

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08553

研究課題名(和文) Hybrid細胞シートによる再生医療的直腸吻合部補強治療法の開発

研究課題名(英文) Development of regenerative medical treatment for rectal anastomosis reinforcement by using hybrid cell sheets

研究代表者

大木 岳志 (Ohki, Takeshi)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90307562

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)：腹膜と脂肪由来幹細胞(ASC)から操作性の良いハイブリッド細胞シートを作製し、再生医療的直腸吻合部補強治療法の開発を目的とした。コロナ禍のため大動物実験からラットを用いた小動物へ変更した。ラット皮下脂肪からASCシートを作製し、ラット広背筋の表面(筋層モデル)に移植した群とハイブリッド細胞シートを移植した群を組織学的に比較した(実験A)。また、消化管モデルとしてラットの胃の漿膜を外科的に除去した部位にASCシートとハイブリッド細胞シートを移植した(実験B)。小動物においてハイブリッド細胞シートの移植に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

縫合不全に対する再生医療的なアプローチは少なく細胞シートを用いた研究はない。腹膜は、術中に採取することが容易で、この腹膜を細胞シートのキャリアとして利用することで、軟らかく操作性の困難な細胞シートを吻合部の補強材料に使用できる可能性がある。本再生医療的治療法が確立すれば、直腸癌手術において人工肛門造設を減せる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop a regenerative medicine rectal anastomosis augmentation therapy by creating a manipulatable hybrid cell sheet from peritoneal and adipose-derived stem cells (ASCs). Due to the coronal disaster, the large animal experiment was changed to a small animal one using rats. ASC sheets were prepared from rat subcutaneous fat and histologically compared between a group transplanted to the surface of the rat vastus lateralis muscle (muscle layer model) and a group transplanted with hybrid cell sheets (Experiment A). In addition, ASC sheets and hybrid cell sheets were transplanted into the surgically removed serosa of the stomach of rats as a gastrointestinal tract model (Experiment B). Hybrid cell sheets were successfully transplanted in small animals.

研究分野：消化器外科

キーワード：再生医療 細胞シート 縫合不全

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、培養口腔粘膜上皮細胞シートを内視鏡を用いて、食道 ESD(内視鏡的粘膜下層剥離術)後の潰瘍面に移植することで狭窄を防ぐ新規再生医療的治療法の開発に成功しており(Ohki, Takeshi, et al. "Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model." Gut 55.12 (2006): 1704-1710)、2008年より本学でヒト臨床応用を開始し、その成果をすでに報告した(Ohki, Takeshi, et al. "Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered cell sheets." Gastroenterology 143.3 (2012): 582-588)。

一方、直腸癌における外科手術として低位前方切除術は多く行われているが、下部直腸癌(Rb)の場合、低位になるほど(肛門に近いほど)術後の縫合不全のリスクが高く、多くの施設では一時的回腸人工肛門造設をおこなっている。そこで、申請者が研究を行ってきた細胞シート技術を応用して縫合不全のリスクを低下させることができないかと考えた。下部直腸は、腹膜翻転部以下に存在し、解剖学的に漿膜がないこと、血流が不良であることが縫合不全の原因と考えられる。そこで、手術中に容易に採取可能な腹膜による補強と細胞シートによるパラクライン効果で血流を改善し縫合不全が減少するのではないかという仮説を立てた。

皮下脂肪から採取した脂肪由来の間葉系幹細胞(Adipose-derived mesenchymal stem cell: ASC)は、臨床応用の際に細胞ソースとして利用しやすい。そこでASCから作製した細胞シートを用いて実験をおこなう。腹膜とASC細胞シートで作製したハイブリッド細胞シートを直腸の吻合部に移植・縫合し、組織学的に効果があるのかを明らかにする。また縫合不全部に対しても治療効果があるのかを検討するため内視鏡を用いて医原性に吻合部を穿孔させた部位にハイブリッド細胞シートを腹腔内から移植し、組織学的に修復できるのかを明らかにする。最終的には、早期の臨床応用に向け、手技の確立も考慮し、腹腔鏡下手術およびロボット支援手術での検討加える。

### 2. 研究の目的

我々が研究を推進してきた細胞シート工学技術を応用し、直腸癌外科手術後(低位前方切除)の縫合不全を減らすために、腹膜と脂肪由来幹細胞(ASC)からハイブリッド細胞シートを作製し、操作性の良い細胞シートによる新規再生医療的消化管吻合部の補強治療の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ハイブリッド細胞シートの作製

脂肪由来幹細胞(Adipose-derived mesenchymal stem cell: ASC)シートの作製

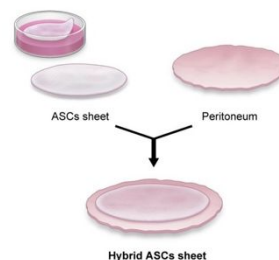
SD-Tg ラットは2.5-4.0%のイソフルランで吸入麻酔した。腹部を滅菌した後、両側の鼠径部から皮下脂肪組織を外科的に摘出した。摘出した組織は10mLのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、20mLのPBS中で小片にミンチした。ミンチした組織を0.1%タイプ2コラゲナーゼ(Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA)で37℃、2時間酵素消化し、130 rpmで振盪した。セルストレーナーで濾過し、4℃、2000 rpmで5分間遠心分離した後、ASCをペレットとして回収した。濾過と遠心分離の工程を2回繰り返した。ASCsを、10%牛胎児血清(FBS; Life Technologies, Frederick, MD, USA)および1%ペニシリン/ストレプトマイシン(富士フイルム和光純薬株式会社)を含む完全培養液(日本、大阪)で100mmディッシュに $1 \times 10^5$ 細胞/ディッシュの密度で播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養した。

ASCsは7日間培養し、翌日に最初の培地交換を行い、以後3日ごとに培地交換を行った。ASCsはPBSで2回洗浄後、0.25% (w/v) トリプシンおよび0.1% (w/v) エチレンジアミン四酢酸(Sigma Aldrich)で37℃、3分処理した。解離したASCsは、10% FBS/DMEMで回収した。4℃、2000rpm、5分間遠心分離した。得られたペレットを10% FBS/DMEMで再懸濁した。全細胞をカウントした後、 $1 \times 10^5$ 個の細胞を100mmディッシュに播種した。ASCsも同様に2回継代した。

継代3では、直径35 mmの温度応答性ディッシュ(UpCell; CellSeed)に $1 \times 10^6$  cells/dishの密度でASCを播種し、完全培地で37℃、5% CO<sub>2</sub>で培養を行った。培地を16.4 mg/mL アスコルビン酸(和光純薬工業)添加の完全培地に交換し、24時間ごとに交換し、細胞が90%コンフルエントになるまでさらに2-3日間培養した。移植後の細胞の増殖能を維持するため、100%コンフルエントにならないようにした。20℃まで30分かけて温度を下げ、ディッシュからASCシートを採取した。ASCsシートは、化学的処理をせずに剥離した。

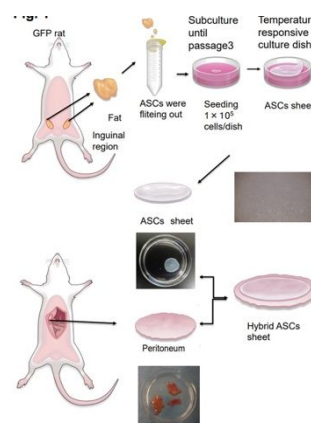
## ハイブリッド細胞シート (Hybrid adipose-derived stem cell: HASC (ASCシート+腹膜) の作製)

SD ラットは 2.0-4.0% のイソフルランで麻酔をかけた。麻酔後、SD ラットは開腹し、腹壁から腹膜を摘出した。腹膜は、直径 30~35mm の円形に切り取った。ラットの腹腔内から採取した腹膜を温度応答性培養皿で培養した ASC シートと積層し、操作性のよい細胞シートを作製した。(右図)。



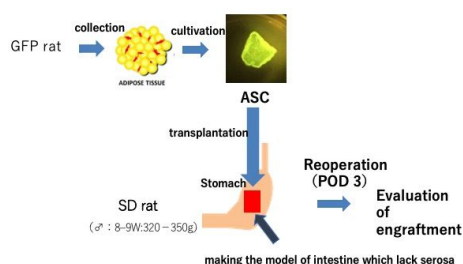
### 実験 A

SD ラットの広背筋への ASC シートおよび Hybrid ASC シートの移植を評価するための実験デザインおよび手順を Fig.1 および Fig.2 提示する。移植の約 2-3 週間前に、吸入麻酔下で SD-Tg ラットの鼠径部より採取した皮下脂肪から ASC を分離した。ASC は継代 3 まで培養した後、35mm 温度応答性ディッシュ (株式会社セルシード、東京、日本) に  $1 \times 10^6$  細胞/ディッシュの密度で播種した。80%コンフルエントになった時点で、20℃まで 30 分間減温し、ディッシュから ASC シートを採取した。こうして得られた ASC シートを、SD ラットの腹壁から抽出した腹膜と積層し、HASC シートを形成した。ASC シート、HASC シート、腹膜を SD ラットの背中の筋肉体に十字切開後移植し、術後 3 日目と 7 日目に肉眼と病理組織学的な評価を行った。



### 実験 B

下部直腸と同じように漿膜を欠いた胃のモデルを作成した。腸のモデルとして胃を選択した。胃の漿膜の下に生理食塩水を注入し、漿膜の処理と切り取りが容易になるようにした。緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を持つラットの脂肪細胞を採取し、予め ASC を作製した。SD ラットに外科的処置で漿膜を除去した胃に ASC を移植し、移植した ASC を SD ラットの腹膜で覆った。術後 3 日目の蛍光の有無を評価した。



(2) Conventional な腹腔鏡下手術によるハイブリッド細胞シート移植手技の Feasibility study

(3) ロボット支援下手術によるハイブリッド細胞シート移植手技の Feasibility study

## 4. 研究成果

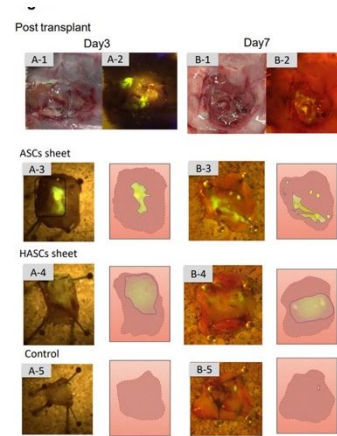
コロナ禍の影響で大動物の使用や実験に複数の人員を要する実験が困難なため、サロゲートとしてラットを用いた小動物で本格的に実験を進めた。SD ラットで ASC シートとハイブリッド細胞シートを安定して作製することができるようになった。ラット皮下脂肪から ASC シートを作製し、ラット背部骨格筋の表面 (直腸筋層のモデル) に移植した群とハイブリッド細胞シートを移植した群を組織学的に比較した (実験 A)。また、小動物へ変更するにあたり、消化管モデルとして胃壁を用いた実験をおこなった。ラットの胃の漿膜を外科的に除去した部位に ASC シートとハイブリッド細胞シートを移植し、組織学的に比較をした (実験 B)。

(3) ロボット支援下手術によるハイブリッド細胞シート移植手技の Feasibility Study: ロボット手術のインストゥルメントを準備していたが、(2)と同様にコロナ禍の影響で大動物実験が困難で小動物用いた実験に変更した。

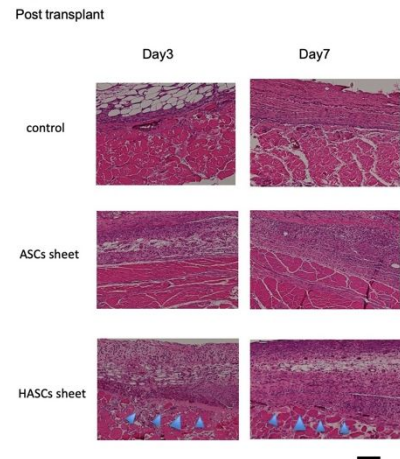
(1) ハイブリッド細胞シートの作製

実験 A

GFP ラットから皮下脂肪を採取し ASC シートを作製した。直腸筋層の代用（漿膜の無い状態）として SD ラット背部骨格筋の筋膜を除去し筋体を露出させた。ASC シート単独群、ASC シート+腹膜（ハイブリッドシート）群、コントロール群とし、それぞれ WT ラットの背部骨格筋体に移植を行った。移植後 3 日目と 7 日目犠死させ、組織を採取した。ASC シート+腹膜（ハイブリッドシート）群では、ASDC 細胞シート単独群と比較して安定した移植が可能であったことを確認した。採取した組織をマクロ・ミクロで検討し HE および免疫染色(Calretinin)で生着を確認した。移植後 3 日目と 7 日目に、紫外線下で移植部位を観察した。移植後 3 日目と 7 日目に採取した標本の画像をそれぞれ A、B と表記した。A-1 と B-1 は肉眼で見た部位である。A-3、B-3 は脂肪由来幹細胞（ASC）シート、A-4、B-4 はハイブリッド脂肪由来幹細胞（HASC）シート、A-5、B-5 はコントロール群である。



病理組織学的所見では、脂肪由来幹細胞（ASC）シート、ハイブリッド脂肪由来幹細胞（HASC）シート、腹膜の 3 群は、ヘマトキシリン・エオジン染色で異なる染色を示した。ASC シートは移植後 3 日目と 7 日目に移植部位から採取した標本で収縮していることが確認された。一方、HASC シートは広範に広がっていた。



移植後 3 日目（表 1）と 7 日目（表 2）に、ASC シート単体と HASC シートがどの程度広がっているかを比較した。直径 30mm 程度の細胞シートが 10mm 以下に縮んでいたり、移植部位に存在していなかったりするグループと、それ以上の直径に広がっている細胞シートのグループを比較した。比較は、水平方向と垂直方向の直径が短い方を基準とした。比較はカイ二乗検定を用い、 $P < 0.01$  を統計的に有意とした。

Table.1

Post transplant day3	Diameter 1cm> or dismiss	Diameter 1cm<	Total
ASCs sheet	8	2	10
HASCs sheet	0	10	10
	8	12	20

P-value <0.01

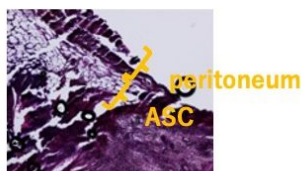
Table.2

Post transplant day7	Diameter 1cm> or dismiss	Diameter 1cm<	Total
ASCs sheet	9	1	10
HASCs sheet	1	9	10
Total	10	10	20

P-value <0.01

実験 B

6 匹の SD ラットに ASC シートを移植した。4 匹の SD ラットは HASC シート、残りの 2 匹は ASC シート単独で移植した。ASC シート単独で移植した 1 匹を除くすべての SD ラットは、蛍光を示した。漿膜のない胃に ASC シートを生着させることに成功した。



	transplanted substance	Fluorescence of ASC	HE stain evaluation
①	ASC combined with peritoneum	positive	peritoneum : existed ASC : existed
②	ASC combined with peritoneum	positive	peritoneum : existed ASC : existed
③	ASC combined with peritoneum	positive	peritoneum : existed ASC : existed
④	ASC combined with peritoneum	positive	peritoneum : existed ASC : existed
⑤	single ASC	positive	ASC : not detected
⑥	single ASC	(no ASC)	(not performed)

Table. 1.

実験 A、実験 B より ASC シートと自己腹膜からなる HASC シートは、操作が容易であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohki Takeshi, Yamamoto Masakazu	4. 巻 13
2. 論文標題 Esophageal regenerative therapy using cell sheet technology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 8~17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2020.04.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawai Yosuke, Takagi Ryo, Ohki Takeshi, Yamamoto Masakazu, Yamato Masayuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Evaluation of human keratinocyte sheets transplanted onto porcine excised esophagus after submucosal dissection in an ex vivo model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 323~331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2020.11.004	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 大木岳志	4. 巻 72
2. 論文標題 食道粘膜上皮の再生	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本気管食道科学会会報	6. 最初と最後の頁 281-287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2468/jbes.72.281	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 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大平慧, 大木岳志, 井上雄志, 小川真平, 番場嘉子, 松尾夏来, 腰野蔵人, 中川了輔, 谷公孝, 前田文, 板橋道朗, 山本雅一, 栗山朋子, 大和雅之
2. 発表標題 直腸縫合不全予防を目指したハイブリッド細胞シートの基礎研究 ~平滑筋への応用~
3. 学会等名 第1回細胞シート工学イノベーションフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾夏来, 大木岳志, 青山翔太, 大平慧, 栗山朋子, 大和雅之, 山本雅一
2. 発表標題 ハイブリッド脂肪由来幹細胞シート移植についての基礎研究
3. 学会等名 第1回細胞シート工学イノベーションフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsuo Natsuki
2. 発表標題 Basic Reach oh Hybrid Adipose-derived Stem Cell Sheet for Prevention of Rectal Anastomosis Leakage
3. 学会等名 第5回 国際組織工学・再生医療学会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松尾夏来
2. 発表標題 直腸癌縫合不全予防を目的としたハイブリッド脂肪由来幹細胞シートの基礎研究
3. 学会等名 第119回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大木岳志
2. 発表標題 細胞シートによる食道再生医療
3. 学会等名 第72 回日本気管食道科学会総会ならびに学術講演会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大木岳志、大和雅之、高木亮、村上大輔、近藤誠、葛西善行、金井信雄、清水達也、岡野光夫、山本雅一
2. 発表標題 細胞シートを用いた食道再生医療
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 宮澤 光男、大西 俊介（分担：大木岳志）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 176
3. 書名 安全に施行するためのESDテクニック[Web動画付]	

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 創傷被覆用シート、及び創傷被覆方法	発明者 大木岳志 et al.	権利者 東京女子医科大学・株式会社セルシード
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-134322	出願年 2020年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 創傷被覆用シート、及び創傷被覆方法	発明者 大木岳志 et al.	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、109126261	出願年 2020年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 創傷被覆用シート、及び創傷被覆方法	発明者 大木岳志 et al.	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、16/983,232	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------