

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16507

研究課題名（和文）間葉系幹細胞を用いた腸管虚血再灌流障害の新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of treatment method for intestinal ischemia-reperfusion injury using mesenchymal stem cells.

研究代表者

柄澤 智史（Karasawa, Satoshi）

千葉大学・医学部附属病院・その他（医員）

研究者番号：20646393

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Sprague-Dawleyラットを用いたモデル作成の確立を行なった。実験系の確立のためには1. 手技時間中の気道確保のための気管挿管手技 2. 開腹、上腸間膜動脈同定、Clump、閉腹などの外科手技 3. 手技終了後7日目までの安定した生存 これらをクリアする必要があり時間を要したが確立することができた。

しかし実験系の次の段階である間葉系幹細胞の採取・培養の手技の確立に難渋し時間を要している。現段階で間葉系幹細胞投与の有効性を検証できる段階に至っておらず、手技のさらなる安定化が必要である。モデルの作成は安定しており、必要な手技の確立は済んでいるため、今後実験数を増やして検討を重ねていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はこれまでのような酸化ストレスの軽減を目的としていたこれまでの研究と異なり、腸管再生まで期待できる治療法という点で効果が証明されれば学術的意義がある。

MSCはヒトにおいても採取・培養方法が確立されており、動物モデルで効果を認めた場合にはヒトへの応用が可能であり、他の虚血再灌流が絡む疾患（心筋梗塞など）への応用も期待できるため、今後も実験を進めていく。

研究成果の概要（英文）：I established the model of intestinal ischemia-reperfusion injury using Sprague-Dawley (SD) rats. (1) Tracheal intubation technique to secure the airway during the procedure (2) Surgical technique such as laparotomy, superior mesenteric artery identification, Clump, (3) Stable survival up to 7 days after the procedure. It took time, but I succeeded in these procedures.

However, it is difficult and time-consuming to establish the procedure for collecting and culturing mesenchymal stem cells. Now, the efficacy of mesenchymal stem cell administration has not been verified yet, and further stabilization of the procedure is needed.

研究分野：救急集中治療医学

キーワード：虚血再灌流障害 急性腸間膜虚血

## 1. 研究開始当初の背景

急性腸間膜虚血の治療法の礎は再灌流を速やかに行うことである。しかし、再灌流した際には、ミトコンドリアから活性酸素類(Reactive Oxygen Species, ROS)が放出され、虚血再灌流障害と呼ばれる重篤な障害が引き起こされることが知られている。虚血再灌流障害に対して各種治療が試みられているが、有効な治療法が確立されているとは言い難い。

近年、細胞生物学の進歩とともに、様々な細胞の起源である幹細胞が発見され、幹細胞を用いた再生医療に注目が集まっている。間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell, MSC)は皮下脂肪や骨髄から比較的簡便に採取でき、培養の方法が確立された幹細胞であり、胚葉間を越えて様々な細胞への分化が可能である。また、自家移植も可能で免疫拒絶反応がないことなどからヒトへの臨床応用も期待できる。MSCの投与にはMSCの多分化能による障害組織の再生効果の他、液性因子による免疫調節効果、抗炎症作用、血管新生作用などの効果が報告されている。また、MSCは経静脈的あるいは腸管内に投与することで腸管にも広く分布し、腸炎動物モデルなどにおいて障害された腸管組織の再生にも効果を示すことが報告されており、腸管虚血再灌流障害においても応用できる可能性が高い。これらの背景より、研究申請者はMSCの投与が腸管虚血再灌流障害を制御し、組織の再生を促すことができると仮説を立て、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

腸管の虚血再灌流障害におけるMSCの投与が果たす効果とその機序を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### ・ MSCの準備

Sprague-Dawley(SD)ラットの骨髄より抽出したMSCを使用する。

### ・ 腸管虚血再灌流モデルラットの作成

SDラット 8-10週齢雌を用いる。イソフルレンを用いて全身麻酔し、開腹後上腸間膜動脈を同定後ブルドック鉗子を用いてclumpする。45分後にclumpを解除する。

### ・ MSCの投与効果の検証

- ・ MSC投与群：腸管虚血再灌流モデル作成後、尾静脈よりMSCを $1.0 \times 10^6$ 個投与する。
- ・ sham群：腸管虚血再灌流モデル作成後、尾静脈より1ml生理食塩水を投与する。

この2群間で以下の2項目についての結果を比較する。

#### 炎症性 biomarker 及び酸化ストレス marker 測定

モデル作成後 2h, 6h の異なる time point において採血を行う。採血項目は Interleukin-6、Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  などの炎症性 biomarker 及び SOD 活性 (Superoxide dismutase activity) などの再灌流障害の程度を示す酸化ストレス marker とする。

#### 組織学的評価

7 日後、イソフルレンにて全身麻酔を行い、開腹後回腸末端から 2cm 程度の腸管を切除し採取する。組織切片を固定後、H.E. 染色での観察の他、腸管平滑筋の再生を観察するため - smooth muscle actin に対する免疫染色や、MSC の確認のため GFP に対しても免疫染色を行い評価する。

#### 4. 研究成果

Sprague-Dawley (SD) ラットを用いたモデル作成の確立を行なった。実験系の確立のためには 1. 手技時間中の気道確保のための気管挿管手技 2. 開腹、上腸間膜動脈同定、Clump、閉腹などの外科手技 3. 手技終了後 7 日目までの安定した生存 これらをクリアする必要がある。時間を要したがこれらの確立をすることができた。

しかしながら実験系の次の段階である間葉系幹細胞の採取・培養の手技の確立に難渋し、時間を要している。現段階で間葉系幹細胞投与の有効性を検証できる段階に至っておらず、手技のさらなる安定化が必要である。モデルの作成は安定しており、必要な手技の確立は済んでいるため、今後実験数を増やして検討を重ねていく。

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〕

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