

小腸粘膜下層（SIS）を用いたラット  
胃壁再生における、間葉系幹細胞併用  
の有効性の検討

氏名 中津 宏基

所属 山口大学大学院 医学系研究科

博士後期課程

応用分子生命科学系専攻

平成25年 1月

## 目次

1. 要旨 . . . . .
2. 背景 . . . . .
3. 目的 . . . . .
4. 方法 . . . . .
5. 結果 . . . . .
6. 考察 . . . . .
7. 結語 . . . . .
8. 謝辞 . . . . .
9. 参考文献 . . . . .

用いてin vitroでの生理的な機能再生を検討し、免疫染色にて組織評価を行った。

ムスカリン受容体アゴニストや一酸化窒素前駆体による薬物刺激、また電気刺激 (electrical field stimulation) による反応性が、4群ともに正常胃壁と類似して確認された。組織学的検査により、MSCを直接併用するgroup 3,4モデルでは、直接併用のないgroup 1,2モデルに比して、整然と配列した平滑筋を多く認め、平滑筋再生に寄与している可能性があると考えられた。また、MSC直接併用モデルgroup3,4では再生部の間質にGFP陽性組織を認め、その一部に繊維芽細胞様の形態を確認した。

MSC は SISに直接併用することにより、体系化された組織再生の環境を整える役割を担っていると考えられた。

## 2. 背景

ブタ小腸粘膜下層 (small intestinal submucosa; SIS, Surgisis E S; Cook Biotech) は、細胞増殖因子を含有する吸収性バイオマテリアルであり、様々な消化器再生の検討が報告され、固有な正常組織

さらに免疫組織染色により移植MSCの経過を調査することを目的とした。

## 4. 方法

### 4-1. 実験動物

200-220gの雌のSDrat（日本SLC）40匹を、以下のプロトコルによる胃壁欠損修復モデルとした。骨髄間葉系幹細胞のallogenic donorとして7週齢の雄のGFP-transduced-SDrat（日本SLC）を10匹用いた。ラットの飼育環境として、室温23℃、12時間ごとの明暗環境、水・食餌の自由摂取にて管理した。胃壁欠損モデル動物は、それぞれ手術より18時間前からの絶食管理とした。飼育管理・実験手順は、動物実験のためのガイドラインに従って実行した。

### 4-2. 骨髄由来間葉系幹細胞（MSC: mesenchymal stem cells）の分離・培養

MSCの分離は以前の報告に従って操作した。7週齢の雄のSD-GFPratを、ペントバルビタール腹腔内投与（50mg/kg）にて麻酔して大腿骨・



脛骨を採取したのち、無菌的に10ml培養液でflashing操作して骨髓を採取し、これをフラスコ内で培養した。培地は10%の牛胎児血清（FBS；Gibco）を含むDulbecco's modified Eagle's medium（DMEM；日水製薬）を用い、1%の抗生剤（ペニシリン／ストレプトマイシン；Gibco）含有とした。flashing操作ののち培養液20mlを加え、2つの75cm<sup>2</sup>フラスコ（BD Falcon）へ分注して培養した。温度37°C、CO<sub>2</sub>濃度5%でのインキュベーターにて72時間培養した段階で、培地交換により非接着細胞集団を除去した。その後も培地交換操作を2-3日おきに行い、接着系細胞集団のみを選択培養した。80 - 90%のconfluentになったところで、トリプシン処理（0.25%、3 - 4分）にて細胞を剥離し、1000g・5分の遠心分離にて回収した。これを3倍の培地へ再懸濁して継代した。同様の継代操作を行い、第3-4継代にて実験に使用した。

#### 4-3. 手術操作

200-220gの雌のSDratを術前18時間の絶食とし、飲水は自由摂取とした。ペントバルビタール腹腔内投与（30mg/kg）による麻酔下に、手術は以前報告した手技にて行った。胃幽門部前壁に径1cmの円形の全

層欠損を作成し、SIS (Surgisis ES) を円形にカットして2枚重ねとしたパッチを5-0PDS II (モノフィラメント吸収糸) にて連続縫合にてwatertightに縫着して修復した。後日の検索の際の目印のため、graft部の端に5-0プロリン (モノフィラメント非吸収糸) にて結節縫合でのマーキングを行った。

6カ月後に胃を摘出し、再生胃壁部分から切片を作成して、in vitroでの運動能検査および組織学的検査を行った。

#### 4-4. MSC併用の準備

SIS単独での修復群を対照にして (group 1)、MSCを併用した群を3種類作成した。SIS単独修復に加えMSCを経静脈投与 (group 2)、MSCをSIS上で培養したMSC-SISでの修復 (group 3)、MSCをシート状に回収しSISに挟み込んでの修復 (group 4)、の4群を作成した。

Group 1 : SIS単独群 (コントロール)

市販品の4層製品のSIS (SURGISIS、Cook Biotech) を2つ折りにして8層とし、円形にカットして使用した。使用直前には生理食塩水に15分間浸して侵軟させて用いた。縫着は5-0PDS II を使用し、作成した径1cmの胃壁全層欠損縁の漿筋層を縫いとり、円形SISの縁より1mm部



に針を通すようにして連続縫合を行った。

目印として、5-0plynylにてSIS前周囲にマーキング縫合を行った。

#### Group 2 : SIS修復後MSC静注群

上記と同様に胃壁欠損修復した直後に、MSC $7-9 \times 10^6$ 個を1mlのPBS(-)に懸濁して、下大静脈よりゆっくりと静注投与した。静注に先立って、100 $\mu$ mのCell Strainer (BD Biosciences) を通して塞栓症予防を行った。またCell Strainer前後での生細胞数や細胞径に変化ないことをVi-cell XR (Beckman Coulter) にて確認した。

#### Group 3 : SIS上MSC培養群

上記の2つ折り8層の円形SISを広げ、連なった2つの円形状（雪だるま状）の4層SISを6well-dish (BD Falcon) へ置き、細胞を生着させる前段階として、ごく少量の培養液を滴下して侵軟させた。MSCを懸濁した培養液を慎重にSIS上へと滴下し、37°C・5%CO<sup>2</sup>インキュベーターにて培養した。

位相差顕微鏡 (Olympus IX71) によりSIS上でのMSC生着を確認し、培養面を内側にして折り込み、前述のように胃壁欠損修復を行った。

#### Group 4 : MSCシートのSISサンドイッチ群

温度応答培養皿 Upcell (CellSeed) を用いて、MSCを $2 \times 10^6$ 個/cm<sup>2</sup>で播種し、confluentになるまで4日間培養した。37°Cから20°Cへ培養温度を下げることにより、monolayerのMSCシートが培養皿から剥離し、培養液内に浮遊して回収された。慎重に操作してこの細胞シートをSISの2つ折りの内側に挟み込み（サンドイッチ状）、これを用いて前述同様に胃壁欠損修復を行った。

#### 4-5. 筋収縮能の評価

再生胃壁部分に対して、薬剤濃度変化による反応性や、電気刺激の周波数変化による反応性を評価するため、オーガンバスシステム (A D Instruments) を用いたin vitroでの薬理学・電気生理学調査を行った。

再生胃壁部分より胃の輪状方向に切り出し、長さ・幅を揃えてストリップを作成し、10mlのオーガンバス内に装着した。Krebs-Henseleit buffer (118mM NaCl, 4.8mM KCl, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2mM MgSO<sub>4</sub>, and 11mM glucose)を満たし、36°C環境で95%O<sub>2</sub> 5%CO<sub>2</sub>のバブリングを継続して行った。ストリップの上下にリング状白金電極を装備しており、内在する神経反応評価としてele



ctrical field stimulation (EFS; 50mV, 1.0msec. duration, 10sec. trains at 2.5, 5, 10, 20, 40, and 80Hz)による反応を検査した。さらに、carbachol hydrochloride (CCH、ムスカリン受容体作動薬;  $1 \times 10^{-8}$  to  $1 \times 10^{-4}$ M) やsodium nitroprusside (SNP、一酸化窒素前駆物質;  $1 \times 10^{-7}$  to  $1 \times 10^{-4}$ M)による薬物刺激での運動機能評価を行った。EFSはelectrical stimulator (Nihon Kohden) にて行い、筋収縮はisometric transducer (Nihon Kohden) にて検知して、Power Lab (AD Instruments) にて記録・解析を行った。

#### 4-6. 組織学的評価

組織切片を4%パラホルムアルデヒドに浸して固定し、パラフィン包埋し、輪状筋方向に沿って $4\mu\text{m}$ に薄切した。H.E.染色での観察評価のほか、腸管平滑筋の再生を観察するため $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA; abcam) やdesmin (abcam) 対して、また腸管壁内の神経線維再生を観察するためS-100 protein 対しての免疫染色を行った。さらに移植したMSCの追跡のため、GFP 対しても免疫染色を行った (Anti-GFP (MBL))。一次抗体処理にて (anti- $\alpha$ -SMA 1:400, anti-desmin 1:100, anti-S-100 protein 1:1000, anti-GFP 1:400) 37°C 40分間



の恒温環境とした。EnVision+systemによる二次抗体を滴下して37°C 40分間反応後、DABで発色させ、最後にHematoxylin5分にて核染色を行った。

標本では、全層・粘膜層・および筋層の厚さをそれぞれ測定した。

#### 4-7. 統計分析

採取データは平均±標準誤差として表示し、ANOVA解析を行った。

$p \leq 0.05$ が統計学的有意差ありとした。

### 5. 結果

全てのラットは健康に生存し、成長した。

胃壁修復部のSISは消失しており、修復部はマーキングのプロリン糸にて認識できたが、憩室化や収縮瘢痕化を認めなかった。

#### 5-1. 筋収縮反応

筋収縮反応の結果をFigure 1に示す。

CCH刺激による収縮反応は全ての群において認められ、濃度依存性の

収縮力増強反応を認めた。しかし、MSCを併用した3群においていずれも、SIS単独群との比較にて明らかな収縮力の増強は認められなかった。SNPによる筋弛緩反応も、4群とも同様に認められ、有意差は確認されなかった。

EFSによる周波数依存的な収縮反応を認めたが、その収縮波も各群間で有意差を認めなかった。

## 5-2. 組織学的所見

全層欠損部分は全ての症例で良好に修復されていた。内腔部は約80%の症例で分化上皮組織によって覆われており、そのほとんどで胃粘膜固有細胞であるparietal cellが確認された。わずかな異物反応を示すのみで移植したSISは消失しており、血管の新生が認められた。深い消化性潰瘍病変の修復過程で見られるような、繊維性瘢痕組織が収縮する無秩序な構造を認めなかった。さらにSIS修復部にも平滑筋の造成が認められ、この修復は欠損胃壁の縁の粘膜筋板や固有筋層から広がっているようにみられた。

MSCを播種されていないSISによって修復したgroup 1 および2 では平滑筋束が薄いのに対し (Figure 2A・B)、MSC播種されたSISで修

復したgroup 3 および 4 では良好な構造がしばしば認められ、周囲正常組織から連続して発達してみられた。(Figure 2C・D)

MSC播種したSISを用いた修復群での、抗 $\alpha$ SMA染色および抗desmin染色の代表的な像をFigure 3に示す。また抗S-100 protein染色では、以前に報告したのと同様に、固有筋層に散在して陽性反応を示した。

抗GFP染色では、再生された平滑筋や神経組織や粘膜ではなく、group 3・4における再生部の間質に陽性反応を呈し、group 1・2での再生組織や正常組織には認めなかった(Figure 4)。また、group 3・4でのGFP陽性の間質には、紡錘形の核を有する細胞を認め、繊維芽細胞と思われた。(Figure 5)

### 5-3. 再生平滑筋束の厚さ評価

再生した個所において、組織学的評価において粘膜・筋層および全層の厚みを計測比較した。MSCを播種していないSISを用いたGroup 1・2に比較して、MSCを播種したSISを用いたGroup 3・4にて、有意に平滑筋束が厚く形成されていた。(Figure 6)



## 6. 考察

消化管のような三次元の臓器再生にとって、再生の足場となる素材が重要であると考えられる。SISはbFGF・VEGF・TGF- $\beta$ などの細胞増殖因子を含有した生分解性バイオマテリアルであり、適した足場素材であると考えられ、これまでも食道・胃・小腸・結腸と様々な消化管再生での報告されている。我々のこれまでの研究にて、SISを用いたラット胃壁全層欠損部の再生実験を行い、固有組織の再生ならず機能回復を伴う再生が期待でき、その反応性はin vivoにおいても確認された。しかし、平滑筋再生・収縮能力の回復に関しては不十分であり、さらなる改善が必要であった。

平滑筋の効果的再生を得るために、生分解性素材と細胞を併用する手法が、膀胱や消化管の再生研究にて報告されている。膀胱再生においては、SISにES細胞や骨髄幹細胞や組織幹細胞を併用して、良好な平滑筋再生効果が報告されており、特にFrimbergerらは、ヒト胚性生殖細胞をSISと併用することにより、ラットの膀胱モデルにおいて上皮・粘膜下層・平滑筋を含むほぼ完全な再生を報告している。ES細胞は臨床利用困難であるが、その代用となる細胞ソースとして

、対照個体自体から採取して自己利用ができ、入手の容易さと細胞の多能性という点からも、間葉系幹細胞が有用と考える。Kanematsuらは膀胱再生実験において、骨髄間葉系幹細胞が平滑筋細胞へ分化した可能性を指摘しており、またShuklaらは、in vitroにおいて骨髄間葉系幹細胞から平滑筋様細胞を得たと報告している。

細胞外マトリクスの視点より考慮すると、SISは小腸に由来する素材であるため、その構造や含有する細胞増殖因子が、腸管細胞の分化・維持のための最適なニッチを構成すると期待される。

以上より、今回我々はSISと骨髄MSCの併用の有用性を、機能的・組織学的に検討した

今回のプロトコールでは3種類のMSC併用法を設定した。

経静脈投与したMSCが胃潰瘍の修復に関与すると報告があり、この投与方法を用いてgroup 2とした。Group 3ではFrimbergerらが行った細胞播種方法に従った。Group 4は細胞シートを利用した。Okanoらの開発した細胞シート工学により、角膜再建が臨床応用に向けて進められ（Nishidaら）、Miyaharaらは心筋梗塞後の心筋拡張機能の改善を報告している。温度応答培養皿Upcellを使用することで細胞シートの回収ができ、このMSCシートをSIS片で挟み込んで使用するの



我々独自の手法である。GFPラットからのallo-MScを採取培養してSISと併用することにより、再生組織中でMScがどのように存在するのか、免疫組織検査にて調査を行った。

ムスカリン作動薬・一酸化窒素前駆物質・EFSのそれぞれに応じた反応性が認められ、以前に報告したSISによる消化管再生が再現性をもって示された。MSc播種群においても十分な収縮力が見いだせなかったが、漿膜下層の繊維化組織による影響ではないかと推察する。

しかし、組織学的には、MSc播種SIS群においては整然と配列した平滑筋束が認められ、MSc播種のない群と比較して良好な再生を示唆していた。

移植されたMScの経過を抗GFP免疫染色によって検討したところ、MSc播種SISのグループにおいて、再生胃壁の間質部に陽性反応を示し、紡錘形の核を有する繊維芽細胞と判断される細胞を認めた。MScが分化増殖して胃壁欠損部の再生が行われたとは判断できないが、GFP陽性“組織”は再生部間質に認めており、移植MScが繊維芽細胞を含む周辺環境に働きかけて、組織修復に貢献していると推察された。ShukulaやKanematsuの報告にあるように、SISとMScの併用による創傷治癒機転において、細胞間環境の改善効果として関与している可能性

がある。

MSCの分泌する各種サイトカインや成長因子は、局所の免疫反応を抑えて癒痕化やアポトーシスを抑制し、血管新生を促進し、組織幹細胞の分化増殖を促す効果があると、CaplanやDennisが述べている。

MSCに対して、SISの含有する因子を含めたその微細環境がどのように影響を与えるか、さらにそれらMSC-SISの関係が周辺環境へどのように働きかけているのか詳細は不明である。しかし、今回の実験結果より、SISを用いた胃壁欠損部再生において、MSCにより修復環境改善効果がもたらされることが示唆された。

SISはブタの小腸由来の生体材料であるため、ブタにおいて自己骨髄由来のautologous MSCを用いた小腸再生研究にてより効果的と思われる。

消化管の組織再生への新たな知見であり、再生医療にとって、組織工学と細胞療法のコンプレックスが重要であると考えられる。

この手法では、患者自己の骨髄由来MSCが治療素材となり、その治療効果も高まる可能性があり、臨床応用に特に興味深いところである。

。

## 7. 結語

消化管再生において、MSCはSISに直接併用することにより、組織再生の環境を整える役割を担っていることが示唆された。

## 8. 謝辞

本研究を遂行するに当たり直接指導いただきました消化器・腫瘍外科学 講師 上野富雄博士に感謝いたします。また実験にご助言いただきました分子病理学小賀厚徳先生（講師・博士）、生体機能分子制御学小林誠先生（教授・博士）に感謝いたします。本研究遂行にあたりご指導、ご助言をいただきました消化器・腫瘍外科学 岡正朗教授に深謝いたします。

## 9. 参考文献



Figure

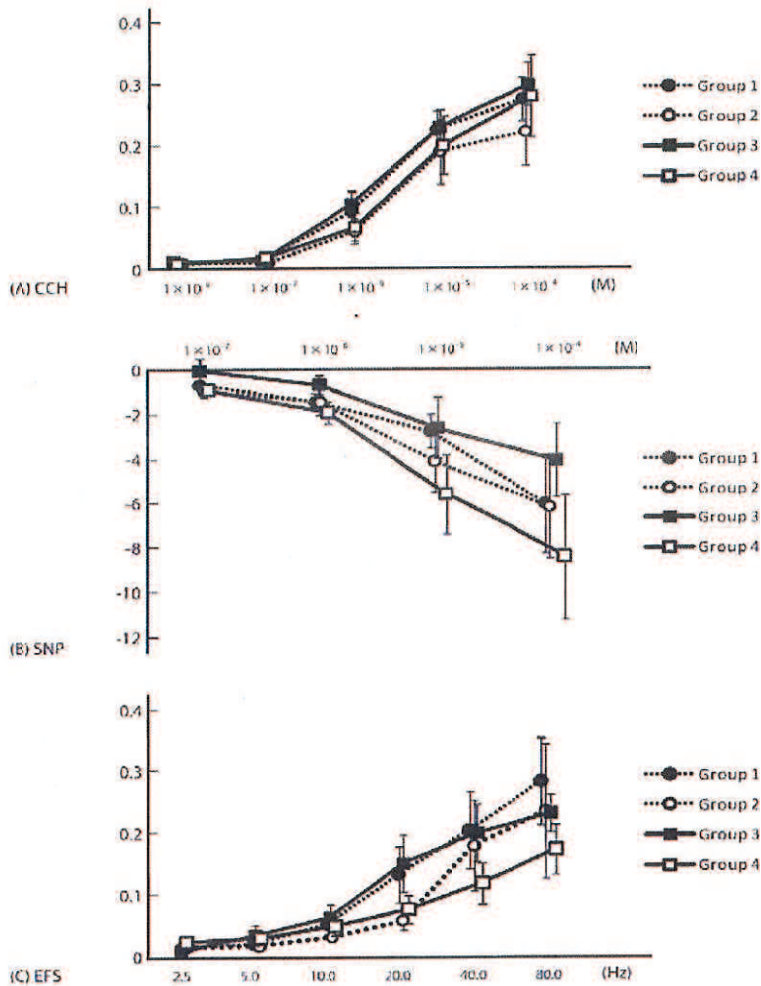


Figure 1 : in vitroでの各刺激に対する筋収縮性

(A) カルバコール (CCH) に対する濃度依存性の収縮反応を認める。  
(B) 一酸化窒素前駆物質 (SNP) に対する濃度依存性の弛緩反応を認める。  
(C) 電気刺激 (EFS) における周波数依存性の収縮反応を認める。

Group 1 (コントロール)・2はMSC播種のないSIS、Group 3・4はMSC播種したSISの群である。どのグループ間においても反応の有意差

を認めない。

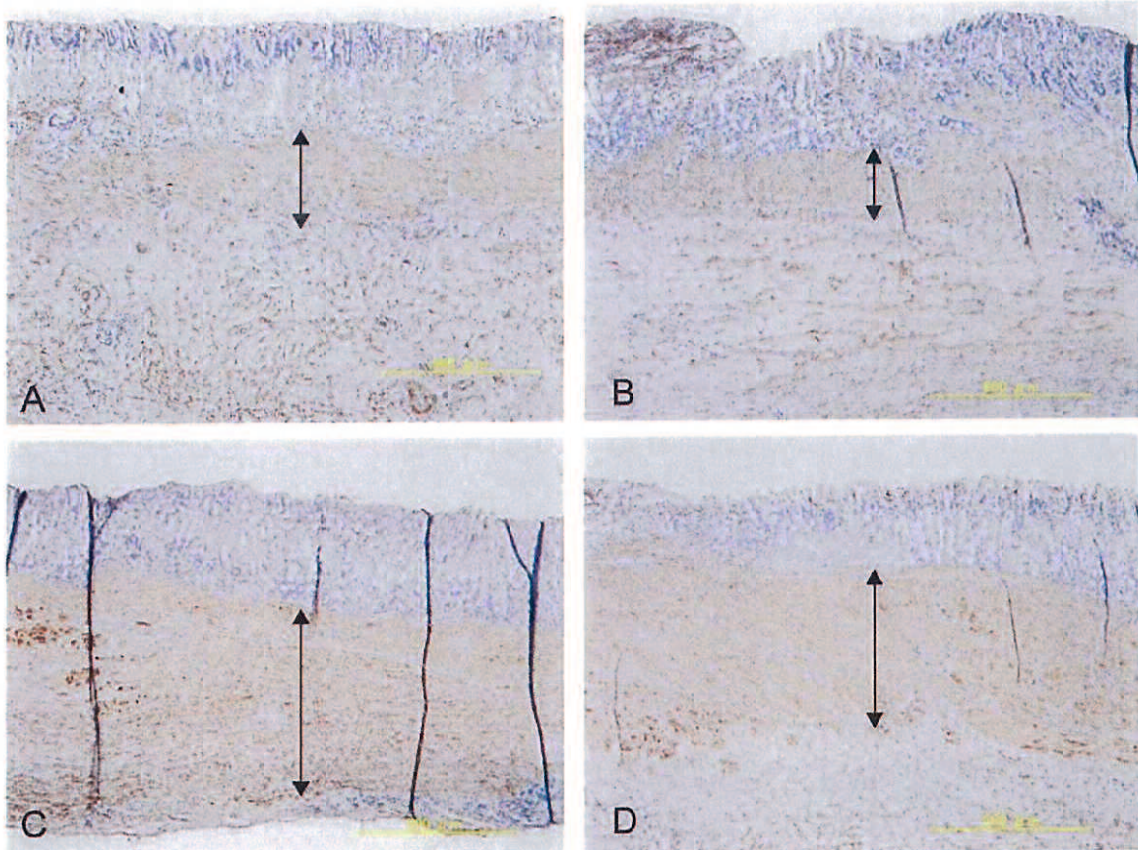


Figure 2 : 再生胃壁における $\alpha$ SMA免疫染色

A : SIS単独群 (Group 1 : コントロール)、B: SIS単独修復直後のMSC  
静注群 (Group 2)、C : SIS上でのMSC培養群 (Group 3)、D : MSCシ  
ートをSISにサンドイッチした群 (Group 4)

双方向矢印は平滑筋束の厚みを示す。



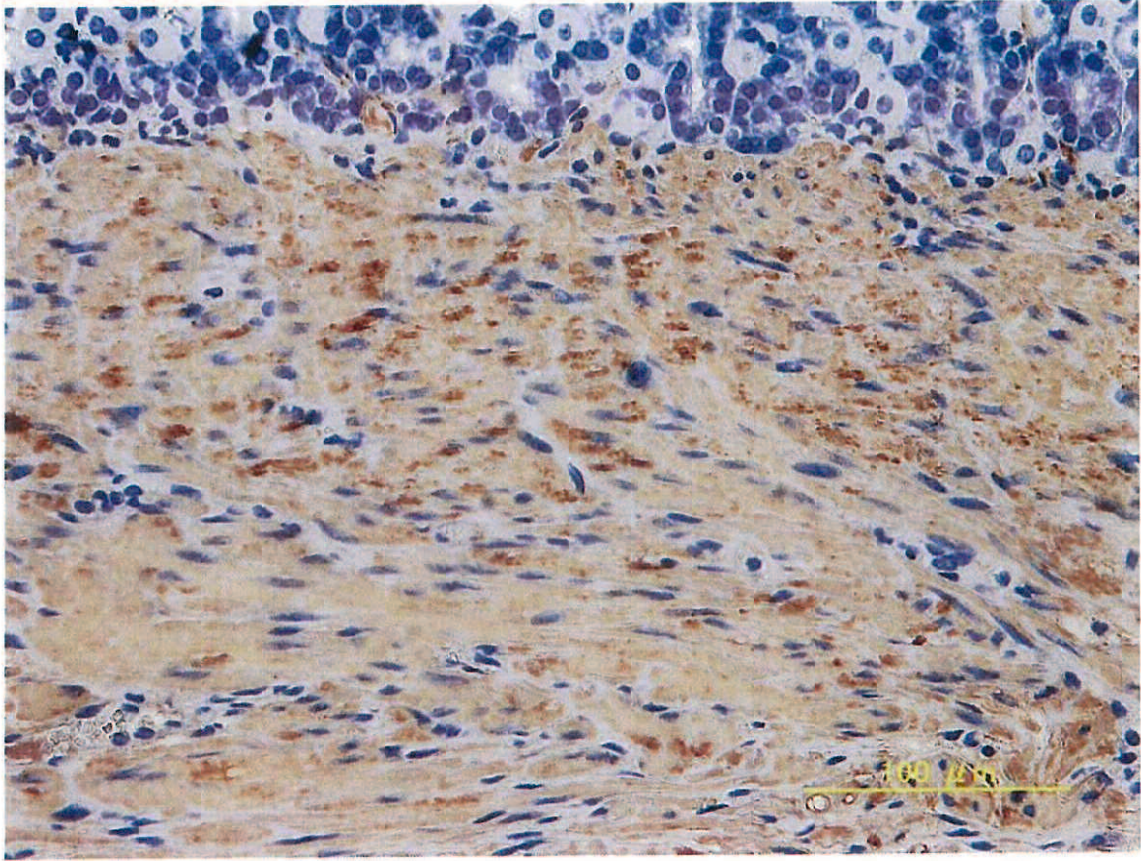


Figure 3 : 再生胃壁における $\alpha$ SMA免疫染色像 高分解像

$\alpha$ SMA陽性の平滑筋細胞が粘膜下層から固有筋層にかけて整然と配列している。

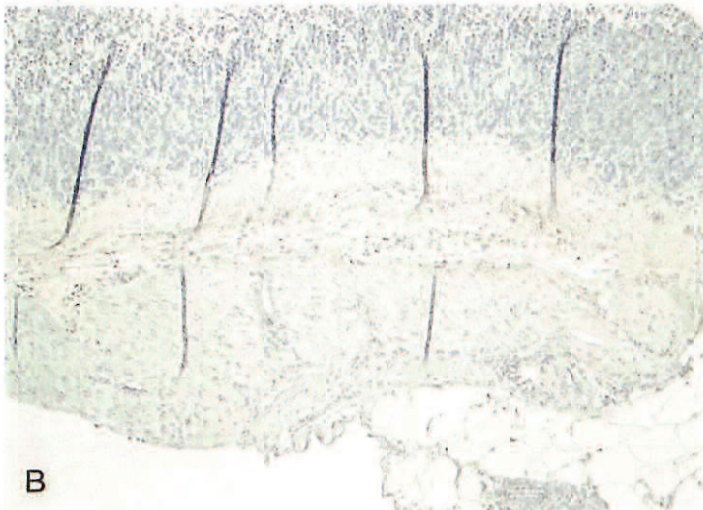
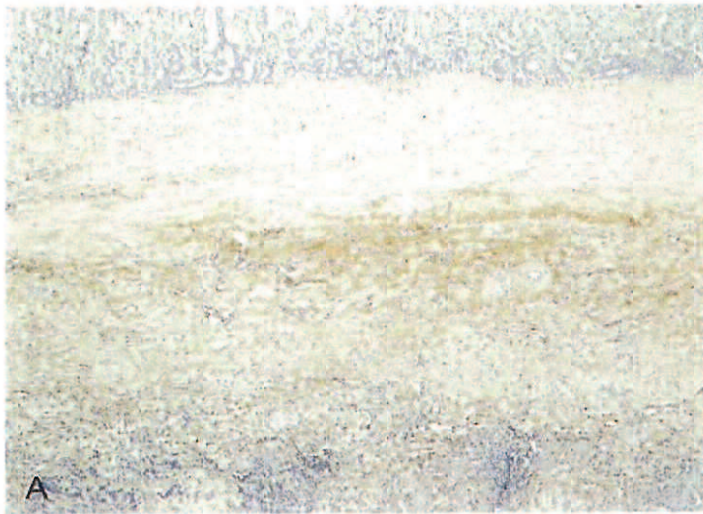


Figure 4 : 抗GFP免疫染色像

(A) MSC播種したSISを使用したグループにてGFP陽性組織を認めるが、平滑筋部や粘膜部はGFP陰性である。(B) negative control:同一標本の正常胃壁部分



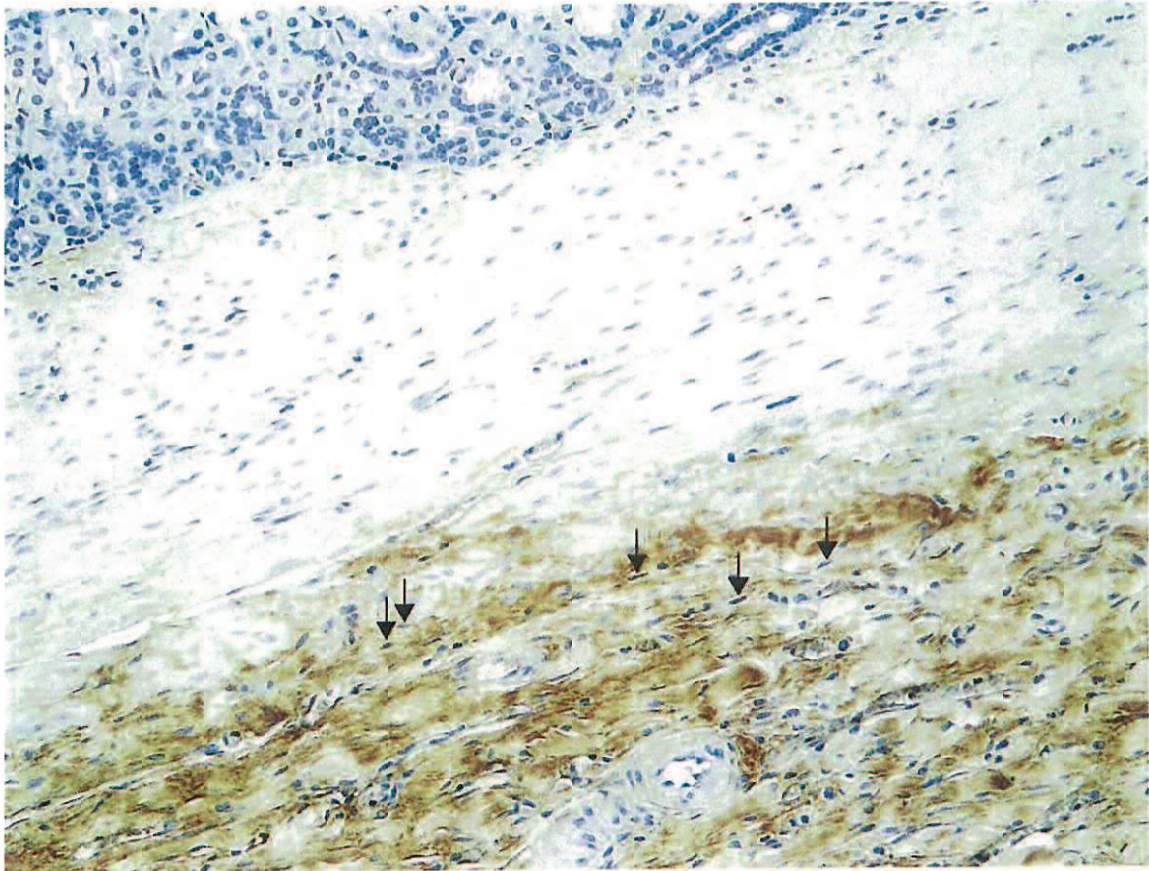


Figure 5 : GFP陽性組織の高分解像像

GFP陽性組織内に紡錘形の核をみとめ、これらは繊維芽細胞と考えられる。

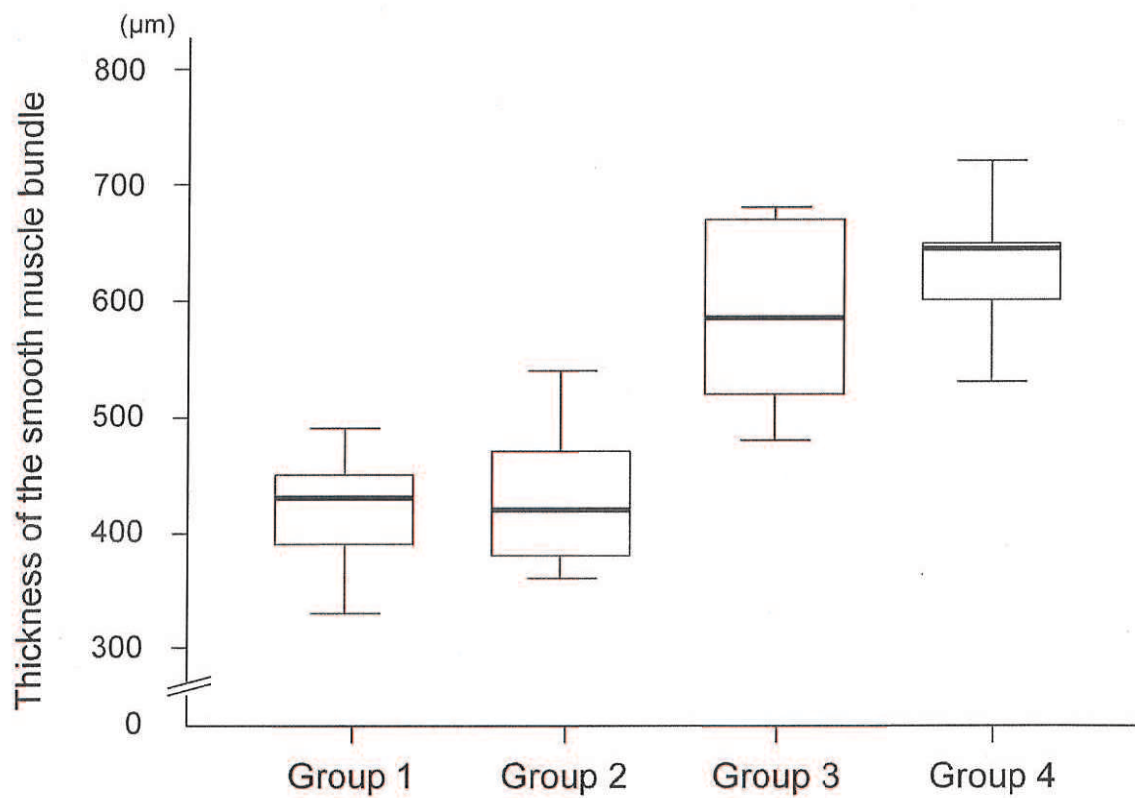


Figure 6 : 再生平滑筋束の厚みの比較

MSCを播種していないSISを用いたGroup 1・2に比較して、MSCを播種したSISを用いたGroup 3・4にて、有意に平滑筋束が厚く認められた。