

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09073

研究課題名(和文) 腸管神経節細胞僅少症への幹細胞移植における大建中湯を用いた治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development a treatment for Hypoganglionosis by stem cell transplantation and Daikenchuto

研究代表者

入江 敬子 (Irie, Keiko)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：30644728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腸管神経節細胞僅少症(Hypoganglionosis, Hypo)への幹細胞移植療法を新規治療法として確立すべく行った先行研究において、Hypoモデル動物へのヒト乳歯歯髄幹細胞の経静脈投与にて腸管蠕動運動改善効果を得た。今回、幹細胞移植と大建中湯投与を併用することで、さらなる効果増強を目指した。しかし、実験に用いたJF1/Ms腸管の病理組織検査では腸管神経節細胞数の減少を認めなかった。JF1/MsはC57BL/6と比較し、大きなゲノム多型性が指摘されている。JF1/Msは腸管についても表現型が個体ごとに異なる可能性が示唆され、このマウスを用いた治療効果の評価は今後も検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管神経節細胞僅少症(Hypoganglionosis, Hypo)は、消化管壁内神経節細胞の著明な減少に起因する蠕動不全を呈する厚生労働省指定難病であり、新たな治療法が渴望される疾患である。疾患モデル動物に対する幹細胞移植により腸管蠕動運動改善効果を認めており、その効果をより確実なものにする方法として、消化器疾患に多用され、基礎研究において複数のエビデンスが確立している大建中湯に着目した。実験動物に表現型の多様性が示唆され、治療効果の評価が困難であったが、腸管神経節細胞の減少および蠕動低下が顕著でない表現型でも、幹細胞移植や大建中湯は腸管蠕動運動に少なくとも悪影響は及ぼさないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In a previous study, intestinal peristalsis was improved by intravenous administration of stem cells from human exfoliated deciduous teeth to an animal model of hypoganglionosis. In this study, we aimed to further enhance the effect by combining stem cell transplantation and Daikenchuto administration. Histopathological examination of the JF1/Ms intestinal tract used in this experiment showed no decrease in the number of enteric ganglion cells. Since JF1/Ms has been noted to have a large genomic polymorphism compared to C57BL/6, it was suggested that the phenotype of JF1/Ms intestinal tracts may also differ from individual to individual. Further studies are needed to determine the efficacy of the treatment.

研究分野：小児外科

キーワード：Hypoganglionosis 大建中湯 幹細胞移植

1. 研究開始当初の背景

腸管神経節細胞僅少症は、消化管壁内神経節細胞の著明な減少に起因する消化管蠕動不全のために重篤な機能的腸閉塞症状を来す、予後不良の先天性消化管疾患である。ヒルシュスプルング病類縁疾患(H類縁)に属し、平成27年1月に厚生労働省指定難病となった。唯一の根治治療は小腸移植であるが、本邦での実施はいまだ容易とは言えない。現在の治療は、中心静脈栄養及び経管栄養、姑息的腸瘻造設に限られ、治療法の開発が渴望されている。

その中で、我々は先行研究で、疾患モデル動物としてJF1/Msを用い、これに対しヒト脱落乳歯歯髄幹細胞(SHED)を経静脈的に投与を行うことで、腸管蠕動運動の改善効果を得ることができた。その中で腸管の病理組織学的解析ではマウス腸管における移植したSHEDの生着を認め、移植したSHEDが、本研究の対象疾患である腸管神経節細胞僅少症で著明に減少している腸管神経節細胞数を有意に回復させたと評価した。

2. 研究の目的

腸管神経節細胞僅少症に対する幹細胞移植を新規治療として確立するうえで、安全性はもちろんであるが、移植効果増強や長期間の効果持続が課題となる。その課題を解決する方策として、即時に、安価に使用でき、本邦での使用経験豊富な薬剤である、また腸管神経節細胞僅少症に対して実臨床にて現在多く処方されている大建中湯に着目した。

大建中湯の解明されている作用機序の中で、バニロイド受容体を介したカルシトニン遺伝子関連ペプチド分泌促進作用は、血管拡張や血管透過性亢進作用を示す他、神経栄養因子の増加が期待され、これらの機序により幹細胞移植における細胞の遊走や定着、さらに神経細胞への分化成熟に対し寄与すると期待した。

腸管蠕動改善効果は増強されるか、増強の場合は、腸管組織へのSHED生着の増加や腸管組織の神経細胞の増加が得られているのか、またはその他の要因によるのか検討する。

3. 研究の方法

先行研究で腸管神経節細胞僅少症の疾患モデルマウスとして用いられたJF1/Msを用い、大建中湯投与群とコントロール食群に分け飼育、体重、摂餌量、便乾燥重量の観察、およびイベントの有無確認を行う。さらにそれぞれの群は、脱落乳歯歯髄幹細胞を11週齢に経静脈投与する群、投与しない群に分別し、観察を継続する。

各群は、24週齢もしくは35週齢以降で動物を犠牲死させ、犠牲死後、マウスの腸管を摘出し、生理化学的評価としてアセチルコリン等薬物や電気刺激に対する収縮活性を確認する。その後病理学的評価(神経節細胞の分布・数、絨毛高、炎症細胞浸潤・繊維化の有無等)、免疫組織学的評価(human Mitochondria antibody; ヒト特異的マーカー、HuC/D; 神経節細胞マーカー、Neurofilament M; 神経線維マーカー)を行う。

大建中湯が作用する、腸管の感覚神経終末でのTRPV1チャンネルの発現やCGRP分泌についても免疫組織学的、生化学的に評価する。

4. 研究成果

今回の研究に用いる予定であったJF1/Msについて、株式会社ツムラとの共同研究において、先行研究で認められたような腸管神経節細胞僅少症の臨床所見を呈さないものが多く、それらの腸管の病理組織検査では腸管神経節細胞数の減少が証明できなかった。飼育環境が異なる影響も考慮したが、自施設にて先行研究と同様の環境下で飼育・管理を行ったJF1/Msも、先行研究で得られた臨床像を認めなかった。そのためJF1/Msを使用しての当実験を続行するにあたり、疾患モデルマウスとしての再検証が必要となった。一方、腸管神経節細胞の減少および蠕動低下が顕著でない表現型でも、幹細胞移植や大建中湯は腸管蠕動運動に少なくとも悪影響は及ぼさないと考えられた。

JF1/Msは、デンマークで“日本の愛玩用マウス”として売られていたネズミを、1987年に三島市の国立遺伝学研究所に導入して育成された系統で、Ednrb遺伝子の自然発生変異(Ednrb/s)に起因する白斑が特徴とされる。主に遠位結腸で腸管神経支配とニューロン密度の減少を示すが、巨大結腸症状は示さないとされる。しかし、前述の株式会社ツムラとの共同研究にてJF1/Msの10.2%(n=49)に巨大結腸を呈した。これは雄に限定すると20%(n=20)に及んだ。

2つの神経堤由来の細胞系統が、異なる最小閾値レベルのEdnrb発現を必要とするといわれ、

腸管神経節ニューロンの正常な発達のためには、Ednrb の発現は野生型の約 12.5%で十分であるが、表皮メラノサイトの完全な発達には、野生型レベルの 25~50%が必要である可能性があるといわれる。Ednrb 遺伝子変異と表現型、特に巨大結腸症の発生については過去にも多く報告があるが、JF1/Ms は C57BL/6 と比較し、大きなゲノム多型性も指摘されており、JF1/Ms は腸管について表現型が個体ごとに異なる可能性が示唆された。

このマウスを腸管神経節細胞僅少症のモデルとして実験に用いる際の治療効果の評価にあたっては、腸管における表現型、つまり神経節細胞の減少および消失の頻度・確率の検討が必要である。さらに表現型による Ednrb の発現割合の検討も課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮田 潤子 (秋吉潤子) (Miyata Junko) (20380412)	九州大学・医学研究院・講師 (17102)	
研究分担者	小幡 聡 (Obata Satoshi) (30710975)	福岡大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	川久保 尚徳 (Kawakubo Naonori) (90711185)	九州大学・医学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	伊崎 智子 (Izaki Tomoko) (90423491)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	吉丸 耕一郎 (Yoshimaru Koichiro) (60711190)	九州大学・医学研究院・講師 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------