

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10922

研究課題名(和文) ヒト乳歯歯髄幹細胞によるヒルシュスプルング病類縁疾患に対する新規再生医療の開発

研究課題名(英文) Novel Therapy for Allied Disorders of Hirschsprung disease using Stem cells from human exfoliated deciduous teeth.

研究代表者

吉丸 耕一郎 (YOSHIMARU, Koichiro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60711190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題はヒト脱落乳歯歯髄幹細胞(SHED)によるヒルシュスプルング病類縁疾患に対する新規再生医療の開発であり、その中でも腸管神経節細胞僅少症を対象疾患としている。研究成果としては、モデルマウスを用いて、腸管の病理組織学的解析・血液生化学的評価・SHEDの分化度と移植効果の評価、である。として、マウス腸管における移植したSHEDの生着の病理組織学的確認をしえた。として、栄養吸収能や臓器障害のないことを確認しえた。としては、移植したSHEDが、本事業の対象疾患である腸管神経節細胞僅少症で著明に減少している腸管神経節細胞数を有意に回復させたことを確認した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research project is the establishment of new regenerative medicine for allied disorders of Hirschsprung disease (ADHD) using stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED), among them hypoganglionosis is considered as a target disease. As a result of the research, using hypoganglionosis model mice, (1) histopathological analysis of intestinal tract, (2) blood biochemical evaluation, and (3) the differentiation of SHED and evaluation of transplantation effect. (1) We confirmed histopathologically engraftment of transplanted SHED in mouse. (2) It was confirmed the improvement of the nutrient absorption and no organ damage. (3) It was confirmed that the transplanted SHED significantly restored the number of intestinal ganglion cells.

研究分野：小児外科

キーワード：腸管神経節細胞僅少症 hypoganglionosis

1. 研究開始当初の背景

小児期に発症し腸管蠕動不全のために機能的腸管不全をきたす疾患の中には、腸管神経節細胞が欠如するヒルシウスプルング病(H病)と、神経節細胞は存在するものの腸管運動不全をきたすヒルシウスプルング病類縁疾患(H類縁)がある。後者の代表疾患としては神経節細胞の数が少ないHypoganglionosisがあり、我々が行った本邦の全国調査では10年間で120例認められている(厚生労働省科学研究費平成23年度難治性疾患克服事業:H類縁疾患、研究代表者:田口智章)。現在、有効な治療法はなく腸瘻や人工肛門の造設、繰り返す腸切除、静脈栄養などで治療が行われているが、図の如く正常新生児の腸管に比較し著明に拡張した腸管の改善は容易ではなく、腹部膨満や嘔吐が続き、治療に難渋し、予後不良な上に生存例も静脈栄養からの離脱が困難である。現在行われている根治的な治療法としては、小腸移植があり、世界でも約2000例以上行われている治療法であるが、強い拒絶反応を初めとする多くの合併症に起因する治療成績不良やドナー不足から本邦での実施は困難であり、低侵襲で安全性の高い新規治療が望まれている。

再生医療のソースとして期待されている細胞にはiPS細胞や骨髄由来の間葉系幹細胞、DPSC(dental pulp stem cell;歯髄幹細胞)などがあり、現在研究が進んでいるが、ヒト脱落乳歯歯髄幹細胞 stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHEDは、2003年にMiuraらにより最初に報告されて以来、頭蓋骨や脊髄、肝細胞、免疫疾患に応用する研究が報告されている。SHEDは多分化能と強い増殖能を持つだけでなく、細胞性免疫に不可欠なHLAの発現が乏しいため免疫寛容性を有し、本来は捨てられる乳歯由来の幹細胞であるため、細胞移植に適したソースといえる。また、SHEDは、歯髄組織は胎生期の頭部神経外胚葉から分化した神経堤細胞に由来すると考えられており、SHEDがこれらの細胞へ分化することは容易と考えられる。そこで、Hypoganglionosisに対し、SHEDを用いて、減少している神経節細胞を腸管内に再生・生着させ腸蠕動を改善させることができれば免疫抑制剤の不要な新しい低侵襲治療となる。

2. 研究の目的

小児期に発症し蠕動不全のため機能的腸管不全をきたす疾患には、先天的に腸管神経節細胞が欠如するヒルシウスプルング病と、神経節細胞は存在するものの腸管運動不全をきたすヒルシウスプルング病類縁疾患(H類縁)がある。H類縁のうち神経節細胞が少ないHypoganglionosisは恒常的に蠕動不全が継続し、現在行われている治療法では予後不良であり、生存例も生涯に渡り静脈栄養を必要とする。本研究では、H類縁の患児に対

し、小腸移植にとって代わる低侵襲治療としてSHEDを移植し蠕動不全腸管の神経系に再生し、腸管機能を改善させる治療法を開発する。

3. 研究の方法

マウスの体重、食事摂取量、水分摂取量、糞便量を測定する臨床的評価。
ティッシュ・オーガンをを用いた電気生理学的腸管蠕動運動の評価。
病理組織学的評価として、HE染色やAChE酵素組織化学、免疫組織化学、蛍光標的法等にて移植細胞の生着を確認する。
血液検体を用いた栄養評価を中心とした生化学的評価。
腸管における糖分や水分の吸収能の評価。
移植方法として静注、腹腔内投与、局所投与、注腸など種々の手法の中で最も有効な細胞移植方法を証明する。

4. 研究成果

研究課題としては、大きく以下にわけることができる。

腸管の病理組織学的解析・血液生化学的評価・SHEDの分化度と移植効果の評価・細胞移植法の評価、である。として、マウス腸管における移植したSHEDの生着の病理組織学的確認をしえた。として、栄養吸収能や臓器障害のないことを確認しえた。

としては、免疫染色にて、移植したSHEDが、本事業の対象疾患である腸管神経節細胞僅少症で著明に減少している腸管神経節細胞数を有意に回復させたことを確認したことから、SHEDが腸管神経節細胞に分化したことが示唆される。移植効果としては、栄養吸収能の改善や体重増加を認めたことを確認した。栄養吸収能の改善としては、形態学的に小腸絨毛構造の改善および、グルコース取り込み能の改善を分子生物学的に証明した。また、体重増加に関しては、同時に経口摂取・水分摂取量もモニタリングし、SHED移植・非移植群で変化がないことも確認した。以上より、体重増加は、栄養吸収が改善されたことによるものと考察している。細胞移植法としては、静注および腹腔内投与を行い、両者を比較検討した。また、腸管電気生理学的解析を行ったが、収縮能において各種薬剤刺激および電気刺激で、モデルマウスにて収縮能が低下していることを確認した上で、SHED移植にて有意に収縮能が改善したことを証明した。

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6件)

Yoshimaru K, Taguchi T, Obata S,

Takemoto J, Takahashi Y, Iwanaka T, Yanagi Y, Kuda M, Miyoshi K, Matsuura T, Kinoshita Y, Yoshioka T, Nakazawa A, Oda Y. Immunostaining for Hu C/D and CD56 is useful for a definitive histopathological diagnosis of congenital and acquired isolated hypoganglionosis. *Virchows Arch.* 2017; 470: 679-685.

Yoshimaru K, Kinoshita Y, Yanagi Y, Obata S, Jimbo T, Iwanaka T, Takahashi Y, Esumi G, Miyata JA, Matsuura T, Izaki T, Taguchi T. The evaluation of rectal mucosal punch biopsy in the diagnosis of Hirschsprung's disease: A thirty-year experience of 954 patients. *Pediatr Surg Int* 2017; 33: 173-179.

柳 佑典, 山座孝義, 山座治義, 野中和明, 中山 功一, 吉丸 耕一朗, 岩中剛, 高橋 良彰, Yuniartha Rathi, 松浦俊治, 孝橋 賢一, 小田 義直, 大賀 正一, 絵野沢 伸, 小林 英司, 田口 智章. 乳歯幹細胞を用いた肝再生研究. *小児外科*. 49; 567-57, 2017.

吉丸耕一朗, 山座孝義, 近藤琢也, 高橋良彰, 岩中 剛, Ratih Yuniartha, 柳佑典, 小幡 聡, 江角元史郎, 伊崎智子, 松浦俊治, 木下義晶, 田口智章. ヒルシュスプルング病及びその類縁疾患に対する幹細胞を用いた新規治療法の展望. *小児外科*. 49; 579-584, 2017.

吉丸耕一朗, 山座孝義, 柳 佑典, 江角元史郎, 林田 真, 松浦俊治, 中島 淳, 田口 智章. ヒルシュスプルング病とその類縁疾患は再生医療で治せるか. *分子消化器病* 2015; 12: 24-31.

吉丸耕一朗, 岩中 剛, 小幡 聡, 柳 佑典, 神保 教広, 江角 元史郎, 宮田 潤子, 松浦俊治, 田口 智章. 小児消化管疾患を遺伝子異常から考える(特にヒルシュスプルング病とその類縁疾患に関して). *分子消化器病* 2015; 12: 234-239.

[学会発表](計 11 件)

吉丸耕一朗, 山座孝義, 梶岡俊一, 高橋良彰, 柳佑典, 松浦俊治, 小田義直, 田口智章. 乳歯髄幹細胞を用いた腸管神経再生による先天性腸管蠕動不全に対する新規治療法の開発. 第44回日本小児栄養消化器肝臓学会, 2017

吉丸耕一朗, 山座孝義, 梶岡俊一, 高橋良彰, 柳佑典, 松浦俊治, 小田義直, 田口智章. ヒルシュスプルング病類縁疾患に対する乳歯髄幹細胞を用いた腸管神経再生医療. 第33回日本小児外科学会秋季シンポジウム, 2017

Koichiro Yoshimaru. Novel therapy for congenital refractory

hypoperistalsis using mesenchymal stem cell. Taiwan-Japan-Korea Pediatric GI joint meeting 2017 (招待講演)(国際学会), 2017

吉丸 耕一朗. 体性幹細胞を用いたヒルシュスプルング病とその類縁疾患の新規治療開発. 第116回日本外科学会, 2016
吉丸 耕一朗. 間葉系幹細胞を用いたヒルシュスプルング病類縁疾患に対する新規治療法の開発. 第43回日本小児栄養消化器肝臓学会, 2016

[10th Annual Conference of Cambodian Society of Pediatric Surgery, 2016]
Koichiro Yoshimaru, Takayoshi Yamaza, Shunichi Kajioka, Mutsumi Nakamura, Yoshiaki Takahashi, Yusuke Yanagi, Toshiharu Matsuura, Tomoko Izaki and Tomoaki Taguchi. New therapeutic proposal for Hirschsprung's disease and allied disorders using the stem cells. Phnom Penh Hotel, PHNOM PENH-CAMBODIA. 25 November 2016.

[World Federation of Association of Pediatric Surgeons (WOFAPS), 2016]
Koichiro Yoshimaru, Yoshiaki Kinoshita, Yusuke Yanagi, Satoshi Obata, Tsuyoshi Iwanaka, Yoshiaki Takahashi, Junko A. Miyata, Toshiharu Matsuura and Tomoaki Taguchi. Rectal mucosal punch biopsy using K-PUNCH for the diagnosis of Hirschsprung's disease: A thirty-year experience of 954 patients. Washington Marriott Wardman Park Hotel, Washington, DC 20008 USA. 8 October, 2016.

[9th Annual Conference of Cambodian Society of Pediatric Surgery, 2015]
Koichiro Yoshimaru, Satoshi Obata, Takahiro Jimbo, Tsuyoshi Iwanaka, and Tomoaki Taguchi. EFFICACY AND SAFETY OF K-PUNCH METHOD FOR RECTAL MUCOSAL BIOPSY AND AChE STAINING IN THE DIAGNOSIS OF HIRSCHSPRUNG'S DISEASE AND RELATED DISORDERS. Phnom Penh Hotel, PHNOM PENH-CAMBODIA. 19 November 2015.

[26th International Symposium on Paediatric Surgical Research, 2015]
Koichiro Yoshimaru, Satoshi Obata, Takahiro Jimbo, Tsuyoshi Iwanaka, Yoshiaki Takahashi, Yusuke Yanagi, Genshiro Esumi, Junko Miyata, Toshiharu Matsuura and Tomoaki Taguchi. Efficacy of the "K-PUNCH" method for rectal mucosal biopsy in the diagnosis of Hirschsprung's disease: A twenty-nine-year experience of 907 patients who underwent "K-PUNCH" biopsy- GIBSON HOTEL, DUBLIN, IRELAND, 24-26 SEP

2015.
[第29回日本小腸移植研究会, 愛知,
2017] 吉丸耕一郎, 山座孝義, 梶岡俊一,
高橋良彰, 柳 佑典, 松浦俊治, 田口智章.
間葉系幹細胞を用いた先天性機能的腸管不全に対する新規治療法の開発.
名古屋大学医学部附属病院 中央診療棟3階講堂, 愛知. 4 March, 2017.
[第28回日本小腸移植研究会, 東京,
2016] 吉丸耕一郎, 山座孝義, 梶岡俊一,
高橋良彰, 柳 佑典, 松浦俊治, 田口智章.
先天性機能的腸管不全に対する間葉系幹細胞を用いた新規治療法の開発.
東京国際交流館プラザ平成, 東京. 12 March, 2016.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉丸 耕一郎 (YOSHIMARU, Koichiro)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号: 60711190

(2) 研究分担者

田口 智章 (TAGUCHI, Tomoaki)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号: 20197247

家入 里志 (IEIRI, Satoshi)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号: 00363359

松浦 俊治 (MATSUURA, Toshiharu)
九州大学・医学研究院・講師
研究者番号: 10532856

林田 真 (HAYASHIDA, Makoto)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号: 70452761

野中 和明 (NONAKA, Kazuaki)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号: 90128067

山座 孝義 (YAMAZA, Takayoshi)
九州大学・歯学研究院・准教授
研究者番号: 80304814

山座 治義 (YAMAZA, Haruyoshi)
九州大学・歯学研究院・講師
研究者番号: 30336151

梶岡 俊一 (KAJIOKA, Shunichi)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号: 90274472

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()