群ともにコントロール群と同レベルまでの内圧の改善を認め、3 群間の差異は認められない。

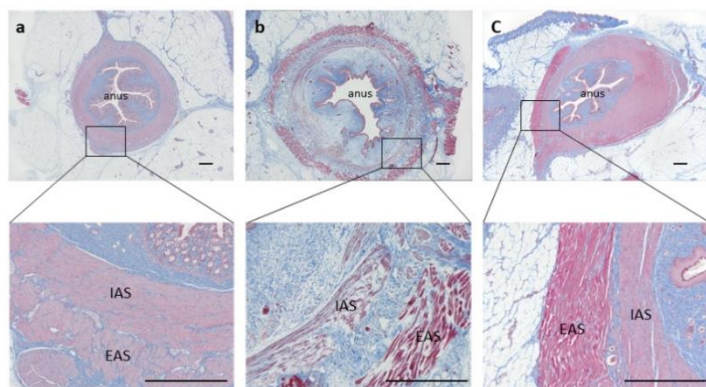


Fig. 3

コントロール群(a)に比べて VD 群(b)では、ない肛門括約筋の断裂が認められ、内外括約筋の間隙には炎症細胞の遊走が認められるが、10 日後の観察では(c) コントロール群と同様のレベルまで治癒が認められる。

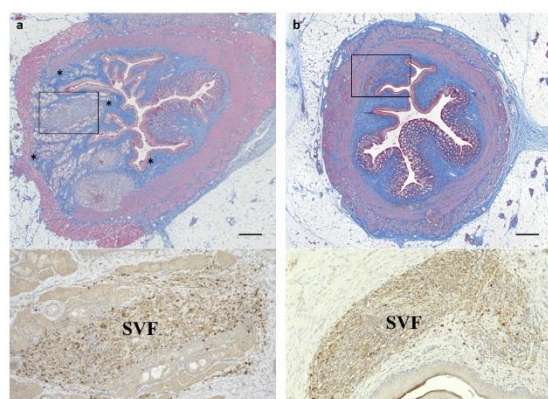


Fig. 4

上段は HE 染色でありそれぞれ 4 日目 (a), 10 日目 (b) ともに移植された SVF が括約筋近傍に生着しているのがわかる。下段は Masson 染色であり、移植生着した SVF がコラーゲン細胞に分化していることがわかる。

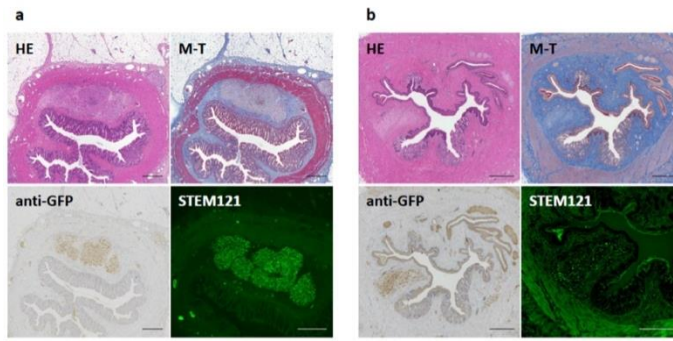


Fig. 5

GFP 導入ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞 (GFP-hADSCs) のヌードラット IAS への移植実験である。

それぞれ 4 日目(a), 10 日目(b)ともに移植された GFP-hADSCs が括約筋近傍に生着しているのがわかる。

それぞれ左上が通常の HE 染色、右上が Masson 染色、左下が抗 GFP 抗体を用いた免疫染色、右下が

STEM121 というヒト細胞質特異的な免疫染色法で行ったものである。

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 0件）

1. 著者名 Satoko Kishimoto, Mitsuru Ishizuka, Ken-ichi Inoue, Tomonori Yamanishi, Takayuki Shimizu, Kanya Kaga, Taku Aoki, Keiichi Kubota	4. 巻 -
2. 論文標題 Local transplantation of syngeneic adipose stromal vascular fraction ameliorates damaged anal sphincter function in a rat model of vaginal distension	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 石塚 満
2. 発表標題 脂肪組織由来再生幹細胞移植による内肛門括約筋機能障害改善効果の検討
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石塚 満
2. 発表標題 脂肪組織由来再生幹細胞移植による内肛門括約筋機能障害改善効果の検討
3. 学会等名 JDDW2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石塚 満
2. 発表標題 便失禁治療への応用を目指した脂肪組織由来再生幹細胞移植による内肛門括約筋機能障害改善効果の検討
3. 学会等名 第26回大腸肛門機能障害研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石塚 満
2. 発表標題 内肛門括約筋機能障害改善を目的とした脂肪組織由来間葉系幹細胞移植の効果
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石塚 満
2. 発表標題 脂肪組織由来間葉系幹細胞移植による内肛門括約筋機能障害改善効果
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022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	清水 崇行 (Shimizu Takayuki) (50622198)	獨協医科大学・医学部・助教 (32203)	
研究分担者	窪田 敬一 (Kubota Keiichi) (70260388)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	
研究分担者	山西 友典 (Yamanishi Tomonori) (90220425)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	

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	井上 健一 (Inoue Kenichi) (90587974)	獨協医科大学・医学部・准教授 (32203)	
研究分担者	岸本 聡子 (Kishimoto Satoko) (10511488)	獨協医科大学・医学部・助教 (32203)	

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