

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18167

研究課題名（和文）腸管神経叢内在ミニ腸を応用したヒルシュスプルング病類縁の病態解析

研究課題名（英文）Study for pathophysiological analysis of Hirschsprung's Disease using iPSC derived mini-gut

研究代表者

内田 孟 (Uchida, Hajime)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・小児外科系専門診療部・医師

研究者番号：30648697

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：腸管発生とともにヒト腸管神経叢の成り立ちを再現できる系を構築し腸管神経細胞の発生および機能不全を明らかにしていく。申請者は、試験で腸管神経細胞を有し蠕動運動、吸収や分泌能などのヒト腸管の機能を有する腸管オルガノイド（ミニ腸）の創生に世界で初めて成功した。ミニ腸分化誘導過程において、分化誘導開始から7日目ですでにPAX3、ZIC1やSOX10の神経細胞初期マーカーが発現し、14日目まで発現が認められた。今後は、臨床組織病態（腸管神経細胞の有無）が明らかな試料からの樹立と、一方でRET遺伝子などの疾患関連遺伝子のゲノム編集による機能低下モデルの作製も討していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管の希少疾患パイオモデルの構築から初期発生、消化管神経分化を模倣する分子プログラム追跡が可能となった。小児希少疾患の疾患機序解明とともに、創薬開発では革新的なin vitro試験系開発を促進させる。今後は、ミニ腸モデルでの検証でヒトin vitro臨床試験モデルの構築を目指す。

研究成果の概要（英文）：Our aim is to construct a system that can recapitulate human intestinal plexus as well as intestinal development, and elucidate the development and dysfunction of intestinal ganglions. Our group succeeded for the first time in the world in creating intestinal organoids (mini-guts), and have human intestinal functions such as peristalsis, absorption, and secretory capacity. In order to evaluate the slow peristalsis as much as possible, we found that the video evaluation by adding histamine is applicable as a method to select mini-intestines capable of peristalsis (mini-intestine-histamine challenge test). In the process of induction of mini-intestine differentiation, PAX3, ZIC1 and SOX10 early markers of crest cells were already expressed on day 7 from the start of differentiation induction, and their expression was observed until day 14 in the mini-gut development. We will develop the creation of loss-of-function models by genome editing of disease-related genes such as the RET gene.

研究分野：移植医療

キーワード：ヒルシュスプルング病 オルガノイド iPSC細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

代表的な先天性疾患であるヒルシュスプルング病は先天的に腸管壁の神経欠如に起因した腸管蠕動不全をきたし腸閉塞症状を呈する疾患であるが、病変の範囲が限定されておりその診断と治療法は確立されている。一方、ヒルシュスプルング病類縁疾患(H類縁)は直腸に神経節細胞が存在するにもかかわらずヒルシュスプルング病に類似した症状を呈する疾患で腸管神経の病理所見での分類と診断・治療方針が提唱されている(「ヒルシュスプルング病類縁疾患診療ガイドライン・実用版 2018年版(田口智章研究班)」。しかし、腸管神経細胞の数および機能の不全状態がなぜ引き起こされるか不明のままである。

申請者らは、培養ディッシュ内で腸管神経細胞を有し蠕動様運動、吸収や分泌能などのヒト腸管の機能を有する腸管オルガノイド(ミニ腸)の創生に世界で初めて成功した(Uchida H, et al. JCI Insight 2: e86492, 2017)。胎児期~乳幼児期の腸管発生を試験管内で再現することが出来る系であり、この培養システムを活用し腸管神経叢の生成と機能不全を明らかにしていく。なぜ腸管神経細胞の不具合が起こるのかに答えるには、腸管発生をベースに神経堤細胞から神経叢への発生を再現する系での解析を行うことが求められ、それがミニ腸であると確信している。

2. 研究の目的

ヒト臓器の中でも腸管は複雑な構造、機能を有しており再生医学分野の介入は容易ではない。腸管は内胚葉、中胚葉、外胚葉由来の細胞・組織より構成され個々の組織が密に連携し、消化吸収・代謝、腸管免疫、蠕動運動などを行っている。申請者らがヒト多能性幹細胞から作製するミニ腸は、LGR5陽性粘膜上皮幹細胞、内分泌細胞、Paneth(パネート)細胞、杯(ゴブレット)細胞やM細胞など生体腸の粘膜上皮系細胞を備えるだけでなく、平滑筋細胞、カハール介在細胞や腸管神経叢も有するヒト小腸組織構成に類似した組織構造を有する。本研究の目的は、腸管発生とともにヒト腸管神経叢の成り立ちを再現できる系を構築し腸管神経細胞の発生および機能不全を明らかにしていくことになる。ヒルシュスプルング病類縁疾患(H類縁)を例にとり、疾患iPS細胞およびゲノム編集による疾患ES細胞を作製しH類縁-ミニ腸疾患モデルを構築する。究極的には、腸管神経細胞の機能不全疾患に対し、患者自身の腸管内に内在する細胞を賦活かし腸管神経細胞の再生による新たな治療法の確立を目指す。

すでに、H類縁の疾患モデルiPS細胞の樹立に成功している。さらに、疾患モデルをより堅牢にするため、ヒトES細胞に対してRET遺伝子を標的にゲノム編集を行いアイソジェニック疾患モデルを構築し分子レベルで病態解明を行う。胎児期~乳幼児期の腸管発生を試験管内で再現するミニ腸作製システムを応用し、腸管発生をベースに神経堤細胞から神経叢への発生を再現する系での解析を行う。この研究アプローチは、申請者らのイノベティブな系であり、ヒト腸管疾患研究の展開に貢献できる新規的なパイオツールであり、治療法の開発を効果的にも行うことが可能となる。

3. 研究の方法

研究を具体的に、着実に遂行するために、研究対象疾患をヒルシュスプルング病類縁疾患およびヒルシュスプルング病とし疾患研究を行う。本研究にかかる臨床研究計画(「腸

に異常を有する疾患の疾患特異的 iPS 細胞による疾患モデルの作成、疾患解析および治療法開発に関する研究」) はすでに国立成育医療研究センター倫理委員会で承認を受けた(受付番号 927)。これまでにヒルシュプルング病類縁疾患およびヒルシュプルング病の iPS 細胞樹立に成功している。本研究計画は大きく 3 つのステージにより遂行される。

ヒルシュプルング病類縁(H 類縁)疾患 iPS 細胞からミニ腸作製

腸管神経発生可視化モデル構築

H 類縁蠕動薬剤反応性評価試験系構築: 難治性腸疾患治療法開発へ応用

【2019 年度】

H 類縁疾患 iPS 細胞由来ミニ腸作製:

H 類縁-iPS 細胞からミニ腸(H 類縁-ミニ腸)の作製をおこなう。これまで、世界的にも H 類縁由来の iPS 細胞を樹立した報告はなく、ましてや腸管への分化誘導系から解析した報告は一例もない。そのため、H 類縁-ミニ腸の初期発生過程から、神経堤細胞~腸管神経細胞群の分化動態を詳細に解析していく。樹立した H 類縁-ミニ腸では、アウエルバッハ神経叢、マイスナー神経叢や腸管神経細胞およびグリア細胞の免疫組織学的解析を行う。

腸管神経発生可視化モデル構築:

通常、腸管神経細胞は神経堤細胞由来とされている。笹井らは、実験モデルで未分化外胚葉から神経堤発生時に極めて初期から神経堤特異的に Foxd3 が発現してくることを明らかにした(Sasai N, et al. Development 2001)。ミニ腸作製初期から FOXD3 が発現しているのを確認済みであり、ヒト神経堤細胞マーカーである PHOX2B の発現可視化モデルを作製する。発現ベクターのデザインは、LGR-EGFP+PHOX2B-tomato として可視化 iPS 細胞を作製し、初期神経堤細胞発生を時系列的に評価する。

【2020 年度以降】

研究項目 および の研究を進める。特に、疾患でのヒト腸管初期発生-腸管神経創出過程を解析するため、H 類縁-iPS 細胞へ PHOX2B マーカーを導入し、対象 iPS 細胞とのでの遺伝子発現動態の比較試験を行っていく。これは、ミニ腸試験系があって初めて可能となる解析である。

H 類縁蠕動薬剤反応性-評価試験系構築:

まず H 類縁蠕動評価方法の構築である。申請らは、ミニ腸が蠕動運動関連物質(ヒスタミンと硫酸アトロピン)にそれぞれ反応することを確認している。さらに、前実験において、緩やかな蠕動運動を可及的に評価するため、さらに蠕動運動可能なミニ腸を選別する方法としてヒスタミン添加による動画評価が適応される(ミニ腸-ヒスタミンチャレンジテスト)ことを見出した。これらを基盤技術とするが、はたしてヒスタミンが H 類縁の蠕動評価に適切かどうかは大きな問題である。そのため、腸管神経叢の機能性とリンクした分子を抽出するとともに、これを化合物スクリーニング系として H 類縁-ミニ腸の蠕動運動を賦活化する化合物を探索していく。候補物質が H 類縁で機能する分子機序も解析し病態解明の一助にするとともに将来の治療薬候補へ繋げていく。

4. 研究成果

腸管発生とともにヒト腸管神経叢の成り立ちを再現できる系を構築し腸管神経細胞の発生および機能不全を明らかにしていく。ヒルシュプルング病類 疾患 (H 類)を例

にとり、疾患 iPS 細胞を作製し H 類 -ミニ腸疾患モデルを構築する。H 類 は直腸に神経節細胞が存在するにもかかわらずヒルシュスプルング病に類似した症を呈する疾患で腸管神の病理所見での分類と診治療方針が提唱されている。しかし、腸管神細胞のおよび機能の不全態がなぜ引き起こされるか不明のままである。申請者は、試管で腸管神細胞を有し蠕動運動、吸収や分泌能などのヒト腸管の機能を有する腸管オルガノイド(ミニ腸)の創生に世界で初めて成功した。ミニ腸が蠕動運動関連物質(ヒスタミンと硫酸アトロピン)にそれぞれ反することを確認している。緩やかな蠕動運動を可及的に評価するため、蠕動運動可能なミニ腸を選別する方法としてヒスタミン添加による動画評価が適応される(ミニ腸-ヒスタミンチャレンジテスト)ことを見出した。ミニ腸分化誘導過程において、分化誘導開始から7日目ですでに PAX3, ZIC1 や SOX10 の神経節細胞初期マーカーが発現し、14日目まで発現が認められた。今後は、臨床組織病態(腸管神経節細胞の有無)が明らかな試料からの樹立と、一方で RET 遺伝子などの疾患関連遺伝子のゲノム編集による機能低下モデルの作製も討していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Uchida Hajime, Sakamoto Seisuke, Kasahara Mureo, Ueno Yoshiyuki, Mochida Satoshi, Haga Hironori, Okajima Hideaki, Eguchi Susumu, Takada Yasutsugu, Umeshita Koji, Kokudo Norihiro, Egawa Hiroto, Uemoto Shinji, Ohdan Hideki, for the Japanese Liver Transplantation Society	4. 巻 34
2. 論文標題 An analysis of the outcomes in living donor liver transplantation for pediatric malignant hepatic tumors using nationwide survey data in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transplant International	6. 最初と最後の頁 1408 ~ 1421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tri.13924	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uchida Hajime, Sakamoto Seisuke, Shimizu Seiichi, Yanagi Yusuke, Fukuda Akinari, Horikawa Reiko, Ito Reiko, Matsunaga Ayako, Murayama Kei, Kasahara Mureo	4. 巻 25
2. 論文標題 Outcomes of liver transplantation for mitochondrial respiratory chain disorder in children	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Transplantation	6. 最初と最後の頁 e14091
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/petr.14091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uchida Hajime, Sakamoto Seisuke, Shimizu Seiichi, Takeda Masahiro, Yanagi Yusuke, Fukuda Akinari, Kasahara Mureo	4. 巻 51
2. 論文標題 Impact of prolonged clamping of the portal vein during liver transplantation in infants with biliary atresia: renewed interest in a long-standing issue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 1292 ~ 1299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-020-02212-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Kengo, Inoue Makoto, Machida Masakazu, Kawasaki Tomoyuki, Tsuruta Satoru, Uchida Hajime, Sakamoto Seisuke, Kasahara Mureo, Umezawa Akihiro, Akutsu Hidenori	4. 巻 3
2. 論文標題 Human Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids as a Model of Intestinal Xenobiotic Metabolism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 StemJournal	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/STJ-200001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuruta S, Uchida H, Akutsu H	4. 巻 3
2. 論文標題 Intestinal Organoids Generated from Human Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JMA Journal	6. 最初と最後の頁 9-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31662/jmaj.2019-0027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------