

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08931

研究課題名(和文)短腸症候群に対する自己細胞のみからなる人工小腸による再生医療

研究課題名(英文)Regenerative medicine for short bowel syndrome by artificial small Intestine composed only of autologous cells

研究代表者

森山 正章(Moriyama, Masaaki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：90815953

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)：短腸症候群は現在まで根本的治療が開発されていない病気の一つである。今回、我々は自己細胞からなる人工小腸を開発することを目的とした研究を開始した。自己細胞を使用するメリットとして、腸管移植後の拒絶反応を減弱させられる可能性が挙げられる。我々は、ヒト細胞を用いて、バイオ3Dプリンターで腸管様構造体の作製に着手した。使用する細胞は、以前の食道を再生する研究からヒントを得て、作製し、それをラットに移植して、実験モデルの確立を行った。続いて、ラットの細胞を用いて、同様に腸管様構造体を作製し、ラットに移植し、検討をおこなった。今後、腸管からの栄養吸収を司る細胞を交えながら、更なる実験を重ねていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児における短腸症候群の発生率は出産10万人に対して24.5人と推定されている。現時点で最終的な治療は小腸移植であるが、移植後の拒絶反応のコントロールが難しく、その5年生存率は50%程度と報告されている。今回の実験を元に、更なる研究を進め、自己細胞からなる人工小腸が実現すれば、短腸症候群に対する新たな治療戦略が確立でき、重症腸疾患患者への大きな貢献が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Short bowel syndrome is one of the diseases for which no fundamental treatment has been developed to date. In this study, we initiated research aimed at developing an artificial small intestine made of autologous cells. One advantage of using autologous cells is the possibility of reducing rejection after intestinal transplantation. We set out to fabricate intestine-like structures using human cells in a bio-3D printer. The cells we used were inspired by previous research on regenerating the esophagus, and we transplanted them into rats to establish an experimental model. Then, using rat cells, they produced intestine-like structures, transplanted them into rats, and examined them. Further experiments will be conducted with cells that control nutrient absorption from the intestinal tract.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 人工小腸 短腸症候群 バイオ3Dプリンター Regenova スフェロイド

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。

1. 研究開始当初の背景

短腸症候群に対する治療には制限があり、医療及び医療工学が発達した現在でも、解決できていない。小児における短腸症候群の発生率は出産 10 万人に対して 24.5 人と推定されており (Wales PW, 2004)、その原因は壊死性腸炎、腸捻転、腸閉塞、神経節細胞欠損症など様々であり (Thompson JS, 2012)、その死亡率は 30%といわれる (Spencer AU, 2005, Spencer AU, 2008)。現時点で最終的な治療は小腸移植であるが、移植後の拒絶反応のコントロールが難しく、その 5 年生存率は 50%程度である。したがって、致死的であり、代替治療が存在しないという点において深刻である。

自己細胞からなる人工臓器による再生医療は、理想的である。近年バイオ 3D プリンターが登場した。我々の Regenova™ というバイオ 3D プリンターは、コンピューターにより、複雑な形状、様々な種類の細胞の組み合わせによる臓器作製が可能となった。これまで我々は、バイオ 3D プリンターである Regenova™ を用いて、血管の構造体 (Itoh, PlosOne, 2015) および複数の細胞を組み合わせた人工気管、人工食道の作製、ラットへの移植を行ってきた (Taniguchi, ITCVS, 2018, Takeoka, PlosOne, 2019)。これらは、早期から生体への生着が確認できた。また、上皮の延長による人工臓器の上皮化もみられ、移植後に機能を獲得していることが確認できた。これによって、この技術が他の消化管にも応用可能であると考えた。

これらのデータ、方法を元にして、今回の人工小腸も同様に作製が可能であり、移植、さらには機能性の獲得も十分に可能であると考えた。小腸への移植手術の手技の確立もすでに済ませており、実験の実現性は担保されている。これを実現することができれば、短腸症候群に対する新たな治療戦略が確立でき、重症腸疾患患者への大きな貢献が可能であると考えに至った。

2. 研究の目的

バイオ 3D プリンターによる、自己細胞と幹細胞を用いた人工小腸の作製、短腸症候群治療モデルの確立とメカニズムの解析を目的とする。

- (1) 生体に近い複雑な小腸構造体の作製方法の確立
- (2) ラットの自己細胞による構造体の作製と自家移植および生着メカニズム解析

3. 研究の方法

(1) 生体に近い複雑な小腸構造体の作製方法の確立

これまでのバイオ 3D プリンターを用いた人工気管、人工食道の作製と同様の手法を用い、小腸に必要な細胞種を用いて、生体に似た構造体の構築を目指す。

- ① ヒト平滑筋、ヒト骨髄幹細胞、ヒト線維芽細胞、ヒト血管内皮細胞、ヒト神経細胞を組み合わせた基本構造体の作製と細胞ソースの決定
これまで用いてきた、線維芽細胞、血管内皮細胞、骨髄幹細胞に、さらに平滑筋細胞、神経細胞を組み合わせ、小腸の基本構造の作製を行う。各細胞の割合を変化させ、最適な組み合わせを検討する。
- ② ヒト iPS 細胞由来の小腸型腸管上皮細胞を内層、その他の細胞群を外層に配置した生体小腸構造に近い構造体の作製
実際の小腸に近い構造体の作製を目指す。上記の基本構造体である平滑筋、線維芽細胞主体の構造体の内層に腸管上皮細胞を積層し、小腸を模した構造体を作製する。
- ③ GFP 遺伝子導入幹細胞の人工小腸内での動態評価
GFP 遺伝子を導入したレンチウイルスを使用し、骨髄幹細胞を GFP で Labeling する。この細胞を用いて人工小腸を作製し、構造体での骨髄幹細胞の分化、増殖などの役割を分析する。

(2) ラット自己細胞による構造体の作製と自家移植および生着メカニズム解析

上記(1)の①～③を元に、Fischer ラットを用いて、初代培養による自己細胞を用いた人工小腸を作製後、自家移植が可能かを明らかにする。また、GFP ラットより採取した細胞で作製した人工小腸で、生体内での移植臓器の細胞動態を解明する。

- ① ラットより採取した自己細胞による人工小腸の作製および自家移植
近交系である Fischer344 ラットより各細胞を初代培養し、上記方法で Scaffold-free 人工小腸を作製し、Fischer344 ラットへ移植する。

② GFP labeling 細胞を用いた体内での動態解析

GFP ラットより採取した各細胞で人工小腸を作製し、Fischer ラットへ移植する。ドナーとレシピエント組織の生着における役割を評価する（免疫抑制剤使用）。

4. 研究成果

(1) 生体に近い複雑な小腸構造体の作製方法の確立

先行実験にて、ヒト皮膚線維芽細胞 (Normal Human Dermal Fibroblasts: NHDF)、ヒト食道平滑筋細胞 (Human Esophageal Smooth Muscle Cells: HESMC)、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (Human Mesenchymal Stem Cells from bone marrow: hMSCBM) を 5:2:3 の割合で作製した食道様構造体が強度および vivo での生体定着反応が良好であった (付図 1, 2)。

この実験結果を参考に NHDF、ヒト腸管平滑筋細胞 (Human Intestinal Smooth Muscle Cells: HISMC)、hMSCBM を 5:2:3 の比率で腸管様構造体を作製し、構造体の強度として問題がなかった。今回作製する小腸は生体内での消化・吸収を目的とするため、食道とは役割が異なることから、NHDF を血管内皮細胞に変更し、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC) を用いて、hMSCBM+ HISMC+ HUVEC からなる腸管様構造体を作製することに成功した (図 1)。生体内での定着具合や、強度として移植に耐えうるかを検討する目的で、これを Fischer ラットに移植した (図 2)。

移植手順としては、予備実験で確立した盲腸小腸バイパスを基本として、内腔にはステントを留置した。2 週間の観察期間をおき、犠牲死させたところ、腹腔内に縫合不全等を示唆する所見はなく、移植実験として特に問題がないことが確認できた (図 3)。

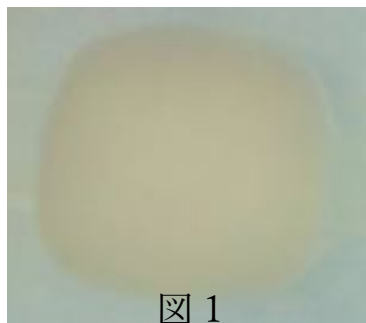


図 1

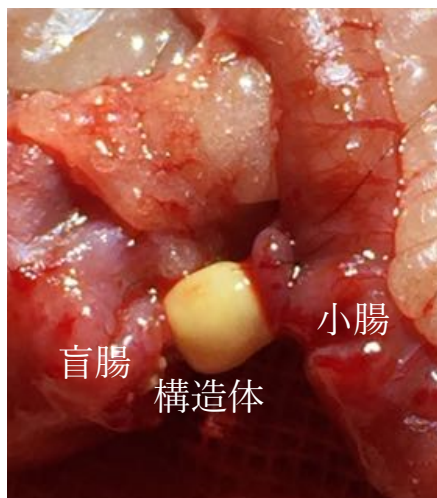


図 2

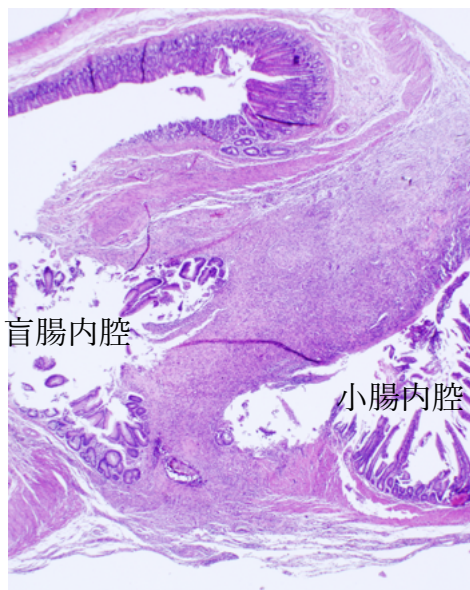


図 3

しかしながら、iPS 細胞由来の腸管上皮細胞を使用した構造体作成には至らなかった。分化誘導の仕組みの解明のためには、今後さらなる実験が必要となる。

(2) ラット自己細胞による構造体の作製と自家移植および生着メカニズム解析

ヒト細胞を用いた構造体の作製とラットへの移植が確立できたため、ラット自己細胞を用いた構造体作製を行った。正常ラット肺毛細血管内皮細胞 (Primary Normal Rat Lung Microvascular Endothelial Cells: RLMVEC)、MSCBM、ラット平滑筋細胞 (Smooth Muscle Cells: SMC) を用いて、腸管様構造体を作製した (図 4)。これを Fischer ラットに移植した (図 5)。

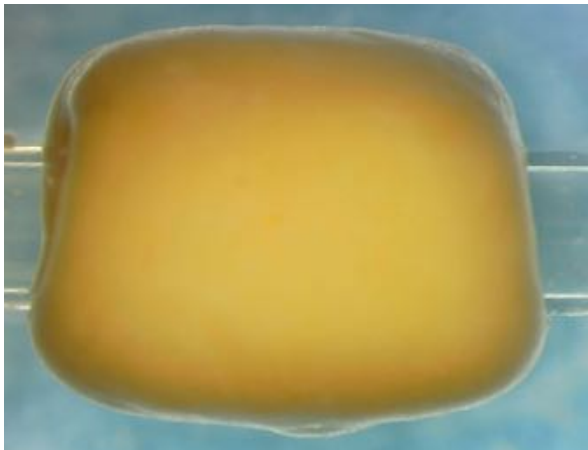


図4

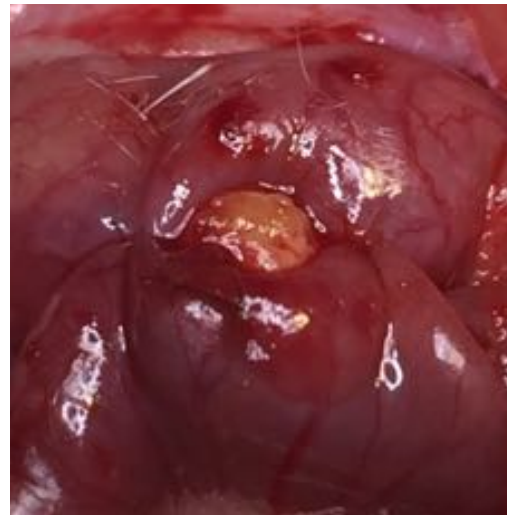


図5

2週間後にこれを犠牲死させて、病理組織学的評価を行ったところ、内腔の開存が確認できた（図6、7）
 さらに長期生存モデルを作成し、8週間後に評価を行った。長期の生存および内腔の開存が確認できた。今後は、予定していたGFP labeling 細胞を用いた体内での動態解析を行うとともに、大型動物での検証を行なっていきたい。

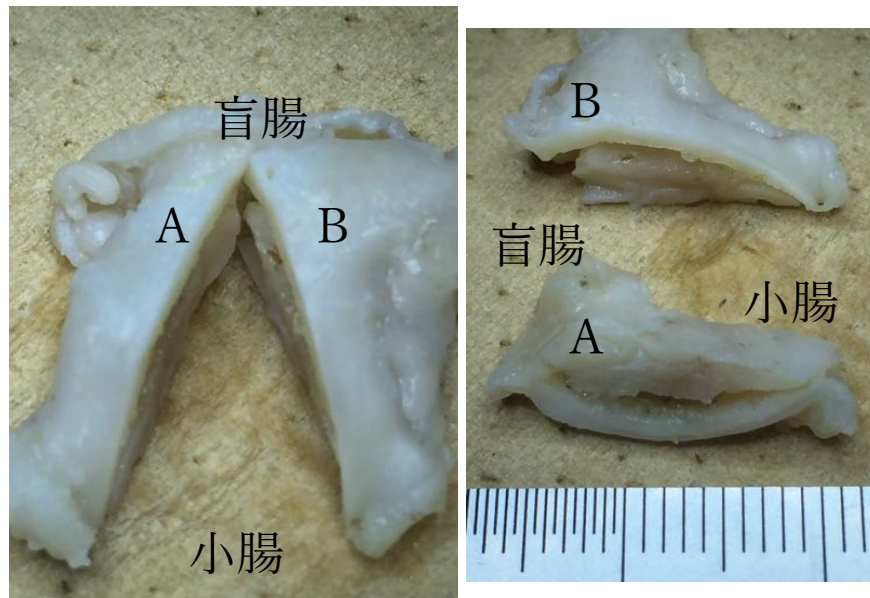


図6

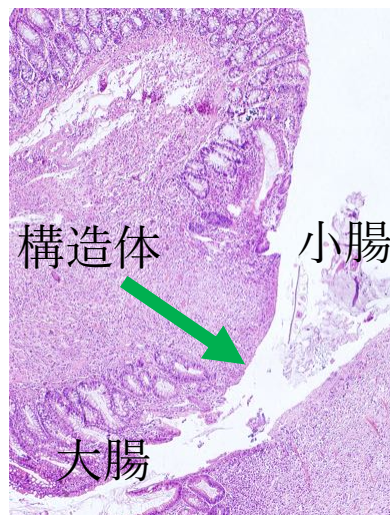
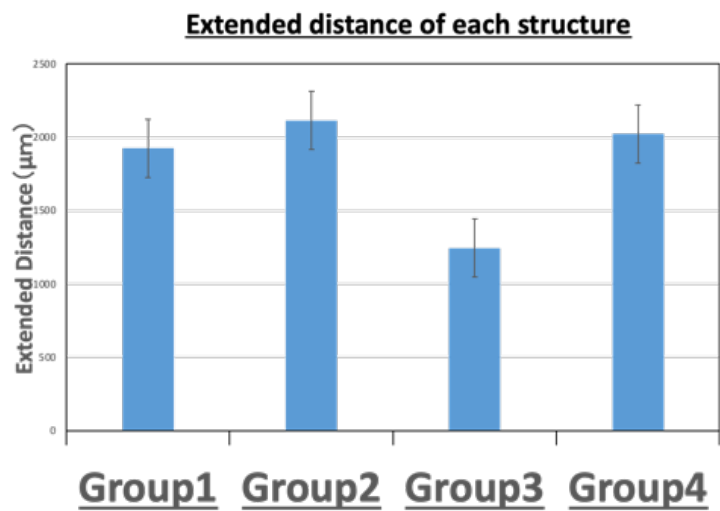
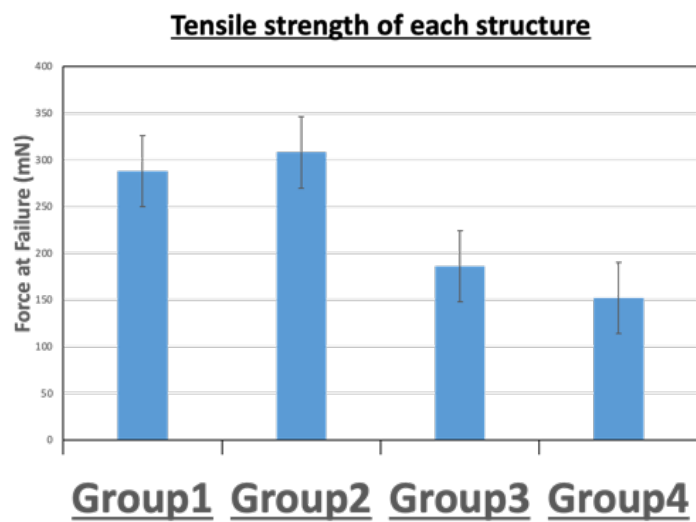


図7



付図 1



付図 2

Group 1: NHDF 50%, HESMC 50%
 Group 2: NHDF 50%, HESMC 20%, hMSC 30%
 Group 3: NHDF 50%, HESMC 20%, hMSC 15%, HUVEC 15%
 Group 4: NHDF 50%, HESMC 20%, HUVEC 30%

(参考文献)

• Takeoka Y, Matsumoto K, Taniguchi D, Tsuchiya T, Machino R, Moriyama M, et al. Regeneration of esophagus using a scaffold-free biomimetic structure created with bio-three-dimensional printing. PLoS One 2019;14:e0211339.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	松本 桂太郎 (Matsumoto Keitaro) (80404268)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授 (17301)	
研究分担者	小山 正三朗 (Oyama Shosaburo) (20815972)	長崎大学・病院(医学系)・客員研究員 (17301)	
研究分担者	谷口 大輔 (Taniguchi Daisuke) (20773758)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員 (17301)	
研究分担者	町野 隆介 (Machino Ryusuke) (90728081)	長崎大学・病院(医学系)・客員研究員 (17301)	
研究分担者	富永 哲郎 (Tominaga Tetsuro) (60457546)	長崎大学・病院(医学系)・講師 (17301)	
研究分担者	田浦 康明 (Taura Yasuaki) (60437887)	長崎大学・病院(医学系)・客員研究員 (17301)	

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	高木 克典 (Takagi Katsunori) (90635856)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員 (17301)	
研究分担者	野中 隆 (Nonaka Takashi) (30606463)	長崎大学・病院(医学系)・准教授 (17301)	
研究分担者	土谷 智史 (Tsuchiya Tomoshi) (30437884)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員教授 (17301)	
研究分担者	中山 功一 (Nakayama Koichi) (50420609)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	
研究分担者	永安 武 (Nagayasu Takeshi) (80284686)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	

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