

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15645

研究課題名(和文) ヒルシュスプルング病および類縁疾患の治療としての新腸管作成に関する研究

研究課題名(英文) The research on creation of new intestinal tract as a treatment for Hirschsprung disease and allied diseases

研究代表者

田口 智章 (Taguchi, Tomoaki)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：20197247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：C57Bl/6マウスおよびヒルシュスプルング病類縁疾患(H類縁)モデルマウスの歯より歯髄を単離し培養することでマウス由来歯髄幹細胞(dental pulp stem cell, DPSC)の表現型及び機能評価を行った。また、本研究課題に先行する形で、ヒト脱落乳歯歯髄幹細胞(SHED)を用いて、in vivoにおける分化傾向を探った。H類縁モデルにおいて、SHED移植群では、非移植群と比較して、体重増加を認めた。この知見はSHEDが腸管神経系細胞にin vivoで分化したことを示唆している。本研究成果は、自家細胞を用いた腸管の作成に向けた有意義な成果と言える。

研究成果の概要(英文)：Mouse-derived dental pulp stem cells (DPSC) were phenotypically and functionally evaluated by isolating and culturing the dental pulp from the teeth of C57Bl/6 mouse and allied disorders of Hirschsprung's disease (ADHD) model mouse. In addition, we studied the differentiation tendency in vivo using stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). In the ADHD model, body weight gain was observed in the SHED-transplanted group as compared with non-transplanted group. This finding suggests that SHED differentiated in vivo into intestinal nervous system cells. The result of this research can be said to be a meaningful result for the preparation of intestinal tract using autologous cells.

研究分野：小児外科

キーワード：ヒルシュスプルング病 小児消化器疾患学 消化管神経節細胞 再生医療 指定難病 ヒルシュスプルング病類縁疾患 組織工学

1. 研究開始当初の背景

小児期に発症し腸管蠕動不全のために機能的腸管不全をきたす疾患は、腸管神経節細胞が欠如するヒルシュスプルング病(H病)と、神経節細胞は存在するものの腸管運動不全をきたすヒルシュスプルング病類縁疾患(H類縁)がある。前者のうち無神経節領域が小腸に及ぶもの(小腸型H病)や後者のうち Chronic Idiopathic Intestinal Pseudoobstruction Syndrome (CIIP)と Hypoganglionosis (HYPO)が代表的なものである(図)。この二疾患は本邦の全国調査では10年間にそれぞれ100例程度発症し治療に難渋している。そこで、われわれはHYPOのモデルマウスに対し、減少している腸管壁内神経系の増殖を目的とし、間葉系幹細胞であるヒト脱落乳歯歯髄幹細胞(SHED)を静脈内投与したところ、体重増加や摂食量の増加がみられ腸管収縮力も増強した(平成25-26年度挑戦的萌芽研究)。一方、これらの疾患の根治術として小腸移植が試みられてきたが、拒絶反応が強いため、長期生着率は40%程度であり、標準的治療としてはまだまだ使えないのが現状である。近年、炎症性腸疾患の新規治療法として腸の粘膜上皮の幹細胞を培養し、これを潰瘍部の修復に用いる方法が開発されつつある(Fordham RP, Yui S, Watanabe M, et al. Cell Stem Cell 13:734-44, 2013)。この方法では腸管上皮を球形に培養することが可能である。この腸管上皮のみの構造物に平滑筋の被覆ができれば蠕動を有する新腸管の作成が可能と考えられる。

2. 研究の目的

小児期に発症し蠕動不全のため機能的腸管不全をきたす疾患は、先天的に腸管神経節細胞が欠如するヒルシュスプルング病(H病)と、神経節細胞は存在するものの腸管運動不全をきたすヒルシュスプルング病類縁疾患(H類縁)がある。H病のうち無神経節領域が小腸に及ぶ小腸型H病やH類縁のうち Hypoganglionosis や慢性特発性偽性腸閉塞症(CIIP)は恒常的に蠕動不全が継続し予後不良である。これらH病およびH類縁の患児に対し、腸管上皮の幹細胞で粘膜層をつくり、その周囲を間葉系幹細胞(MSC)を平滑筋に分化させた細胞層で覆うことにより蠕動能をもった新腸管を作成し、腹腔内に移植する。実験では近交系の同系のマウスを用いて同系移植の形で実施する。臨床では自己の粘膜採取と自己の骨髄または歯髄を細胞のソースとして用いる自家小腸移植のモデルとなる。

3. 研究の方法

- 1) C57BL/6 マウス(近交系)の歯髄からMSCを単離し培養。
- 2) 歯髄MSCから平滑筋に分化させる。

- 3) C57BL/6 マウスの大腿骨骨髄から骨髄MSCを単離し培養。
- 4) 骨髄MSCから平滑筋細胞に分化させる。
- 5) C57BL/6 マウスの小腸粘膜採取し幹細胞を単離し培養。
- 6) 小腸粘膜幹細胞は近位小腸と遠位小腸から採取し性状を比較。
- 7) 小腸粘膜 spheroid または organoid を作成。
- 8) 小腸粘膜 spheroid または organoid とMSCから分化させた平滑筋を共培養し新腸管を作成。
- 9) 新腸管をC57BL/6マウスの腸間膜内または腎被膜下または背部皮下に移植。生着を検証する。

4. 研究成果

C57BL/6 マウスおよびヒルシュスプルング病類縁疾患モデルマウスの歯より歯髄を単離し培養することでマウス由来歯髄幹細胞(dental pulp stem cell, DPSC)の表現型及び機能評価を行った。また、ヒト脱落乳歯歯髄幹細胞(stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED)を用いて、in vivoにおける分化傾向を探った。結果、SHEDは神経節細胞や神経線維へ分化した可能性を見出した。腸管作成の上、用いる予定の細胞ソースであるSHEDの分化傾向をつかんだことは極めて重要である。

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 17 件)

Zhang Xiu-Ying, Yanagi Yusuke, Sheng Zijing, Nagata Kouji, Nakayama Koichi, Taguchi Tomoaki, Regeneration of diaphragm with bio-3D cellular patch, Biomaterials, 査読有、167 巻、2018、1 - 14
doi:10.1016/j.biomaterials.2018.03.012

田口智章、吉丸耕一朗、柳佑典、松浦俊治、小児外科領域における新規治療の開発-難治性疾患に対する乳歯歯髄肝細胞を用いた新規治療-、第118回日本外科学会定期学術集会、査読無、宿題報告、2018、61 - 70

Taguchi Tomoaki、Obata Satoshi、Ieiri Satoshi、Current status of Hirschsprung's disease: based on a nationwide survey of Japan、Pediatric Surgery International、査読有、33 巻、

2017、497 - 504
DOI: 10.1007/s00383-016-4054-3
Taguchi Tomoaki, Ieiri Satoshi,
Miyoshi Kina, Kohashi Kenichi, Oda Yoshinao, Kubota Akio, Watanabe Yoshio,
Matsufuji Hiroshi, Fukuzawa Masahiro,
Tomomasa Takeshi, The incidence and
outcome of allied disorders of
Hirschsprung's disease in Japan:
Results from a nationwide survey,
Asian Journal of Surgery、査読有、40
巻、2017、29 - 34
DOI: 10.1016/j.asjsur.2015.04.004
Uchida Keiichi, Nakajima Atsushi,
Ushijima Kosuke, Ida Shinobu, Seki Yoshitaka,
Kakuta Fumihiko, Abukawa Daiki, Tsukahara Hisayuki,
Maisawa Shun-ichi, Inoue Mikihiro, Araki Toshimitsu,
Umeno Junji, Matsumoto Takayuki, Taguchi Tomoaki,
Pediatric-onset Chronic Nonspecific
Multiple Ulcers of Small Intestine,
Journal of Pediatric Gastroenterology
and Nutrition、査読有、64 巻、2017、
565 - 568
DOI: 10.1097/MPG.0000000000001321
Kato H, Thi Mai Pham T, Yamaza H,
Masuda K, Hirofuji Y, Han X, Sato H,
Taguchi T, Nonaka K, Mitochondria
Regulate the Differentiation of Stem
Cells from Human Exfoliated Deciduous
Teeth, CELL STRUCTURE AND FUNCTION、
査読有 42 巻、2017、105 - 116
DOI: 10.1247/csf.17012
Yoshimaru Koichiro, Taguchi Tomoaki,
Obata Satoshi, Takemoto Junkichi,
Takahashi Yoshiaki, Iwanaka Tsuyoshi,
Yanagi Yusuke, Kuda Masaaki, Miyoshi Kina,
Matsuura Toshiharu, Kinoshita Yoshiaki,
Yoshioka Takako, Nakazawa Atsuko,
Oda Yoshinao, Immunostaining for Hu C/D
and CD56 is useful for a definitive
histopathological diagnosis of congenital
and acquired isolated hypoganglionosis,
Virchows Archiv、査読有、470 巻、2017、
679 - 685
DOI: 10.1007/s00428-017-2128-9
Yanagi Yusuke, Nakayama Koichi,
Taguchi Tomoaki, Enosawa Shin, Tamura
Tadashi, Yoshimaru Koichiro, Matsuura
Toshiharu, Hayashida Makoto, Kohashi
Kenichi, Oda Yoshinao, Yamaza
Takayoshi, Kobayashi Eiji, In vivo and
ex vivo methods of growing a liver bud
through tissue connection, Scientific
Reports、査読有、7 巻、2017、14085
DOI: 10.1038/s41598-017-14542-2
柳 佑典, 山座孝義, 山座治義, 野中和
明, 中山功一, 吉丸耕一朗, 岩中 剛,
高橋良彰, Rathi Yuniartha, 松浦俊治,

孝橋賢一, 小田義直, 大賀正一, 絵野沢
伸, 小林英司, 田口智章, 乳歯幹細胞を
用いた肝再生研究、小児外科、査読無、
49 巻、2017、567 - 571
吉丸耕一朗, 山座孝義, 梶岡俊一, 高橋
良彰, 柳 佑典, 小田義直, 田口智章,
乳歯歯髄幹細胞を用いた腸管神経再生
による先天性腸管蠕動不全に対する新
規治療法の開発、日本小児栄養消化器肝
臓学会雑誌、査読無、31 巻、2017、84
吉丸耕一朗, 山座孝義, 近藤琢也, 高橋
良彰, 岩中 剛, Ratih Yuniartha, 柳
佑典, 小幡 聡, 江角元史郎, 伊崎智子,
松浦俊治, 木下義晶, 田口智章, ヒルシ
ュスプルング病及びその類縁疾患に対
する幹細胞を用いた新規治療法の展望,
小児外科、査読無、49 巻、2017、579 -
584
Yoshimaru K, Kinoshita Y, Matsuura T,
Esumi G, Wada M, Takahashi Y, Yanagi
Y, Hayashida M, Ieiri S, Taguchi T,
Clinical analysis of 70 bowel
obstruction cases without a history of
laparotomy, Pediatr Int、査読有、58
巻、2016、1205 - 1210
DOI: 10.1111/ped.13003
Taguchi T, Ieiri S, Miyoshi K, Kohashi
K, Oda Y, Kubota A, Watanabe Y,
Matsufuji H, Fukuzawa M, Tomomasa T,
The incidence and outcome of allied
disorders of Hirschsprung's disease
in Japan:Results from a nationwide
survey, Asian J Surg、査読有、40 巻、
2017、29 - 34
DOI: 10.1016/j.asjsur.2015.04.004
田口智章, 小児外科領域の臨床研究：難
治性疾患から TR まで(第 15 回臨床研究
セミナー 第 3 部外科臨床研究の実践)、
日外会誌、査読無、117 巻、2016、236
- 238
Watanabe Y, Sumida W, Takasu H, Oshima
K, Kanamori Y, Uchida K, Taguchi T, Early
jejunostomy creation in cases of
isolated hypoganglionosis:
verification of our own experience
based on a national survey, Surg Today、
査読有、45 巻、2015、1509 - 1512
DOI: 10.1007/s00595-015-1114-6.
Yamaza T, Alatas FS, Yuniartha R,
Yamaza H, Fujiyoshi JK, Yanagi Y,
Yoshimaru K, Hayashida M, Matsuura T,
Aijima R, Ihara K, Ohga S, Shi S,
Nonaka K, Taguchi T, In vivo
hepatogenic capacity and therapeutic
potential of stem cells from human
exfoliated deciduous teeth in liver
fibrosis in mice, Stem Cell Res Ther、
査読有、6 巻、2015、171
DOI: 10.1186/s13287-015-0154-6.
Soh H, Fukuzawa M, Kubota A, Kawahara

H, Ueno T, Taguchi T, Megacystis microcolon intestinal hypoperistalsis syndrome: A report of a nationwide survey in Japan, J Pediatr Surg, 査読有、50 巻、2015、2048 - 2050 DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2015.08.026.

〔学会発表〕(計 4 件)

Taguchi T, Obata S, Akiyama T, Urushihara N, Kawahara H, Kubota M, Kono M, Nirasawa Y, Honda S, Nio M, Ieiri S, High Mortality Rate of Hirschsprung's disease-related Short Bowel Syndrome ?Result from a Nationwide Survey in Japan-, PAPS 2017 (国際学会) 2017

Obata S, Ieiri S, Souzaki R, Akiyama T, Urushihara N, Kawahara H, Kubota M, Kono M, Nirakawa Y, Honda S, Nio M, Hashizume M, Taguchi T, The Current Trend of Laparoscopy-assisted Operation for Hirschsprung's disease in Japan, PAPS 2017 (国際学会) 2017
Obata S, Ieiri S, Yamataka A, Koshinaga T, Iwai J, Ikeda H, Taguchi T, Acquired Hypoganglionosis in Japan; Based on a Nationwide Survey in 10 Years, PAPS2016 (国際学会) 2016

吉丸耕一郎、山座孝義、梶岡俊一、高橋良彰、柳 佑典、松浦俊治、田口智章、体性幹細胞を用いたヒルシュスプルング病とその類縁疾患の新規治療開発、第116回日本外科学会定期学術集会、2016

〔図書〕(計 1 件)

Taguchi T, Iwanaka T, Okamatsu T ed., Springer Japan 2016, Operative General Surgery in neonates and Infants Springer Japan 2016、2016、402

〔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

田口 智章 (TAGUCHI, Tomoaki)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：20197247

(2)研究分担者

黒田 達夫 (KURODA, Tatsuo)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授
研究者番号：60170130

山座 孝義 (YAMAZA, Takayoshi)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号：80304814

柳 佑典 (YANAGI, Yusuke)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：30596664

松浦 俊治 (MATSUURA, Toshiharu)
九州大学・医学研究院・講師
研究者番号：10532856

吉丸 耕一郎 (YOSHIMARU, Koichiro)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：60711190

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()