

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792035

研究課題名(和文) 骨髄間葉系幹細胞は組織腸管上皮幹細胞を支配するのか

研究課題名(英文) The ability of mesenchymal stem cells to initialize self-renewal of intestinal stem cells

研究代表者

野瀬 聡子 (Nose, Satoko)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：90467564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では腸管虚血再還流障害に対する骨髄間葉系幹細胞(MSC)治療の可能性について腸管上皮幹細胞に着目して検討した。腸管虚血再還流障害モデルを作成し、MSCによる腸上皮幹細胞および腸上皮細胞の維持・増殖への影響について検討した。虚血再還流障害後に認めた腸上皮細胞のapoptosisの促進および再生の抑制による粘膜障害は、LacZ-labeled MSC移植により著明な改善を認めた。また、レシビエント小腸の腸上皮幹細胞領域にLacZ陽性細胞を認め、生着したMSCは、腸上皮幹細胞に分化、もしくは腸上皮幹細胞と細胞融合することによって新たな腸上皮幹細胞機能を獲得する可能性があるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The role of transplanted mesenchymal stem cells (MSCs) in the recovery after intestinal ischemia/ reperfusion injury (IRI) was investigated focusing on the intestinal stem cell function. We explored the mechanisms for the therapeutic action of engrafted MSCs that affect the epithelial cell res titution and proliferation as a result in consequences to the epithelial stem cell regulation in an IRI model. Recovery of epithelial function after IRI was significantly promoted by MSC transplantation due to inhibiting apoptosis and promoting cell proliferation. Furthermore, lacZ-labelled MSC-derived cells were identified in the area of intestinal stem cells. Engrafted MSCs were likely programmed to differentiate to intestinal stem cells.

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：組織腸上皮幹細胞 間葉系幹細胞移植 虚血再還流障害 再生

1. 研究開始当初の背景

腸管虚血再還流障害は、絞扼性イレウス、出血性ショック、壊死性腸炎などで認められる臨床的に重要な病態である。しばしば多臓器不全に陥り死亡率が高い。こういった病態に対して、腸管再生医療の基礎として組織幹細胞の一つである腸上皮幹細胞研究が進展しつつある。研究代表者はこれまでに、障害を受けた腸管におけるある種の栄養シグナル(グルタミントランスポーターASCT2, ロイシントランスポーターLAT1)が up-regulate することで、腸管粘膜を保護している可能性を示唆した (Nose et al, J parenteral & enteral nutrition 2010)。障害を受けた腸管粘膜では様々な細胞内シグナルが関与して、細胞維持・増殖をしていると考えられるが、腸管組織再生能力はほとんどなく、全ての上皮細胞を供給する腸上皮幹細胞が、陰窩底部に存在し腸上皮細胞の再生・恒常性を維持すると考えられる。一方、骨髄間葉系幹細胞(MSC)は多分化能を利用して、発生学的に内胚葉、中胚葉、外胚葉由来の細胞が複雑に絡み合っている腸管再生治療に期待がもたれている。MSCは虚血後の腸上皮幹細胞の維持・増殖にも関与することが示唆されているが、MSCの機能、細胞運命は未だ明らかではない。そこで腸管虚血再還流下のようなストレス下で、腸上皮幹細胞の維持にMSCがどのように作用するのかに注目した。

2. 研究の目的

MSC移植による組織腸上皮幹細胞の増殖亢進と分化抑制の制御機構を明らかにすることを目的とした。腸管虚血再還流障害モデルを用い、ドナー由来MSCのレシピエント小腸組織における分布、機能、細胞運命および腸上皮細胞がどのように再生・増殖するかその過程を検討した。

3. 研究の方法

体重19-25g, 4-6週齢のC57BL/6雄性マウスを用い対象を以下の3群に分類した。対照群: 単開腹群、虚血再還流障害群(I/R-MSC): 上腸間膜動脈根部を30分結紮し作成、MSC移植群(I/R+MSC): 上腸間膜動脈根部を30分結紮し同時に尾静脈より同種の骨髄由来間葉系幹細胞(DSファーマ)を 2×10^4 細胞/g・body weight投与した。術後3日後に犠死させた後に組織検体摘出を行った。

(1) 腸管上皮の形態的变化を評価: HE標本を作成しChiuらの分類に従って粘膜障害を評価した。

(2) 腸管上皮のapoptosisおよびproliferationの評価: 腸管虚血再還流障害により腸管上皮細胞のアポトーシスが促進していることは、研究代表者の過去に所属していた教室で既に確認している(外科と代謝・栄養 38(1):9-19, 2004)。MSC移植が腸管

上皮細胞に与える変化について、TUNEL染色によりapoptosisの評価を、BrdU免疫組織染色によりproliferationの評価を行った。

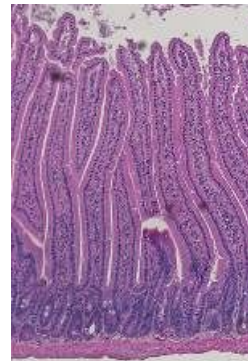
(3) 腸管虚血再還流障害マウスのMSC治療

MSCにbeta-galactosidase遺伝子導入を行った(以下、LacZ-labeled MSC)。LacZ-labeled MSC移植後の虚血再還流障害マウス腸管における腸上皮幹細胞の発現について、免疫組織化学法を用いて検討した。また、レシピエント腸管におけるドナーMSCの分布を観察した。

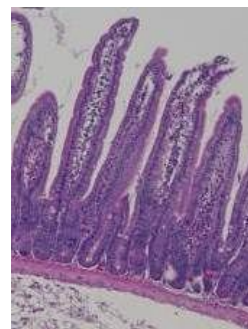
4. 研究成果

(1) 腸管上皮の形態的变化

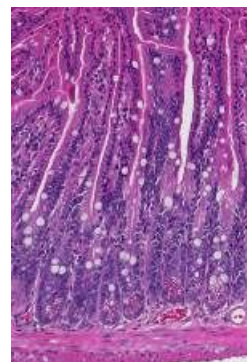
I/R群の腸管粘膜は対照群に比し著明な萎縮と筋層の皮薄化を認めた。また、一部に絨毛の脱落を認めた(平均score Grade 3)。I/R+MSC群ではこれらの変化は著明に改善しており、対照群とほぼ同程度であった(平均score Grade 1)。



対照群
Grade 0



I/R群
腸管粘膜の脱落
萎縮が著明
Grade 3



I/R+MSC
腸管粘膜構造の
改善を認める
Grade 1

また、粘膜絨毛高および陰窩深は、対照群に比し I/R 群では有意に低値を呈し、I/R 群に比し I/R+MSC 群では有意に高値を呈した ($p<0.05$)。

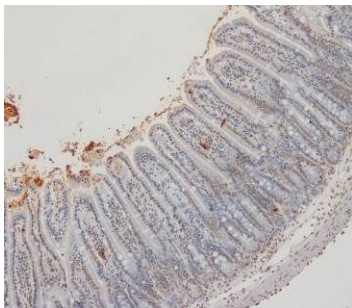
	対照群	I/R	I/R+MSC
絨毛高(μm)	604 \pm 41	497 \pm 24	596 \pm 9
陰窩深(μm)	75 \pm 8	45 \pm 2	55 \pm 5

以上から、腸管虚血再還流障害により、小腸粘膜は著明な粘膜障害を受けるが、MSC 投与により障害から回復することが示され、腸管虚血再還流障害における MSC 治療効果が明らかとなった。

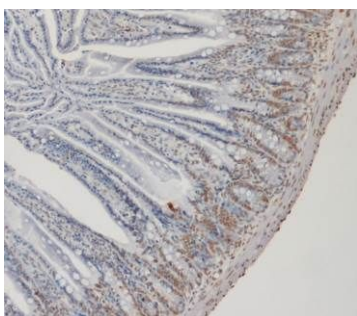
(2) 腸管上皮の apoptosis および proliferation の評価

I/R 群の陰窩部分に多数の TUNEL 染色陽性細胞を認め、対照群に比し有意増加していたが、I/R+MSC 群では I/R 群に比し有意に減少していた ($p<0.05$)。

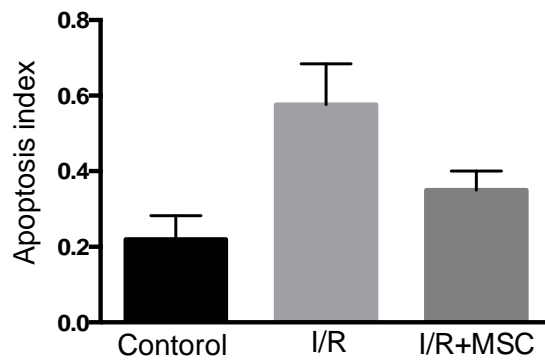
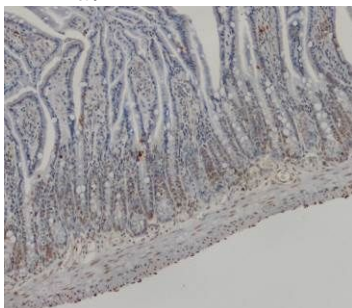
対照群



I/R 群



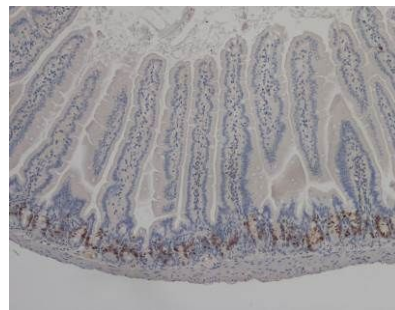
I/R+MSC 群



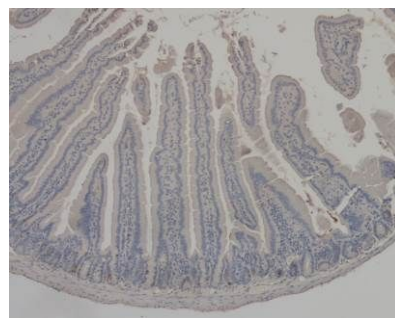
以上より、虚血再還流障害により腸管上皮細胞の apoptosis は促進するが、MSC 投与により、apoptosis は抑制されることが示された。

また Brd-U 陽性細胞は、I/R 群では対照群に比し有意に低下を認め、I/R+MSC 群では I/R 群に比し有意に増加を認めた ($p<0.05$)。

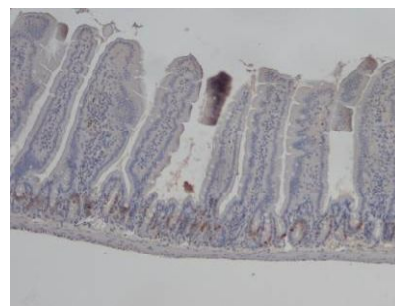
対照群

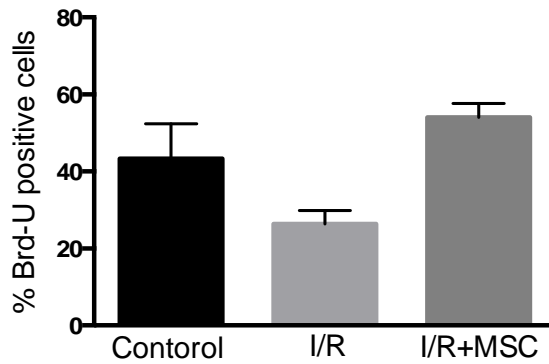


I/R 群



I/R+MSC 群



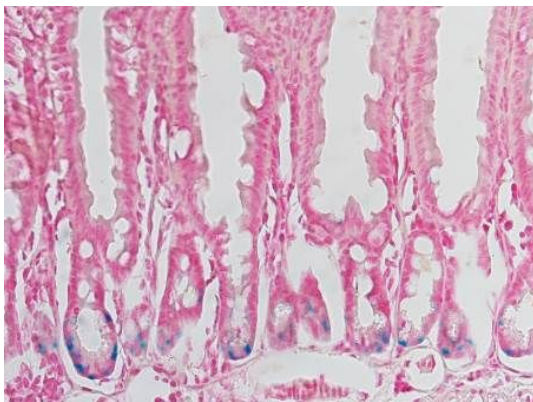


以上より、虚血再還流障害により、腸管上皮細胞の細胞増殖は、著しく障害されるが、MSC 投与により細胞増殖能が回復することが示された。

以上の結果から、MSC 移植により虚血再還流障害マウス急性期の腸管上皮の apoptosis 抑制、および腸管上皮の再生が促進されることが、虚血再還流障害による粘膜障害を改善されている可能性が示された。

(3) 腸管虚血再還流障害マウスの MSC 治療

腸上皮幹細胞の発現についてそのマーカーである Lgr5 遺伝子発現については、免疫組織学的検討では、全ての群で発現が弱く有意差を認めなかった。一方、LacZ-labeled MSC 移植から 3 日目における LacZ 陽性細胞がレシピエント小腸組織切片に同定された。Cell position 4 の腸上皮幹細胞 niche に相当する部位に LacZ 陽性細胞を認めた。



以上の結果から、ドナー由来 MSC は、レシピエント小腸組織において腸上皮幹細胞に置き換わり、さらに腸上皮細胞に分化する可能性があるものと推察された。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野瀬 聡子 (NOSE, SATOKO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号： 90467564