

令和元年6月5日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19933

研究課題名(和文)食道幹細胞を用いた食道の再生

研究課題名(英文) Esophagus tissue engineering with esophageal tissue stem cell.

研究代表者

西野 豪志 (NISHINO, Takeshi)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：80645193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：食道全層の再生を目指した本研究では、細胞ソースとしてマウス食道幹細胞、足場として脱細胞化したラット食道を用いた。マウス食道上皮から採取した細胞群からFACSでCD34陽性細胞を回収し、培養することで食道幹細胞を単離することができた。ラット食道は既報告の方法に沿って脱細胞化させることができた。脱細胞化したラット食道にマウス食道幹細胞を播種・培養し、顕微鏡下に扁平上皮様細胞層が形成されていることを確認し、皮下移植モデルを作成したが、移植した食道の虚脱に伴い紐状の線維組織に置換された。一部で重層扁平上皮細胞層も確認することができたが、食道全層を再現するまでには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道疾患の手術では、胃や腸を用いて食道を再建する必要があるが、再生医療の技術により自分の細胞から食道を再生することができれば、健康な臓器を犠牲にする必要がなく、理想的である。今回、食道再生の細胞源となる食道幹細胞をマウス食道から単離し、細胞を洗い流した食道の骨格に移植することで、食道再生することができかどうかを検証した。結果的に一部の粘膜層は再生されたが、食道の筋肉や血管までは再生できなかった。

研究成果の概要(英文)：We proposed regeneration of whole esophageal layers with tissue engineering, adopting with murine esophageal tissue stem cell for the cell source and the decellularized esophagus of rat for regeneration scaffold. We could establish the procedure to isolate murine esophageal tissue stem cell through sorting with CD34 positive cell by FACS. And we could decellularize the esophagus of rat in accordance with previous report. We seeded and cultivated isolated esophageal stem cell into decellularized esophagus of rat and confirmed microscopically development of squamous epithelium like cell layer in esophageal scaffold. We established the subcutaneous implant model of rat, but the implanted graft was collapsed and replaced to stringy fibrous tissue. We could observe partially multilayered squamous cell layer, but finally we could not regenerate whole esophageal layers.

研究分野：医歯薬学

キーワード：食道幹細胞 食道再生 iPS細胞 遺伝子解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性食道閉鎖症は 2500 ~ 5000 人に 1 人に発症する先天性異常である。先天性食道閉鎖症の 10% は欠損距離の長い Long gap atresia であり、その場合、胃、大腸、小腸などの自家臓器で再建を行う必要がある。また、成人においては、食道癌に対する食道切除後に、腹部から頸部までを自家臓器で再建する必要がある。しかし正常臓器を再建に用いることで、採取臓器の機能障害をきたす場合があり、また、再建臓器の虚血による縫合不全や吻合部狭窄などの合併症の頻度が高い。術式の工夫など様々な対策が講じられているが、いまだ合併症による死亡例も少なくない。再生医療の技術により食道を再生し、移植することができれば、食道再建の限界が広がり、患者にとって大きな利益となる。

従来、立体的な管腔臓器の再生は困難であると考えられてきたが、小腸や大腸などの消化・吸収に携わる臓器と比べると、食道の機能は食物の運搬という単純なものであり、再生医療の可能性が高いと考えられる。食道は、粘膜上皮・粘膜下層・筋層の層構造を有し、豊富な神経や血管、リンパ管の分布がある。これらの複雑な構造を立体的に再生する必要があり、立体的な足場としてコラーゲンで被覆したシリコンステントやメッシュシートなどを使用した報告がみられるが、機能を有する全層の再生には至っていない。食道上皮を再生する細胞ソースとして骨髄由来間質細胞や食道成熟上皮細胞を用い、重層扁平上皮を再生した報告があるが、粘膜上皮のみの再生であり、筋層や血管・神経組織への分化は得られていない。近年、食道の基底層に存在する基底細胞が自己再生と分化能力のある組織幹細胞としての特性を持つことが明らかにされ、Croagh らは、食道上皮から食道幹細胞を単離する手法を確立した (J Pediatr Surg 2009)。さらに彼らは、単離した食道幹細胞は 2 週間培養することで重層扁平上皮に分化することも確認した。一方、立体的な臓器再生に用いる足場 (scaffold) として、脱細胞化した臓器 (acellularized scaffold) が、細胞増殖、遊走、分化誘導、間質の構築、免疫応答の寛容性などの点において優れているという報告が心臓・気管・肺などの臓器でみられている。食道に関しても、Sjoqvist らは、脱細胞化したラット食道に骨髄間葉系間質細胞を播種・移植することで、食道上皮の再生、血管新生、筋線維の新生を認めたと報告しており (Nat Commun 2014)、脱細胞化した食道は非常に有用な足場としての役割を果たすと考えられる。そこで今回、われわれは、「細胞ソース」として局所の幹細胞である食道幹細胞を使用し、「足場」として脱細胞化した食道を用いることで、食道全層の再生が可能なのではないかという着想に至った。

マウスの胎生期の発生において、マウス食道は胎齢 9.5-11.5 日の間に前腸から分かれる。もともと気管・肺とは起源を同じくし、肺芽が伸長・分岐していくことで徐々に呼吸器系組織が形成され、食道も経時的に伸長することで形成されていくことが知られている。さらに、食道幹細胞に関しても、呼吸器と同様に前腸内胚葉系の幹細胞を由来とし、BMP などの特有の分化シグナルを受け、食道の組織幹細胞へ分化することが明らかとなっている (Stem cell Res 11: 1003-12, 2013)。近年の iPS 細胞の研究の進歩は目覚ましく、呼吸器領域では、すでに iPS 細胞から、II 型肺胞上皮細胞など種々の細胞への分化・誘導も確認されている (Huang, et al. Nat Biotech 2014)。そのプロトコールは Ventilation cocktail (Wnt, Bmp4, retinoic acid などの誘導因子を使用) としてある程度確立しており、基底細胞 (p63+) への分化・誘導にも成功している。基底細胞は食道の局所の幹細胞でもあり、発生学的にも起源を同じくすることから、このプロトコールを用いて分化・誘導させた基底細胞が食道幹細胞と同一の性格を有している可能性がある。その同一性に関しては確かめられてはおらず、確認する必要はあるものの、食道の再生に非常に有望な細胞ソースである可能性がある。iPS 細胞からこのプロトコールを参考にして、食道幹細胞 (p63+基底細胞) を経由して扁平上皮細胞への分化・誘導できる可能性について着目した。

2. 研究の目的

食道再建のために健常な臓器に損傷を与える必要がなくなれば、食道手術の侵襲を軽減させることができ、食道疾患の患者にとって大きな福音となる。そのために今回のプロジェクトでは、局所の幹細胞である食道幹細胞が食道全層の再生に寄与する可能性を証明すること、iPS細胞から食道幹細胞 扁平上皮細胞への分化・誘導への道筋をたてることで、食道再建のための新たな可能性の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス食道からの食道幹細胞単離

Maghsoudlouらの方法 (Pediatr Surg Int 2014) に準じて行った。マウスをCO₂吸入により sacrifice し、頸部から腹部食道までを摘出した。PBS/AA にて洗浄し、食道を全長に渡り長軸切開し、再度 PBS/AA で洗浄する。Dispase I + 1% AA で 15 分間・37℃ で培養させた後、粘膜下層から粘膜層のみを分離・細切し、0.05% trypsin/EDTA + 1% AA で 10 分間・37℃ で培養した。上清を除去し、8ml の soybean trypsin inhibitor 含 PBS で懸濁し、40 μm のフィルターを通した後、188g・5 分間・4℃ で遠心分離し、K-SFM+ medium と懸濁する。再度遠心分離し、200 μL の staining buffer (SB) で懸濁し、CD34-PE (1:100, 4℃・30 分) で染色した。コントロールとして、マウスの大腿骨から採取した骨髓細胞を用いた。大腿骨から 1ml 注射器で骨髓を採取し、1ml の PBS でフラッシュする。70 μm のフィルターを通し、188g・5 分間・4℃ で遠心分離し、氷中に保存。200 μL の SB で懸濁し、CD34 で染色する (BM+ control)。FACS で CD34 抗体陽性細胞をソーティングし、これを食道幹細胞とした。

(2) ラット食道の脱細胞化による足場の作成。

Sjoqvist らの方法 (Nat Commun 2014) に準じて行う。投与する食道幹細胞と識別するために、レシピエントには GFP ラットを用いる。CO₂ で sacrifice し、食道を採取する。口側・肛門側にカニューレを挿入し、両端を結紮し、食道を脱イオン水に 20 分間浸し、浸透圧刺激で細胞膜を破壊する。界面活性剤による細胞の洗い流しを 2 時間行う。DNase I を用いて 3 時間かけて DNA を破壊する。このプロトコールは組織が完全に脱細胞され、透明になるまで繰り返す。洗浄の後、4% PBS + 1% AA で保存する。適切に脱細胞化できたかどうかについて、Elastin, collagen I/II, VEGF, Fibronectin などの染色にて評価した。

(3) 食道幹細胞の播種・移植・皮下モデル作成。

脱細胞化した 4cm のラット食道に 1.6-1.8 cells/ml の予め単離した食道幹細胞を散布し、3 週間培養する。食道内に上皮が形成されていることを顕微鏡下に確認する。ラットに全身麻酔を施し、腹部に切開をおき、皮下組織内に 15 mm に切断した食道を移植する。(投与群) コントロールとして脱細胞化した食道に PBS を注入した食道を移植する。(コントロール群) 7 日間液状の栄養を与え、7 日間は軟らかい食事を与え、移植後 1・2 週目に犠牲死させ、グラフトを摘出する。

生着・分化の有無：無染色・H-E 染色にて形態的評価を行った。

食道全層再生の有無：H-E 染色に加えて、食道上皮 (pan-CK, 63)・神経 (Gap43, -III tubulin)・血管 (vWF)・筋肉 (Desmin)・細胞間接着 (Zo-2) について免疫組織学的に評価した。

4. 研究成果

(1) マウス食道からの食道幹細胞単離

Maghsoudlou らの方法に準じて、sacrifice したマウスから食道を摘出し、Dispase I, 0.05% trypsin/EDTA で処理し 40 μ m でフィルタリングの後、遠心分離し、K-SFM+ medium と懸濁した。当初は脱核細胞のみで生存細胞が採取できず、幹細胞の採取・単離に難渋した。Dispase 処理時間を調整し、食道を細切ることにより、上皮細胞の採取に成功した。約 2.0×10^4 /ml の細胞を回収することができるようになったが、その後の培養がうまくいかず、培養の条件設定をいくつか試しながら手技を繰り返した。最終的に、FACS を用いて CD34 抗体陽性細胞を食道幹細胞が含まれる細胞群を単離することができた。

(2) ラット食道の脱細胞化による足場の作成

Sjoqvist らの方法に準じて、摘出したラット食道を脱イオン水に 20 分間浸し、浸透圧刺激で細胞膜を破壊した。その後、界面活性剤による細胞の洗い流しを 2 時間行った。DNase I を用いて 3 時間かけて DNA を破壊させた。このプロトコールは組織が完全に脱細胞され、透明になるまで繰り返す予定であったが、完全な透明になるまでの脱細胞化に難渋し、時間を要した。最終的に、Elastin, collagen I/II, VEGF, Fibronectin などの染色を行い、完全に脱細胞化されたことを確認することができた。

(3) 食道幹細胞の播種・移植・皮下モデル作成。

脱細胞化したラット食道に単離したマウス食道幹細胞を播種し、3 週間培養した。顕微鏡下に食道内に扁平上皮様細胞層が形成されていることを H-E 染色にて確認した。前述のように作成した食道をマウスの皮下に移植した。結果としては、多くのケースで移植した食道の虚脱に伴い紐状の線維組織に置換されてしまった。一部において重層扁平上皮細胞層を思わせる構造を確認することができたものの、一方でそれに伴った筋層や間質を再現するまでには至らなかった。

上記の実験遂行に時間を要したため、当初予定していた同所移植モデルの作成、iPS 細胞から誘導した基底細胞を用いた移植モデルの作成には至れなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。