

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861202

研究課題名(和文)小腸幹細胞Organoid Unitを用いた人工小腸作製

研究課題名(英文)Generating tissue-engineered small intestine (TESI) from cultured intestinal stem cells.

研究代表者

虎島 泰洋(TORASHIMA, Yasuhiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：40534467

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)：(1)仔マウスから小腸を採取し、TESIを作成した。(2)Lgr5-EGFP マウスの小腸より上皮幹細胞を分離し培養を行った。(3)培養された上皮幹細胞を、TESI作成手順と同様に移植したところ、腸管上皮様の構造、分化が確認されたが筋層構は認めなかった。(4)仔マウス小腸から腸管間質系幹細胞を分離し培養を行った。それらを同様に移植したが、腸管上皮構造は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：The procedure for generating TESI from mature intestinal cells was established in a mouse model. Then, TESI was successfully generated from Lgr5 stem cells with further differentiation into intestinal epithelium after 4 weeks of in vivo implantation.

研究分野：外科学一般・消化器外科学

キーワード：TESI 人工小腸 小腸上皮幹細胞 小腸間質系幹細胞 培養細胞

1. 研究開始当初の背景

小児領域において、壊死性腸炎や軸捻転等による腸管壊死に対し大量腸切除を余儀なくされ短腸症候群をきたす症例が少なくない。短腸症候群は約 75%以上の小腸を失うことで起こると言われている(Stollman et al. Gastroenterologist, 1996)。その主な治療法として従来より経静脈栄養が行われてきたが、5 年生存率は 30%と低く、カテーテル留置に関連した敗血症など合併症に伴う頻回の入退院による Quality of Life の低下など申告な問題を抱えている。近年は外科治療による腸管延長術や小腸移植が導入され、の有効例が報告されつつあるが、小腸移植は過大な侵襲を伴う手術であり免疫抑制剤が必須であることや、小腸移植の 3 年生存率はいまだ 60%にとどまっている(Kato et al. Ann Surg, 2006)など、満足のできる結果には至っていない。さらに本邦においては深刻なドナー不足もあり、再生医療に対する期待はむしろ高まっている。

現在、腸管組織に対する再生医療は、内視鏡的粘膜切除術 (EMR) にともなう人工食道潰瘍に対する自家口腔粘膜上皮細胞シートによる再生医療的治療法(Ohki et al. Gut, 2006)の確立や、マウスおよびヒト腸細胞の長期間培養の成功 (Sato et al. Nature, 2011)、iPS 細胞から腸様構造の組織が作成される(Ueda et al. Biochem Biophys Res Commu, 2009)など、様々な分野で研究が進められているが、いまだ臓器としての腸管再生には至っていない。

2. 研究の目的

申請者は、平成 22 年より 2 年間にわたる研究留学において、マウスより間葉系幹細胞や Intestinal subepithelial myofibroblasts (ISEMF) を抽出培養し、それらを評価検討する研究や、小腸障害モデル作成に携わる一方、マウス小腸より Organoid Unit を作成し、そ

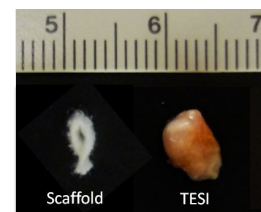
れをマウス腹腔内大網に埋設することで Tissue Engineered Small Intestine (TESI) を作成する研究(Sala et al. Tissue Eng, 2011)にも携わり、小腸全層を再生することに成功している。ここで作成される TESI は分化した上皮細胞はもとより、粘膜下層に脈管組織や神経細胞、さらには筋層も備えており、ラットの大量腸切除モデルにおいては TESI を残存腸管と吻合することで体重増加を認める結果を得ており(Grikscheit et al. Ann Surg, 2004)、TESI が吸収能を持ち、生体内で有効性を持つことが証明されている。一方で TESI の発育に関わる因子の研究が進められており、VEGF や FGF10 過発現モデルにおいて TESI の生育が促進されることが証明されているが(Fgf10 に関する論文を投稿中)、その発育は不確実で、粘膜上皮幹細胞、間葉系幹細胞や、それらを支持する細胞の役割等いまだ未知の部分も多い。また現在の手技 TESI 1 個を作成するために子マウス数匹から小腸採取を要し、臨床応用にはまだ大きなハードルが存在する。

3. 研究の方法

本研究はマウス小腸より採取した細胞を大量培養し、それを Organoid Unit とし TESI を作成することを目指し、再生腸管の臨床応用への基盤となる研究を行うものである。また上皮細胞と間葉系細胞を異なる遺伝子組み換えマウスより採取し培養することで、それぞれが担う分化細胞を検討する。

4. 研究成果

まずはマウス小腸からの TESI 作製を当教室において再現できることを確認し

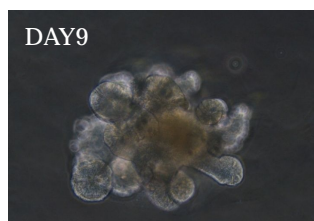


た。これは仔マウスから小腸を採取し、片化した後に酵素処理を行い Organoid Unit を作

製、これを生体内吸収性の Scaffold に充填し、NOD/SCID マウスの大腸へ移植。4 週後にそれを採取し成長、分化を組織学的、免疫組織化学的に検討した。技術の習熟により、安定して TESI が作製できることが可能となった。

次いで T Sato らのプロトコル(Nature, 459, 263-365. 2009) に則り、Lgr5-EGFP マウスの小腸より上皮幹細胞を分離し、*in vitro* での培養を行った。培養液に mEGF、Noggin、そして Stanford

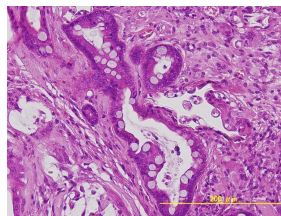
大より取り寄せた cell line より生成した Rspol



などを混合した Matrigel を用い培養、継代を行い、上皮幹細胞の増殖が確認された。それら培養された上皮幹細胞を、TESI 作成手順と同様に Scaffold に充填し NOD/SCID マウス大腸に移植したところ、培養を介さず作成した TESI と同様の構造が形成された。それらは組織学的に腸管上皮様の構造を呈しており、免疫組織化学染色にてはパネート細胞、内分泌細胞、杯細胞や吸収上皮細胞の存在が確認された。また陰窩付近で活発な細胞分裂がみられ、成長、分化が確認された。しかし上皮幹細胞のみの移植では腸管筋層構造が確認されなかった。

続いて、仔マウス小腸から腸管間質系幹細胞を分離し、継代培養を行った。それらを同様に単独で Scaffold に充填し NOD/SCID マウス大腸に移植したが、腸管上皮構造は得られなかった。

現在、培養した上皮幹細胞と、培養した腸管間質系幹細胞とを混合したものを Scaffold に充填し NOD/SCID マウス大腸に移植し TESI を作成する試みを継続している。



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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

虎島 泰洋, 第 27 回日本小腸移植研究会, 2015/3/14, Junko Fukutake Hall (岡山市)

〔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

虎島 泰洋 (TORASHIMA, Yasuhiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
講師

研究者番号：40534467

(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：