

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592280

研究課題名（和文）組織工学を活用した神経堤幹細胞によるヒルシュスプルング病に対する治療戦略

研究課題名（英文）New treatment strategy for Hirschsprung's disease with neural crest stem cells by tissue-engineering

研究代表者

金廣 裕道 (KANEHIRO HIROMICHI)

奈良県立医科大学 医学部 准教授

研究者番号：30204580

研究成果の概要（和文）：ヒルシュスプルング病に対する治療戦略を考慮するに、その準備実験として、三次元立体培養を用いた iPS 細胞の腸管神経系への分化誘導研究を行った。iPS 細胞を懸垂培養して胚葉体を形成し、付着培養に移行することにより、蠕動運動能を有する神経ネットワークを含んだ腸管に特有の三胚葉系を有する腸管臓器を分化誘導することができた。本研究はヒルシュスプルング病という疾患治療を目標とすると、疾患由来という特性を生かすことのできる iPS 細胞から腸管が誘導可能であったことが大変重要な発見であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：For a new treatment strategy for Hirschsprung's disease, we tried to performe the differentiation from induced pluripotent stem cells to enteric nervous system using the three-dimensional culture. We demonstrate that mouse iPS cells have the ability to organize a gut-like organ with motor function in vitro by three-dementional culture. A gut-like organ was composed of all the enteric components of three germ layers. When this study aims for treatment of Hirschsprung's disease, it was very important discovery to organization of functional gut including the nervous system from iPS cells which have a disease-specific characteristic.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、再生医学、幹細胞、細胞・臓器移植

## 1. 研究開始当初の背景

ヒルシュスプルング病は、腸管神経節の欠損と運動機能低下から巨大結腸症をきたす疾患で、神経堤幹細胞の遊走機能に関わる遺伝子の異常が原因であるとされ、いわゆる神経堤症といわれている。これまでに ES 細胞から腸管分化誘導が可能で、神経栄養因子である GDNF、BDNF を添加することにより、神経堤幹細胞が分化誘導できることが分かっている。そこで遊走能を有する神経堤幹細胞を選択し、さらに組織工学の技術を活用してシート状にして移植することにより、効率よく治療に貢献できると考え、研究を計画した。

## 2. 研究の目的

神経堤幹細胞の中で遊走能の高いものを抽出した上でシート状にすることにより腸管神経系の緻密な神経ネットワークを *in vitro* で再現することを目標とし、さらに最終的にヒルシュスプルング病モデルマウスに移植を行うことを考慮すると、ES 細胞ではなく、疾患特異的にも対応可能な iPS 細胞を用いて、研究を行うことが必要であると考えられた。

まずは、iPS 細胞から蠕動運動能を有する腸管特異的な三胚葉系を有した腸管神経系への分化誘導に関する研究を行うことが必要と考えられた。

## 3. 研究の方法

iPS 細胞を含む培養液を培養皿の蓋に吊り下げて行う懸垂培養系で、iPS 細胞は重力の影響で培養液の先端に凝集し、胚葉体を形成する。この胚葉体を付着培養系に移して培養をおこない、蠕動運動能を有する腸管特異的な三胚葉系の細胞を有する腸管臓器の分化誘導をおこなった。さらに、形態学的、解剖学的な解析を行った。

## 4. 研究成果

iPS細胞は重力の影響を受けて、培養液の先端に凝集し胚葉体を形成する。懸垂培養を 6 日間行った胚葉体を用いて付着培養を行うと、約 7 日目に心筋細胞の収縮リズムとは異なり、不規則なリズムで自動収縮する 3 次元ドーム状の組織を認めるようになる。約 10

日目になると管腔状にも形態変化し、約 14 日目になると規則正しいリズムで自動運動するようになる。約 21 日目になると規則正しい自動運動に加えて、大きく波打つような搾り出す動き（蠕動様運動）が観察されるようになる。iGutを解剖学的に解析すると、個体の腸管と同様、内側から内胚葉由来のGoblet細胞やTuft細胞を含み、表面に微絨毛を有した粘膜上皮細胞が配列し、その外側中胚葉由来の平滑筋細胞やICC、最外層や腸管外側に外胚葉由来の神経線維ネットワークの順に一定の秩序で同心円状に配列しており、三胚葉系の組織を有する三層構造を呈した臓器としての腸管であった。ヒルシュスブルグ病に対する治療という目標を考慮すると、iPS細胞から腸管分化誘導が可能であるということは大変重要な発見であると考えられる。これらの研究成果は、Ueda T, Yamada T et al: Generation of functional gut-like organ from mouse induced pluripotent stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2010;391:38-42. で報告した。

##### 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. Generation of functional gut-like organ from mouse induced pluripotent stem cells. Ueda T, Yamada T Kanehiro H, Nakajima Y et al: Biochem Biophys Res Commun. 2010;391:38-42.
2. iPS細胞から蠕動運動する腸管の作成. 植田 剛, 中島祥介. 感染・免疫・炎症 2010;40:80-82.
3. 腸管再生医療の現状と展望-iPS細胞からの腸管再生-. 植田 剛, 中島祥介 大腸癌フロンティア 2010;3:75-79.

[学会発表] (計 2 件)

1. 金廣裕道、山田高嗣、植田剛、中島祥介 ES細胞を用いた神経堤幹細胞の分化誘導法の検討 第47回日本小児外科学会 (2010年愛知)
2. 金廣裕道、山田高嗣、中島祥介 多能性幹細胞を用いた腸管分化誘導法の開発 (2010年愛知)

[図書] (計 1 件)

1. 人工多能性幹(iPS)細胞から蠕動運動する人工腸管(iGut)への臓器分化誘導と再生医療への展望. 植田 剛, 山田高嗣, 小山文一, 金廣裕道, 中島祥介. 分子細胞治療フロンティア 2010;215-221.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：人工腸管の作成法

発明者：山田高嗣

権利者：奈良医大

番号：2009-139271

出願年月日：2009年6月10日

国内外の別：国内、

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金廣 裕道 (KANEHIRO HIROMICHI)

奈良県立医科大学 医学部 准教授

研究者番号：30204580

### (2) 研究分担者

山田 高嗣 (YAMADA TAKATSUGU)

奈良県立医科大学 医学部 助教

研究者番号：20316061

植田 剛 (UEDA TSUYOSHI)

奈良県立医科大学 医学部附属病院

研究員

研究者番号：40526810