

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08596

研究課題名（和文）鎖肛術後の排便機能障害に対する脂肪由来Schwann様細胞を用いた治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a treatment using adipose-derived Schwann-like cells for defecation dysfunction after anorectal malformation surgery.

研究代表者

石橋 広樹 (ISHIBASHI, Hiroki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・講師

研究者番号：20314867

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：鎖肛（直腸肛門奇形）では、先天的に括約筋群の形成・発達が悪い事も多く術後の排便管理に難渋している。今回、鎖肛を想定した排便機能障害モデルにおいて、臨床応用を目指した脂肪由来 Schwann様細胞（SLC）投与による神経再生促進および排便機能改善効果を確立する目的で本研究を行った。この研究では、ADSCからSLCに分化誘導するプロトコルを確立し、排便障害モデルラットを作成後にSLCを投与してその効果を検討する。成果は、1. ADSCからSchwann細胞への分化誘導に成功した。2. 排便障害モデルラットを作成した。3. 排便障害モデルにSLCを移植すると、膀胱内圧の改善を認め、膀胱壁の厚さも改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鎖肛（直腸肛門奇形）では、先天的に括約筋群の形成・発達が悪い事も多く、特に高位型では直腸肛門形成術を施行しても排便機能が不良な症例が存在し、術後の排便管理に難渋している。鎖肛において骨盤内臓神経再生による排便機能改善効果についての報告はなく、ADSCを用いた骨盤内臓神経再生・排便障害改善が確立され、臨床応用できれば画期的な治療法となる。

研究成果の概要（英文）：In anorectal malformation, the sphincter muscles are often congenitally poorly formed and developed, making postoperative defecation management difficult. In the present study, we aimed to establish the effects of adipose-derived Schwann-like cells (SLC) administration on nerve regeneration and improvement of defecation function in a defecation injury model of anal-clavicular anus, with the aim of clinical application. In this study, a protocol to induce differentiation of ADSCs into SLCs was established and the effects of SLCs were investigated by administering SLCs after the creation of a defaecal injury rat model. The results are as follows: 1. Differentiation induction from ADSCs to Schwann cells was successfully achieved; 2. Defecation disorder model rats were created; 3. Transplantation of SLCs into the defecation disorder model resulted in improvement of bladder inner pressure and bladder wall thickness.

研究分野：小児外科学分野、再生医療分野

キーワード：鎖肛 直腸肛門奇形 排便機能障害 脂肪由来Schwann様細胞 ADSC

1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床的背景

鎖肛(直腸肛門奇形)は先天的な直腸肛門の形成異常であり、直腸が盲端となり肛門が閉鎖している病態である。外科的に括約筋群(恥骨直腸筋、外肛門括約筋)の中心を通るように直腸肛門形成術を行うが、特に高位型では、先天的に括約筋群の発達および骨盤内臓神経網の発達が不良かつ直腸肛門形成の手術に伴う神経損傷もあり、十分な排便機能が得られないことが多く、臨床的に問題となっている。そこで、骨盤内臓神経の再生を促進することで、直腸周囲の括約筋群の動きが良くなり、鎖肛術後の排便機能の改善が得られるのではないかと着想した。

(2) 脂肪由来間葉系幹細胞 (Adipose derived stem cell: ADSC)

近年、脂肪組織内に多能性を有する ADSC の存在が明らかとなり、骨髄由来幹細胞と比べ、採取効率が高く、低侵襲に獲得できるという利点から再生医療への応用が期待されている。ADSC は自らの脂肪組織から抽出し移植する auto-transplantation の場合拒絶反応がなく、倫理的な問題も少ない。ADSC は様々な能力を持つと言われており、内胚葉・外胚葉へと転換できる「分化可塑性」だけでなく、抗炎症作用、障害部位への Homing 能力、障害部位への栄養効果などが報告されており、我々はこれまでに、肝切除虚血再灌流障害モデルマウスにおいて、ADSC 移植が、Trophic 効果 (Saito Y, et al. *J Surg Res.* 2013) 及び Homing 効果 (Saito Y, et al. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2014) を有し、術後肝傷害を軽減し、肝再生を促進することを報告してきた (図 1)。さらに我々は、ADSC からインスリン産生細胞の作成にも成功している (Ikemoto et al. *Sci Rep*, 2019)。

神経再生に関して移植 ADSC は Schwann 様細胞へ分化し NGF (神経成長因子)、VEGF (血管内皮増殖因子)、BDNF (脳由来神経栄養因子) などの神経再生にかかわる様々な栄養因子やサイトカインを分泌することが報告されており、これらのパラクライン効果によりすでに存在する Schwann 細胞の機能を活性化させると報告されている。(transplant. 2009)。当初は未分化 ADSC を投与予定であったが、教室で ADSC から Schwann 様細胞への分化誘導に成功したので、機能を有する Schwann 様細胞での動物実験に変更した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ADSC を Schwann 様細胞に分化・促進して、これを投与することで、括約筋群の動き・発達にも繋がるとの仮説に基づき、鎖肛を想定した排便機能傷害モデルにおいて、臨床応用を目指した脂肪由来 Schwann 様細胞投与による効果を確認し、神経再生促進および排便機能改善効果を確立することである。

3. 研究の方法

(1) ADSC の Schwann 様細胞への分化促進 (in vitro)

未分化ヒト ADSC から三次元培養を用いて、Schwann 様細胞への分化誘導プロトコルを既報の方法を参考に確立する。ヒト ADSC は Invitrogen 社 (米国ニューヨーク州グランドアイランド) より購入し、成長サプリメントおよび GlutaMAX-1 (を添加した ADSC 基礎培地で維持した。初代ヒト SC は ScienCell Research Laboratories 社 (米国カリフォルニア州カールスバッド) から調達し、完全 SC 培地 (ScienCell Research Laboratories 社) で製造者の指示に従って培養した。SH-SY5Y 細胞株は ATCC (CRL-2266、米国バージニア州マナサス) から入手し、15% ウシ胎児血清 (FBS) および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を添加した DMEM/F12 で維持した。ADSC から SLC への分化を誘導するために、ADSC を 3~5 継代培養した後、 1×10^5 ADSCs/well を コラーゲン I コート 6 ウェルプレートに播種して従来の SLC 群とし、または 2×10^4 ADSCs/well と 0.2 mg/ml の μ -piece (16629004; 富士フィルム) を混合して超低添着 96 ウェルプレートに播種して 3D SLC 群とした。3D グループの細胞が各ウェルにスフェロイドを形成した後 (播種後約 24 時間)、葉酸を用いた我々の修正プロトコルを用いて、従来の SLC グループと 3D SLC グループの両方で分化を誘導した。すべての細胞は、加湿インキュベーター内で 37 °C、5% CO₂ で培養された。培地を交換する際、従来の SLC 群には 2 ml/ウェルの培地を、3D SLC 群には 100 μ l/ウェルの培地を添加した。

(2) 排便障害モデルラットの作成

(対象) Wister 系 8 週齢雄性ラット

(方法) 仰臥位に固定し下腹部正中切開を行い、実体顕微鏡下に骨盤内臓を左方へ圧排し大腰筋節の内側縁で下腹動脈および閉鎖動脈の内側に接する脂肪組織との間を丁寧に剥離し直腸側腔を展開する。直腸内臓神経叢を同定し、血管の損傷に注意しながら直腸壁から剥離した後に切離する。

(3) 排便障害モデルラットへの脂肪由来 Schwann 様細胞の投与 (in vivo)

排便障害モデルに脂肪由来 Schwann 様細胞を骨盤内に投与して、膀胱内圧、肛門内圧検査を行い、その効果を検討する。

4. 研究成果

(1) ADSC の Schwann 様細胞 (SLC) への分化促進 (in vitro)

ヒト ADSCs は、我々のプロトコルを用いて SLC に分化させた。代表的な画像は、分化過程における 3D SLC グループの形態学的変化を示している (図 1A)。分化の 18 日後、細胞は体積がわずかに減少したタイトなスフェロイドに凝集した。図 1B に示すように、RCP μ -piece を足場として使用した場合、十分な細胞形成が維持された。さらに、S100 カルシウム結合タンパク質 B (S100B) や神経成長因子受容体 (NGFR) などの SC マーカーの発現は、従来の SLC に比べて 3D SLC で有意に上昇した (図 1C)。

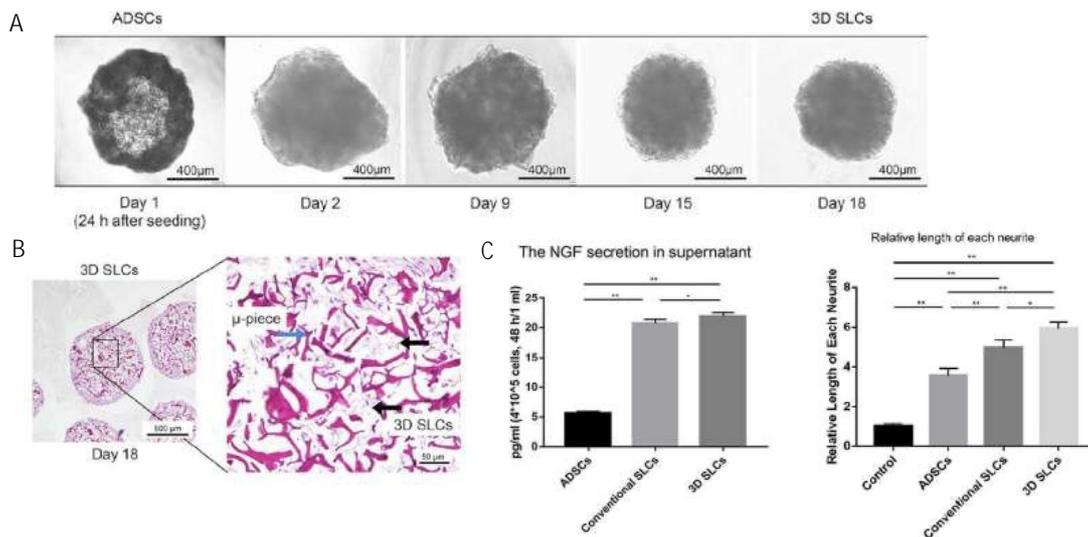


図1: ADSCから作成した3D SLC spheroid

(2) 便障害モデルラットの作成

Wister 系 8 週齢雄性ラットを使用して、仰臥位に固定し下腹部正中切開を行い、実体顕微鏡下に骨盤内臓を左方へ圧排し大腰筋節の内側縁で下腹動脈および閉鎖動脈の内側に接する脂肪組織との間を丁寧に剥離し直腸側腔を展開する。ラットの直腸内臓神経叢を同定し、血管の損傷に注意しながら直腸壁から剥離した後に切離して、排便障害モデルを作成した (図 2)。膀胱内圧検査では、コントロールと比べて、膀胱の収縮が消失しており、排便・排尿障害モデルとして使用可能と判断した (図 3)。

図2: 排便障害モデル作成

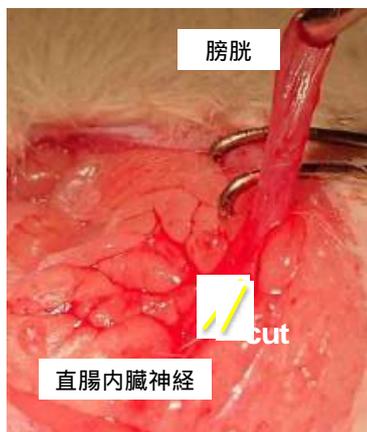
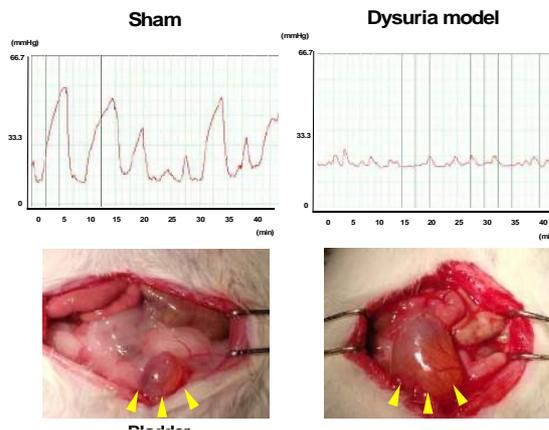


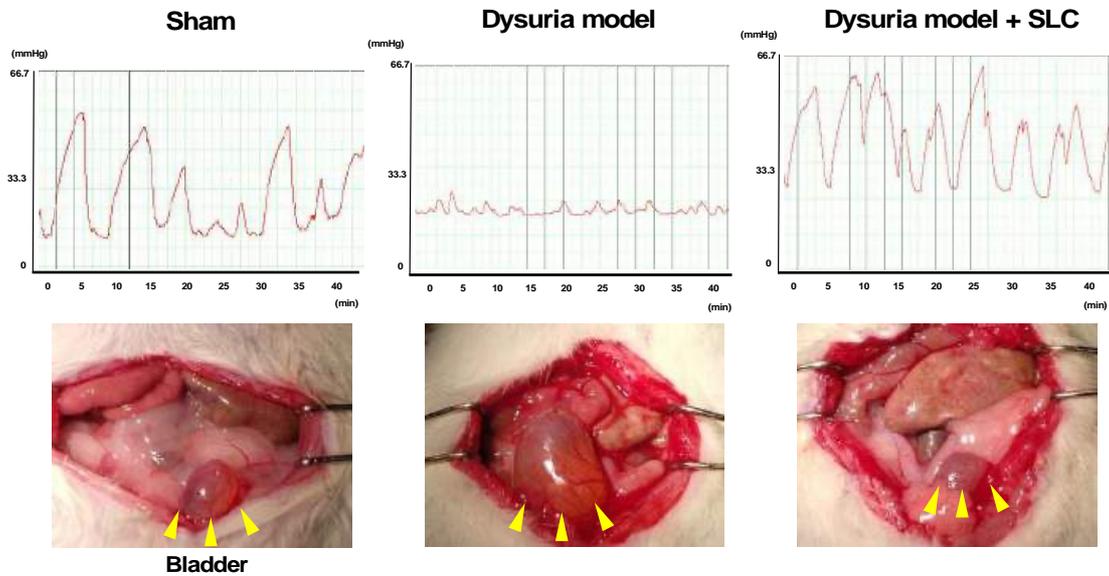
図3: 排便障害モデルでの膀胱内圧



(3) 排便障害モデルラットへの脂肪由来 Schwann 様細胞の投与 (in vivo)

排便・排尿障害モデルへ SLC の投与を行ったところ、膀胱内圧は正常化して、膀胱収縮を認めた (図 4)。また、膀胱壁の厚さも改善していた。

図4：排便障害モデルへのSLC投与による膀胱内圧の変化



【まとめ】

今回の研究で、ヒト ADSC から Schwann 様細胞 (SLC) への分化誘導において、3D 培養技術を用いて効率的で機能を有する分化誘導法を確立することが出来た。また、排便・排尿障害モデルラットの作成にも成功した。ADSC から分化誘導した SLC を排便・排尿障害ラットに移植することで、機能改善が得られることが証明された。鎖肛において SLC 移植による骨盤内臓神経再生が排便機能改善効果に繋がる可能性が示唆され、今後、実際の臨床応用に向けて更なる検討を続ける予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mori H, Masahata K, Umeda S, Morine Y, Ishibashi H, Usui N, Shimada M.	4. 巻 52
2. 論文標題 Risk of carcinogenesis in the biliary epithelium of children with congenital biliary dilatation through epigenetic and genetic regulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surg Today	6. 最初と最後の頁 215-223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-021-02325-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mori H, Ishibashi H, Yokota N, Shimada M.	4. 巻 52
2. 論文標題 Risk factors for metachronous contralateral inguinal hernia after laparoscopic percutaneous extraperitoneal closure for unilateral inguinal hernia in children	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surg Today	6. 最初と最後の頁 1491-1496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-022-02480-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yokota N, Ishibashi H, Suga K, Mori H, Kitamura A, Nakagawa R, Shimada M.	4. 巻 69
2. 論文標題 A case of Gross E esophageal atresia discovered following a unique clinical course	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Med Invest	6. 最初と最後の頁 141-144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2152/jmi.69.141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita S, Takasu C, Morine Y, Ishibashi H, Ikemoto T, Mori H, Yamada S, Oya T, Tsuneyama K, Shimada M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Characteristic submucosal alteration in biliary carcinogenesis of pancreaticobiliary maljunction with a focus on inflammasome activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Hepatobiliary Pancreat Sci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jhbp.1253	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori H, Morine Y, Mawatari K, Chiba A, Yamada S, Saito YU, Ishibashi H, Takahashi A, Shimada M.	4. 巻 41
2. 論文標題 Bile Metabolites and Risk of Carcinogenesis in Patients With Pancreaticobiliary Maljunction: A Pilot Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 327-334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石橋広樹
2. 発表標題 地方大学における小児内視鏡外科手術の教育 技術認定医取得を目指す取り組み
3. 学会等名 第36回日本内視鏡外科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石橋広樹
2. 発表標題 小児abdominoscrotal hydrocele (ASH) に対する腹腔鏡下手術の有用性
3. 学会等名 第60回日本小児外科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石橋広樹, 森大樹, 横田典子, 島田光生
2. 発表標題 小児内視鏡外科手術の現状と今後の展望【Video】小児鼠径ヘルニアに対するLPEC法の治療成績および適応拡大
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石橋広樹, 森大樹, 横田典子, 島田光生
2. 発表標題 極低出生体重児発症の鼠径ヘルニアに対するLPEC法の妥当性
3. 学会等名 第59回日本小児外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石橋 広樹
2. 発表標題 リンパ管温存腹腔鏡下精巣動静脈切離術 (Palomo法) における色素を用いた術中イメージングの有用性
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石橋 広樹
2. 発表標題 巨大胸骨後ヘルニアに対して腹壁筋Flapを併用した横隔膜修復術
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 石橋広樹 (分担)、上野滋 (監修)、仁尾正記・奥山宏臣・田尻達郎 (編集)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 452
3. 書名 標準小児外科学 (第8版) 分担 (第18章 (肝・胆・膵))	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	池本 哲也 (IKEMOTO Tetsuya) (20398019)	徳島大学・病院・教授 (16101)	
研究分担者	齋藤 裕 (SAITO Yu) (50548675)	徳島大学・病院・講師 (16101)	
研究分担者	森 大樹 (MORI Hiroki) (70448330)	徳島大学・病院・特任助教 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関