

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861164

研究課題名(和文)ブタ脱細胞化小腸骨格と小腸オーガノイドを用いた再生小腸グラフトの開発

研究課題名(英文) Organ reengineering of a small bowel graft using decellularized scaffold of porcine intestine and intestinal organoid

研究代表者

日比 泰造 (Hibi, Taizo)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10338072

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)：本研究は臓器の脱細胞化技術を用いて作製したブタ由来の小腸スキヤフォールドに、小腸オーガノイドを生着させ小腸グラフトを開発し、小腸不全に陥り小腸移植を必要とする患者の新たな治療の嚆矢となることを目的とした。ブタ小腸の脱細胞化を繰り返し行い手技の安定化後、資源的な面からラットに計画を切り替えた。グラフト腸管および血管を確保しヘパリン化生食による還流に成功し、免疫染色で明らかな細胞核が存在しないことを確認できた。現在、電子顕微鏡で内部の微細構造を観察しているほか、細胞骨格に含まれているDNAおよび細胞外マトリックスの評価を行っている。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a transplantable small bowel graft with the organ decellularization technique using porcine intestinal scaffold and intestinal organoid as a future treatment alternative for intestinal failure patients waiting for small bowel transplantation. After the decellularization technique of porcine intestine matured, we switched the plan to use rat intestine because of logistic reasons. We successfully reperfused the small bowel graft through the vessels with heparinized saline and confirmed that there is no cell nuclei within the scaffold by immunohistochemical staining. We are currently conducting precise observation of the internal structure of the graft using electron microscope and evaluation of DNA included in the cytoskeleton and the nature of extracellular matrix.

研究分野：肝胆膵・移植外科

キーワード：移植外科学 小腸グラフト

1. 研究開始当初の背景

小腸不全は消化管での栄養の消化・吸収機能が廃絶した状態を指す。約 60-70%は小児では腹壁破裂、成人では血栓症による虚血などで腸管が極端に短くなった短腸症候群、残りは小腸の機能不全が原因で生涯の中心静脈栄養が必要となる。患者はカテーテル感染による敗血症・静脈閉塞による血管ルート消失・胆汁うっ滞性肝障害による肝硬変を中心とした致命的な合併症の危険性を抱え、これらの病態に小腸・多臓器移植 (図 1) が適応となる (Abu-Elmagd K, *Ann Surg* 2009)。小腸は直接外界と接し、リンパ組織が豊富で複雑な免疫防御機能を有するため、最も難しい固形臓器の移植であるが免疫抑制療法・術式の革新で長期成績は飛躍的に改善した。国際集計では 1980 年代に 20%以下だった 5 年生存率が 2000 年代後半に 40-50%台 (図 2)、最多症例数の米国ピッツバーグ大学では 75%に上昇した (Ueno T, *Surg Today* 2010; Abu-Elmagd K, *Ann Surg* 2012)。

図 1

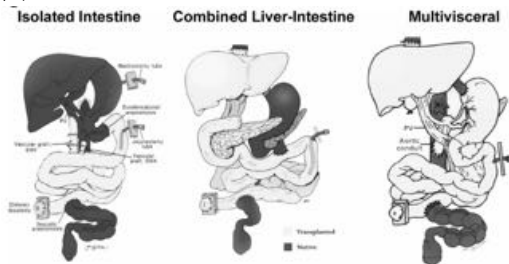
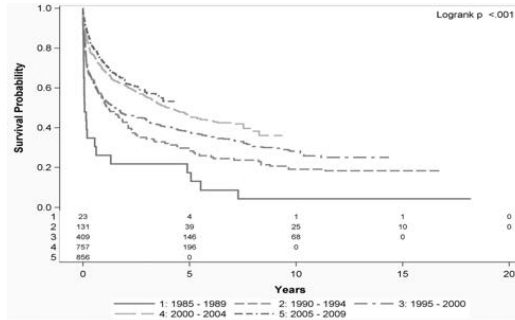


図 2



しかし、標準治療の肝・腎の移植と異なり小腸移植後晩期でも拒絶・感染によるグラフト不全・患者死亡は高率で長期成績は不良である。移植大国の米国も慢性的なドナー不足で、小腸移植以外に救命手段がない患者が常時 200 人以上待機中で (Mazariegos G, *Am J Transplant* 2010)、日本の状況はさらに深刻である。また小腸不全の発生・死亡数に関する正確なデータがなく、平成 23 年度科学研究補助金：小腸機能不全の治療指針作成に関する研究で漸く全国実態調査が企画された。カナダの新生児期短腸症候群の発生頻度 (Wales PW, *J Pediatr Surg* 2004) から推測した日本の患者数は年間 200-300 例となり、小児肝移植 (年間 100-120 例) で

最多の胆道閉鎖症に匹敵する。現状、日本の小腸移植数は 2011 年までの 15 年間で計 20 例に過ぎず未だ保険適応ではない。これを受け小腸不全の患者・家族が 2011 年 9 月に厚生労働省に保険適用を求める要望書と約 22 万人分の署名を提出し、小腸不全に対する新たな治療の創成は急速に少子化の進む日本の喫緊の課題である。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は**患者自身の細胞を用いた移植可能な小腸グラフトの作製**である。これまで小腸の消化・吸収機能を保持する動物モデルの作製に成功した報告はない。ひとつの理由は、小腸の粘膜上皮は栄養素を吸収する絨毛で覆われ 2-5 日間程度の短いサイクルで再生されるが、この再現が難しい点である。また現行の小腸移植の最大の問題点は小腸自体の強い免疫原性であるが、腸管免疫系の解明は抗菌ペプチド分泌を行うパネート細胞の役割など含めその端緒にある。

本研究で作製する小腸グラフトの臨床応用の実現性を評価するには早い段階で大動物のブタでの脱細胞化モデルの構築が重要であると考えられる。小腸の脱細胞化そのものがこれまで報告がなく、臓器移植領域で世界的に脳死ドナー不足が問題となっている中で、廃棄される小腸を粘膜上皮の幹細胞の自己複製あるいは iPS 細胞の成熟・分化誘導に不可欠な細胞外マトリックスとして有効に活用できる点が極めて独創的であり、今後新たな生体基盤として大きな発展につながると思われる。移植可能な小腸グラフトの作製は未だ端緒に過ぎず、本研究の実験系は**小腸不全に苦しむ小児・成人患者への福音の第 1 歩**と考える。本研究が成就した暁には、引き続き小腸グラフトの運動 (排泄) 機能の研究へと進み、ますます臨床応用に近づくことが期待される。また副次的には小腸の強い抗原性の解明にもつながることが予想され、未だ長期成績が不十分な現行の小腸・多臓器移植の治療効果改善にも大いに役立つと考える。

3. 研究の方法

(1) ブタ肝臓ですでに確立した脱細胞化法 (Yagi H, *Cell Transplant*, 2012) を用いて、まず得られた脱細胞化小腸が細部に渡り十分に細胞を保持するマトリックス構造を有しているか、吻合可能な強度を持つ血管構造が保たれているか、これまで評価されていない内部構造の詳細について、肝臓で行ってきた評価法を用い、遺残 DNA 解析 (細胞成分遺残の評価)・免疫染色 (マトリックス成分遺残の評価)・プラスチック注入法

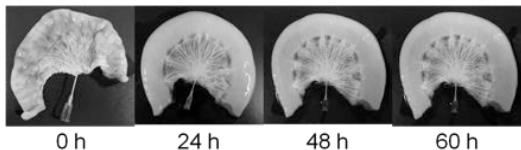
(血管構築の評価)・電子顕微鏡(内部マトリックス立体構造の評価)を用いて細部に渡って解析し、更に残存細胞外マトリックスの性質を蛋白質質量分析を用いて評価する。

(2) 肝臓では免疫染色および蛋白質質量分析によって、Collagen、Laminin、Fibronectinを主体とした細胞外マトリックスの残存のみでなく、Cadherin、Galactinなどの接着因子の残存、および微量ながらFGF、VEGF、HGF等の成長因子の残存が確認されている。人工的なマトリックスとは異なり、生体由来の骨格を用いることの意義を小腸においても明らかにし、細胞生着時の細胞-マトリックス間インタラクションにおける重要なファクターとなる因子を検出したいと考えている。

4. 研究成果

(1) まず、ブタの小腸を摘出し肝臓においてすでに確立した脱細胞化法により上腸間膜動脈の分枝に留置したカテーテルから3日間にわたり微量のTrypsin/TritonX-100を中心とした薬剤を還流させた。すべての生細胞を融解・除去し、ブタ小腸の脱細胞化に成功した(図3)。

図 3



(2) 引き続きブタ小腸の脱細胞化後の内部構造の詳細につきDNA解析、免疫染色、電子顕微鏡での観察が当初の計画であったが、大動物での実験が人的・財政的な面から続行が困難となった。そのため前段階としてまず小動物での小腸脱細胞化へ計画を切り替えた。マウス小腸においてはグラフト腸管の確保、大血管系を用いてヘパリンを加えた生理食塩水による灌流は可能であった。しかし静脈の脆弱性から、小腸細胞外マトリックスへ細胞充填する際の耐用性に不安があることとグラフト作成後の吻合の際に技術的に難渋することが予想された。そのためラット小腸での試験に変更した。グラフト腸管は十分な長さが確保でき(図4)、ヘパリンを加えた生理食塩水による小腸の灌流を行うことも可能であった(図5)。蛍光での発光にも成功している(図6)。ラット7匹を用いて、手技の習熟を図り最後の2匹で安定した結果が出ている。

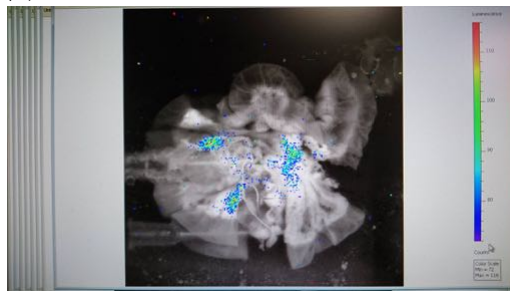
図 4



図 5



図 6



脱細胞化した組織には明らかな細胞核が存在しないことは免疫染色で確認でき、現在、電子顕微鏡で内部の微細構造を観察している。細胞骨格に含まれているDNAおよびCollagen、Laminin、Fibronectinを主体とした細胞外マトリックスの評価を行っている。また、脱細胞化した組織に充填する細胞として多分化能を有する歯髄幹細胞とiPS細胞を用いた再細胞化に着手している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)*すべて査読あり

(1) Hibi T, Shinoda M, Itano O, Obara H, Kitago M, Abe Y, Yagi H, Tanaka M, Hoshino K, Fujino A, Kuroda T, Kawachi S, Tanabe M, Shimazu M, Kitagawa Y. A steroid minimization immunosuppression protocol using basiliximab in adult living donor liver transplantation for hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatol Res.* 2015;45:1178-84.

(2) Inagaki Y, Oshiro Y, Tanaka T, Yoshizumi T, Okajima H, Ishiyama K, Chikashi Nakanishi C, Hidaka M, Wada H, Hibi T, Takagi K, Honda M, Kuramitsu K, Tanaka H, Tohyama T, Ikegami T, Imura S, Shimamura T, Nakayama Y, Urahashi T, Yamagishi K, Ohnishi H, Nagashima S, Takahashi M, Shirabe K, Kokudo N, Okamoto H, Ohkohchi N. A Nationwide Survey of Hepatitis E Virus Infection and Chronic Hepatitis E in Liver Transplant Recipients in Japan. *EBioMedicine* 2015;2:1607-12.

(3) Ei S, Shinoda M, Itano O, Obara H, Kitago M, Hibi T, Yagi H, Abe Y, Matsubara K, Ono Y, Kawachi S, Hoshino K, Kuroda T, Tanabe M, Kitagawa Y. Effects of Addition of Early Enteral Nutritional Support During the Postoperative Phase in Patients after Living-Donor Liver Transplantation. *Ann Transplant*. 2015;20:357-65.

(4) Mishima K, Obara H, Sugita K, Shinoda M, Kitago M, Abe Y, Hibi T, Yagi H, Matsubara K, Mori T, Takano Y, Fujiwara H, Itano O, Hasegawa N, Iwata S, Kitagawa Y. Helicobacter cinaedi bacteremia with cellulitis after ABO-incompatible living-donor liver transplantation: Case report. *World J Gastroenterol*. 2015;21:7911-5.

(5) Hibi T, Nishida S, Sageshima J, Levi DM, Ruiz P, Roth D, Martin P, Okabayashi K, Burke GW, Ciancio G, Tzakis AG. Excessive immunosuppression as a potential cause of poor survival in simultaneous liver/kidney transplantation for hepatitis C. *Transpl Int*. 2014;27(6):606-16.

(6) Hibi T, Nishida S, Levi DM, Selvaggi G, Tekin A, Fan J, Ruiz P, Tzakis AG. When and why portal vein thrombosis matters in liver transplantation: A critical audit of 174 cases. *Ann Surg*. 2014;259:760-6.

(7) Hibi T, Shinoda M, Itano O, Kitagawa Y. Current status of the organ replacement approach for malignancies and an overture for organ bioengineering and regenerative medicine. *Organogenesis*. 2014;10:241-9.

(8) Shinoda M, Tanabe M, Itano O, Obara H, Kitago M, Abe Y, Hibi T, Yagi H, Fujino A, Kawachi S, Hoshino K, Kuroda T, Kitagawa Y. Left-side hepatectomy in living donors: through a reduced upper-midline incision for liver transplantation. *Transplant Proc*. 2014;46:1400-6.

(9) Kadota Y, Yagi H, Inomata K, Matsubara K, Hibi T, Abe Y, Kitago M, Shinoda M, Obara H, Itano O, Kitagawa Y. Mesenchymal stem cells support hepatocyte function in engineered liver grafts. *Organogenesis*. 2014;10:268-77.

(10) Hibi T, Nishida S, Levi DM, Sugiyama D, Fukazawa K, Tekin A, Fan J, Selvaggi G, Ruiz P, Tzakis AG. Long-term deleterious effects of aortohepatic conduits in primary liver transplantation: proceed with caution. *Liver Transpl*. 2013;19:916-25.

(11) Fukazawa K, Nishida S, Hibi T, Pretto EA Jr. Crystalloid flush with backward unclamping may decrease post-reperfusion cardiac arrest and improve short-term graft function when compared to portal blood flush with forward unclamping during liver transplantation. *Clin Transplant*. 2013;27:492-502.

(12) Fukazawa K, Yamada Y, Nishida S, Hibi T, Arheart KL, Pretto EA Jr. Determination of the safe range of graft size mismatch using body surface area index in deceased liver transplantation. *Transpl Int*. 2013;26:724-33.

[学会発表] (計 3 件)

(1) Hibi T et al. Outcomes of living donors in small bowel transplantation. 2015/6/12. XIV International Small Bowel Transplant Symposium. Buenos Aires, Argentina.

(2) 日比泰造ほか. 生体小腸移植における成人ドナーの術後成績. 第 27 回日本小腸移植研究会. 2015 年 3 月 14 日. 岡山大学 (岡山県岡山市).

(3) Hibi T et al. Long-term follow-up of adult living donors for small bowel transplant in pediatric recipients. 2013/6/26. XIII International Small Bowel Transplant Symposium. Oxford, U.K.

[招待講演] (計 3 件)

(1) 日比泰造. 切除困難な進行・再発がんの手術戦略: 腫瘍外科と移植外科の融合. 第 21 回外科フォーラム. 2014 年 7 月 26 日. ホテルオークラ東京 (東京都港区)

(2) 日比泰造. 難治がんの温故知新. 第 6 回東京周術期管理講演会. 2015 年 11 月 11 日. ハイアットリージェンシー東京 (東京都新宿区).

(3) 日比泰造. 難治がんの治療戦略: 腫瘍外科と移植外科の融合. 第 12 回 CAESUR Seminar. 2015 年 12 月 19 日. 新宿文化クイントビル (東京都新宿区).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日比 泰造 (HIBI Taizo)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 10338072