

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 20 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591496

研究課題名（和文）：羊膜と羊膜幹細胞を用いた消化・吸収能且つ蠕動能を持つ全周性腸管の再生

研究課題名（英文）：Regeneration of small intestine with ability of absorption and peristalsis using amniotic membrane and amniotic stem cells

研究代表者：

辻本洋行（TSUJIMOTO HIROYUKI）

同志社大学・研究開発推進機構・研究員

研究者番号：20521272

研究成果の概要（和文）：

消化・吸収能を持ち且つ蠕動能を持つ全周性腸管の再生を最も困難にしている腸管上皮組織の再生の問題を克服するため、我々は優れた組織・細胞再生誘導能力や多分化能を持つ羊膜や羊膜幹細胞を用いることにより検討を行った。培養実験において、羊膜上培養や羊膜幹細胞等との共培養により、腸上皮細胞の増殖分化が誘導促進された。しかしながら、動物モデル（ラット）を用いた腸管の再生実験において、平滑筋組織様組織の再生は認められたが、腸上皮組織の再生は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

To overcome the difficulty of regeneration of intestinal epithelial tissues which is the most serious problems for regeneration of fully circular walled intestine with digestion, absorption and peristalsis, we utilized amniotic membrane and amniotic stem cells, which have excellent ability to induce cell and tissue regeneration or pluripotency to differentiate. In the *in vitro* analysis, the culture on amniotic membrane or co-culture with amniotic stem cells induced the growth and differentiation of the intestinal epithelial cells. However, in the *in vivo* experiment to reconstruct the intestine using animal models, the intestinal epithelial tissues were not regenerated although the smooth muscle-like tissues were recognized.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学（細目番号：7302）

キーワード：(1) 小腸大腸肛門外科学 (2) 再生医学 (3) 消化管再生 (4) 羊膜 (5) 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

食物の消化・吸収と消化内容物の運搬機能を持つ全周性腸管の再生は、未だ不可能である。その理由は、(1) 腸上皮の組織再生が困難 (2) 再生した腸管の癒痕化 (3) 腸管平滑筋

再生の不良、に要約される。応募者らは、これまでの科学研究費助成研究で、上記(2)(3)を克服し消化・吸収を行う腸管ではないが蠕動能を持ち癒痕狭窄が無い全周性食道の再生に成功した。

しかし消化・吸収能を持つ全周性腸管の再生を困難にしている最大の問題点は、(1)の腸管上皮の再生が困難なことである。本問題を克服し前述のような腸管の再生を行うためには、これまでの方法に加え、何らかの新しい技術的な工夫が必要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究を発展させ、消化・吸収能を持ち且つ蠕動能を持つ全周性腸管の再生を困難にしている最大の問題である(1)の腸管上皮の再生について取り組む。特に、我々は優れた組織・細胞再生誘導能力や多分化能を持つ羊膜および羊膜幹細胞を用いることにより、腸管上皮の再生の可否について、培養上における検討や動物モデル(ラット)における腸管作製の実験を行うことにより、より困難で未だ成功報告のない消化・吸収能腸管の再生を行うことを目標とする。

3. 研究の方法

I. *in vitro* 実験

1) 単離腸上皮細胞の羊膜・コラーゲンゲル上培養

まず新生児ラット(哺乳ラット、F344、3W雄)の小腸管から腸上皮細胞をEDTA法(Evans法)にて単離する①。それを予め脱上皮細胞処理を行ったヒト羊膜(出産時に無菌的に詐取、NPO法人「再生医療支援機構」より入手)上、もしくはコラーゲンゲル(新田ゼラチン、Cell Matrix Type I)上にて培養(D-MEM培地、10%FBS含)を行い、1, 2, 3週間後その状態を病理組織学的に観察した。

2) 単離腸上皮細胞の共培養

新生児ラット(哺乳ラット、F344雄、3W)の小腸管から腸上皮下筋線維芽細胞②をFuruya法に準じ組織片培養法にて単離する。

また妊娠ラット(F344、14日目)から羊膜を採取し、collagenase法にて羊膜上皮幹細胞を、さらにその残った組織片培養から羊膜間葉系幹細胞③を単離した。

ヒト羊膜上、あるいはコラーゲンゲル内にて上記細胞②および③をそれぞれ培養し、1週間後その上に1)の方法に単離した腸上皮細胞を重層し、1, 2, 3週間後その状態を病理組織学的に観察した。

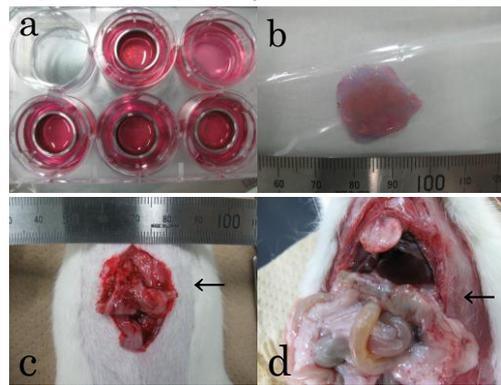
3) 株化腸上皮細胞の羊膜上・コラーゲンゲル培養および共培養

株化されたラット腸上皮細胞(IEC-6)を、1)と同様に羊膜上およびコラーゲンゲル上にて培養し、1, 2, 3週間後その状態を観察。さらに2)と同様に羊膜上やコラーゲンゲル内にて細胞②③をそれぞれ培養、1週間後その上にIEC-6細胞を重層し、1, 2, 3週間後その状態を観察した。

II. *in vivo* 実験

I-1)にて単離した腸上皮細胞①を羊膜上にて1週間培養する。さらにI-2)にて採取した細胞②および③を羊膜上にて1週間培養後、腸上皮細胞①を重層し、さらに1週間培養を行った。また対象として1週間培養液内でincubateした羊膜を用いた。

以上の方法にて作製した羊膜シート(写真a)を、Poly-glycolic acid(PGA)不織布に新生児ラット(F344、3W)から採取しminceした胃平滑筋組織を載せた上に重ねて複合細胞シート(写真b)を作製。これをシリコンチューブに巻きロール上にし、麻酔下に成人ラット(F344、7W雌)を開腹し、大網内に包埋(吸収糸にて2針固定、写真c)した。5週間後、再開腹し(写真d)作製された人工腸管を取り出し、その組織再生について病理組織学的に評価した。

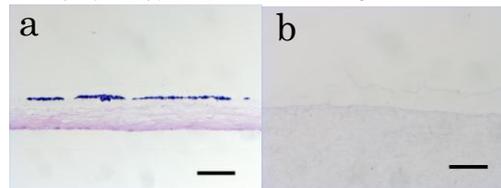


4. 研究成果

I. *in vitro* 実験

1) 単離腸上皮細胞の羊膜上・コラーゲンゲル培養

単離腸上皮細胞は、羊膜上における1週後の観察において、単層の上皮組織として認められ、一部に細胞の立方化や重層化も認められた(写真a)。しかしながら、2, 3週目の観察においては細胞は消失していた。一方、コラーゲンゲル上において腸上皮細胞は、1, 2, 3週目の何れの観察でも確認出来なかった(写真b)。単離腸上皮細胞は、コラーゲンゲル上では培養出来ないが、羊膜上であれば1週間程度培養が可能であり、また一部に細胞分化も伴うと考えられた。

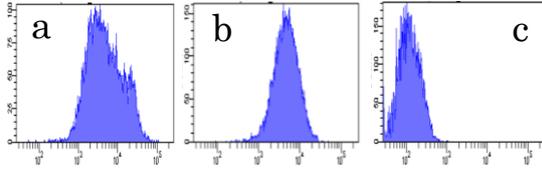


2) 単離腸上皮細胞の共培養

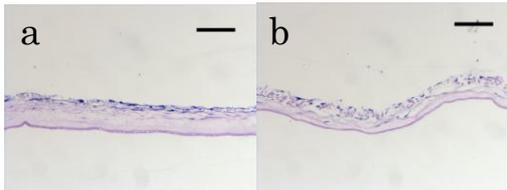
単離培養された筋上皮細胞は免疫染色にて・SMA(+), S100(-), vimentin(+), cytokeratin (-)であった。

単離培養された羊膜幹細胞の内、羊膜上皮

幹細胞は数代迄しか培養できず、一方羊膜間葉系幹細胞は20代以上培養が可能であり、以降、羊膜間葉系幹細胞を羊膜幹細胞として実験を行った。フローサイトメトリーの解析にて同細胞はCD11b(-)、CD29(+) (図 a)、CD31(-)、CD44(+) (図 b)、CD45(-) (図 c)、CD90(-)であった。

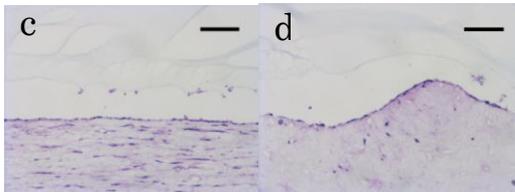


単離腸上皮細胞は羊膜上における腸上皮筋線維芽細胞と羊膜間幹細胞との共培養において、1週目の観察ではそれらの細胞層の上に一層の扁平な細胞層として認められた (写真 a, b)。しかし2,3週目の観察においては、上皮細胞は脱落していた。



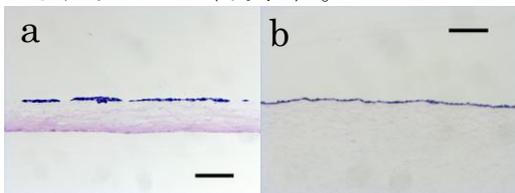
一方、単離腸上皮細胞はコラーゲンゲルにおいて腸上皮筋線維芽細胞と羊膜間幹細胞と共培養した場合、1週目の観察においてコラーゲンゲルの上に一層の扁平な細胞層として認められた (写真 c, d)。しかし2,3週目の観察にて、上皮細胞は脱落していた。

以上より単離腸上皮細胞は、腸上皮筋線維芽細胞や羊膜間幹細胞と共培養した場合、羊膜上のみならずコラーゲンゲル上でも1週間程度培養が可能と考えられた。

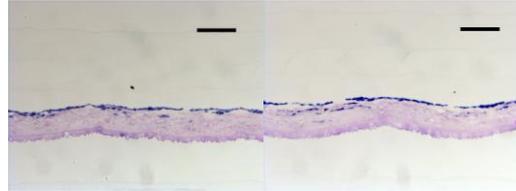


3) 株化腸上皮細胞の羊膜上・コラーゲンゲル培養および共培養

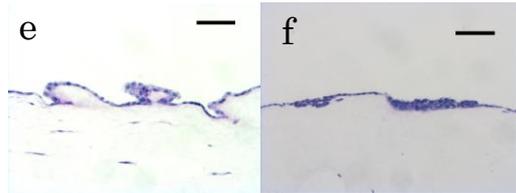
株化腸上皮 IEC-6 細胞は羊膜上にて1-3週目において、単層の上皮組織として認められ、一部に細胞の立方化や重層化を認めた (写真 a)。一方、コラーゲンゲル上においては IEC-6 細胞は、1-3週目の観察において単層の上皮組織のみとして認められ、重層化や立方化は認められなかった (写真 b)。



また株化腸上皮 IEC-6 細胞は羊膜上において腸上皮筋線維芽細胞や羊膜間幹細胞と共培養した場合、1-3週目の観察においてそれらの細胞層の上に一層の扁平な細胞層として認められ、一部に重層化や立方化も認められた (写真 c, d)。



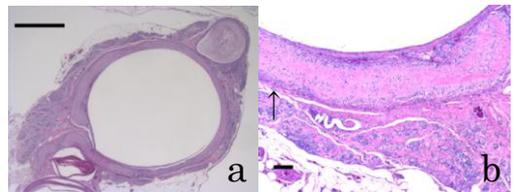
さらに IEC-6 細胞はコラーゲンゲルにて腸上皮筋線維芽細胞や羊膜間幹細胞と共培養した場合、1-3週目の観察においてコラーゲンゲルの上に一層の扁平な細胞層として認められ、一部に重層化や立方化が認められた (写真 e, f)。



以上より株化腸上皮細胞は、羊膜のみならずコラーゲンゲル上でも3週間以上単独で培養が可能であるが、特に羊膜上培養や腸上皮筋線維芽細胞や羊膜間幹細胞と共培養した場合、細胞の増殖だけでなく重層化や立方化等の細胞の分化も伴うと考えられた。

II. *in vivo* 実験

前述の単離腸上皮細胞を羊膜上で単培養もしくは腸上皮筋線維芽細胞や羊膜間幹細胞と共培養したものに、平滑筋細胞を加えラットの大網に包埋し、5週間後にその再生腸管の観察を行った。しかしいずれの場合も、一部に平滑筋様組織の再生を認めたが、腸上皮組織の再生は認められなかった。(写真 a, b)。さらに10週まで観察を行ったが、やはり腸上皮組織の再生は認められなかった。



以上の検討から次の事が考察された。

培養実験の結果より①羊膜の含有成分や構成成分は、腸上皮細胞の増殖や分化を誘導・促進すると考えられた。また②腸上皮筋線維芽細胞や羊膜幹細胞の分泌する液性成分も、腸上皮細胞の増殖や分化を促進すると考えられた。しかしながら、腸管再生実験において平滑筋様組織の再生は認められたが、腸上皮組織の再生は認められないことより、特に③生体内にて腸上皮組織の再生を伴っ

た消化吸収能且つ蠕動能を持つ全周性腸管を再生するためには更なる技術的な改良工夫が必要と思われた。

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 6 件)

① Hiroyuki Tsujimoto, Ayumi Tanzawa, Mari Matoba, Ayumi Hashimoto, Shuko Suzuki, Shinichiro Morita, Yoshito Ikada, Akeo Hagiwara. The anti-adhesive effect of thermally cross-linked gelatin film and its influence on the intestinal anastomosis in canine models. J Biomed Mater Res Part B, 査読有, 101B, 2013, 99-109

DOI: 10.1002/jbm.b.32821

② 萩原明郎, 辻本洋行, 阪倉長平, 中村達雄, 消化器系における神経再生: 神経再生を用いる直腸癌の新しい手術戦略, GI Research, 査読無, 20, 2012, 48-55

③ Chiko Yoshida, Ayumi Tanzawa, Atsushi Tamura, Junki Ikeda, Taichi Orikasa, Hideki Takamori, Shinichiro Morita, Hiroyuki Tsujimoto, Akeo Hagiwara. The biological properties of the alkali-treated collagen and gelatin -A preliminary study of their influence on cell growth when used as scaffolds-. 同志社大学理工学研究報告, 査読有, 53, 2012, 7-12

④ 丹澤あゆみ, 辻本洋行, 的場麻里, 橋本歩, 鈴木周子, 森田真一郎, 筏義人, 萩原明郎. 新規癒着防止材熱架橋ゼラチンフィルムの物理的・生物化学的特性-癒着防止効果の機序及び腸管吻合部への影響に対する基礎的検討, 同志社大学理工学研究報告, 査読有, 52, 2011, 149-155

⑤ Hiroyuki Tsujimoto, Tatsuo Nakamura, Tsuneharu Miki, Toshikazu Kubo, Eigo Otsuji, Hisakazu Yamagishi, Akeo Hagiwara. Regeneration and functional recovery of intrapelvic nerves removed during extensive surgery by a new artificial nerve conduit: A breakthrough to radical operation for locally advanced and recurrent rectal cancers. J Gastrointest Surg, 査読有, 15, 2011, 1035-1042

⑥ Tetsuji Yoshikawa, Shinichi Hamada, Eigo Otsuji, Hiroyuki Tsujimoto, Akeo Hagiwara. Endocrine differentiation of rat enterocytes in long-term three-dimensional co-culture with intestinal myofibroblasts. In Vitro Cell Dev Biol-

Animal, 査読有, 47, 2011, 707-715

[学会発表] (計 8 件)

① 辻本洋行, 丹澤あゆみ, 吉田千子, 筏義人, 萩原明郎, 他. 新規癒着防止材熱架橋 gelatin film の生物学的特性 -熱架橋度と癒着防止効果の関係について-. DDWJ. 2012.10.12 (神戸市)

② 辻本洋行, 丹澤あゆみ, 鈴木周子, 筏義人, 萩原明郎, 他. 再生の足場材料を用いた癒着防止材 -腹膜の再生と消化管吻合部への影響-. 日本消化器外科学会. 2012.7.19 (富山市)

③ 辻本洋行, 丹澤あゆみ, 吉田千子, 筏義人, 萩原明郎, 他. 再生の足場材料を用いた癒着防止材 -熱架橋 gelatin film による腹膜の再生と消化管吻合部への影響-. 日本再生医療学会. 2012.6.13 (横浜市)

④ 辻本洋行, 丹澤あゆみ, 橋本歩, 筏義人, 萩原明郎, 他. 架橋 gelatin film の癒着防止効果と消化管吻合部への影響 -その腹膜再生効果と物理的・生物学的特性について-. 日本外科学会. 2012.4.14 (千葉市)

⑤ 辻本洋行, 丹澤あゆみ, 橋本歩, 筏義人, 萩原明郎, 他. 架橋 gelatin film の癒着防止効果と消化管吻合部への影響 -その腹膜再生効果と物理的・生物学的特性について-. DDWJ 2011.10.23 (博多市)

⑥ 辻本洋行, 丹澤あゆみ, 橋本歩, 筏義人, 萩原明郎, 他. 熱架橋 gelatin film を用いた癒着防止と消化管吻合部への影響. 日本外科学会. 2011.4 (誌上開催)

⑦ 辻本洋行, 丹澤あゆみ, 橋本歩, 筏義人, 萩原明郎, 他. 熱架橋 gelatin film を用いた癒着防止と腹膜再生. 日本再生医療学会. 2011.3.2 (東京都)

⑧ 辻本洋行, 丹澤あゆみ, 橋本歩, 筏義人, 萩原明郎, 他. 架橋 gelatin film を用いた癒着防止と腹膜再生. DDWJ. 2010.10.14 (横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻本洋行 (TSUJIMOTO HIROYUKI)
同志社大学・研究開発推進機構・研究員
研究者番号: 20521272

(2) 研究分担者

萩原明郎 (HAGIWARA AKEO)
同志社大学・生命医科学部・教授
研究者番号: 90198648

(3) 連携研究者

()

研究者番号: