

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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791735

研究課題名（和文） 消化管運動障害に対するカハールの介在細胞の再生医療

研究課題名（英文） Regeneration of Interstitial cells of Cajal for gastrointestinal motility disorder.

研究代表者

森 昌玄 (MORI MASAHARU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00445389

研究成果の概要（和文）：消化管運動の維持には、腸管平滑筋、腸管神経と並んで、消化管のペースメーカー細胞と呼ばれるカハールの介在細胞の存在が不可欠である。カハール細胞の障害による消化管運動障害を来す疾患はヒルシュスプルング病や糖尿病、炎症性腸疾患など種々のものが知られている。これらの疾患ではカハール細胞の再生により消化管運動の回復が期待される。今回の研究で、マウス骨髄中の非血球系の幹細胞である間葉系幹細胞から、形態学的にカハール細胞と思われる細胞へ分化させることに成功した。

研究成果の概要（英文）：Interstitial cells of Cajal (ICC) that work as pacemaker cells in gut play important roles in autonomic gut motility as well as intestinal smooth muscles and nerves. It has been reported that the number of ICC is decreased in various conditions such as Hirschsprung's disease, diabetes mellitus, and inflammatory bowel disease. It is expected that regeneration of ICC improve gut motility in such conditions. In this study, we succeeded to differentiate murine bone marrow mesenchymal stem cells into cells that were morphologically compatible with ICC in either optical and electron microscopy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：カハール，腸管運動，再生，間葉系幹細胞，移植

1. 研究開始当初の背景

カハールの介在細胞 (Interstitial cells of Cajal, ICC) は slow wave と呼ばれる電気活動により腸管運動を統制する消化管の

pacemaker 細胞である。この ICC が障害されると、腸管の協調運動が破綻し、消化管内容を効率的に肛門側へ送り出すことができなくなる。Hirschsprung 病やその類縁疾患

で神経と共に障害されているとの報告もあり、その他糖尿病の際の胃麻痺や、虚血再灌流障害時、Mechanical ileus、炎症性腸疾患でも ICC が障害されることがわかっている。

ICC に関する研究は機能解明と共に発生学的起源が議論されてきた。すなわち、腸管神経と同じ神経堤幹細胞 (Neural Crest Stem Cells, NCSCs) 由来なのか、間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell, MSC) 由来なのかというものである。“うずらの vagal neural crest を鶏胚に移植したところ鶏胚由来の ICC が出来た” (Lecoin et al. 1996) や “NCSCs migration 到達前の腸管を摘出して培養したところ、腸管神経は発生せず、ICC は発生した” (Young et al. 1996) という報告など、MSC 起源説を強力に支持する証拠となったが、その後も直接的に MSC が起源であることを証明する報告には至らなかった。

その後近年になって、全骨髄の移植によって ICC (と考えられる細胞) に分化させることが出来たという報告 (Ishii et al. 2009, Liu et al. 2010, Li et al. 2011) が散見されるようになった。これらの報告はいずれも、1990 年代までの MSC 有力説と合わせて、移植した骨髄中の MSC が ICC に分化したのであると結論づけているが、現在まで MSC から ICC への分化を直接的に証明した報告は存在しない。

2. 研究の目的

ICC の障害に起因する種々の腸管運動障害を ICC の再生医療を用いて治療することを最終的な目標に、その 1st step として、MSC から ICC への分化を直接的に証明することを今回の研究の目的とした。

3. 研究の方法

体細胞全てが green fluorescent protein (GFP) 陽性の EGFP mouse 骨髄から、PDGFR (+)、Sca-1 (+) を利用して flowcytometry にて MSC を採取する (Morikawa et al. 2009) ことから始める。こうして得られた MSC を二つの実験系で移植することを試みる。

(1) ex vivo co-culture (共培養実験)

得られた MSC を 3 週間ほど浮遊培養することで neuro sphere 同様の MSC sphere (幹細胞の持つ自己増殖能により形成される MSC 細胞塊) を形成させる。一方、共培養の相手 (recipient) として、WT mouse や W/Wv mouse (c kit タンパクをコードする locus W の mutation により ICC が極端に減少した model mouse) から腸管組織片を摘出し、粘膜・粘膜下層を剥離した「筋状片」を作成する。こ

れらを culture dish 上で接触させて 1 週間ほど共培養した後、固定・染色し、共焦点レーザー顕微鏡及び電子顕微鏡で観察・評価した。(図 1.)

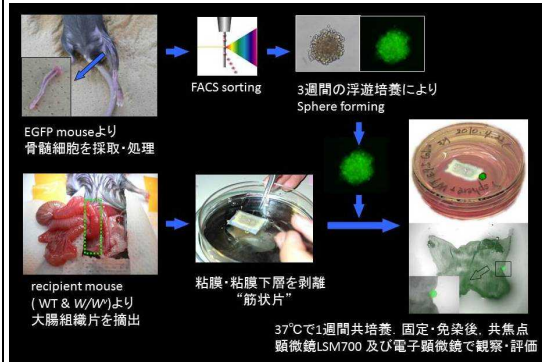


図 1. 共培養実験手順

(2) in vivo bone marrow transplantation (骨髄移植実験系)

flowcytometry にて採取した MSC を、Ly5.1 mouse (体細胞全てが CD45.1 にて識別可能) より採取した血球系幹細胞 (Hematopoietic stem cells, HSC) と、前処置・移植後の当分の生存に必要な各分化細胞を WT mouse からそれぞれ採取。8.5Gy の全身照射にて全処置を施した、Adult の WT mouse や W/Wv mouse に、経静脈的に投与する。約 6 ヶ月間飼育後、sacrifice し腸管を固定・染色し共焦点レーザー顕微鏡にて観察・評価した。(図 2.)

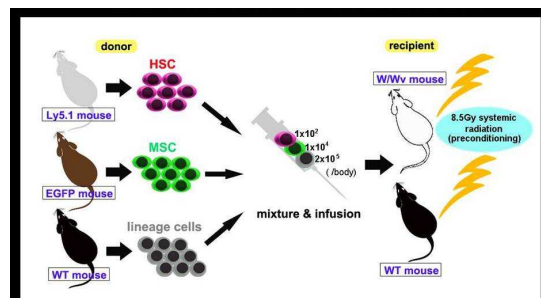


図 2. 骨髄実験プロトコール

4. 研究成果

(1) ex vivo co-culture (共培養実験)

WT mouse との共培養

GFP 陽性の移植 MSC 由来細胞が腸管組織片内へ migrate する様子が観察された。それらの細胞のうち一部は、ICC marker である AIC と共陽性を示した。(図 3.)

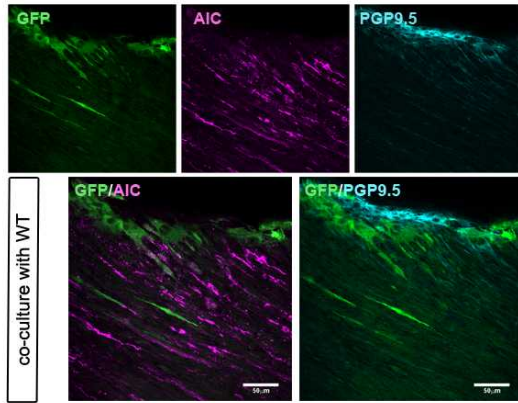


図 3. WT mouse との共培養
W/Wv mouse との共培養
WT 同様、W/Wv mouse との共培養でも、MSC 由来細胞の組織内 migration、AIC 共陽性化が認められた。(図 4.)

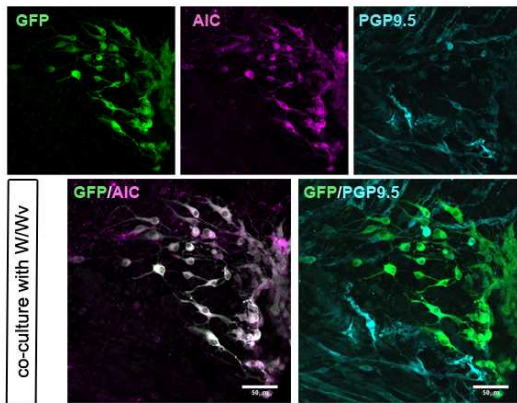


図 4. W/Wv mouse との共培養

定量解析

Sphere を接触させた組織片辺縁から組織片内へ migrate した距離の最大値 (mix migrating distance) と GFP 陽性細胞のうちの AIC と共陽性を示したものの割合 (double positive ratio) を検定したところ、両パラメータにおいて有意差を認めた。(図 5.)

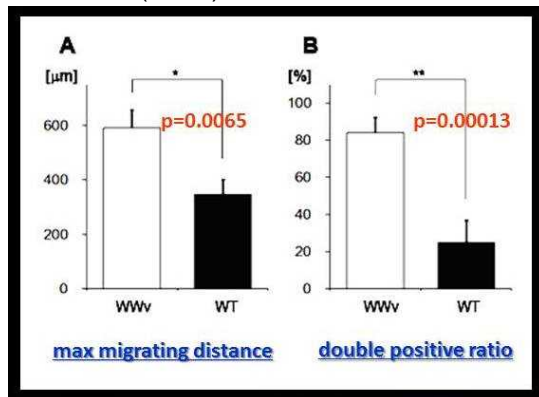


図 5. 定量解析

強拡大像

Migration、AIC 陽性率の高かった W/Wv mouse との共培養検体について高倍率 (x630) で観察した。共陽性を示した移植 MSC 由来細胞は、複数の突起構造を有しており、その突起を介して共陽性細胞どうし、nateivenauron 細胞と接しており、network 形成が示唆された。また共陽性細胞の一部は myenteric plexus と思われる神経細胞体の密集した部位の近傍まで migration していることが示された。これらの特徴は ICC の光学顕微鏡的特徴に一致した。(図 6.)

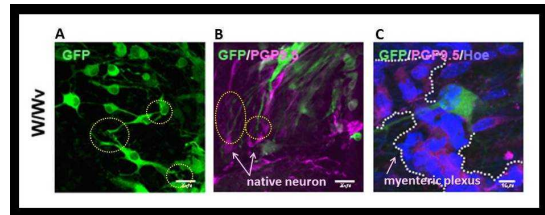


図 6. 強拡大像 (図中緑で示す細胞は AIC と共陽性を示すことが確認されたもので、図 4. まででは白で示した細胞だが、便宜上緑で示した。)

免疫電子顕微鏡所見

同じく W/Wv mouse との共培養検体において、移植 MSC 由来細胞質中の GFP を nanogold で標識した免疫電子顕微鏡観察をしたところ、それらの細胞は、細胞質にミトコンドリアや intermediate filament を豊富に含んでおり、ICC の電子顕微鏡的特徴に一致した。(図 7.)

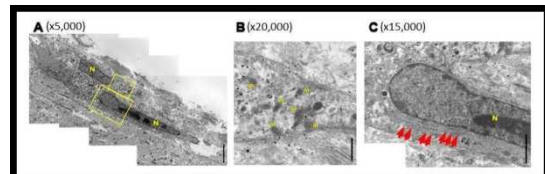


図 7. 免疫電子顕微鏡所見 (図中「M」はミトコンドリア、赤矢印は intermediate filament)

(2) in vivo bone marrow transplantation (骨髄移植実験系)

WT mouse への骨髄移植

移植 MSC 由来の GFP 陽性細胞は紡錘形をしており、AIC と共陽性を示した。(図 8.)

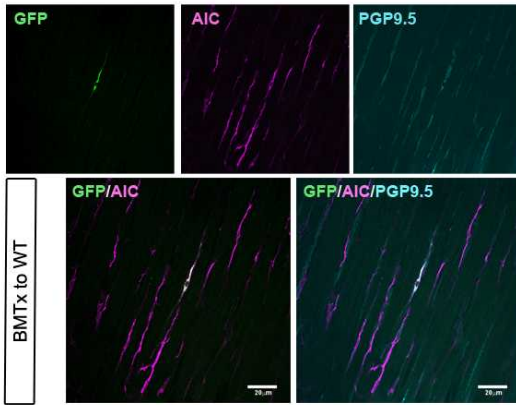


図 8. 骨髄移植された WT mouse 腸管

W/Wv mouse への骨髄移植

紡錘形の細胞体に複数の突起構造を有する GFP 陽性細胞が myenteric plexus 周囲に存在し、AIC と共陽性を示した。(図 9.)

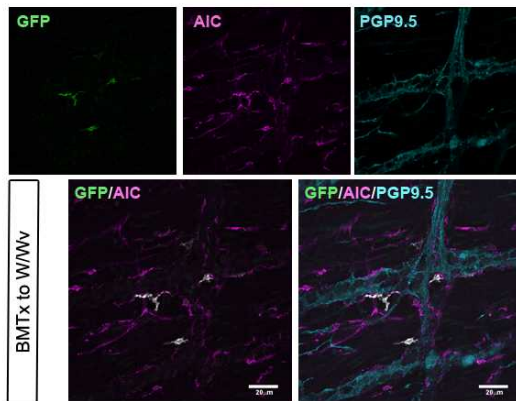


図 9. W/Wv mouse への骨髄移植

以上の結果から、mouse 骨髄より flowcytometry により採取した MSC を、共培養・骨髄移植することで、移植先への生着が認められ、ICC marker である AIC 陽性を呈すること、また光学顕微鏡的・電子顕微鏡的に ICC としての特徴を有していることが証明でき、ICC への分化を証明することが出来た。

今後の課題としては、この細胞の機能的な評価 (すなわち slow wave の証明など) や、ICC 障害 model mouse への移植と機能回復の確認、human 検体での同様な (この場合手術 sample との共培養) などが考えられる。

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 0 件)

(これまでの成果を現在投稿準備中)

[学会発表](計 3 件)

森昌玄 Mesenchymal Stem Cell transplantation from murine bone marrow differentiated into ICC marker positive cells. (The 3rd International Symposium on the Development of the Enteric Nervous System: Cells, Signals and Genes 2012.3.26 香港)

森昌玄 間葉系幹細胞を用いたカハール細胞再生の試み (第48回 日本小児外科学会総会 2011.7.20 東京)

森昌玄 間葉系幹細胞によるカハール細胞再生医療の試み (第41回 小児消化管機能研究会 2011.2.26 東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 昌玄 (MORI MASAHARU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00445389