

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24014

研究課題名（和文）生体分解性足場を用いた組織工学的手法と赤色LEDによる新たな腸管再生法の開発

研究課題名（英文）Development of tissue engineering method using bioabsorbable scaffolds and new intestinal regeneration method using red LED

研究代表者

吉川 雅登（YOSHIKAWA, Masato）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・徳島大学専門研究員

研究者番号：60737097

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者は、既にシリコンチューブを用いた腸管再生モデルを作成しているが、これを改変して、生体分解性チューブを使用し、さらに赤色LEDを照射することで、腸管再生能が改善され、かつ足場の除去に再開腹が不要であるという仮説のもと、本研究では短腸症候群における腸管再生の臨床応用を目指しその有用性について検討した。

ラットでシリコンチューブおよび生体分解性PGAチューブを間置する腸管再生モデルの作成に成功した。両群とも、8週で全層での腸管再生が得られ、神経繊維も確認できた。PGAチューブ群では、完全に吸収・消失していた。なお、赤色LED照射の腸管延長効果はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体分解性チューブをscaffoldにした腸管再生モデルにおいて、腸管再生速度の促進および足場の除去を要さない長い再生腸管が得られた。短腸症候群患者において比較的簡単な手術手技や安価な医療資材によって自己組織による効果的な腸管の延長が可能となり、根本的治療の存在しない短腸症候群の患者にとって大きな福音となる可能性があると思われる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to develop a more efficient intestinal regeneration method as a radical treatment for short bowel syndrome.

We have already created an intestinal regeneration model in rats using a silicone tube. By modifying this method to use a bioabsorbable tube instead of a silicone tube and irradiate it with a red LED, the intestinal regeneration ability is improved and reopening of the abdomen is not necessary to remove the scaffold. In this study, we investigated its usefulness for clinical application of intestinal regeneration in short bowel syndrome.

I have succeeded in creating new intestinal regeneration models using a silicone tube and a bioabsorbable PGA tube in rats. In both groups, full-thickness intestinal regeneration was obtained at 8 weeks, and nerve fibers were also confirmed. In the PGA tube group, it was completely absorbed and disappeared. However, there was no effect of extending the intestinal tract by red LED irradiation.

研究分野：消化器外科学、小児外科学

キーワード：再生医療 短腸症候群 腸管延長 脂肪由来幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)短腸症候群は、広範囲小腸切除後に小腸が本来の1/2~1/3以下しか残存しておらず、経口摂取のみでの水分および栄養の吸収では生命を維持することが困難な状態である。Total paraenteral nutrition (TPN)の開発進歩により生命維持の延長が可能とはなっているが、長期のTPNは肝不全へといった肝障害を引き起こすことや、sepsisの原因となること、さらには幾度となく起こるline閉塞および感染のためline確保困難などの予後不良因子としての問題を抱えている。またTPNは医療コストの面でも世界的に問題となっており、米国では在宅でのTPNでは年間に患者1人あたり100,000ドル以上の医療費が必要となると報告されている。このように本疾患は患者の予後の面および医療費の面双方からの問題がある。他の治療法として腸管の延長術があり、腸管を短冊状に交互に割をいれるものや、長軸方向に二分割する方法などが施行されてはいるが、腸管長の延長には限界があり依然根本的な治療法としては確立していない。小腸移植も治療法の一つとして挙げられるが、ドナーの問題もあり、治療成績も依然満足に行くものとは言い難い。

(2) 研究代表者は前段階実験として、図1のようにシリコンチューブをscaffoldとした全層での腸管再生モデルを作成し、さらに再生腸管の線維被膜内に脂肪由来幹細胞(ADSC)を注入することで、8週間でチューブの周囲に全層で新たな腸管再生を得ることに成功した。これを経時的にみると、1週目ではシリコンチューブの周囲は肉芽組織と膠原線維で覆われていたが、粘膜は認めず、2週目では次第に線維性被膜が厚くなり4週目以降でチューブの両端から粘膜の再生を認めた。このモデルの線維被膜内にADSCを投与し腸管再生速度の促進を目指したが、コントロールに比べ延長促進効果は軽度であり有意な差は認めなかった。また、シリコンチューブを除去するには再度腸管を切除する必要があり、実臨床のモデルとしては応用が難しいと考えられた。このため研究代表者は腸管再生速度を効率化し、臨床応用を容易にするために必要な新たな手法について検討することとした。

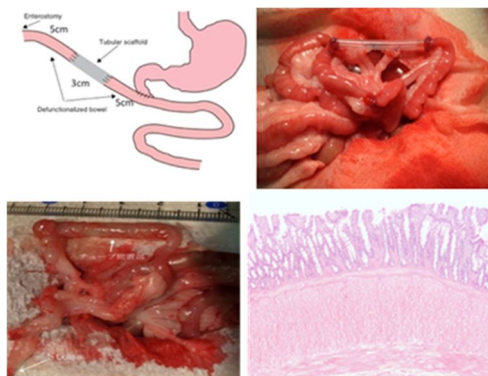


図1：シリコンチューブでの腸管再生

2. 研究の目的

本研究の目的は、短腸症候群の根本的治療として、より効率的な腸管再生法を開発することである。

腸管再生モデルを組織工学、再生医療、光細胞工学の観点から改変することとした。組織工学の観点からは、細胞生着の優れた足場であり、生体内で加水分解される生体分解性チューブ(Poly-glycolic acid、約4週間で生体に吸収される)(PGAチューブ)(図2)を使用することとした。また、再生医療の観点から、幹細胞単体よりも生着率、分化能が優れるとされる腸管オルガノイドを使用することとした。更に、細胞増殖を誘導するとされる赤色LEDを、移植細胞に前照射することとした。これらの改変により、腸管再生速度、再生腸管機能が改善され、かつ、足場の除去に再開腹・腸管損傷が不要であるという仮説(図3)を立て、短腸症候群における腸管再生の臨床応用を目指しその有用性について検討する

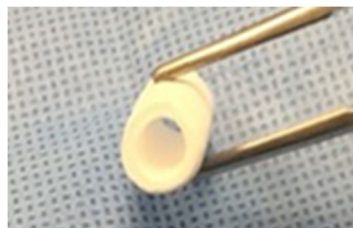


図2：生体分解性チューブ(PGA)

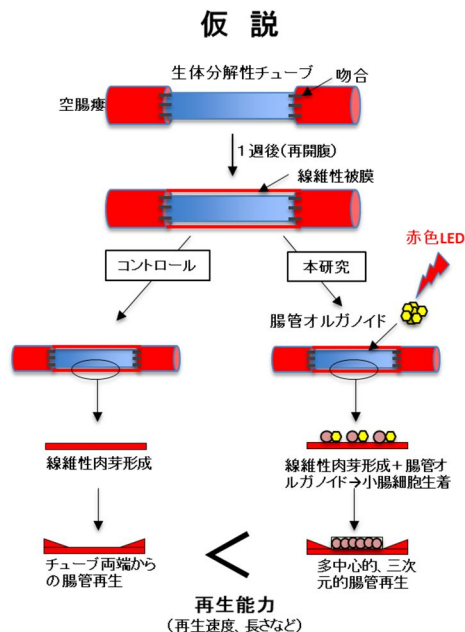


図3：仮説

3. 研究の方法

(1)赤色 LED 照射の腸管オルガノイドに対する効果

ラット腸管オルガノイドを単離・3次元培養する。

赤色 LED を培養した腸管オルガノイドに照射し、最も強い増殖能が得られる波長・照射時間を決定し、その条件下で腸管オルガノイドに赤色 LED 照射を行い、その増殖能（細胞周期、Ki67 index）およびその形態変化を調べる。

培養液中の ROS 発現、Western Blot で ERK、Cyclin D 発現を調べ、サイトカイン（VEGF、FGF など）も測定する。

(2)ラット腸管再生モデルに対する腸管オルガノイド投与の効果、腸管機能評価

Wistar rat (8 週齢) (体重 250g) を用い、前述の図のように腸管再生モデルを作成（コントロール群）後、1 週後に再開腹し上記の基礎実験で得られた条件下で赤色 LED 照射を行った腸管オルガノイドをチューブ周囲の被膜内に移植する。1. コントロール群、2. 腸管オルガノイド投与群、3. 赤色 LED 照射群、4. 腸管オルガノイド投与 + 赤色 LED 照射群 (各 n=5) 4 群に分けて、2、4、8 週間後に擬死させ組織を採取、再生腸管の長さを計測、HE 染色で絨毛長も測定し腸管の再生能を評価する。また、腸管機能を各群で下記の機能評価を行い、比較検討する。

消化吸収能(ブドウ糖、アミノ酸、脂質乳化液)、 再成腸管の形態(H.E 染色)、 腸管蠕動機能(腸電位計)、 消化酵素分泌能(マルターゼ、ラクターゼ)

4. 研究成果

(1)ラット腸管再生モデル(シリコン群および PGA 群)の作成

Wistar rat (体重 250g) で、図 4 のように腸管再生モデルを作成した。

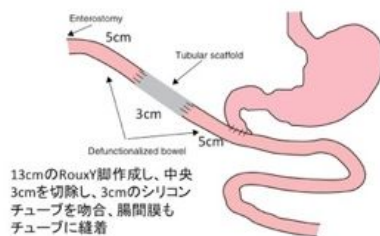


図 4 : ラットモデルの手術シエーマ

下図のようにシリコン群および PGA 群ともに 8 週後に腸管再生が得られた。
シリコン群（8 週後）

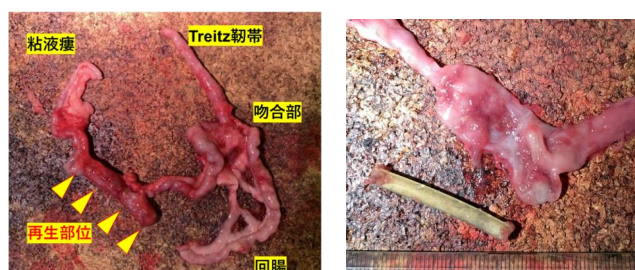


PGA チューブ群（8 週後）



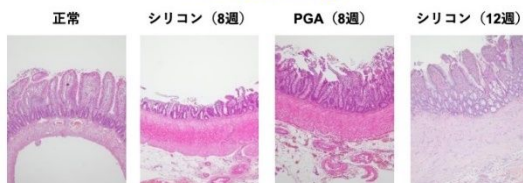
8 週目の時点で、PGA は吸収されて消失していた。

シリコン群（12 週後）



再生腸管の病理組織所見 (HE 染色)

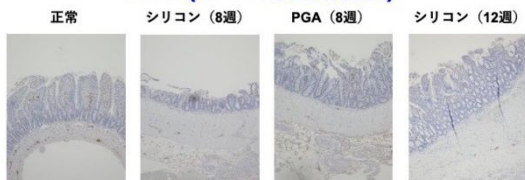
HE staining



組織所見でも、全層で腸管が再生しており、さらに12週では、粘膜固有層も8週に比し、厚くなっていた。

S100 蛋白発現

IHC (S-100免疫染色)



8週目および12週目でも、神経繊維を確認した。

(2) 腸管オルガノイドの単離・精製

小腸オルガノイドの培養は、単離・培養はうまくいかなかったため、使用を断念した。

(3) 赤色 LED の照射

同モデルに、赤色 LED を照射してみたが、さらなる腸管延長効果は得られなかった。

なお、モデルの作成に予想以上に時間を要したため、再生腸管の機能試験までは進めなかった。

まとめ

ラットでシリコンチューブおよび生体分解性 PGA チューブを間置する腸管再生モデルの作成に成功した。両群とも、8週で全層での腸管再生が得られ、神経繊維も確認できた。特にPGAチューブ群では、8週の腸管再生時には、足場であるPGAチューブは完全に吸収され、消失しており、再生の足場としてはシリコンチューブより有用と思われた。

なお、赤色 LED の照射は腸管延長効果はなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Yamada S, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Arakawa Y, Saito Y, Yoshikawa M, Miyazaki K, Shimada M	4. 巻 27
2. 論文標題 Prognostic prediction of apparent diffusion coefficient obtained by diffusion-weighted MRI in mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Hepatobiliary Pancreat Sci	6. 最初と最後の頁 388-395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.732.	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 -

1. 著者名 Yamada Shinichiro, Shimada Mitsuo, Morine Yuji, Imura Satoru, Ikemoto Tetsuya, Saito Yu, Takasu Chie, Yoshikawa Masato, Teraoku Hiroki, Yoshimoto Toshiaki	4. 巻 14
2. 論文標題 A new formula to calculate the resection limit in hepatectomy based on Gd-E0B-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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) 10.1371/journal.pone.0210579	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 吉川雅登, 森根裕二, 山田真一郎, 宮崎克己, 徳田和憲, 齋藤裕, 荒川悠佑, 池本哲也, 居村暁, 島田光生
2. 発表標題 DWI-MRIのADC値を用いた転移性肝癌の予後予測に関する検討
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 吉川雅登, 森根裕二, 山田真一郎, 宮崎克己, 徳田和憲, 齋藤裕, 荒川悠佑, 池本哲也, 居村暁, 島田光生
2. 発表標題 DWI-MRIのADC値を用いた転移性肝癌の切除後予後予測, 抗癌剤効果予測に関する検討
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉川雅登, 池本哲也, 良元俊昭, 山田眞一郎, 齋藤裕, 荒川悠佑, 居村暁, 森根裕二, 島田光生
2. 発表標題 膵切除周術期における人工膵臓を用いた血糖管理の有用性
3. 学会等名 第81回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川雅登, 齋藤裕, 高露萍, 池本哲也, 荒川悠佑, 宮崎克己, 居村暁, 森根裕二, 島田光生
2. 発表標題 GSK3 inhibitorsを用いた脂肪由来間葉系幹細胞から肝細胞様細胞への分化誘導
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshikawa M, Yamada S, Shimada M, Mirine Y, Imura S, Ikenoto T, Arakawa Y, Saito Y, Miyazaki K
2. 発表標題 Prognostic prediction of mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma from ADC value of DWI-MRI
3. 学会等名 IASGO 2019
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------