

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792034

研究課題名（和文）鎖肛術後の排便機能障害に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)移植による治療効果の検討

研究課題名（英文）Effect of the treatment for the anal canal dysfunction using dedifferentiated fat cell (DFAT)

研究代表者

金田 英秀 (KANEDA HIDE)

日本大学・医学部・専修指導医

研究者番号：30598967

研究成果の概要（和文）：

rat DFAT を用いて平滑筋分化誘導(5%FCS 含有 DMEM+TGF β 5ng/ml)を行ったところ、control(5%FCS 含有 DMEM)と比較し、有意に平滑筋細胞へ分化していた。rat DFAT による平滑筋並びに骨格筋の機能再生が可能であることを証明するため、肛門管障害モデルを CTX(cardiotoxin)の局所投与にて作製した。作製した肛門管障害モデルに対して GFP rat DFAT を局所投与したところ、control(PBS 局所投与)と比較し肛門内圧に差がみられ、また、HE 染色においても炎症性細胞の浸潤に差がみられたことから、DFAT における機能再生が可能であることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：

I found significantly α -Smooth muscle actin (α SMA) positive cell at the smooth muscle differentiation medium compared with the control (5%FCS), cultured rat DFAT with the smooth muscle differentiation medium (5%FCS, TGF β 5ng/ml). To confirm whether rat DFAT have possibility of smooth muscle and skeletal muscle differentiation in vivo, I produced anal canal (it consists of smooth muscle and skeletal muscle) dysfunction rat model using cardiotoxin (CTX). Green fluorescence protein (GFP)-labeled DFAT or PBS were injected into para-anal canal tissue. Immunohistochemistry revealed that inner smooth muscle and external striated muscle layers in anal canal showed atrophy or necrosis in the control group, whereas DFAT transplantation led an increase of smooth muscle and striated muscle mass with variable fiber orientation. GFP-labeled DFAT model showed a decrease of inflammatory cells in HE stain. DFAT cell transplantation resulted in a significant improvement of anal canal pressure, compared with control. DFAT cell transplantation promotes anal canal muscle regeneration and improves anal canal pressure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：先天性消化器疾患学

1. 研究開始当初の背景

中間位、高位鎖肛に分類される患者らにおいては、便の保持と排出を行う外肛門括約筋

の発育不全と、肛門管内の静止圧を維持する内肛門括約筋の欠如を伴うことが多く、恥骨直腸筋の発育も悪い。特に高位鎖肛の術後に

は、しばしば便失禁や便汚染などの排便機能障害を伴い、患者のQOLを低下させる原因となっている。これに対して、大腿部骨格筋の移行による肛門管補強などの手術法の工夫や、術後のバイオフィードバックモニターによる排便訓練がなされているものの、十分に満足すべき排便コントロールは得られていない。

心筋や血管平滑筋の再生に関しては幅広く再生医療の研究が行われ現実的なものとなりつつある (Pearlman et al. Nat Med 1995 1:1085-9)。一方、骨格筋 (横紋筋) に関しては、Duchenn 型筋ジストロフィーなどの治療を目的とした様々な研究がなされているが、再生した組織の機能について必ずしも期待した結果は得られていない (Gussoni et al. Nat Med 1997 3:970-7)。平滑筋と骨格筋によって構成される内・外肛門括約筋の再生を考えるにあたり、そのどちらにも分化する能力を持つ DFAT を用いることは合理的であると思われる。また、細胞治療を用いた肛門括約筋再生による排便機能障害の治療は今まで試みられておらず、新しい視点からの取り組みと考え、本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

当研究施設では DFAT から平滑筋細胞への分化を確立しており (マウス、ヒト)、また、脱メチル化剤を用いてではあるが DFAT から骨格筋への分化も確認している。そこで、平滑筋ならびに骨格筋への分化能力を持つと考えられる rat DFAT を用いて、内肛門括約筋 (平滑筋) と外肛門括約筋 (骨格筋) で構成されている肛門管の再生を試みる。

当該研究施設にてすでに確立させた方法で rat DFAT の平滑筋細胞への分化誘導を行うとともに、ヘビ毒である CTX (cardiotoxin) を用いて、肛門管障害モデルを確立する。また、rat DFAT の局所投与により、障害された肛門管の組織再生が可能かどうかを肛門内圧測定を用いて継続的に評価することで検討する。

3. 研究の方法

(1) rat DFAT の平滑筋細胞分化

6 well dishへrat DFATを 1×10^5 /wellにて播種する。平滑筋誘導培地は、5%FCS含有DMEM+TGF β 5ng/mlとし、3日ごとに培地交換を施行した。培養開始からday1, 3, 5, 7にてRNAを採取し、平滑筋マーカー α SMA並びに平滑筋後期マーカーSMMHCをReal time PCRにて検出した。また、day7における α SMAの蛋白レベルを検討するためにanti- α SMA抗体とHoechstを用いて免疫組織化学を施行し、

平滑筋陽性細胞数/総核数にてrat DFATの分化度を評価した。

(2) ラット肛門管障害モデルの確立

SD rat メス 6~8 週齢を用いて障害モデルの検討を行った。肛門内圧の測定を行うに当たり前処置として生理食塩水 10ml で洗腸を行った。内圧を測定するカテーテル (スターメディカル社) を肛門内に挿入し、定点内圧測定を行うことで肛門内圧を測定した。肛門括約筋の障害には、一般的に筋障害モデル (前脛骨筋) に用いられているヘビ毒の CTX (cardiotoxin) を使用した。CTX (10 μ M) を 100 μ M ずつ肛門周囲に局所投与し肛門管障害を作製した。

当初、CTX (10 μ M) 100 μ l を 4 か所 (0 $^\circ$, 3 $^\circ$, 6 $^\circ$, 9 $^\circ$) に局所投与することで障害作製を行うも、個体差が出現し、障害度合いが一定しなかったため、CTX (10 μ M) を 100 μ l x 4 x 2 (肛門内腔、肛門周囲) に局所投与することで、障害度合いの個体差を消失させた。

障害の評価を、肛門内圧測定とともに HE 染色にて行い障害作製翌日の肛門内圧測定にて律動波の消失と、静止圧の低下を確認し、障害モデルの確立とした。

(3) DFAT 投与による肛門括約筋再生

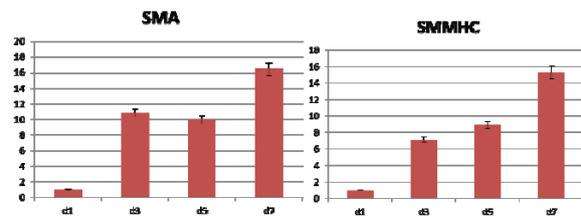
GFP トランスジェニック rat より作製された脱分化脂肪細胞 (GFP rat DFAT) を用いて、肛門括約筋の再生を試みた。GFP rat DFAT を 1×10^6 /body (2.5×10^5 /50 μ l (PBS) x 4 か所: 肛門周囲) で局所投与し、control (対照) を 200 μ l (PBS)/body (50 μ l x 4 か所: 肛門周囲) とした。障害作製日より 7 日後に細胞投与を行い、継続的に肛門内圧測定により肛門括約筋の機能再生を評価した。また、肛門内圧に差が出現した時点で肛門管の摘出を行い、HE 染色にて組織学的評価を行った。

4. 研究成果

(1) rat DFAT の平滑筋細胞への分化誘導

a. Real time PCR

RNA を継続的に採取 (day1, 3, 5, 7) し、Real time PCR にて平滑筋初期マーカー α SMA と、後期マーカー SMMHC の検討を行った結果、徐々にマーカーの発現上昇がみられた (図 1,



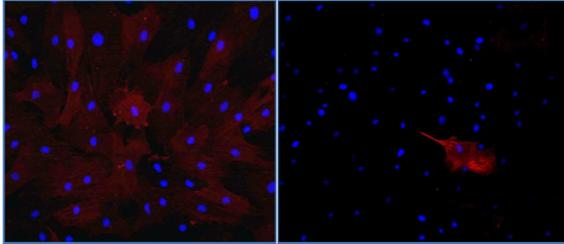
2)。

< 図 1 : SMA >

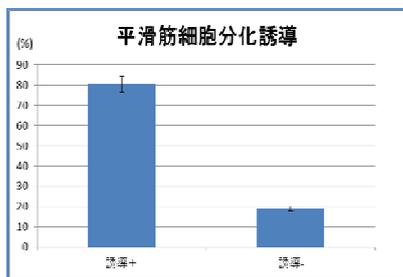
< 図 2 : SMMHC >

b. 免疫組織化学

Day7における α SMAの蛋白レベルを検出するため anti- α SMA 抗体にて免疫組織化学を施行した。平滑筋様細胞数/総核数にて比較検討したところ平滑筋誘導培地(図3)は、control(5%FCS 含有 DMEM: 図4)と比較して有意に平滑筋様細胞が増加していた(図5)



<図3: 平滑筋誘導> <図4: control>

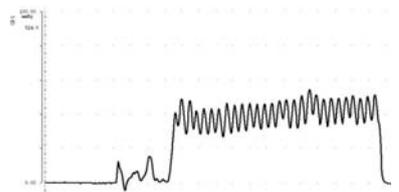


<図5: 平滑筋様細胞数/総核数>

(2) 肛門管障害モデルの確立

a. 週齢による肛門内圧変化

個体によって週齢数が低いと肛門内圧も安定しないが(図6)、約8週齢前後のラットではほぼすべての個体にて内圧が安定した(図7)。



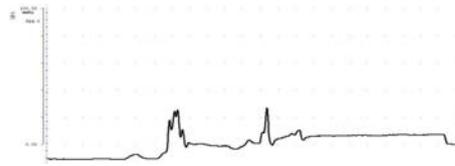
<図6: 6週齢肛門内圧>



<図7: 8週齢肛門内圧>

b. 障害の作製

CTX(10uM) 100ulx8ヶ所投与直後より律動波の消失並びに静止圧の低下がみられ(図8)、障害作製日よりday21前後で正常の肛門内圧へ回復する(図9)。



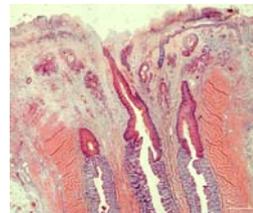
<図8: 障害直後の肛門内圧>



<図9: day21における肛門内圧>

c. HE染色

CTX(10uM)による組織変化は障害作製日よりday5の時点で炎症性細胞の浸潤が最も強く見られた(図10)。

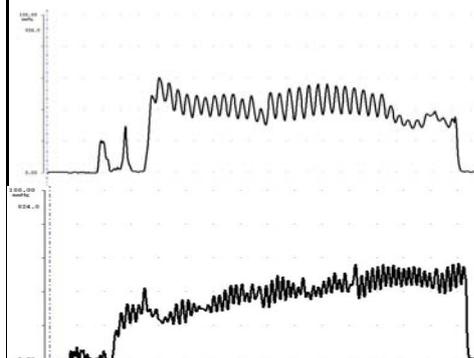


<図10: day5における肛門管のHE染色>

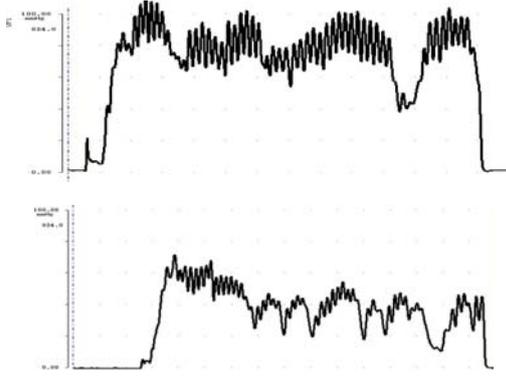
(3) DFAT投与による肛門管機能再生

a. 肛門内圧変化

障害作製からday7においてGFP rat DFAT(2x10⁶/body)の局所投与を行うことで細胞投与より約一週間後には肛門内圧の回復がみられ(図11)、PBS投与(図12)との差がみられた。



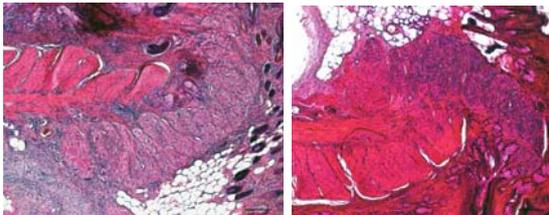
<図11(DFAT投与群): 上段: 障害前 下段: day14>



<図 12(PBS 投与群) :
上段：障害前 下段：day14>

b. HE 染色

DFAT 投与群と PBS 投与群における肛門内圧に差がみられた時点(day14)にて肛門管を摘出し、組織学的評価を DFAT 投与群 (図 13) では、PBS 投与群 (図 14) と比較し、内外肛門括約筋における炎症性細胞の浸潤が少なかった。



<図 13:DFAT 投与群><図 14:PBS 投与群>

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ①細川崇, 杉藤公信, 小沼憲祥, 石岡茂樹, 金田英秀, 細田利史, 大橋研介, 池田太郎, 越永従道, 松本太郎, 加野浩一郎. 脱分化成熟脂肪細胞(DFAT)のT細胞増殖抑制効果とマウス皮膚移植の急性拒絶期における免疫抑制効果. 第 49 回日本小児外科学会学術集会 2012/5/14~5/16、横浜
- ②石岡茂樹, 細川崇, 小沼憲祥, 杉藤公信, 池田太郎, 金田英秀, 細田利史, 古屋武史, 小宮山翔吾, 入部雄司, 越永従道, 加野浩一郎, 松本太郎. 脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cells:DFAT)を用いた炎症性腸疾患への治療検討. 第 49 回日本小児外科学会学術集会 2012/5/14~5/16、横浜
- ③小沼憲祥, 石岡茂樹, 細川たかし, 池田太郎, 杉藤公信, 古屋武史, 金田英秀, 南郷

容子, 小宮山翔吾, 越永従道, 加納浩一郎, 松本太郎. マウス皮膚移植における脱分化成熟脂肪細胞(DFAT)の免疫抑制効果. 第 112 回日本外科学会定期学術集会 2012/4/12~4/14、千葉

- ④石岡茂樹, 細川崇, 小沼憲祥, 杉藤公信, 池田太郎, 金田英秀, 細田利史, 古屋武史, 小宮山翔吾, 入部雄司, 越永従道, 加野浩一郎, 松本太郎. マウス炎症性腸疾患モデルに対する脱分化脂肪細胞(DFAT)の効果. 第 112 回日本外科学会定期学術集会 2012/4/12~4/14、千葉

6. 研究組織

(1)研究代表者

金田 英秀 (KANEDA HIDE)
日本大学・医学部・専修指導医
研究者番号：30598967

(2)研究分担者

研究者番号：

(3)連携研究者

研究者番号：