

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21526

研究課題名（和文）疾患変異を修復された内在性幹細胞の組織再建能の検証

研究課題名（英文）Regenerative capacity of intrinsic stem cells subjected to disease-causing gene mutations

研究代表者

榎本 秀樹（Enomoto, Hideki）

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：00360511

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、先天性疾患における組織欠損を内在性幹細胞を用いて修復可能かを検証する実験を行なった。疾患モデルとして、神経幹細胞の異常により腸の神経欠損が起こるヒルシュスブルグ病（HSCR）に焦点を当てた。HSCRを誘導する優勢阻害型遺伝子変異を条件的に除去できる形で遺伝子改変したマウスを作製した。このマウスにおいて発生の各段階で神経幹細胞における遺伝子変異を除去したところ、変異を除去された幹細胞による神経再生が観察された。この結果は、疾患誘導変異を修復すれば内在性幹細胞が組織修復・再生を行えることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性HSCRの克服を目指し、ES細胞やiPS細胞由来から誘導された腸管神経前駆細胞を腸管に移植する細胞補充療法の開発が始まっている。しかし、難治性HSCRでは、細胞を移植すべき腸管が極めて長いことに加え、移植した細胞が生後の腸に生着しにくいという大きな問題を抱えている。本研究では、内在性の腸管神経幹細胞を治療すれば組織再生が誘導されることが明らかとなり、HSCRの新規治療法として内在性幹細胞の応用が有用な戦略になり得ることが示された。また、この結果は、他の先天性疾患でも同様のことが起こり得る可能性を示唆しており、先天性疾患の治療法に新たな可能性を提示する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated the tissue regeneration capacity of intrinsic stem cells in congenital diseases. As a model system, we chose to examine Hirschsprung disease (HSCR). HSCR is characterized by the congenital absence of the enteric ganglia in the distal gut and caused by dysfunction of enteric neural stem cells. We generated a HSCR mouse model in which a disease causing mutation can be removed in a conditional fashion. We found that, after removal of the mutation, enteric neural stem cells participated in neurogenesis, which led to regeneration of the enteric nervous system. These findings demonstrate that, once the disease causing mutation is eliminated, intrinsic stem cells can contribute to the regeneration of tissues and prevent tissue loss.

研究分野：神経発生

キーワード：先天性疾患 組織欠損 内在性幹細胞 遺伝子変異 ヒルシュスブルグ病

1. 研究開始当初の背景

奇形を伴う先天性疾患は、幹細胞の異常に起因する組織形成不全が大半をしめる。これら疾患群の治療については、生後に欠損部位の補填・修復を行うことが現段階で行われる唯一の治療法となっているが、欠損が広範な場合には修復に限界があり、満足な治療効果が得られていない。このような背景の中、近年の診断技術の進歩やゲノム編集技術の著しい発展を鑑みると、近未来的には、胎児期に幹細胞の遺伝子修復を行って組織発生の正常化を誘導する新しい再生医療の創出が期待される。組織幹細胞とその派生細胞には自律的に組織を形成する自己組織化能があり、生理的環境下に存在する内在性幹細胞を利用して組織形成を回復させる試みは生理的な意味合いでも理にかなっている。一方、ここで検証されなければならない課題は、病的な幹細胞は原因遺伝子の修復により自律的組織形成能を再獲得できるかという問題である。

2. 研究の目的

本申請では、疾患モデルマウスを用い、内在性神経幹細胞の修復により神経系がどの程度再構築可能かについて明らかにしていく。疾患としては先天性の腸管神経幹細胞の異常により広範に神経欠損を起こす難治性ヒルシュスプルング病 (HSCR) に焦点をあてる。このモデルマウスで一部の神経幹細胞の正常化を行い、修復神経幹細胞により腸管神経系が正常に形成されるかを解明する。

3. 研究の方法

腸管神経系の発生に必須のシグナル受容体 RET の優勢阻害変異体 (Ret S811F) の cDNA を loxP 配列で挟み、その下流に mCherry cDNA を持つ遺伝子カセットを Ret プロモーター下に挿入した条件的 Ret S811F マウスを作製した。このマウスにおいて、Cre を用いてマウスの発生過程および生後のさまざまな時期でさまざまな程度の内在性神経幹細胞の遺伝子修復 (Ret S811F の除去) を行い、HSCR フェノタイプが救済される程度を組織学および生理学的解析で評価した。

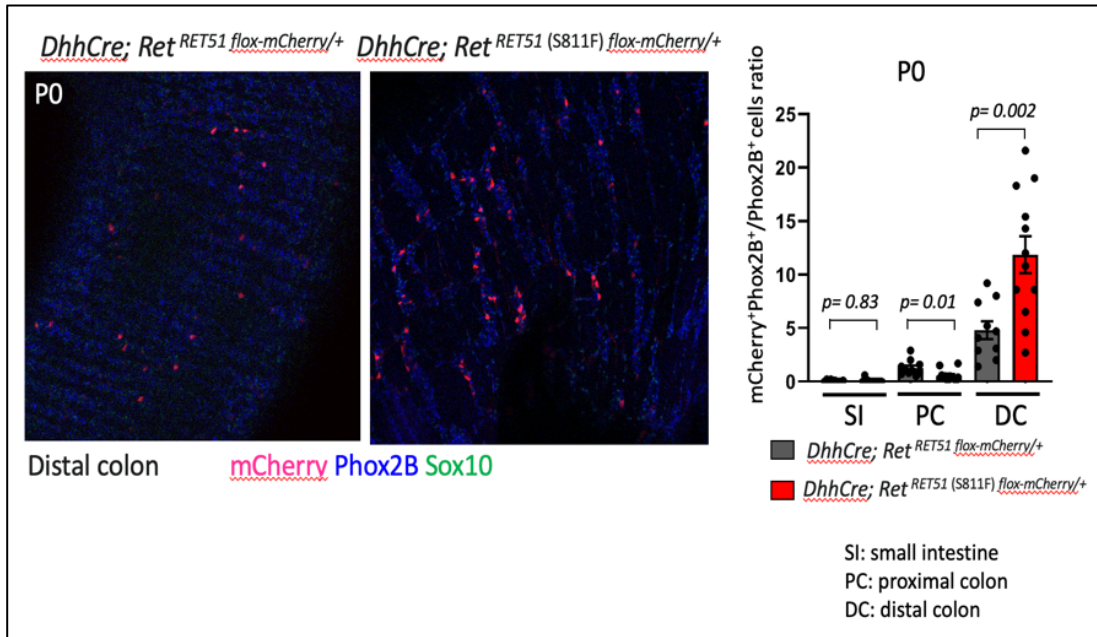
4. 研究成果

作製した条件的 Ret S811F マウスは、変異タンパクの優勢阻害作用により HSCR 同様の腸管神経系欠損を呈した。このマウスを腸管神経前駆細胞特異的 Cre マウスと交配すると、腸管神経欠損が回避された。形成された腸管神経系の細胞は、mCherry を発現していた。すなわち、疾患誘導変異である Ret S811F の除去により神経幹細胞が神経再生を行えることが示された。さらにこの系を用い、腸管神経系の起源である迷走神経堤細胞の一部(Phox2B-CreERT2)およびシュワン細胞前駆細胞(Dhh-Cre)でそれぞれ Ret S811F の除去を行なった。その結果、シュワン細胞前駆細胞における遺伝子修復で腸管神経系が安定して再生されることが明らかとなった (図)。シュワン細胞前駆細胞による神経形成は主に生後に起こるため、この結果は、HSCR において出生後にシュワン細胞前駆細胞の遺伝子修復を行えば腸管神経系の再生が起こる可能性が示された。

本研究結果は、さまざまな先天性疾患における組織欠損の回避に内在性幹細胞が応用可能であることを示唆しており、再生医学や周産期医療に新規洞察を与える。

図：シュワン細胞前駆細胞による腸管神経再生

写真右は修復を受けたシュワン細胞前駆細胞から生まれたニューロン(赤)。左はコントロール。グラフでは腸管各部位での神経形成の定量データを示す。遺伝子変異修復を受けたシュワン細胞前駆細胞は大腸末端で活発な神経形成を行い腸管神経を再生する(グラフの赤いバー)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okamoto Mitsumasa, Uesaka Toshihiro, Ito Keisuke, Enomoto Hideki	4. 巻 8
2. 論文標題 Increased RET Activity Coupled with a Reduction in the <i>RET</i> Gene Dosage Causes Intestinal Aganglionosis in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0534-20.2021	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 Uesaka Toshihiro, Okamoto Mitsumasa, Nagashimada Mayumi, Tsuda Yoshihiro, Kihara Miho, Kiyonari Hiroshi, Enomoto Hideki	4. 巻 69
2. 論文標題 Enhanced enteric neurogenesis by Schwann cell precursors in mouse models of Hirschsprung disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2575 ~ 2590
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/glia.24059	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 Nakatani Taichi, Iwasaki Mitsuhiro, Yamamichi Atsuhiko, Yoshioka Yuta, Uesaka Toshihiro, Bitoh Yuko, Maeda Kosaku, Fukumoto Takumi, Takemoto Tatsuya, Enomoto Hideki	4. 巻 62
2. 論文標題 Point mutagenesis in mouse reveals contrasting pathogenetic effects between MEN2B and Hirschsprung disease associated missense mutations of the <i>RET</i> gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 214 ~ 222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12664	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 Sunardi Mukhamad, Ito Keisuke, Sato Yuya, Uesaka Toshihiro, Iwasaki Mitsuhiro, Enomoto Hideki	4. 巻 15
2. 論文標題 A Single RET Mutation in Hirschsprung Disease Induces Intestinal Aganglionosis Via a Dominant-Negative Mechanism	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1505 ~ 1524
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcmgh.2022.12.003	査読の有無 無
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 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 榎本秀樹
2. 発表標題 腸管神経の発生・病理・再生
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榎本秀樹
2. 発表標題 Function of Schwann cell precursors as autonomic neural stem cells
3. 学会等名 The International Society for Stem Cell Research (ISSCR) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榎本秀樹
2. 発表標題 組織幹細胞としてのシュワン細胞の機能 発生・病理・再生医療の観点から
3. 学会等名 日本再生医療学会総会
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
---------	---------