

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462773

研究課題名(和文)小腸不全症の治療法 - 小腸化大腸の効率的作製のための研究

研究課題名(英文)The study of regeneration of fetal small intestinal mucosa on the denuded colon

研究代表者

野田 卓男 (NODA, Takuo)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号：50237848

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)：小腸化大腸の効率的作製法を確立することを目的とした。胎仔ラットの小腸をコラーゲン処理して作製したorganoid unitを移植に用いた。

ラットの上行結腸約15mmを分離、無粘膜大腸を作製した。分化促進因子を添加したorganoid unitを無粘膜大腸、幹細胞の効率的な付着を期待しステントを挿入した状態の無粘膜大腸、一端に回腸15mmを吻合した無粘膜大腸に注入した。3週間後に内腔を観察したが、粘膜上皮の再生は極一部だった。回腸を吻合したものは、粘膜侵入が一部認められた。小腸化大腸の作製は、分化促進因子の添加では不十分だが、正常小腸を吻合すると粘膜が侵入し、これを利用する方法が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish the efficient method of regeneration of fetal small intestinal mucosa on the denuded colon. Intestinal epithelial organoid units harvested from fetal rats were injected into denuded colon of adult rats.

The 15mm length of ascending colon was isolated. A surgical mucosectomy was performed and denuded colonic muscle was reformed to tubular structure. Organoid units with stimulating factor were injected into the denuded colon, the denuded colon with stenting tube, and the denuded colon anastomosed with 15mm ileum. Full resurfacing of denuded colon with neomucosa did not occur in any loop. Only small nodular neomucosal area was seen in the denuded colon and partial extension of ileal mucosa to the colonic muscle anastomosed with ileum.

Full surfacing of denuded colon with neomucosa is very difficult to perform using this technique. Denuded colon anastomosed with small intestine may be helpful to regenerate of fetal small intestinal mucosa.

研究分野：小児外科学

キーワード：小腸化大腸 小腸粘膜幹細胞 ラット Organoid units

1. 研究開始当初の背景

短腸症候群は小腸における消化吸収能のみならず免疫機能が著しく低下するため、栄養不全、免疫不全を来し致命的でさえある。また、小児においては身体的・精神的な発育障害をきたす原因となる。短腸症候群に対する治療として、対症療法的に、主に経静脈栄養が行われているが、根本的な治療とはならず種々の合併症もあり、その管理に難渋する。経静脈栄養から離脱し経口の栄養摂取が可能かどうか、患児の予後や quality of life に大きく関与する。経静脈栄養からの離脱には、正常な機能を有する残存小腸の長さが問題であり、Bianchi 法や Step 延長術などが外科的小腸延長術として臨床応用されているが、これらを行うにもある程度の長さの残存小腸が必要である。また、根治的な手術として小腸移植があるが、小腸はリンパ組織が多く拒絶反応がおこりやすく、免疫抑制による副作用としての敗血症の合併も多い。肝臓や腎臓の移植に比べ臨床成績は不良といわざるを得ず、実用的な治療法として確立していない。そこで、最近は再生医学研究の一環で小腸組織再生が challenge されている。マウス ES 細胞から腸管組織を誘導する研究報告が散見されるが、完全に管腔構造を有する小腸が誘導されるまでは至っていない。その理由として、小腸組織の再生には、内胚葉由来の上皮、中胚葉由来の平滑筋、外胚葉由来の神経組織さらには血管まで再生しなければならないことが大きな壁になっていると考えられる。そこで我々は、短腸症候群の患児にも残存する大腸を代用腸管とし、小腸粘膜をそこに再生する方法を研究してきた。すなわち、無粘膜化した大腸に胎仔ラットより採取した小腸から小腸幹細胞を含む細胞塊 (organoid unit) を移植することで、無粘膜大腸内腔に極一部ながら島状に小腸粘膜を再生させた。さらに、bFGF を organoid unit に添加することで再生がやや促進されたが、完全に無粘膜大腸内腔をすべて覆うような小腸粘膜の再生は認められなかった¹⁾。

2. 研究の目的

無粘膜大腸に小腸粘膜 stem cell 含有溶液 (organoid unit) を移植して小腸粘膜を再生させ、小腸化大腸を作製する方法を確立した¹⁾が再生効率に問題がある。この小腸化大腸作製の過程で organoid unit を移植するときいくつかの増殖因子を添加することで再生効率を高め、完全な管腔構造を呈し消化吸収可能な小腸化大腸を作製することを目的とする。

(1) 分化誘導促進因子 (未定) を organoid unit に添加し、無粘膜大腸内腔に小腸粘膜が再生される効率が促進されるかどうかを判定する。

(2) 無粘膜大腸を長くした場合、どの程度の長さまで小腸粘膜化が可能かを調べる。

3. 研究の方法

胎仔 Lewis ラットより採取した小腸をコラーゲン処理して作製した organoid unit を雄性同種ラットの有茎無粘膜大腸の内腔に注入して再生小腸を作製する。このとき、organoid unit に分化促進因子を添加し、各々の添加因子群毎に小腸粘膜の再生効率を検討する。

(1) 胎仔 Lewis ラットの小腸を細かく刻み HBSS で洗浄の後、酵素処理 (collagenase XI, dispase I) し、小腸粘膜の stem cell を含む organoid unit を作製する。

(2) 雄性 Lewis ラットの上行結腸 1.5cm を分離し、腸間膜対側で開き粘膜を除去。管腔構造に再建し有茎無粘膜大腸を作製。この無粘膜大腸内腔に organoid unit を移植する。このとき organoid unit に分化促進因子を添加する。

(3) Organoid unit 移植 3 週間後にラットを犠死し、無粘膜大腸内腔での小腸粘膜再生の程度を判定する。

(4) 無粘膜大腸を 1.5cm より長くした場合、どの程度の長さまで小腸粘膜化が可能かを確認する。

4. 研究成果

(1) 上皮細胞増殖因子である EGF を添加した organoid unit を注入した無粘膜大腸内腔には、部分的に島状 (結節状) の粘膜組織

が認められた。しかし、以前の bFGF を添加した organoid unit を注入した時の結果¹⁾より少ないくらいであった。

この結果を顧みると、分化促進因子の添加のみでは期待する小腸粘膜再生が得られないと考え、実験方法を変更した。

(2) 小腸粘膜幹細胞が効率良く無粘膜大腸内腔に接することを期待し、再管腔構造に形成した無粘膜大腸内にステントチューブを残し、bFGF 添加 organoid unit を注入した。3週間後にラットを犠死して内腔を観察したところ、小腸粘膜上皮と思える組織は認められなかった。

以前、小腸粘膜下組織(SIS)を scaffold として小腸に間置することで SIS に小腸粘膜を再生させる研究を行った²⁾。これを応用して無粘膜大腸の一端に1.5cm の回腸を吻合し、この内腔に bFGF 添加 organoid unit を注入した。3週間後にラットを犠死させ内腔を観察したところ、無粘膜大腸部分には(1)と同様に部分的な島状の粘膜組織を認め、回腸側から回腸粘膜が無粘膜大腸側に数mm 侵入していた。Organoid unit 由来の島状の粘膜組織と回腸粘膜が融合している部分はなかった。

(3) 腸管は粘膜上皮、平滑筋、腸管壁内神経叢、神経線維、リンパ組織および脈管から成り、すべての杯葉成分由来の組織を含む。そのため iPS 細胞からの腸管再生も困難で十分な成果が得られていない。腸管再生研究は組織工学的手法を用いたものが代表的で、種々のものが scaffold (支持組織)として使用されている。Scaffold としては人工高分子化合物のみならず生体の組織を使用した研究も行われているが、いずれも平滑筋や神経叢の再生が不十分である³⁾。そこで、scaffold として無粘膜大腸を利用すれば粘膜上皮のみを再生させることで平滑筋、神経叢などを完備した小腸化大腸を形成できると考え、今回

の研究を進めてきた。しかし、今回の研究では organoid unit に分化促進因子を添加しても無粘膜大腸内腔を覆うような小腸粘膜を再生させることはできなかった。Organoid unit に含まれる小腸粘膜幹細胞が scaffold にうまく付着しても、増殖を刺激するのみでは不十分で、他の因子、たとえば線維組織の増殖を抑制する因子や新生血管の増殖を促す因子なども必要と考えられる。また、無粘膜大腸の一端に回腸を吻合した場合、回腸粘膜が無粘膜大腸側にわずかだが侵入してくることが確認でき、これが小腸粘膜幹細胞からの新たな再生粘膜上皮を刺激するかどうかを確かめることも課題となりうる。

(4) 今回の研究では当初期待していた成果が得られなかったが、いくつかの解決すべき問題点が挙げられる。

小腸粘膜幹細胞は胎仔ラットの小腸を処理して採取した organoid unit から得たが、胎仔ラットおよび妊娠ラットの犠牲を可能であれば避けるべきである。小腸粘膜幹細胞が陰窩底部に存在することが確認され、これを培養する技術も報告されている⁴⁾。陰窩底部から採取した小腸粘膜幹細胞の培養技術の確立というハードルを乗り越えなければならないが、胎仔ラットや新生児ラットを犠牲にしなくても小腸粘膜幹細胞を得ることができる。

今回、organoid unit と分化促進因子の添加では十分な小腸粘膜が再生しなかったことから、無粘膜大腸への注入ではなく他の方法を検討すべきと考える。一例として、陰窩底部から採取した小腸粘膜幹細胞を in vitro である程度の大きさまでシート状に培養し、無粘膜大腸に移植してそれを小腸間に間置すること方法が考えられる。

短腸症候群の治療法としての再生医療を目指すには、残存する自己の組織を変換して利用するということを目標に研究を行うことが理に適っている。

引用文献

- 1) Yoshida A, Noda T, Tani M, et al: The role of basic fibroblast growth factor to enhance fetal intestinal mucosal cell regeneration in vivo. *Pediatr Surg Int* 25: 691-695, 2009
- 2) Wang ZQ, Watanabe Y, Noda T, et al: Morphologic evaluation of regenerated small bowel by small intestinal submucosa. *J Pediatr Surg* 40: 1898-1902, 2005
- 3) 貝原 聡: 腸管再生研究の現状と展望. *Frontiers in Gastroenterology* 10: 169-173, 2005
- 4) 佐藤俊朗: 腸管上皮幹細胞. *生化学* 85: 743-748, 2013

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

野田 卓男 (NODA, Takuo)
岡山大学病院・小児外科・教授
研究者番号：50237848

(2)研究分担者

尾山 貴徳 (OYAMA, Takanori)
岡山大学病院・小児外科・助教
研究者番号：10380164

永坂 岳司 (NAGASAKA, Takeshi)
岡山大学病院・消化器外科・講師
研究者番号：30452569

野口 洋文 (NOGUCHI, Hirofumi)
岡山大学医学部・再生医学・客員研究員
研究者番号：50378733

(3)連携研究者

()

研究者番号：