

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08606

研究課題名(和文) 肛門括約筋障害に対する脱分化脂肪細胞由来のexosomeを用いた筋再生治療の検討

研究課題名(英文) Muscle regeneration therapy using dedifferentiated fat cells-derived exosome for anal sphincter disorders

研究代表者

細川 崇 (HOSOKAWA, Takashi)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：50870094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスC2C12筋芽細胞株を用いて、DFAT condition medium (CM) とexosomeの筋分化に対する影響を検討した。DFAT CM群は、MyoD、Myogeninで有意な発現上昇を認めたものの、DFAT由来exosome群では、一定の傾向は示さなかった。また、肛門括約筋障害モデルラットを使用し、経時的に肛門内圧を測定してDFATおよびDFAT由来exosomeの有用性を検討した。DFATを局所投与したラットの肛門内圧は、control群に比し、より早期に上昇することを確認した。しかしexosome群の肛門内圧は、一定の上昇傾向がみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肛門括約筋障害は、便秘や便失禁などの排便機能障害をきたすが、現行の治療法では治療に難渋する例が多い。特に小児外科領域における直腸肛門奇形は、先天的な肛門括約筋低形成による機能障害も認めることから、肛門括約筋の再生医療が新規治療法として期待される。近年、再生医療の中でも、そのシグナル伝達の1つとしてexosomeが注目されている。本研究ではDFATから放出されるexosomeが筋分化誘導に与える影響を解明し、より効果的に肛門括約筋機能を改善する方法を検討する。DFAT由来のexosomeによる肛門括約筋の機能改善効果を示す事で、直腸肛門奇形患者の排便機能の改善に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In vitro, C2C12 cells, which are myoblasts derived from mice, were divided into control group, DFAT condition medium group, medium group with DFAT-derived exosome, and DFAT condition medium group without exosome. The expression of MyoD and Myogenin were compared by RT-PCR. In the DFAT exosome group, both MyoD and Myogenin were up-regulated, although not significantly. In vivo, the effects of DFAT and DFAT-derived exosomes were examined in a rat model of anal sphincter dysfunction in which cardiotoxin was administered topically around the anus. The anal pressure of rats with anal sphincter dysfunction was evaluated using manometry after topical administration of DFAT or DFAT-derived exosome, and it was confirmed that the anal pressure of rats treated with topical DFAT increased earlier than that of the control group. However, the anal pressure in the exosome group did not show a constant tendency to increase.

研究分野：再生医療

キーワード：肛門括約筋 脱分化脂肪細胞 exosome 筋再生治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肛門括約筋障害は、便秘や便失禁などの排便機能障害をきたし、長期にわたる排便機能障害は患者に著しいQOL低下をもたらす。発症原因としては分娩に伴う会陰裂傷が最も多く、外傷、腫瘍摘出や痔核といった直腸肛門周囲の外科手術に伴う障害などがある。しかし、その治療法は内服薬による排便コントロールやバイオフィードバックをはじめとする機能訓練、肛門管の縫縮や括約筋修復術、筋皮弁の移植といった外科手術等が挙げられるが、いずれも治療に難渋する例が多く、新規治療法が望まれる。特に小児外科領域における直腸肛門奇形は、手術による肛門括約筋損傷のみならず、肛門括約筋低形成による機能障害があり、肛門括約筋の再生医療が新規治療法として期待される。近年、Mesenchymal stem cell (MSC)を中心とした体性幹細胞を用いた再生医療が盛んに研究され、そのシグナル伝達の1つとしてexosomeが注目されている。当研究室ではMSCに似た性質を持ち、かつ、MSCと比べ細胞調整が容易で均一な細胞が得られる成熟脂肪細胞由来の脱分化脂肪細胞(Dedifferentiated fat cell: DFAT)を用いて、細胞治療やexosomeに関する研究をしている。また、肛門括約筋障害においては、モデルラットの肛門括約筋がDFATの投与によって組織学的、機能的に改善することを確認した。本研究では肛門括約筋機能が改善する機序を解明するとともに、DFATから放出されるexosomeを用いて、より効果的に肛門括約筋機能の改善効果を得られる方法を検討する。

2. 研究の目的

本研究ではDFAT由来のexosomeを用いることで肛門括約筋機能を改善する機序を解明し、それを踏まえ、より効果的な治療方法を模索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) DFAT由来exosomeによる筋芽細胞の分化誘導の検討

実験1: DFATの調整

C57BL/6 マウス(雌性, 8-9週)を用いて、清潔操作で皮下脂肪組織を採取する。皮下脂肪組織(1g)を採取した後、0.1% (w/v) コラゲナーゼ溶液を用いて37℃、1時間処理し、フィルター濾過を行った後、低速度遠心分離(135g, 3分間)を行う。上層に集積した成熟脂肪細胞を採取し、10%ウシ胎児血清含有脂肪細胞用無血清培養液CSTI-303MSC(Cell Science & Technology Institute Inc, Miyagi, Japan)で満たした25cm²細胞培養用プラスチック中に細胞(5×10⁴)を導入し、37℃、5% CO₂条件下で培養する。7日後、培養液を交換し、細胞付着面が底になるようにプラスチックを反転させ培養を継続する。得られたDFATを用いて以下の実験を行う。

DFAT由来exosomeの調整

10cm dish 3枚でDFATを80% confluentの状態まで培養し、exosome free mediumで培地交換した後、48時間培養後の培養上清を回収、Exoquick-TCを添加後、遠心することでexosomeが単離される。また、Amicon ultraを用い、DFAT condition mediumを遠心することでexosomeを除去したDFAT condition mediumを作成する。

DFAT exosomeによる筋芽細胞の分化誘導

マウスC2C12筋芽細胞株を10%FBS含有DMEMで培養する。C2C12細胞を2×10⁴個/wellで播種し、exosomeが筋原性分化に及ぼす影響を調べるために、DMEM、DFAT由来exosome添加DMEM、DFAT condition medium, exosomeを除去したDFAT condition mediumを用いてそれぞれ5%CO₂下、37℃で培養する。

培養したC2C12を回収し、MyoDおよびMyogeninの発現をRT-PCRを用いて比較検討する。

(2) 実験2: ラット肛門括約筋障害モデルに対するDFAT由来exosomeを用いた肛門括約筋再生治療の検討

ラット由来DFATの作製

Sprague-Dawley(SD)ラットを用いて、清潔操作で皮下脂肪組織(1g)を採取した後、実験1と同様の手順でラットDFATを作製し、以下の実験を行う。

ラット由来DFATからのexosome抽出

作製したDFATを10cm dishで培養した後、exosome free mediumで培地交換し、48時間培養後の培養上清を回収し、Exoquick-TCを添加後、遠心することでexosomeを単離する。

肛門括約筋障害モデルラットの作製

SDラット(8~9週齢)に対して、吸入麻酔を施行した後、肛門内腔側、肛門周囲にそれぞれCTX(20µM)を100µlずつ、3、6、9、12時方向に局所投与する。

DFAT由来exosomeの肛門括約筋障害モデルラットへの投与

CTX投与の3日後、肛門括約筋障害モデルラットをコントロール群、DFAT投与群、DFAT由来exosome投与群に分け、吸入麻酔下に肛門内腔側、肛門周囲にそれぞれ生理食塩水、ラットDFAT、ラットDFATから抽出したexosomeを3、6、9、12時方向に局所投与する。

肛門括約筋機能の検討

各群それぞれに対して、経時的に吸入麻酔下で solid-state manometry を肛門内に留置し、肛門の機能評価(最大静止圧, 最小静止圧, 平均静止圧, 律動波)を行う。

肛門括約筋の組織像の検討

各群のラットに対し、CTX 局所投与から 7、14、21 日目に安楽死した後、肛門管を摘出し、10%ホルマリンで固定してパラフィンで包埋し、Hematoxylin-Eosin 染色、免疫組織化学染色し、横紋筋細胞、平滑筋細胞の分化状態を比較検討する。

4. 研究成果

(1) 実験 1 : DFAT condition medium 群は、Control 群に比し、2 日目、3 日目で MyoD の発現が上昇傾向を認め、Myogenin で有意な発現上昇を認めた。一方、DFAT 由来 exosome 群では、MyoD、Myogenin とともに、一定の上昇傾向が見られなかった。しかし、exosome を除去した DFAT condition medium 群では、condition medium 群と同様、2 日目、3 日目で MyoD の発現が上昇傾向を認め、Myogenin で有意な発現上昇を認めた。

図 1 Exosome の電子顕微鏡像

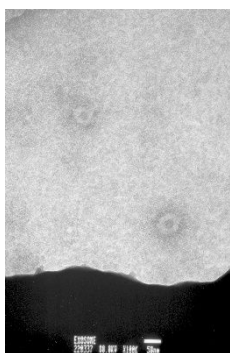
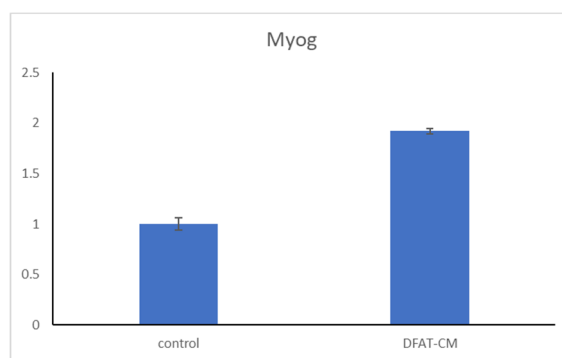
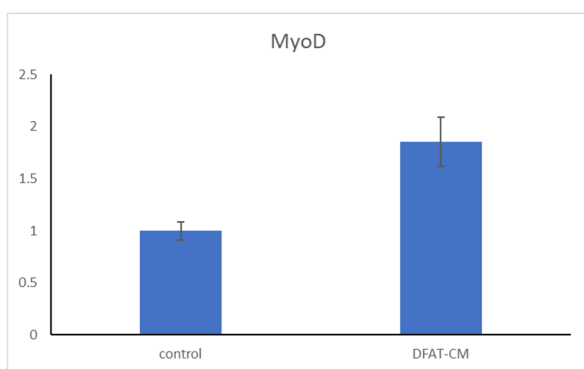
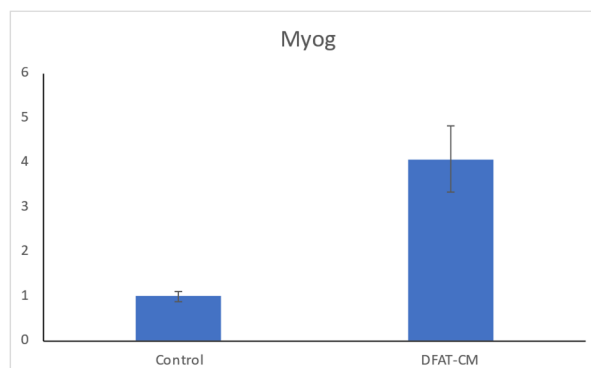
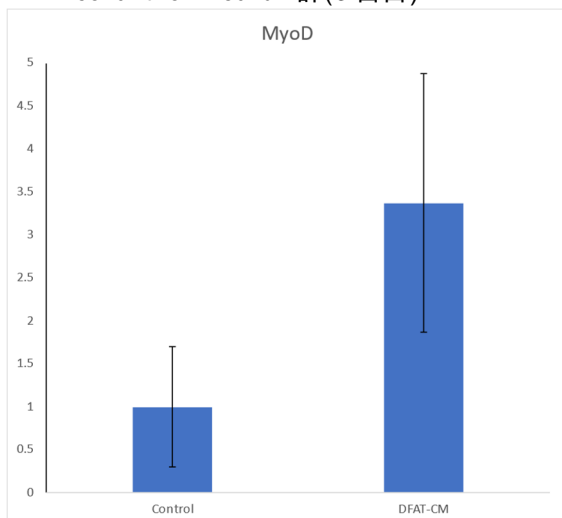


図 2 DFAT 由来 exosome による筋芽細胞の分化誘導の検討

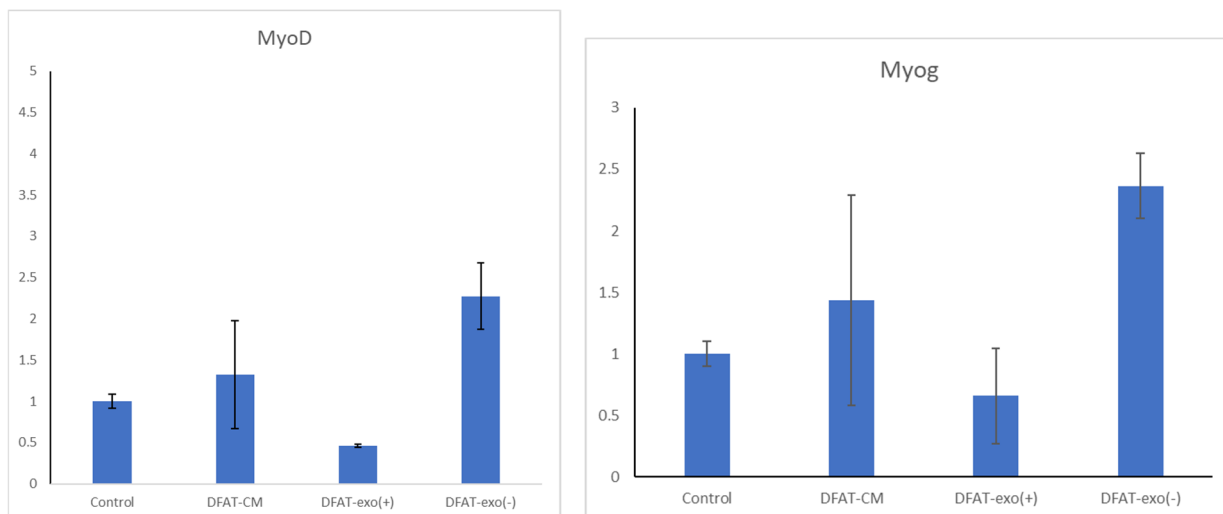
DFAT condition medium 群(2 日目)



DFAT condition medium 群(3 日目)



DFAT condition medium 群、DFAT 由来 exosome 群、exosome を除去した DFAT condition medium 群の比較



(2) 実験2：ラットの肛門に CTX を局所投与し、再度モデルの作成を試みたが、当初 CTX(20 μ M)を 100 μ l ずつ局所投与したが、安定した肛門括約筋障害の作製が困難であった。CTX 濃度、投与量をそれぞれ再検討した。CTX 濃度を 20 μ M、40 μ M、60 μ M でそれぞれ検討し、投与量に関しても、1 か所あたり 100 μ l、200 μ l、300 μ l、400 μ l、500 μ l までの検討を行った。今回の検討では安定したモデル作製に必要な至適投与量は CTX(20 μ M)を 1 か所あたり 400 μ l であった。次に、作製した CTX 肛門括約筋障害モデルラットを使用し、DFAT および DFAT 由来 exosome の有用性を検討した。肛門括約筋障害ラットに、DFAT または DFAT 由来 exosome を局所投与し、肛門内圧を経時的に評価した。DFAT を局所投与したラットの肛門内圧は、control 群に比し、より早期に上昇する傾向が見られた。しかし、exosome 投与群の肛門内圧に関しては、一定の上昇傾向がみられなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上瀧 悠介、細川 崇、阿部 奈緒子、藤田 衣里、山岡 敏、松本 太郎、上原 秀一郎
2. 発表標題 肛門括約筋障害に対する脱分化脂肪細胞を用いた筋再生治療の検討
3. 学会等名 第61回 日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2024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	松本 太郎 (MATSUMOTO Taro) (50366580)	日本大学・医学部・教授 (32665)	
研究分担者	金田 英秀 (KANEDA Hide) (30598967)	日本大学・医学部・助教 (32665)	
研究分担者	上原 秀一郎 (UEHARA Shuichiro) (00448060)	日本大学・医学部・教授 (32665)	

	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
研究協力者	山岡 敏 (YAMAOKA Bin)		

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
研究協力者	藤田 衣里 (FUJITA Eri)		
研究協力者	上瀧 悠介 (KAMIDAKI Yusuke)		
研究協力者	阿部 奈緒子 (ABE Naoko)		

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