

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592699

研究課題名(和文) 組織工学と多能性幹細胞の腸管分化誘導技術を融合した新しい腸管移植法の開発

研究課題名(英文) New transplantation strategy of gut like organ differentiation from pluripotent stem cells by tissue engineering

研究代表者

金廣 裕道(Kanehiro, Hiromichi)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30204580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞から腸管臓器分化誘導を行う技術と細胞シートを技術を用いて、体外での腸管構造の長期培養を行う研究を行った。脂肪由来幹細胞の血管新生能に着目し、これらを共培養する実験を行った。脂肪由来幹細胞から血管構築を伴った腸間膜構造の作成を試みると、CD31発現細胞を確認できたが、温度応答培養皿を用い脂肪由来幹細胞をシート状に培養し、重積することにより血管構造を持った脂肪細胞集塊の誘導を試みたが、腸間膜様構造を誘導することはできなかった。さらに、iPS細胞と脂肪由来幹細胞を共培養して、3次元培養で胚葉体を作成した。これらを付着培養するが、こちらも血管新生を確認することができなかった。

研究成果の概要(英文)：We tried to perform the long-term culture in vitro with our gut-like organ differentiation from induced pluripotent stem (iPS) cells. We paid attention to adipose tissue-derived stem cells (ADSC) with ability for angiogenesis, we cultured iPS cells and ADSCs together. We tried to differentiation of intestinal mesentery, we demonstrated that ADSCs expressed the vascular endothelial marker genes such as CD31. However we could not develop fatty tissue with vascular formation by tissue-engineering technique. We tried to angiogenesis for gut-like organ using the embryoid body from iPS cells and ADSCs by three-demensional culture. We could not confirm the vascular formation. We could not demonstrate the angiogenesis with vascular formation for gut-like organ in vitro.

研究分野：小児外科学

キーワード：多能性幹細胞 腸管分化誘導 組織工学 iPS細胞 脂肪由来幹細胞 短腸症候群

1. 研究開始当初の背景

腸間膜動脈血栓症やクローン病などの手術時に小腸が大量切除されると、術後に残存小腸の消化吸収機能が生命の維持及び発育に対して不十分となり、短腸症候群をきたすことが知られている。これまでに本邦では現在、短腸症候群に対しては主な治療法として経静脈栄養や、外科治療による腸管延長術、小腸移植が行われ、有効例が報告されつつあるが、消化不良、栄養障害や長期中心静脈栄養に起因する肝不全、カテーテル感染による敗血症といった合併症、また手術侵襲や術後管理も困難であり満足のできる結果には至っていない。さらに、臓器移植医療においては拒絶反応が問題で、特に小腸では他の臓器とは異なり、リンパ節やパイエル板などの豊富なリンパ組織が存在し、粘膜上皮の免疫原性が極めて強いといった特徴があり、移植後の成績は不良とされている。新たな移植法の可能性として、胚性幹(ES)細胞や人工多能性幹(iPS)細胞といった多能性幹細胞を用いた特異的細胞に分化する基礎的研究とその応用が試みられている。

われわれは、ES細胞やiPS細胞を含む培養液をdishの蓋に吊り下げて行う懸垂培養Hanging drop cultureで胚様体を形成し、この胚様体を用いて、粘膜、平滑筋、ICC、神経細胞などの三胚葉系を有する腸管特異的な組織で構成される蠕動運動を呈する腸管臓器の分化誘導に、世界で初めて2002年にES細胞で、2010年にiPS細胞で成功した(Stem cells, 2002 BBRC, 2010 下図)。これらの成果は、in vitroで多能性幹細胞から機能的な人工腸管が作成でき、臓器移植医療の懸け橋となる画期的な発見である。しかしながら現時点では、分化誘導された腸管組織には血管、リンパ管といった脈管系が存在せず、in vitroでの長期培養は困難である。そこで我々は、長期培養を目指すべく、脂肪由来幹細胞の血管新生能に着目し研究を計画した。

2. 研究の目的

近年、脂肪組織にも多能性を有する脂肪由来幹細胞(ADSC; Adipose tissue-derived Stem Cell)が存在することが報告され、臨床研究を経て、CAL(Cell Assisted Lipotransfer 細胞付加型脂肪移植)という名称で実用化されており、簡便な細胞供給源として期待されている。ADSCは、血管新生因子であるVEGF(Vascular endothelial growth factor)、抗アポトーシス作用を持つHGF(Hepatocyte growth factor)などを産生し、移植した細胞の生着を促進するという特徴を持っている。またADSC自体は低酸素状態でVEGFとHGFの産生を上昇させることもわかっており、虚血領域にても血管新生するというメカニズムが考察されている。

現状では我々が多能性幹細胞から分化誘導した腸管組織には血管、リンパ管といった

脈管系が存在しないが、ADSCの上記作用により、血管新生が期待できる可能性を有している。

そこでわれわれは、iPS細胞から世界で初めて蠕動運動能を有する臓器としての腸管の分化誘導に成功した技術を基礎に、失われた腸管を根本的に再生するという全く新しい治療戦略として、拒絶反応のない人工的な蠕動運動する消化管再生へむけての研究を計画した。

腸管構造のin vitroでの長期培養へは血管新生を伴うことが重要と判断し、組織工学を活用し脂肪由来幹細胞をシート状に培養して重積することで腸間膜様構造を作成して、以前からの腸管分化誘導技術を用いた人工腸管と共培養し長期培養を行うという研究を計画した。

3. 研究の方法

脂肪由来幹細胞は、大阪大学微生物病研究所感染動物実験施設長である岡部勝教授より提供承諾のうえ供与されたGFP-トランスジェニックマウス

(C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)C14-Y01-FM1310sb)の皮下脂肪組織をコラゲナーゼで処理した後に遠心分離して成熟脂肪細胞を採取する。成熟脂肪細胞は培養液中に浮遊するので、T-75 フラスコで天井培養(Ceiling culture)にて7日間培養したのち、フラスコ天井に付着した脂肪滴をもたない線維芽細胞様の細胞を付着培養(Out growth)することにより脂肪由来幹細胞(ADSC)を樹立した。

iPS細胞からの腸管分化誘導に関しては以前からの報告の通り、三次元培養で胚葉体を形成し、後に付着培養系に移して培養した。形態学的にも腸管特異的な三胚葉系の細胞を有し、秩序だてて粘膜、筋層、神経が配列し、蠕動様運動も伴う腸管臓器の分化誘導ができる。

続いて脂肪由来幹細胞のみを培養し、脂肪分化用の培養液で培養し、成熟脂肪細胞の分化誘導を脂肪染色で確認したうえで、血管内皮細胞への誘導を行うべく刺激因子を加えて、血管系への分化誘導を行った。この組織で血管内皮細胞に発現するとされるCD31などの陽性細胞の存在を確認した。

最終的にこの培養系を継続し、血管構築を伴った脂肪細胞集塊を作成、この組織群を腸間膜に見立てて、前述のiPS細胞から分化誘導された腸管構造と共培養することで、長期培養を行うこととした。温度応答培養皿を用いて脂肪由来幹細胞をシート状に培養し、重積することで腸間膜様構造を作成を試みた。作成された組織をCD31、EVGやD2-40などの脈管系マーカーの免疫染色やreal-time PCRでこれらの発現の確認を行い、GEPでの観察を行うことにより、脂肪由来幹細胞から血管新生されているか否かの確認を行った。

iPS細胞と脂肪由来幹細胞を混和して三次元培養で胚葉体を形成した。これらの付着培

養を行い、血管新生を伴った腸管構造の作成を行った。作成された組織を CD31、EVG や D2-40 などの脈管系マーカーの免疫染色や real-time PCR でこれらの発現の確認を行い、GEP での観察を行うことにより、脂肪由来幹細胞から血管新生されているか否かの確認を行った。

4. 研究成果

脂肪由来幹細胞を脂肪分化用の培養液で培養すると、脂肪染色にて成熟脂肪細胞と思われる細胞群を確認することができた。また脂肪由来幹細胞を血管系に分化誘導を行うべく培養を行うと、脂肪由来幹細胞には発現せず血管内皮細胞に発現するとされる CD31 などの陽性細胞の存在が確認できた。しかし、温度応答性培養皿でこれらの培養系を継続し、シート状に培養して重積することにより血管構築を試みた。ECG、D2-40 などの血管、リンパ管で発現するマーカーにより形態学的にも解析を加えたが、血管構造を確認することはできなかった。Invitro で血管構築を伴った脂肪細胞集塊を誘導することは困難であり、脂肪細胞と血管からなる腸間膜構造を分化誘導することはできなかった。

iPS 細胞と脂肪由来幹細胞をさまざまな比率で混和し、胚葉体の形成を行った。胚葉体、クラスターの形成はいずれの比率でも起こるが、腸管分化誘導効率に関しては、iPS 細胞のみの場合と比較し、著しく誘導効率が低下した。また、EVG、D2-40 などの免疫染色を用いて形態学的に解析したが、腸管構造内やその周囲に血管構造を確認することはできなかった。

以上の結果から、invitro 環境のみで長期培養を試みたが、血管新生を伴った臓器としての腸管構造を誘導することはできなかった

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 10 件)

1. 山田高嗣, 植田剛, 中島祥介(2nd/3) : 消化器領域における再生医工学(第 12 回) 腸管再生医療 iPS細胞から腸管の臓器再生 : G.I.Research 2:166-170 2013.
2. Ueda T, Nakajima Y(1st/12):Prophylactic laparoscopic lateral pelvic lymph node dissection for lower rectal cancer: Remarking on the vesicohypogastric fascia.Jpn J Cancer Chemother. 2014
3. Inoue T, Ueda T, Nakajima Y (4th/11): Laparoscopic surgery after endoscopic resection for rectal cancer and neuroendocrine tumors. Surg Endosc. 2014 E-pub
4. Koyama F, Ueda T, Nakajima Y(9th/10) : Adenovirus-mediated Bcl-xL gene therapy

combined with pronase treatment protects the small intestine from radiation-induced enteritis in mouse model. J Genet Syndr Gene Ther 2014 E-pub

5. Ueda T, Nakajima Y (1st/11) .Clinical outcomes of pelvic exenteration for locally advanced primary or recurrent non-colorectal pelvic malignancies. Jpn J Cancer Chemother. 40:2433-6. 2013
6. Nakamoto T, Ueda T, Nakajima Y(7th/16): The "sliding door" technique for closure of abdominal wall defects after rectus abdominis musculocutaneous flap transposition. Jpn J Cancer Chemother. 40:2430-2. 2013
7. Inoue T, Ueda T, Nakajima Y(7th/12): Local recurrence after rectal endoscopic submucosal dissection: a case of tumor cell implantation Clin J Gastroenterol published on line 2013.12
8. Obara S, Ueda T, Nakajima Y(5th/10): Laparoscopic lateral pelvic lymphnode dissection for lower rectal cancer: initial clinical experiences with prophylactic dissection. Jpn J Cancer Chemother. 39(12):2173-5 2012
9. 植田剛, 山田高嗣, 中島祥介(1st/3) : 外科領域における再生医療の応用 腸管再生技術の開発 日本外科学会雑誌 113 : 424-428 2012
10. 植田剛, 中島祥介(1st/2) : 【新しい技術を用いた消化器研究の最前線】 iPS 細胞から消化器臓器を作製できるか. 分子消化器病 9 : 119-123 2012

[学会発表](計 3 件)

1. Yamada T, Ueda T, Nakamoto T, Nakajima Y. Organ regeneration of functional gut (iGut) from mouse iPS cells. The 12th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2014.6.18-21 Vancouver, BC, Canada
2. 中島 祥介, 植田 剛, 山田 高嗣 消化管幹細胞研究の新たな展開 iPS細胞から iGut の作製 第 100 回日本消化器病学会総会 2014/4/23-26 東京
3. 植田 剛, 中島 祥介(1st/11)IBD 合併癌 (Colitic Cancer)のサーベイランスと治療 本邦報告例集積からみたクローン病合併直腸肛門部癌の特徴 cancer surveillance に向けた検討 第 69 回日本大腸肛門病学会学術集会 2014/11/7-8 横浜
4. 植田 剛, 金廣 裕道, 中島 祥介 外科領域における先端技術・治療の開発 多能性幹細胞を用いた腸管再生医療の現状と展望 第 112 回日本外科学会定期学術集会 2012/4/12-14 千葉 指定シンポジウム
5. 中島 祥介, 植田 剛, 山田 高嗣 再生腸管の現状と展望 第 67 回日本消化器

6.

〔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〕

特記なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

金廣裕道(Hiromichi Kanehiro)

奈良県立医科大学 医学部 准教授

研究者番号: 30204580

(2)研究分担者

植田 剛(Takeshi Ueda)

奈良県立医科大学附属病院 研究員

研究者番号: 40526810

(3)連携研究者

なし