

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591488

研究課題名（和文）再生医療を駆使した新しい小腸伸張術

研究課題名（英文）Influence of mesenchymal stem cells on intestinal tissue engineering combined with Bianchi's procedure using small intestinal submucosa

研究代表者

上野 富雄 (UENO TOMIO)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70284255

研究成果の概要（和文）：成長・増殖因子を含んだ細胞外マトリクスからなる吸収性のバイオマテリアルである小腸粘膜下組織（以下、SIS）を用い、間葉系幹細胞（以下、MSC）を併用し、消化管再生を行った。また、短腸症候群患者に対する治療法として我々が独自に考案した「小腸再生伸張術」の可能性を大動物で検証した。その結果、SIS単独よりもMSCを併用することにより、消化管再生の質は向上し、また、大動物での実験により「小腸再生伸張術」が臨床応用可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Small intestinal submucosa (SIS) is a biodegradable collagen-rich matrix containing functional growth factors. In this study, we investigated the feasibility of SIS in conjunction with mesenchymal stem cells (MSCs) for regeneration of the gastrointestinal tract. Also, we examined the achievability of SIS as a bioscaffold when combined with small intestinal tissue engineering and Bianchi's procedure. Seeded MSCs provided an enriched environment that supported tissue regeneration by the SIS graft in the engineered stomach. SIS has the potential for use as a scaffold that promotes the formation of a physical and physiological neointestine, which means that our proposal approaches a novel surgical treatment even in patients with short bowel syndrome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：肝胆膵外科学、消化器外科学、再生医療、消化管運動

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、消化器外科学

キーワード：消化管再生医療、小腸粘膜下組織、間葉系幹細胞、小腸伸張術

## 1. 研究開始当初の背景

多分化能および自己複製能を有する組織幹細胞の存在が明らかにされ、特に骨髄中の

間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell; MSC）は自己骨髄からの採取が容易で自己細胞を利用できるため注目されている。これらの組

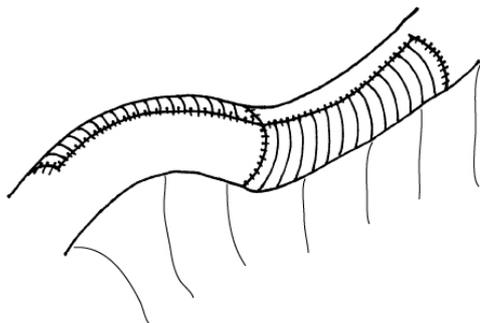
織幹細胞は iPS 細胞ほどの万能性はないものの、“組織や臓器の種子”ともいえる細胞群であり、幹細胞の維持・制御の微小環境（ニッチ）に基づいて、組織の恒常性を維持するといわれている。

三次元の臓器再生に至るには、優秀な“種”（幹細胞）があっても、それを育む“畑”としての足場（マトリクス）や“肥料”としての成長因子（増殖・分化調整因子）がなければ、“種”が芽吹くことはない。

小腸粘膜下組織（small intestinal submucosa: SIS）は、細胞外マトリクスからなる吸収性のバイオマテリアルであり、異種（ブタ）小腸において、免疫原性となる細胞成分を取り除き、粘膜下層のみをフリーズドライとし、既に医療材料として商品化したものである（サージシス™（Cook 社製）。SIS は bFGF、TGF-β などの細胞増殖因子を失活させることなく含有し、“種”（幹細胞）にとっての“肥料を包含した良質の畑である”といえる。研究代表者はこれまでの研究成果に基づき、SIS は消化管再生のマトリクスとして適しているとの考えに至った。

他方、小腸伸張術（intestinal loop lengthening）は、1980年に Bianchi ら（Bianchi A. *J Pediatr Surg*, 1980）が実験動物に初めて行った術式（Bianchi 手術）で、小腸を大量切除され消化吸收不良を来している短腸症候群（short bowel syndrome: SBS）の外科的治療として臨床で応用されている手術である。Bianchi 手術では、腸管の長軸方向に腸間膜を二分し、それを直列につなぎ合わせるもので、小腸の長さは伸長できるが、内腔は単に二分されるに過ぎず、SBS 患者の根本的治療としては不確実であるといわざるを得ない。

そこで代表研究者は、再生医療を応用して小腸吸収面積を倍加させる「小腸再生伸張術」の着想に至った。Bianchi 手術と同様に、腸間膜の主幹動静脈から腸管への血管を温存し、小腸の長軸方向に前葉・後葉に二分し、長軸方向に、口側・肛門側にスライドすると、そこに半周の腸管欠損部が2箇所できるが、それぞれを SIS で小腸再生すれば（下図）、小腸吸収面積を倍加できるという手術が小腸再生伸張術である。



## 2. 研究の目的

本研究では、MSC を併用した SIS による胃壁組織再生を検討し、MSC の SIS 組織修復に及ぼす影響を観察し、消化管再生の質が向上するかを検討するとともに、さらに大動物を用い、「小腸再生伸長術」が可能であることを検証することが目的である。

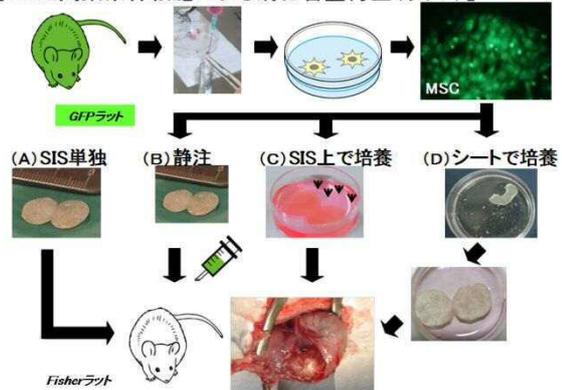
## 3. 研究の方法

### (1) MSC を併用した SIS による胃壁組織再生の検討

GFP ラットの骨髄から MSC を抽出・培養し、SIS とともに Fisher ラットに以下のように群分けし、胃壁全層欠損再生実験を行った。

- ① SIS 単独修復群
- ② SIS 修復+MSC の経静脈投与群
- ③ SIS と MSC を共培養した MSC-SIS 群
- ④ SIS+シート化 MSC 併用群

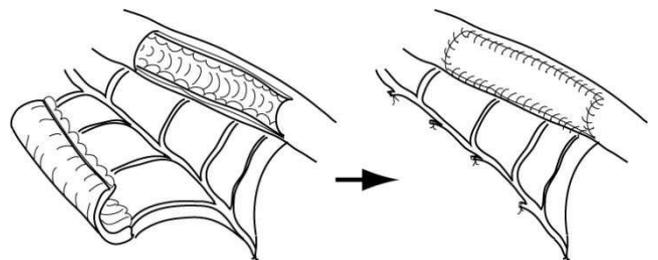
### 【SIS と間葉系幹細胞による消化管壁再生（ラット）】



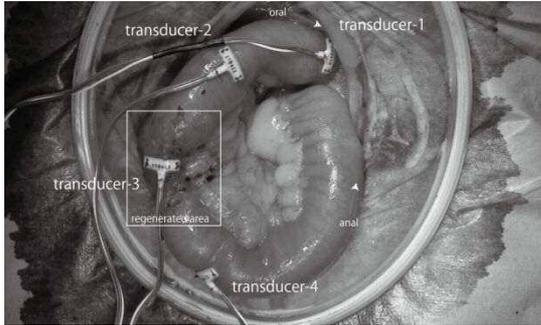
6 カ月後再生組織を取り出し、薬物電気生理学的手法により機能評価を、免疫組織染色で形態評価を行い、各群間を比較検討した。

### (2) 「小腸再生伸長術」が大動物で可能か否かの検証実験

ビーグル犬で腸間膜の主幹動静脈から腸管への血管を温存しながら、小腸の長軸方向に前葉・後葉に二分した後、小腸半周の広範囲切除部を SIS で修復した（下図）。



術後6カ月に下図のように再生部を含め近位空腸および遠位空腸にフォーストランスデューサーを取り付け、空腹時の消化管運動を観察した。

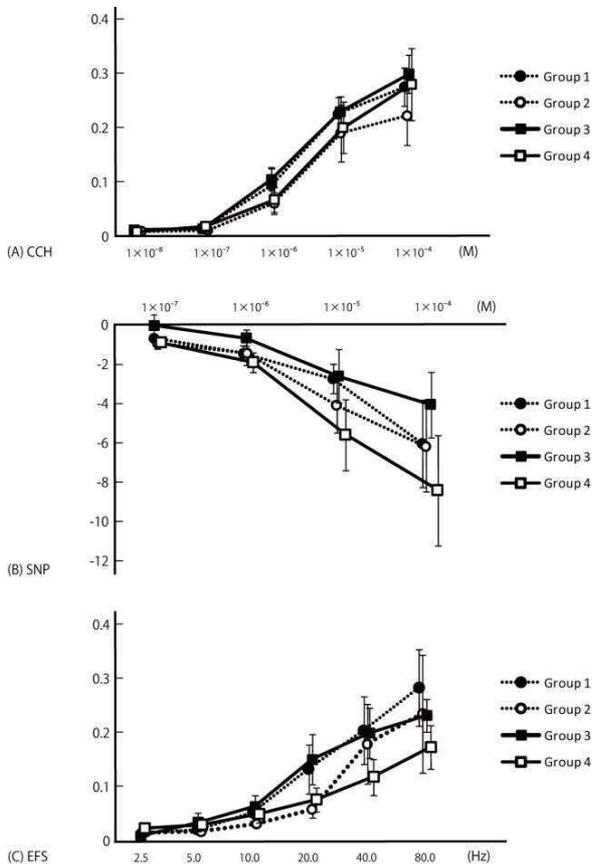


さらに再生組織を取り出し、再生組織の免疫組織染色で形態評価を、薬物電気生理学的手法により機能評価を行い比較検討した。

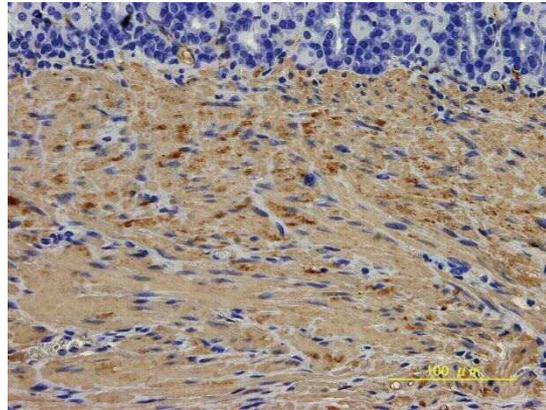
#### 4. 研究成果

##### (1) MSCを併用したSISによる胃壁組織再生の検討

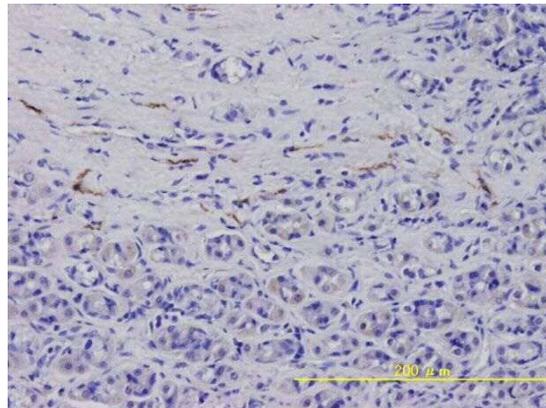
MSCとSISを併用したラット胃壁修復実験での電気生理学的評価では、アセチルコリン作動薬(CCH)による収縮誘発、NO前駆物質(SNP)による弛緩誘発、electrical field stimulation (EFS)法による神経筋伝導の有無について観察した。下図のように各群間に差はなかったが、いずれの群でも収縮、弛緩を認めた。



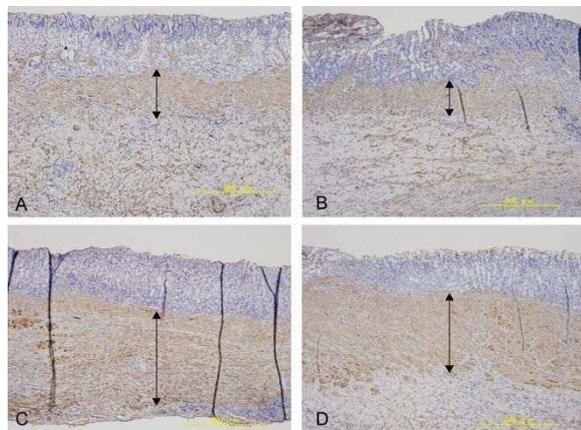
抗 $\alpha$ SMA抗体(下図)および抗desmin抗体による再生組織の観察では、抗 $\alpha$ SMA抗体および抗desmin抗体による陽性細胞を認め、平滑筋細胞の再生を認めた。



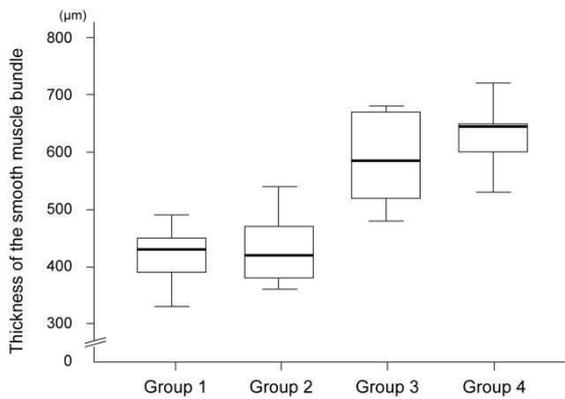
また腸管グリア細胞のマーカーであるS-100蛋白に対する免疫組織化学染色を行ったところ、下図のような陽性細胞を認めた。



各群における平滑筋層は下図に示すように幅に差が認められ(A:①群、B:②群、C:③群、D:④群)、



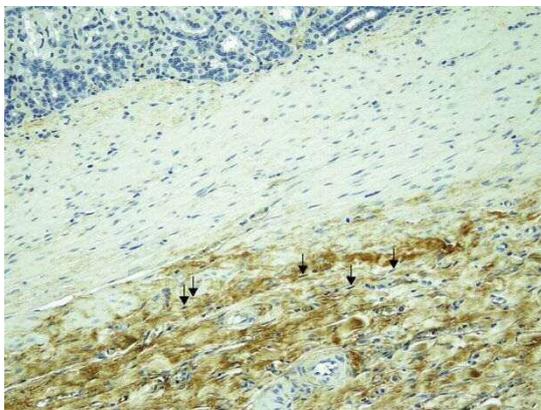
計測すると下図のように各群間に有意差が認められた。



Group3 および4 はいわゆる MSC を局在化させた seeded-SIS 群であり、局在化させた MSC が SIS による平滑筋再生の質を向上させていることがわかった。さらに抗 GFP 抗体を用いて染色したところ、group 1 および2 には GFP 陽性組織は認めず、group 3 および4 に GFP 陽性組織を認めた (下図)。



GFP 陽性組織を平滑筋再生層とは異なり、その下層に認め、さらに強拡大で観察すると (下図)

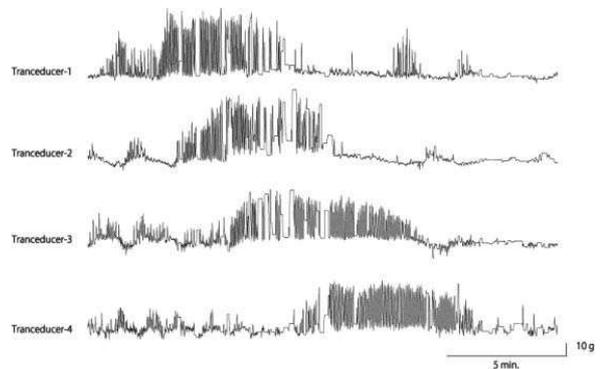


その間質染色組織には紡錘形の核を有した線維芽細胞様細胞 (↓) が観察された。

以上により、胃壁欠損を SIS により再生修復すると、in vivo では正常胃と同様の反応を示し、in vitro でも薬物・電気生理学的反応を示し、組織学的には  $\alpha$ -SMA、desmin、S-100 蛋白陽性の細胞を認め、本来の 3 次元構造と生理機能を有した消化管壁再生が誘導されることがわかった。さらに MSC を局在化させて SIS と併用した群は、再生組織修復において線維芽細胞様細胞を誘導し、良好な平滑筋再生に寄与している可能性が示唆された。

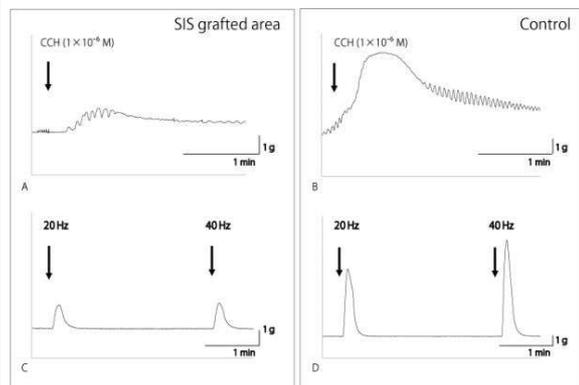
## (2) 「小腸再生伸長術」が大動物で可能か否かの検証実験

小腸の半周を Bianchi 手術の要領で欠陥処理した後、切除し、同部を SIS にて置換・再生したビーグル犬の再生小腸のフォーストランスデューサーを用いた空腹期消化管運動の観察では、下図のような



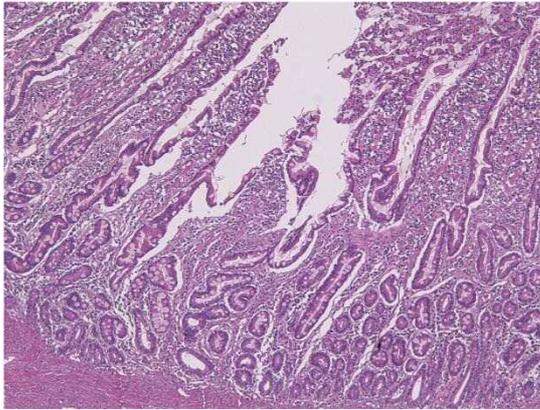
通常のイヌで認められる空腹期蠕動波 (migrating motor complex: MMC) が、再生組織を含め順蠕動性に認められた。

再生組織の in vitro の観察では、下図のように

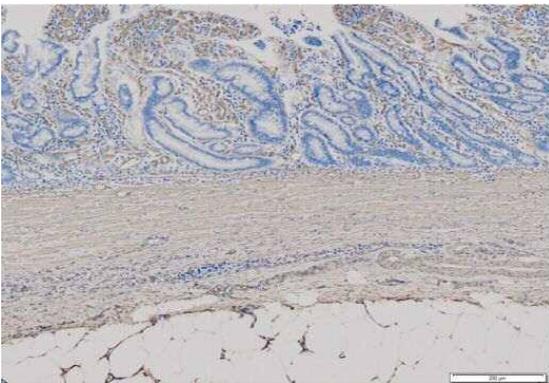


SIS で再生された組織は、大動物でもアセチルコリン作動薬 (CCH) により収縮が誘発され、electrical field stimulation (EFS) 法による神経筋伝導も観察された。

形態学的な観察では、粘膜再生部も良好で吸収上皮細胞および Goblet 細胞も認めた（下図）。

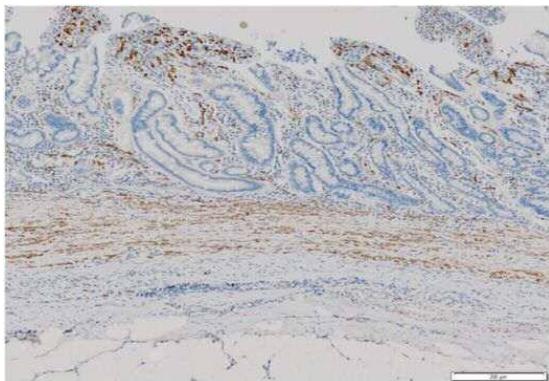


さらに抗  $\alpha$ SMA 抗体および抗 desmin 抗体を用いた再生組織の観察でも、下図のように抗  $\alpha$ SMA 抗体陽性細胞



(抗  $\alpha$ SMA 抗体染色)

および下図のように抗 desmin 抗体陽性細胞を認め、良好な平滑筋再生が誘導されていることがわかった。



(抗 desmin 抗体染色)

以上の大動物での実験により、「小腸再生伸長術」が臨床応用可能であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①Hiroki Nakatsu, Tomio Ueno, Atunori Oga, Mitsuhiro Nakao, Taku Nishimura, Sei Kobayashi, Masaaki Oka. Influence of mesenchymal stem cells on stomach tissue engineering using small intestinal submucosa. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 査読あり in press

[学会発表] (計 3 件)

①上野富雄、他. 同種移植片による小腸再生伸長術—SIS を用いた小腸壁再生の可能性. 第113回日本外科学会定期学術集会 2013年4月13日 マリンメッセ福岡、福岡

②上野富雄、他. ブタ小腸粘膜下組織 (SIS) に間葉系幹細胞 (MSC) を併用した消化管壁再生の検討. 第12回日本再生医療学会総会 2013年3月23日 パシフィコ横浜、横浜

③Tomio Ueno, Mitsuhiro Nakao, Masaaki Oka. Canine small intestinal motility grafted with porcine small intestinal submucosa. 20th United European Gastroenterology Week. 2012.10.20-24.Amsterdam RAI. Netherlands.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 富雄 (UENO TOMIO)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70284255