

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592091

研究課題名(和文)

ヒルシュスプルング病における神経堤幹細胞移植治療の可能性に関する研究

研究課題名(英文)

Investigation of neural crest stem cell therapy for Hirschsprung's disease

研究代表者

下島 直樹 (SHIMOJIMA NAOKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30317151

研究成果の概要(和文):

先天性の腸管神経系異常疾患であるヒルシュスプルング病およびその類縁疾患に対して、マウスおよびヒトの腸管を用いて腸管神経の起源である神経堤幹細胞を分離、回収し、これをヒルシュスプルング病モデル動物に移植してその生着、遊走、分化の能力を検証した。また、病因を明らかにする目的で、同疾患患児の血液を用いて網羅的な遺伝子解析を行い、発症のメカニズムに係る可能性のある関連遺伝子を探索した。

研究成果の概要(英文):

Hirschsprung's disease and allied diseases are congenital loss or abnormal development of enteric nervous system. We investigated a feasibility of neural crest stem cell transplantation as a novel therapy alternative to surgery. Neural crest stem cells are co-cultured with gut from Hirschsprung's disease model. Survival, migration, and differentiation of transplanted cells were investigated.

To clarify etiologies of these disease, genomic DNA is extracted and mutation analyses were carried out.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	300,000	90,000	390,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：先天性消化器疾患学、ヒルシュスプルング病

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒルシュスプルング病の原因はその起源である神経堤幹細胞の腸管における遊走障害という説があり、幹細胞側の因子として Ret, Ednrb、環境因子として Gdnf, Edn3 などが関係深いことが分かってきた。

(2) 神経堤幹細胞の分離、回収が 1999 年

に初めて報告され、これを用いた腸管神経の再生治療がヒルシュスプルング病の新たな治療戦略になりうると考えた。

(3) 我々の研究グループで開発した PO-Cre/floxP-CAT-CAG-EGFP マウスは、神経堤由来細胞が EGFP 陽性細胞として認識可能であるため、高効率に神経堤幹細胞の回収が可能であり、また移植後もレシピエント細胞

との区別を明確にできる点が独創性、有用性のいずれの面からも優れていると考えた。

2. 研究の目的

(1) マウスおよびヒトから神経堤幹細胞を分離、回収し、これを無神経節腸管に移植することで腸管神経の再生治療を行うこと。

(2) 再生治療を行う上で病因が幹細胞と環境因子のどちらにあるのかにより再生治療の戦略が異なることから、ヒルシュスブルグ病および類縁疾患患者の血液サンプルを用いて原因遺伝子の特定を行うこと。

3. 研究の方法

(1) P0 Cre/floxP-CAT-CAG-EGFP マウスの胎仔腸管より EGFP 陽性細胞を分離し、自己増殖能をもつ細胞塊 (sphere) の作成を行い、得られた sphere が多分化能を有するかを免疫染色を用いて検証する。

(2) 自己増殖能、多分化能を有する神経堤幹細胞を野生型マウスおよびヒルシュスブルグ病モデルマウスである Ret ノックアウトマウスの胎仔腸管と共培養し、細胞の生着、遊走、分化の能力を検証する。

(3) マウスの手法を応用して、ヒト腸管より同様に自己増殖能を有する sphere の作成を行い、多分化能の検証を行う。

(4) ヒルシュスブルグ病および類縁疾患の患児血液サンプルからゲノム DNA を抽出し、関連遺伝子探索を目的として次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を行う。

4. 研究成果

(1) P0 Cre/floxP-CAT-CAG-EGFP マウスより自己増殖能を有する sphere を得ることに成功した。また、神経、グリア、平滑筋の 3 系統への多分化能を確認した。

(2) 得られた神経堤由来細胞の sphere を野生型胎仔マウス腸管に移植すると、24 時間以内に細胞は腸管内に遊走を開始し、4 日後には網目状のネットワークを形成し、神経へ分化していることが免疫染色で明らかになった。本結果は 2nd International Symposium on Development of the Enteric Nervous System 他で発表した。

(3) ヒルシュスブルグ病モデルである Ret ノックアウトマウスの胎仔腸管にも同様の実験を行い、同じように移植した細胞が生着、遊走し、神経に分化する様子が観察された。本結果は Journal of Pediatric Surgery に発表予定。

(4) ヒト腸管からの sphere 作成を約 20 症例より行い、約 7 割の症例で回収に成功した。また、神経、グリア、平滑筋への多分化能も確認した。ヒルシュスブルグ病や類縁疾患においては、神経への分化に障害をもつ sphere が形成されることを発見し、病因にもつながら興味深い知見として 23rd International Symposium on Pediatric Surgical Research 他で発表した。

(5) ヒルシュスブルグ病の 3 症例について、関連遺伝子である Ret, Gdnf における変異の有無を解析したが、コーディング領域に機能欠損を起こすような変異は認めなかった。(4)での神経への分化障害が症例によって異なる結果になったことの考察は今後の課題として残った。

(6) ヒルシュスブルグ病類縁疾患である hypoganglionosis の患児 4 名と両親 2 名について、原因遺伝子探索目的に次世代シーケンサーを用いて all exon の解析を行った結果、両親にヘテロ、患児にホモの変異を認める劣性の遺伝形式における候補遺伝子は認めなかった。一方、患児全員に共通して変異が認められ両親には変異が認められない優性の遺伝形式における候補遺伝子を 2 つ認めている。本結果は第 41 回小児消化管機能研究会で発表した。

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 3 件)

1. Shibata S, Yasuda A et al., Sox10-Venus mice: a new tool for real-time labeling of neural crest lineage cells and oligodendrocytes. MolBrain. 査読あり 3:31, 2010,

2. 下島直樹, 森川康英: Hirschsprung 病 小児科診療 査読なし 2010 : 73 Suppl.: 644-646

3 . Nagoshi N, Shibata S et al. Ontogeny and multipotency of neural crest derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. Cell Stem Cell 査読あり 10;2(4), 2008, 392-403

〔学会発表〕(計6件)(国際学会のみ)

1 . Naoki Shimojima, Yasuhide Morikawa, Ryuhei Nishikawa, Shinsuke Shibata, Ryo Hotta, Atsuhiko Arisue, Hirofumi Tomita, Fumika Takasato, Masahiro Mori, Yuki Yamamoto, Yasushi Fuchimoto, Hiroto Hasegawa, Ken Hoshino, Narihito Nagoshi, Masaya Nakamura, Yumi Matsuzaki, James H. Okano, Hideyuki Okano : Isolation, proliferation, and differentiation of neural crest stem/progenitor cells from human gut in normal and motility disorder patients. The 4th Scientific Meeting of the Japan Hungary Surgical Society: 2010.11.19 Yokohama, Japan

2 . Naoki Shimojima, Yasuhide Morikawa, Ryuhei Nishikawa, Shinsuke Shibata, Ryo Hotta, Atsuhiko Arisue, Hirofumi Tomita, Fumika Takasato, Masahiro Mori, Yuki Yamamoto, Yasushi Fuchimoto, Hiroto Hasegawa, Ken Hoshino, Narihito Nagoshi, Masaya Nakamura, Yumi Matsuzaki, James H. Okano, Hideyuki Okano : Isolation, proliferation, and differentiation of neural crest stem/progenitor cells from human gut in normal and motility disorder patients 23rd International Symposium on Paediatric Surgical Research.: 2010.9.13 Tokyo, Japan

4 . Naoki Shimojima, Yasuhide Morikawa, Ryuhei Nishikawa, Shinsuke Shibata, Ryo Hotta, Hirofumi Tomita, Fumika Takasato, Masahiro Mori, Yuki Yamamoto, Yasushi Fuchimoto, Ken Hoshino, Narihito Nagoshi, Masaya Nakamura, Yumi Matsuzaki, James H. Okano, Hideyuki Okano Isolation, proliferation, and differentiation of neural crest stem cells from human gut. Pacific Association of Pediatric Surgeons 43rd Annual meeting 2010.5.26 Kobe, Japan

3 . Shimojima N, Morikawa Y, Nishikawa R, Shibata S, Hotta R, Nagoshi N, Fuchimoto Y, Hasegawa H, Hoshino K, Nakamura M, Matsuzaki Y, Okano HJ, Okano H. Investigation of novel cell replacement therapy for Hirschsprung's disease. XI International Small Bowel Transplantation

Symposium 2009.9.10 Bologna, Italy

5 . Shimojima N, Morikawa Y, Nishikawa R, Shibata S, Hotta R, Nagoshi N, Nakamura M, Matsuzaki Y, Okano HJ, Okano H. Migration, localization, and differentiation of neural crest-derived enteric neural precursor cells in aganglionic gut 7th Stem cell research symposium 2009.5.15 Tokyo, Japan

6 . Shimojima N, Shibata S, Hotta R, Nishikawa R, Nagoshi N, Okano HJ, Morikawa Y, Okano H. Investigation of neural crest stem cell therapy for Hirschsprung's disease 2nd International Symposium Development of the enteric nervous system: cells, signals, and genes 2009.2.24 London, England

〔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

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/surgery/ps/staff/studies.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

下島 直樹 (SHIMOJIMA NAOKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30317151

(2)研究分担者

森川 康英 (MORIKAWA YASUhide)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：90124958

岡野 栄之 (OKANO HIDEYUKI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：60160694

芝田 晋介 (SHIBATA SHINSUKE)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70407089

名越 慈人 (NAGOSHI NARIHITO)

慶應義塾大学・医学部・(助教)

研究者番号：10383837

(3)連携研究者

該当者なし