

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17593

研究課題名(和文) ヒルシュスブルグ病有神経節腸管における神経及び免疫細胞の相互発生制御機構の検証

研究課題名(英文) Investigating the wiring mechanisms of nerves and immune cells in the aganglionic segment of Hirschsprung's disease

研究代表者

武田 昌寛 (Takeda, Masahiro)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：50806164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は発生過程における神経系と免疫系の相互ワイヤリングに着目し、1)ヒルシュスブルグ病(以下H病)の腸管組織透明化による三次元イメージング法の構築、2)H病におけるM細胞の形態学的観察、3)腸管神経末端における解剖学的検証に焦点をあて検証を行った。H病マウスにおけるパイエル板は胎生期から出生7日までの期間いずれも極めて発達が未熟であり、形態学的観察が困難と結論付けた。また腸管神経系の解剖学的検証においては、ヒト検体を用い肛門部における腸管神経最末端の評価を行った。その結果、anorectal lineが腸管神経最終末端の基準線であることを確認し、新たな直腸粘膜生検法を確立するに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により報告した新たな直腸粘膜生検法は、神経系および肛門解剖に基づいた新たな手法である。特に本手法は、ヒルシュスブルグ病の病巣である無神経節腸管の肛門側の末端がどこまでかという、病態解明にも直結しており、ヒルシュスブルグ病の診断および病態の観点から学術的に有意義な研究成果であったと考えられる。更に病巣の範囲を明確に特定することで、これまで術後合併症として扱われてきた内肛門括約筋アカラジアの存在および解明にも将来的に貢献できると考えられる。また本手法の採用により、これまで世界的にも診断方法が多岐にわたるヒルシュスブルグ病において、診断率の向上が期待されることが社会的意義である。

研究成果の概要(英文)：This study focuses on the mutual wiring of the nervous and immune systems during development and conducts verifications by: 1) establishing a three-dimensional imaging method through tissue clearing of intestinal tissues in Hirschsprung's disease (HD), 2) morphological observation of M cells in HD, and 3) anatomical verification at the neural terminals of the rectum. It was concluded that the Peyer's patches in HD mice are extremely underdeveloped throughout the period from embryonic stages to 7 days postnatal, making morphological observations difficult. Furthermore, anatomical verification of the enteric nervous system was conducted using human specimens to evaluate the neural endpoints in the anal region. As a result, the anorectal line was confirmed as the baseline for the final endpoints of the intestinal nerves, leading to the establishment of a new rectal mucosal biopsy method.

研究分野：小児外科

キーワード：ヒルシュスブルグ病 腸管神経 腸管免疫 肛門解剖 anorectal line 直腸粘膜生検

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒルシュスブルグ病(以下H病)は無神経節腸管切除後にも難治性腸炎(以下H病腸炎)の合併率が低下せず、生命予後に関わる因子として、その病態解明が進められている。H病腸炎に関わる病態として、H病の有神経節腸管における神経細胞の未熟性やIgAの低下が示されてきたが、発生過程における神経系と免疫系に着目した研究は行われてこなかった。先天性疾患であるH病において、H病腸炎を代表とする有神経節腸管の病態解明には、その根幹を成す発生過程における形態学的異常の検証が有用であると考えた。

(2) H病関連腸炎の原因の一つとして、無神経節腸管の遺残が挙げられる。正常腸管神経の最終末端の指標であるanorectal lineが、H病の無神経節腸管の最終末端と一致する可能性に着目した。anorectal lineを指標とした新たな直腸粘膜生検を施行し、その有用性を検証する。

2. 研究の目的

(1) H病腸炎を含む、H病の有神経節腸管における病態解明を目的とし、本研究では、腸管神経系の発生過程を免疫染色することなく直接観察することが可能なH病蛍光イメージングモデルマウスを使用し、最新の蛍光イメージング技術(組織透明化とライブイメージング技術)を用いて、未だ解明されていないH病の腸管免疫系と腸管神経系の発生メカニズムを可視化し、新しい発生機構とそれに関わる因子を明らかにする。

(2) H病の病態である無神経節腸管の最終末端に着目することで、anorectal lineを使用した新たな直腸粘膜生検に着想した。これまで明確な指標のなかった直腸粘膜生検において、解剖学に基づいた客観的指標であるanorectal lineを使用した直腸粘膜生検により、診断率の向上およびその有用性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 腸管神経堤細胞マーカーであるSox10遺伝子に蛍光タンパクVenusを標識したマウスと、H病原因遺伝子であるエンドセリンレセプターBノックアウトマウスを用いた。この両マウスを交配しH病腸管神経系イメージングマウスでダイレクトに腸管神経系の発生を蛍光観察することが可能となる。3次元イメージングを行うにあたり、組織の伸縮が無く、蛍光タンパクが褪色しない、操作の簡便さに重点を置き、SeeDB法を選択した。顕微鏡は共焦点顕微鏡を使用し、2mm程度の深度でタイリングイメージングによる広い視野での腸管神経、免疫細胞の位置関係が明瞭に可視化できるようなイメージング方法を確立する。回腸の腸管神経細胞と免疫細胞の発達を蛍光イメージング法により経時的変化を追う。共焦点レーザー顕微鏡で撮影した断層像を三次元画像処理ソフトImaris (bitplane社)にて立体構築処理、形態分析を行う。

(2) 临床上、H病が疑われた症例を対象に全身麻酔下直腸粘膜生検を施行。生検検体はanorectal line直上に1箇所、更にその口側で1箇所の計2か所の採取を行った。切除検体は術中迅速病理にて診断に十分な組織量があるかを確認し、その後HE染色、アセチルコリンエステラーゼ染色にて診断を行った。病理結果がaganglionosisであった場合H病と診断する。anorectal line直上の1箇所目の生検結果がhypoganglionosisで、口側の2箇所目の検体がnormoganglionosisであった場合、physiologic hypoganglionosisとして経過観察の方針とした。1箇所目の生検結果がhypoganglionosisで、口側の2箇所目の検体がhypoganglionosisであった場合、pathologic hypoganglionosisと診断し、臨床経過、造影結果を考慮の上、H病と同

様のpull-through手術の方針とした。本手法による診断率、再生検率および診断チャートによる結果を後方視的に検証した。

4. 研究成果

(1) 当初、胎生15日、18日、出生0日における評価を行うこととしていたが、対象となるコントロールマウスのパイエル板が極めて小さくかつ、再現性のある検体採取法の確立は困難であることが判明した。その後、出生7日、14日、21日と体格が大きくなるにつれパイエル板の発達は著しく、回腸およびパイエル板をSeeDB法および蛍光シグナル保持に優れたScale S法を同時に行い、透明化ホルマウント検体で三次元イメージング法により視覚化に成功した(図1)。その後、コントロールマウスのパイエル板において未熟神経マーカーであるPSA-NCAM陽性の神経線維を確認するも、TUJ1(成熟神経マーカー)の描出は困難であった(図2)。またH病マウスにおけるパイエル板は胎生期から出生7日までの期間いずれも極めて発達が未熟であり、神経線維および免疫系細胞の観察は困難であった。今回の胎児期から出生初期の日齢では免疫細胞の発現を確認することが困難であった。免疫系細胞と神経発生の過程を更に追跡し関連を解明する必要がある。

図1

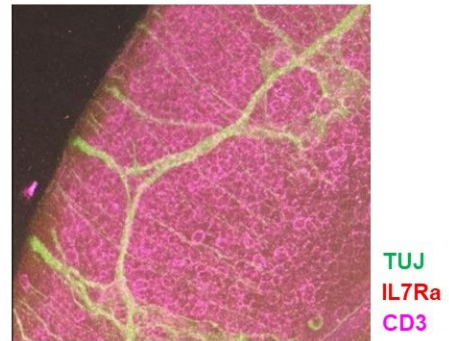
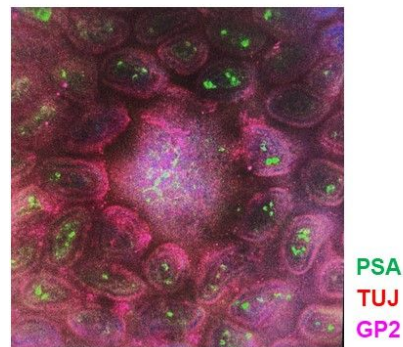


図2



(2) 2か所の検体採取を行った症例(2-ARL)は54例。内、31例(57.4%)がnormoganglionosis、19例(35.2%)がaganglionosis、4例(7.4%)がhypoganglionosisの診断であった。またnormoganglionosisとaganglionosisと診断された症例では、2箇所検体の診断結果は全て一致していた($\kappa=1.0$)。この結果を受け、以降の症例では検体採取箇所を原則anorectal line直上の1箇所のみとする方針とした(1-ARL)。術中迅速にてhypoganglionosisと診断された際は、2-ARL同様に更に口側の検体を採取し、physiologic hypoganglionosis(anorectal line直上: hypoganglionosis, 口側: normoganglionosis)かpathologic hypoganglionosis(2検体ともhypoganglionosis)かの診断を行った。1-ARLは36例。内、17例(47.2%)がnormoganglionosis、17例(47.2%)がaganglionosis、2例(5.6%)がhypoganglionosisの診断であった。本手法により、診断のために再度直腸粘膜生検を要した症例は認められなかった。Normoganglionosisと診断された全症例は、その後、保存的加療で症状の改善を認めた。Aganglionosisと診断された症例はH病として全例根治術を施行。切除検体からも診断はH病であった。Pathologic hypoganglionosisと診断された2例は症状が重篤であり、根治術を施行。切除した直腸全体がhypoganglionosisであり、術後症状の改善を認めた。Physiologic hypoganglionosisと診断された4例は保存的加療により症状の改善を認めた。本手法の導入により原則1つの検体で、肛門感覚神経に重要なanorectal line肛門側のanal transitional zoneの損傷を避けることができ、またvery short type H病の診断を、見逃すことなく確実に行うことが可能となった。また生検結果がhypoganglionosisであった場合、physiologic hypoganglionosisもしくはpathologic hypoganglionosisかの鑑別を可能とする新たなフローチャートを作成し、その有効性を示した。本手法の導入によりH病の診断率は向上し、再検査率の減少が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeda Masahiro, Ochi Takanori, Koga Hiroyuki, Tsuboi Koichi, Arakawa Atsushi, Lane Geoffrey J, Yamataka Atsuyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Biopsy diagnosis of Hirschsprung's Disease using a single excisional biopsy based on the anorectal line.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Pediatric Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/a-2065-9071	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 武田昌寛
2. 発表標題 Anorectal lineを基準とした直腸粘膜生検(単一検体)によるHirschsprung病診断の有用性の検証
3. 学会等名 第59回 日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masahiro Takeda
2. 発表標題 Single submucosal excisional rectal biopsy using the anorectal line heralds a new era for diagnosing Hirschsprung's disease.
3. 学会等名 International Paediatric Colorectal Club Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masahiro Takeda
2. 発表標題 Diagnosing Hirschsprung's disease with a single excisional submucosal rectal biopsy using the anorectal line
3. 学会等名 The 54th Annual PAPS Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------