

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659616

研究課題名(和文) 脂肪幹細胞を用いた肛門括約筋再生に関する研究

研究課題名(英文) Tissue regeneration of resected anal sphincter muscle by the stem cells derived from adipose tissue

研究代表者

藤田 文彦 (FUJITA, Fumihiko)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：40380943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、患者自身の脂肪組織から脂肪幹細胞を抽出し、肛門機能を再生させる研究である。

平成24年度、ラットにおける脂肪組織由来幹細胞の採取・培養し、in vitroにおいて確認した。平成25年度、ラット排便機能障害モデルの作製・脂肪由来幹細胞移植実験を行った。ラットによる排便機能障害モデルを作製し、直腸内に内圧測定用のトランスデューサーを挿入して肛門内圧の低下を確認した。このモデルの肛門括約筋切除部に脂肪由来幹細胞を注入し、肛門内圧の改善を確認すると同時に病理組織学的に検討した。平成26年度、脂肪幹細胞を組織に高率よく生着させるため、脂肪幹細胞シートを用いた移植を行った。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to evaluate functional recovery after implantation of adipose derived stem cells (ADSCs) in anal sphincter resection (ASR) animal model.

We could get ADSCs from rats and culture them in vitro at the first year. Secondary, we made ASR model and the rats in the ASR group showed a significant decrease in anal pressure for about one month when compared with the baseline. The lack of the anal sphincter muscle could be confirmed histologically. Finally, ADSCs were injected around the anus of the rats in ASR group. The rats showed a significant increase in anal pressure when compared with the control group and the growing tissues were found at the site injected ADSCs. The same phenomenon could be confirmed by using cell sheet made by ADSCs.

研究分野：外科学一般・消化器外科学

キーワード：脂肪幹細胞 肛門機能 肛門機能不全モデル 肛門括約筋切除 再生 細胞シート

1. 研究開始当初の背景

(1) 従来、肛門に近い下部直腸に存在する癌に対しては永久的人工肛門を要する手術が必要であった。しかし、人工肛門は患者に与える精神的および社会的負担が大きいため、肛門括約筋だけを切除して肛門を温存する手術が行われるようになった。この術式は、多施設協同行われた研究において、手技的および癌の根治性が確認されている。しかし、この手術の弱点として、術後に便失禁などの肛門機能低下があげられる。

(2) 移植させる組織は拒絶反応を抑えるため患者自身の脂肪組織から脂肪幹細胞を抽出し、肛門括約筋を再生させ自家移植させる方法を想定した。

2. 研究の目的

(1) 手術後に低下した患者さんの肛門機能を改善させることがこの研究の目標である。

(2) 肛門機能改善に使う技術には再生医療技術を利用する。すなわち、脂肪組織から脂肪幹細胞を抽出し、肛門機能を担っている平滑筋を再生させる研究である。

3. 研究の方法

(1) ラットにおける脂肪組織由来幹細胞の採取・培養実験；ラットの腹腔内腎臓周囲や鼠径部より脂肪組織を採取し、脂肪組織由来幹細胞を精製分離してコントロール培地内で増殖させる。これをフローサイトメトリーにて脂肪由来幹細胞の細胞であることを確認する。

(2) ラット排便機能障害モデルの作製；ラットに全身麻酔をかけ、尾部の所より切開を加え、肛門括約筋の切除を行う。術後から1週間間隔で直腸内にトランスデューサーを挿入して肛門内圧を測定し、正常ラットと比較する。

(3) 脂肪由来幹細胞移植実験；ラット排便機能障害モデルの肛門括約筋切除部に脂肪由来幹細胞を注入して、肛門内圧および排便障害の改善を観察する。また、ラットを犠牲死させ、肛門周囲組織の病理組織学的に評価する。続いて、脂肪幹細胞をシート化した細胞シートの移植実験を行い、効率の良い肛門機能改善効果についても検討を行った。

(4) 移植・再生組織の評価；移植組織あるいは再生（増勢）組織の由来について検討した。すなわち、雄性ラットから採取した組織を雌性ラットへ移植し、フィッシュ法を用いてドナー由来の組織が1ヶ月間にわたり、残存しているかの評価を行った。

4. 研究成果

(1) ラットにおける脂肪組織由来幹細胞の

採取・培養実験；まず、invitroにおいて脂肪組織由来幹細胞の存在を確認した。ラットの腹腔内より脂肪組織を採取し、脂肪組織由来幹細胞を精製分離して培地内で増殖させ、CD34、CD44、CD90を測定し、脂肪由来幹細胞の存在を確認することができた。

(2) 脂肪幹細胞再生誘導実験；(1)にて採取した脂肪幹細胞の再生能を確認すべく、脂肪組織および筋組織への誘導実験を行い、それぞれの組織への誘導が確認出来た。

(3) ラット排便機能障害モデルの作製；ラットの肛門括約筋を切除することでモデルを作製し、直腸内に内圧測定用のトランスデューサーを挿入して肛門内圧を測定し、正常ラットと比較した。モデルラットにおいて有意に肛門内圧の低下が観察され、しかも、約1ヶ月にわたり肛門内圧が低下した肛門機能不全ラットを作製することができた(図1)。

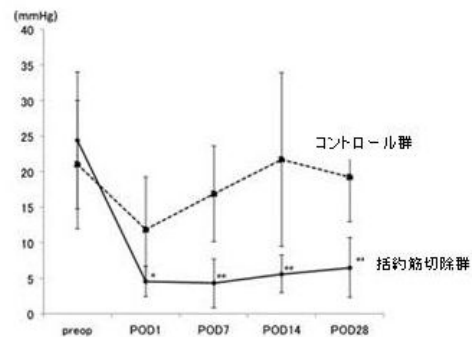


図1

(4) 脂肪由来幹細胞移植実験；ラット排便機能障害モデルを利用して肛門括約筋切除部にラットより採取した脂肪由来幹細胞を注入した。コントロール群と比較して脂肪幹細胞を移植したラットにおいて、有意に肛門内圧の上昇が認められた。

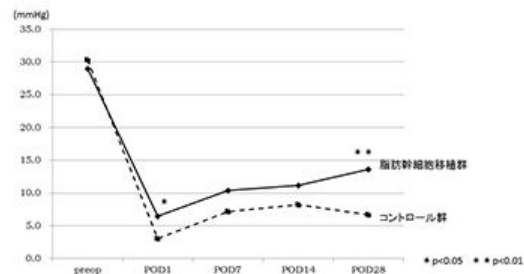


図2

(5) 細胞移植部位の組織学的検討；細胞移植部位を病理組織学的に検討したところ、増勢した繊維組織が観察された。しかし、染色にて確認したところ、平滑筋組織は証明できなかった。また、ドナー由来の組織が否かもはっきりしなかった。

(6) 脂肪幹細胞シートによる移植実験；雄性ラット由来の脂肪幹細胞 2×10^5 個/皿を播種し6日間の培養でシート化することに成功した。モデルラットの肛門括約筋の切除部位にこの脂肪幹細胞シートを移植して、肛門機能障害モデルのコントロールと肛門内圧の比較を行った。術後の各ポイントでの肛門内圧に有意差を認めなかったが、全体としては有意差をもって移植群の肛門内圧が高値を示した。

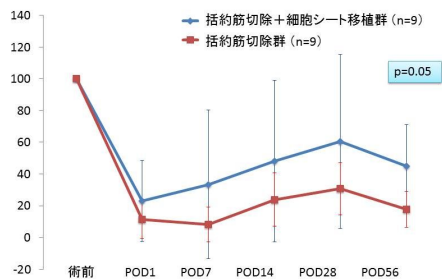


図 3

(7) 移植・再生組織の評価；細胞シートを移植した肛門機能障害モデルラットを犠牲死させ、その組織評価を行ったところ平滑筋切除断端の境界は不明瞭となり、同部位に平滑筋が再生した可能性が考えられた。平滑筋を染色させる方法で確認したところ陽性の結果であった。由来細胞を確認するために行ったフィッシュ法では、移植部位にY染色体は認めず、ドナーである雄性ラット由来の組織は確認出来なかった。増勢（再生）した組織は、レシピエント由来である可能性が示唆された。

(8) 今後の展望；今回の研究では何らかの組織が増勢し、肛門機能の改善をみたが、増勢組織の由来など詳細な検討が不十分であると思われる。我々は雄性ラットをドナーとして雌性ラットへ移植し、そのY染色体を確認する方法をとったが、ドナー由来組織は残存していなかった。そこで、現在計画中の実験としては、GFP といわれる緑色蛍光を発する組織をもった所謂グリーンラットをドナーとして移植することを考えている。

最終目標は、この細胞移植技術の臨床への応用である。すなわち、手術により肛門機能の低下した患者への脂肪幹細胞移植である。患者自身の大腿部または腹部より採取した脂肪組織からディスプレイ閉鎖回路を用いて脂肪由来幹細胞のみを抽出・濃縮し、肛門周囲へ移植する。この手技はすでに欧米にてクローン病患者の腸管皮膚瘻や難治性痔瘻に臨床応用されており、その方法に従う。この方法が確立できれば、低位直腸癌患者に

対して自然肛門を温存した手術を施行した上に肛門機能も保つことが可能になると思われる。

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)

Yamaguchi I, Fujita F, Yamanouchi K, Mishima T, Kawahara D, Sakai Y, Ito S, Kanetaka K, Takatsuki M, Kuroki T, Eguchi S. A novel animal model of long-term sustainable anal sphincter dysfunction. Journal of Surgical Research, 査読有, 184; 2013; 813-818
DOI; 10.1016/j.jss.2013.04.010. Epub 2013 Apr 25.

〔学会発表〕(計 6 件)

井上悠介 藤田文彦 虎島泰洋 川原大輔 米田晃 曾山明彦 足立智彦 日高匡章 北里周 金高賢悟 高槻光寿 黒木保 江口晋、組織工学を用いた肛門機能不全動物モデルに対する機能再生、114 回日本外科学会、2014 年 4 月 3 日 - 4 月 5 日、京都国際会館、京都

山口 泉、藤田文彦、山之内孝彰、虎島泰洋、堺 祐輔、黒木 保、巽 理恵、丹羽正美、江口 晋、脂肪幹細胞を用いた肛門括約筋再生の試み、第 18 回長崎障害者支援再生医療研究会、2013 年 4 月 23 日、長崎大学医学部ポンペ会館、長崎

山口 泉、藤田文彦、山之内孝彰、虎島泰洋、井上悠介、川原大輔、堺 祐輔、黒木 保、巽 理恵、丹羽正美、江口 晋、肛門機能不全モデルに対する脂肪幹細胞を用いた肛門括約筋再生の試み、第 19 回日本大腸肛門機能障害研究会、2013 年 9 月 7 日、ホテルニューオータニ、東京

山口 泉、藤田文彦、山之内孝彰、三島壯太、川原大輔、伊藤信一郎、金高賢悟、黒木保、江口 晋、肛門機能不全動物モデルに対する機能再生を目指した脂肪幹細胞移植、第 68 回日本消化器外科学会総会、2013 年 7 月 17 日-7 月 19 日、シーガイアコンベンションセンター、宮崎

山口 泉、藤田文彦、山之内孝彰、三島壯太、川原大輔、小坂太郎、足立智彦、曾山明彦、伊藤信一郎、北里 周、虎島泰洋、金高賢悟、高槻光寿、南 恵樹、黒木 保、江口 晋、長期肛門内圧低下を可能とする肛門機能不全動物モデル作製の試み、第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月 11 日-4 月 13 日、マリンメッセ福岡、福岡

Yamaguchi I, Fujita F, Yamanouchi K, Kawahara D, Sakai Y, Ito S, Kanetaka K, Takatsuki M, Kuroki T, Eguchi S, Reproducible animal model for the study of anal sphincter disfunction for regenerative medicine, 3rd TERMIS world congress, 2012.9.6-2012.9.8, Vienna Austria

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 文彦 (FUJITA Fumihiko)
長崎大学・病院(医学系)・講師
研究者番号：40380943

(2) 研究分担者

(なし)

研究者番号：

(3) 連携研究者

(なし)

研究者番号：