

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12659

研究課題名(和文) ヒト小腸粘膜下組織の解析と脱細胞化による移植片の作製

研究課題名(英文) Analysis and decellularization of human small intestinal submucosa for potential application as an implantable biomaterial

研究代表者

上野 富雄 (UENO, Tomio)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：70284255

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)：ブタの小腸を脱細胞化した小腸粘膜下組織 (small intestinal submucosa: SIS) は、再生医療における足場素材であるが、異種であることに起因する副作用がある。ブタSISの脱細胞化には、Badylakの方法、Abrahamの方法、Luoの方法があるが、我々は最良とされるLuoの方法によりヒト小腸の脱細胞化を行った。本研究はヒトの小腸からSISの脱細胞化の方法を検討した世界初の報告であるが、残念ながら、ブタSISの脱細胞化でのLuoの方法は、ヒトSISの脱細胞化には応用できないことが判った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はヒトの小腸から採取したSISの脱細胞化を検討した世界初の報告である。今回はブタSISの脱細胞化において最もよいとされるLuoの方法で行ったが、ヒトSISの脱細胞化には適用できないことが判明した。異種の組織や材料を再生医療の治療や足場素材として使用する場合、副作用や免疫応答が懸念され、ヒト由来の組織を用いることが望ましい。今回の結果は、ブタSISといった異種を対象とした強力な脱細胞化は、ヒト組織には不要であるとも考えられ、今後の研究では、Badylakの方法、Abrahamの方法を視野に入れ、ヒトのSISの脱細胞化方法を改良するためにさまざまなアプローチを検討する必要があると考えている。

研究成果の概要(英文)：The small intestinal submucosa (SIS), which is decellularized porcine small intestinal tissue, serves as a scaffold material in regenerative medicine. However, there are side effects associated with its xenogeneic nature. There are several methods for decellularizing porcine SIS, including the methods developed by Badylak, Abraham, and Luo. In our study, we performed decellularization of human small intestine using Luo's method, which is the first report worldwide to investigate the decellularization of SIS from human small intestine. Unfortunately, it was found that Luo's method for decellularizing porcine SIS cannot be applied to human SIS.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 ヒト小腸粘膜下組織 脱細胞化 成長因子

1. 研究開始当初の背景

ブタ小腸粘膜下組織 (**small intestinal submucosa: SIS**) は、ブタ小腸から粘膜と漿膜筋層を剥離したもので、「巨大な蛋白質の超分子複合体から成る細胞外マトリックス」と「成長因子」が結合したものである。細胞の保持・増殖・分化の制御に直接かかわり、ヒト再生医療の足場素材として注目されている。ブタ **SIS** をヒト再生医療の足場素材として用いるためには、ブタ **SIS** は異種であるため脱細胞化をする必要がある。一方、脱細胞化が行われたブタ **SIS** を用いても異種であることに起因する副作用が懸念され、ヒト再生医療における使用が問われている。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト由来の足場素材が作製できれば、異種であることに起因する問題を解決できると考え、ヒト小腸から **SIS** を採取し、ヒト **SIS** の適切な脱細胞化の方法を検討し、ヒト再生医療における、より適切な足場材料、すなわち同種移植としての脱細胞化されたヒト **SIS** を作製することが目的である。

3. 研究の方法

本研究は、ヒト組織を用いて行うため、川崎医科大学・川崎医科大学附属病院倫理委員会に倫理審査の申請を行った。2021年4月30日、承認番号 5219-00 として、承認された。

脱細胞化において理想的な方法は細胞外マトリックスを損傷することなく、成長因子が保った状態で細胞成分を取り除くことであり、様々な方法が報告されている。本研究では、ブタ **SIS** の脱細胞化で最良とされる Luo の方法に従い、脱細胞化を行うこととした。

Luo JC, Chen W, Chen XH, Qin TW, Huang YC, Xie HQ, et al. A multi-step method for preparation of porcine small intestinal submucosa (SIS). Biomaterials 2011; 32: 706-13.

4. 研究成果

まず、ヒト組織での本実験を施行する前に、ブタ組織を用い、Luo の方法に従い、基本手技の確認を行った。ブタ **SIS** に対し、以下の手順で脱細胞化を行った。

1. 物理的剥離：小腸の漿膜筋層、粘膜層を物理的に剥離する。
2. 脱脂操作：脱脂容剤(**Triton X-100**)に 12 時間浸水させた後、脱イオン化水で 3 度洗浄する。
3. 酵素消化：トリプシン液とともに 12 時間インキュベートし、3 度生理食塩水で洗浄する。
4. 界面活性剤処置：ドデシル硫酸ナトリウム (**Sodium dodecyl sulfate: SDS**) 液に 4 時間浸水させ、3 度生理食塩水で洗浄する。
5. 凍結乾燥化：過酢酸アルコール液に 30 分浸水させ、生理食塩水で洗浄した後、フリーズドライにかける。

以上の過程で得られた試料を、それぞれの過程で、成長因子の計測を行った。成長因子は **TNF- α** を **ELISA** 法にて測定した。最後に脱細胞化した組織に対し、**real time PCR** 法を行い、脱細胞化した組織内に **DNA** がないことを確認した。物理的剥離後の **SIS** と比較して、脱細胞化処理した **SIS** は急激に **TNF- α** の低下を認めた。このことは、既報とは異なっており、脱細胞化組織からの成長因子の抽出法に問題があると考え、検討を行った。その結果、抽出バッファーを成長因子の測定に合わせ適宜、個別に変更することにより、抽出効率を高めることができるようになった。**real time PCR** 法では、10 検体中 9 検体で、**DNA** の存在を認めず、脱細胞化の手技、**PCR** の手技ともに、ヒト組織標本にて実験を継続する上で、問題ないと考えられた。

次いで、ヒト組織での本実験に着手した。胃全摘術、膵頭十二指腸切除術など、標準手術にて正常小腸がやむなく採取される手術において、採取されたヒト小腸から漿膜筋層、粘膜層を物理的に剥離し、ヒト **SIS** を取り出した。引き続き、ブタ **SIS** の脱細胞化において最良とされる Luo らの既報に沿って、脱脂容剤 (**Triton X-100**) に 12 時間浸水させた後、脱イオン化水で 3 度洗浄する脱脂操作、トリプシン液とともに 12 時間インキュベートし、3 度生理食塩水で洗浄する酵素消化、ドデシル硫酸ナトリウム (**Sodium dodecyl sulfate: SDS**) 液に 4 時間浸水させ、3 度生理食塩水で洗浄する界面活性剤処置、過酢酸アルコール液に 30 分浸水させ、生理食塩水で洗浄した後、フリーズドライにかける凍結乾燥化を行い、ヒト **SIS** の脱細胞化を行った。

それぞれ脱細胞化したヒト SIS の組織切片を HE 染色で確認した。さらに脱細胞化したそれぞれの SIS から DNA を抽出し、残存 DNA 量を測定した。具体的な方法として、脱細胞化させた SIS を凍結乾燥させ、QIAamp DNA Mini Kit を用い DNA を抽出した。その抽出液を Picogreen で定量化して残存 DNA 量を評価した。また SIS 内に含まれる主な成長因子として bFGF (Basic fibroblast growth factor)、VEGF (Vascular endothelial growth factor)、TGF- β (Transforming Growth Factor- β)の 3 つがあると報告されているが、それぞれの成長因子の含有量を測定した。測定する成長因子によって抽出するバッファーを変更したほうが良いとの結論が得られたため、bFGF は WSE-7420 EzRIPA Lysis kit、VEGF と TGF- β は Chun らが報告する抽出バッファー (酢酸 2.86ml (0.5M) + Tri-HCl 5ml (50mM) + 蒸留水 92.14ml + プロテアーゼ阻害剤 使用容量の 100 倍希釈)) により行った。抽出液を 4 で 1 ~ 3 日間攪拌し、3000 ~ 12,000 g で 30 分間、4 C で遠心分離した。その上澄み液を採取して、MWCO 3-15 k メンブレンと 80-100 体積の ddH₂O を使用して 4 で 2 日間透析し、透析液を 3,000 ~ 12,000 g で 30 分間、4 で遠心分離した。その上清を回収し上澄み液を ELISA 法でそれぞれの成長因子を定量化した。成長因子の評価するため、マウスの骨髄由来間葉系幹細胞 (Bone marrow stromal cells : BMSC) を 3 種類の脱細胞化したヒト SIS と共培養し、細胞増殖・生存の評価を行った。方法は Yanhui らが報告している方法で行った。

光学顕微鏡による観察では、細胞を認めなかった。脱細胞化ヒト SIS の残存 DNA 量の測定では、4 検体中 1 検体のみしか基準を満たしていなかった。b-FGF は脱細胞化を行う前の SIS には 4644 pg/mg 認められたが、脱細胞化後は 0 pg/mg であった。VEGF は脱細胞化を行う前の SIS には 4961 認められたが、脱細胞化後は 28 pg/mg であった。TGF- β は脱細胞化を行う前の SIS には 89 pg/mg 認められたが、脱細胞化後は 2 pg/mg であった。脱細胞化した SIS とマウス骨髄由来間葉系幹細胞との共培養による細胞増殖・生存を確認する実験では生細胞の生着と増殖を認めなかった。

以上の検討から、ブタ SIS の脱細胞化で最良とされる Luo の方法はヒト SIS の脱細胞化には応用できないことが判った。異種の組織や材料を再生医療の治療や足場素材として使用する場合、副作用や免疫応答が懸念され、ヒト由来の組織を用いることが望ましい。今回の結果は、ブタ SIS といった異種を対象とした強力な脱細胞化は、ヒト組織には不要であるとも考えられ、今後の研究では、Badylak の方法、Abraham の方法を視野に入れ、ヒトの SIS の脱細胞化方法を改良するためにさまざまなアプローチを検討する必要があると考えている。

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

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