

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02989

研究課題名（和文）ES細胞由来小腸オルガノイドを用いた再生医療による短腸症候群の革新的治療

研究課題名（英文）Innovative Treatment of Short Bowel Syndrome by Regenerative Medicine Using ES Cell-Derived Small Intestinal Organoids

研究代表者

江口 晋（Eguchi, Susumu）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・教授

研究者番号：80404218

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：ES細胞由来小腸組織（ミニ腸）を利用した短腸疾患治療技術を確立するために、まずミニ腸を加工した細胞組織を免疫不全マウスへ移植し生着したミニ腸の特性について評価した。移植したミニ腸の成熟化におけるホスト由来血流の影響を評価するために、大網部へミニ腸を移植すると移植2日目には移植下層部にヒト間葉陽性が一定の厚みを持った組織を構築しその上にヒト上皮陽性が組織化された。またミニ腸由来組織内部には微量ながらマウス由来の血管組織が浸潤する様子が確認できたものの、粘膜突起の成熟にまでは至らなかった。また短腸モデルマウスにおいては皮下に温生食を一定量投与による生存率が向上する作製法を確立させた段階である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

短腸症候群はクローン病や腸間膜梗塞などの治療のために実施する小腸の広範切除に起因し残存小腸の長さおよび機能に依存することが知られ、有効な治療法の一つとして小腸移植が期待されている。しかし小腸移植は拒絶等が起こりやすく十分な治療効果ができていないため、生体外で作製した小腸組織を移植させる再生医療研究が着目されている。本研究では生育センターより提供されたES細胞由来小腸組織（ミニ腸）を用いた短腸症候群治療に向けた治療法の確立を試みた。移植したミニ腸由来組織において小腸様構造の形成を確認しており、移植部位並びに移植法を確立することで新たな治療法の確立ができるのではないかと期待している。

研究成果の概要（英文）：To establish a technology for the treatment of short intestinal disease using ES cell-derived small intestinal tissue (mini-intestine), we first transplanted engrafted mini-intestine into immunodeficient mice and evaluated the characteristics them. To evaluate the effect of host-derived blood flow on the maturation of the transplanted mini-intestine, when the mini-intestine was transplanted into the large net, human mesenchymal-positive tissue with a certain thickness was constructed in the lower layer of the transplantation on the second day, and human epithelial-positive tissue was organized on top of it. Although a small amount of mouse-derived vascular tissue was observed infiltrating the mini-intestine-derived tissue, it did not reach the maturation of the mucous membrane process. In the short intestine model mice, we are in the process of establishing a method to improve the survival rate by subcutaneously administering a certain amount of warmed saline solution.

研究分野：消化器外科学

キーワード：細胞シート化 ミニ腸移植 短腸症候群 ES細胞 小腸化大腸

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

短腸症候群はクローン病や腸間膜梗塞などの治療のために実施する小腸の広範切除に起因している。生じる症状は残存小腸の長さおよび機能に依存し、脂肪、脂溶性ビタミン、およびビタミンB12などの栄養欠乏、免疫機能の著しい低下が生じる。さらに、回腸末端および回盲弁の切除は、腸内細菌異常増殖の素因となる可能性がある。このように小腸の広範切除で様々な副作用を引き起こしやすいため、予後改善治療の確立が必要である。現状の予後改善治療としては生涯にわたった中心静脈栄養(TPN)による処置、水分/電解質(カルシウムおよびマグネシウムなど)の集中モニタリング等が必要であり、長期TPNの対象ではない患者に適応が認められない場合、小腸移植が推奨される。しかし小腸移植は5割程度という低い5年生存率により、近年では生体外で作製した小腸組織を移植させる再生医療研究が着目されている。また、小腸組織自体は内胚葉由来の腸管上皮細胞、中胚葉由来の平滑筋細胞、外胚葉由来の腸管壁内神経叢、さらには血管によって構築される複雑な組織体であるため、十分な栄養吸収能を持たせることが困難といった多くの問題を抱えている。加えて、小腸はリンパ組織が多く拒絶作用が起こりやすく、一定期間の拒絶反応による機能不全が起こりやすいため人工肛門を作製し数年の検査による安定性の確認を行わなければならない。そのため長期的治療期間が必要であり、患者への負担が大きいことが懸念されている短腸症候群においては「小腸のような栄養吸収能を持たせる」、「腸内細菌の異常増殖を抑制させる」ことが重要である。つまり、失われた大量小腸を新しい細胞、組織にも再生し、機能を回復させ、日常生活に復させることができるのかという学問的問いが存在する。

2. 研究の目的

本研究は短腸症候群に対してES細胞を用いた細胞シート移植を行い失われた小腸機能を補うことで、安全かつ短期間で短腸症候群の予後改善ができるのではないかと発想した。これまで行われてきた治療法として大腸間置(大腸の一部を摘出し小腸の代わりを担わせる治療法)あるいは腸管延長術などが挙げられるが小腸として十分な吸収能を担わせることができていない。また切除/吻合箇所が多いため、「腸内細菌の異常増殖」による免疫反応を誘導させる可能性がある。さらに小腸移植術も行われるが、生存率が低いことから普及には至っていない。そこで本研究では小腸組織の移植による大腸の小腸化に着目した。小腸組織を構成する腸管上皮細胞はほかの消化器系の細胞(肝細胞や膵β細胞など)に比べ、生体からの細胞分離並びに細胞培養技術が十分に確立できておらず十分な細胞源を確保できていなかったが、近年、再生医療や創薬研究、バイオ人工臓器等に利用されているES/iPS細胞で腸管上皮細胞を含む多くの消化器系細胞への分化誘導技術が確立され、iPS細胞を分化誘導させながら臓器の元となる組織体を生体外で構築する培養技術が確立されている(T, Takebe. et al. Nature, 2013.; H, Koike. et al. Nature, 2019. 他)。しかし小腸オルガノイドをそのまま再生医療に用いる場合、目的部位に細胞を定着させることが困難であるという問題があった。一方、本研究の研究協力者である国立成育医療研究センターの梅澤教授らは安定的にES細胞から腸オルガノイド(小腸細胞組織)作製に成功(H, Uchida. et al. JCI Insight, 2017.)し、細胞シートの形態での提供を可能とした。そこで本研究ではES細胞から作製された腸オルガノイドという複雑な組織体をシート状組織(ES cell-derived Organoids Sheet: ESOS)に加工し大腸へ移植することで大腸の小腸化を図り、短腸症候群による低栄養患者のQOLの改善を目指す。本研究の独自性としてはES細胞由来腸オルガノイドから作製したシートの移植による小腸化大腸の構築といったこれまでにない世界初の治療技術の確立させる点である。

3. 研究の方法

既報の分化誘導法に則ってES細胞よりミニ腸を国立成育医療研究センターにて作製し、室温下で長崎大学へ輸送した。輸送したミニ腸はCO₂インキュベータ内で数日培養を行った後にES細胞由来ミニ腸をメス等で切断しピンセットにて広げESOSを作製した。作製したESOSは免疫不全マウスの大網ならびに小腸粘膜へ移植を行った。また移植モデルである短腸症候群モデルの作製においては免疫不全マウスを開腹後、小腸を摘出・腸管吻合を実施し生存率等を評価した。

4. 研究成果

(1) ESOSの製造ならびに移植

ミニ腸は図1aのように室温下で輸送され、到着後CO₂インキュベータ内で培養を行った。ミニ腸は到着1週間において死細胞は確認されなかったものの、2週間以降では内部にて細胞死が確認されたため1週間以内にて移植実験等に利用することとした。またESOSへと加工したミニ腸の構造解析を行った結果、上皮細胞(CK19)と間質細胞(Vimentin)がセパレートされた構造をしてしていた(図1b)。つまり分化誘導にて作製したミニ腸は小腸様の構造を維持しており細

胞シート化によって2層構造体を構築することが示唆された。

そこで免疫不全マウスの盲腸粘膜を EDTA にて剥離させ ESOS の移植を行った結果、移植2日目には ESOS 由来の組織が確認でき、その組織内部において腸粘膜系上皮細胞であるヒト Pan-cytokeratin が粘膜側にて確認された。また粘膜下層部においてはミニ腸由来の間質細胞であるヒト Vimentin が高い細胞増殖性を示したものの、

1週間以降にはミニ腸由来細胞が確認できず十分な細胞生着ができなかった(図2a)。小腸粘膜はターンオーバー傘幹細胞領域であるため、既報の幹細胞移植とは異なり細胞増殖性が低い成熟化した粘膜上皮細胞では長期的な細胞生着が促せなかったことが考えられる。次に成熟細胞の高い細胞増殖性を促すために血流が豊富な移植部位である大網部へミニ腸のまま移植させ、細胞生着性ならびに生着後の構造を評価すると、ミニ腸は大網部ならびに肝臓部に生着(あるいは癒着)し1週間以上の細胞生着を確認した。生着した構造を免疫染色にて確認すると、ミニ腸のような球状組織の外側にCK19ならびにCK20陽性の上皮細胞が粘膜のような構造を構築しヒト vimentin 陽性の間質細胞ならびに微量なマウス CD31 陽性の血管内皮細胞が存在していた。つまり血流が豊富な移植環境下では高い細胞生着性を促すとともに、腸管組織の高次元化を促すことが示唆された。

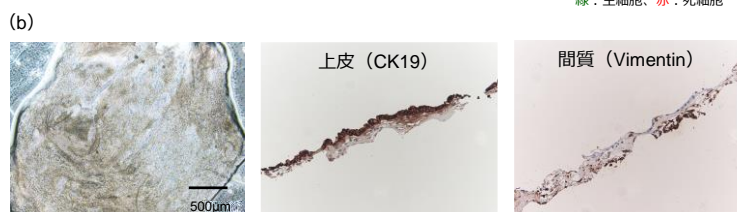
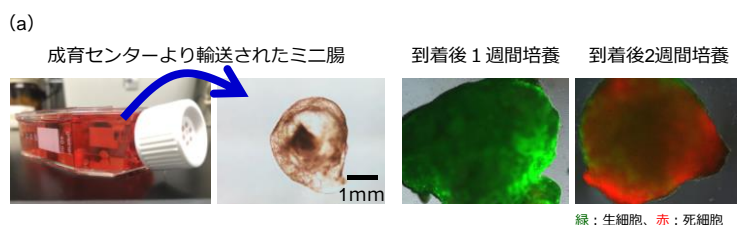


図1. 輸送されたミニ腸の生存性 (a) と ESOS の構造 (b)

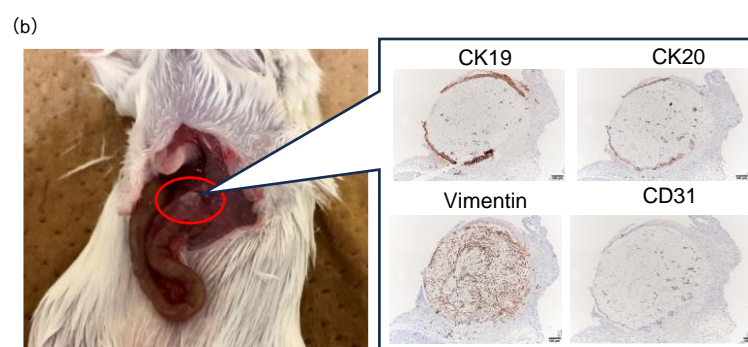
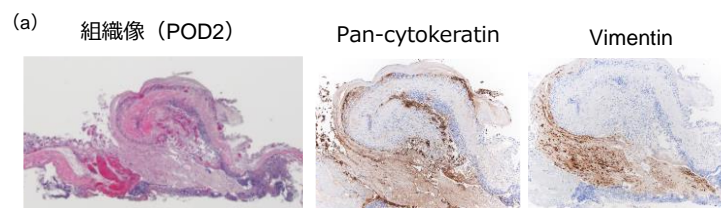


図2. ESOS ならびにミニ腸移植。(a) ESOS の盲腸粘膜部への移植、(b) ミニ腸の大網移植と POD7 における免疫染色画像。

(2) 短腸症候群モデルの評価

免疫不全マウスを開腹させたのちに小腸全体の60%に相当量を摘出・腸管吻合させた。閉腹時に温生食水の皮下注射の有無によるマウスの生存性を比較した結果、温生食水を投与した群は非投与群に比べ高い生存を確認した(図3)。モデル作成においては出血等による脱水ならびに低体温などの初期症状によって生存性を劇的に低下する可能性があるが、温生食水によって緩和されたものの、それ以降においては吸収能の低下によって生存率が著しく低下した。今後はこのモデルに対して ESOS あるいはミニ腸移植を行い生存率の変化について評価を行う予定である。



図3. 短腸モデルの作製における温生食水の影響。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松島 肇, 中川美和, 藤木真人, 江口 晋, 橋本宏治
2. 発表標題 小腸移植後早期においてPD-L1発現がグラフトに及ぼす影響
3. 学会等名 第121回日本外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔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
研究分担者	梅澤 明弘 (Umezawa Akihiro) (70213486)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・再生医療センター・再生医療センター長 (82612)	

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