

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20301

研究課題名(和文) 腸管運動不全に対するヒト歯髄幹細胞を用いた神経堤細胞移植治療に関する研究

研究課題名(英文) Study of the neural crest cell transplantation therapy for gastrointestinal motility disorders using dental pulp stem cells.

研究代表者

藤村 匠 (Takumi, Fujimura)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：80573443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腸管神経節細胞の欠失・機能異常が本態とされる腸管運動不全は手術のみでは十分な排便機能を獲得できないこともある難治性疾患である。我々はこの病態に対し、腸管神経を用いた細胞移植治療の有用性を報告してきた。その成果を基に、臨床的にアクセスしやすい神経堤細胞である歯髄細胞を用いた治療効果の有用性を検討した。移植細胞を可視化し、モデルマウスに移植して細胞生着を経時的に観察した。細胞生着を確認できたが、移植細胞の組織学的観察は困難であり、分化能評価には至らなかった。歯髄細胞は免疫学的拒絶の可能性は低い細胞とされる。腸管由来神経堤細胞と歯髄細胞との増殖・維持法の違いを見直し、分化能の評価を行う必要がある。

研究成果の概要(英文)：Gastrointestinal motility disorders are intractable disease which may not be able to acquire sufficient defecation function only by surgery. We have reported the usefulness of cell transplantation therapy using enteric neural crest cells to this condition. Based on the results, we examined the effectiveness of the therapeutic effect using dental pulp cells as a clinically accessible neural crest cells. Transplanted cells were visualized and transplanted into model mice to observe engraftment of the transplanted cells for several month after cell transplantation. Although engraftment of the transplanted cells could be confirmed, histological observation of the transplanted cells was difficult, and the differentiation ability could not be evaluated. Based on the difference in growth and maintenance method between gut derived neural crest cells and dental pulp cells, it is necessary to evaluate their differentiation potential.

研究分野：小児外科

キーワード：歯髄細胞 腸管運動不全 可視化

1. 研究開始当初の背景

腸管運動不全の原因は神経堤細胞の腸管内遊走障害、機能異常と言われ、その治療法は手術であるが、無神経節腸管の長い症例では手術は人工肛門を造設し、短腸症候群として管理するという対症療法的なものである。こうした疾患は治療に複数回の手術を要したり、手術後も良好な排便機能が得られないために命を落したり、時に小腸移植を必要とする症例が存在する。また、根治手術が可能な症例においても、満足の行く排便機能を獲得できない症例も少なくない。

1999年に神経堤細胞の回収が可能であることが報告され、この小児外科領域の難治性疾患に対し、神経堤細胞移植を用いた再生医療に関する報告がなされるようになってきた。

我々の研究グループも腸管神経の起源である神経堤細胞を移植することで機能改善・付加を試みる研究を行っており、マウス腸管由来神経堤細胞を用いて腸管運動不全モデルマウスに移植することで、移植した細胞が腸管神経に分化し、一定の機能改善の傾向があることを確認した。

そして、さらに臨床応用に近づけるために、よりアクセスが可能な神経堤細胞として歯髄細胞が注目し、それらの細胞を用いた腸管運動不全への細胞移植治療の有効性を評価しようと考えた。我々がこれまで取り組んできた腸管由来神経堤幹細胞は増殖能に乏しく、十分な検体量確保が難しい。臨床では Donor source としての採取が難しいという問題点があった。そこで、腸管神経と起源を同じく迷走神経付近から発生する経堤幹細胞に注目した。頭頸部に向かう経堤幹細胞として歯髄組織が挙げられる。これは胎生期の神経外胚葉から発生した経堤細胞由来と言われ、採取できる歯髄幹細胞(Dental pulp stem cells:DPSCs)には頭頸部経堤幹細胞が含まれる。DPSCは神経、筋、軟骨、骨、グリア細胞への分化を示すことが知られており、腸管由来 NCSCs 同様に機能することが期待される。また、DPSCは NCSCs だけでなく、間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell:MSC)を含む事が知られている(S.Shi et al 2005)。我々の研究グループでは骨髄由来 MSC から腸管の Cajal 細胞を再生させる研究も進めており(Mori et al under preparation)、DPSCの移植治療により腸管運動のペースメーカーとも言われる Cajal 細胞も同時に再生させることができれば、ますます腸管運動不全に対する新規低侵襲治療の可能性が広がると考えた。さらに、DPSC(特に乳児由来の場合は脱落乳歯歯髄細胞:SHED と呼ばれる))では HLA 発現が乏しく、免疫寛容も高く、異種移植が可能であることがマウスの実験で知られている。つまり、最終的には DPSC 移植治療による免疫抑制剤を必要としない、低侵襲な腸管神経系全体の再生治療の実現を目的としている

2. 研究の目的

無神経節腸管を持つ腸管運動不全モデルマウスに対し、歯髄細胞を用いた移植治療を行い、細胞が生着し、期待される腸管神経への分化傾向を示すか検討した。さらに、細胞移植により、臨床的な腸管運動の改善があるか検証した。

3. 研究の方法

ヒト歯髄細胞を培養し、ウイルスを用いて蛍光発光融合タンパクで標識し、無神経節腸管を持つモデルマウスに移植を行った。8週間の経時的観察を行い、その間に腸管運動機能評価を行った。経時的観察終了後は腸管を摘出し、免疫組織化学染色による細胞の同定と分化傾向の評価を行った(図1)。

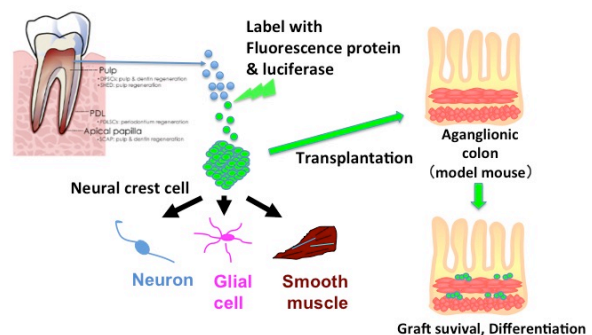


図1 歯髄細胞移植実験の概要

(1) モデルマウスは免疫不全マウス(NOD-SCID)の腸管に塩化ベンザルコニウムを作用させて腸管神経を焼灼することで人工的に無神経節腸管を作成したものを用いた。

全身麻酔下に4週齢のNOD-SCIDマウスを開腹し、0.1%塩化ベンザルコニウムを腸管に作用させ、腸管神経を焼灼・消失させ、腹腔内を十分に洗浄した後閉腹し、手術から2週間後にモデルマウスとして使用した。

(2) 移植細胞はDMEM, L-glu, FBSを含む培地で10-14日間の培養の後分化傾向蛍光発光融合タンパク(ffLuc)でウイルスを用いて標識し、移植後の細胞が生着しているかどうかをIn Vivo imaging system (IVIS)を用いて評価した。

移植する歯髄細胞が腸管由来神経堤細胞同様に神経(PGP9.5)、グリア(S-100)、平滑筋(SMA)へ分化することを、それぞれ神経マーカー PGP9.5、グリアマーカー S-100、平滑筋マーカー αSMAを用いて確認した。

(3) 移植後のマウス腸管を摘出し、移植した細胞を同定し、その分化傾向をヒト細胞のマーカー STEM121、神経マーカー PGP9.5、グリアマーカー S-100、平滑筋マーカー αSMA免疫組織化学染色で評価した。

4. 研究成果

(1) 研究者本人がその有用性を報告 (Fujimura et al, PLoSOne, 2016) (図2) しており、それと同様の方法を用い、NOD-SCID に応用したモデルを作成した。作成したモデルは報告したものとほぼ同様の組織学的構造・腸管運動機能の特徴を持っていることが確認できた。

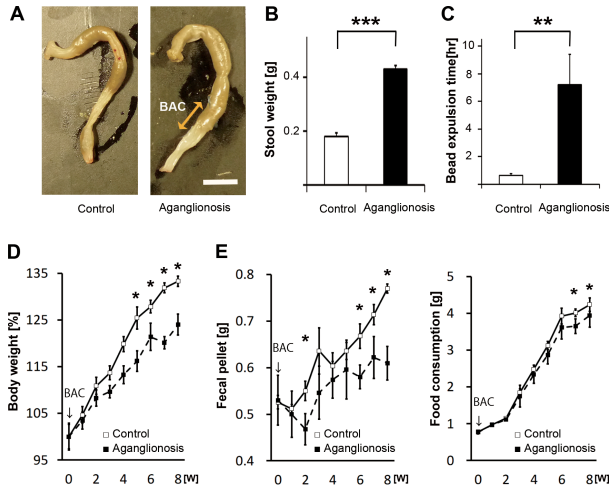


図2 薬剤性腸管運動不全モデルマウスは腸管内残便量は有意に増加し、排便機能は有意に低下、排便量、食事摂取量、排便量が野生型マウスより劣る傾向がある (Fujimura et al, PLoSOne, 2016 Fig 4 を引用)

(2) 発光タンパクで標識した移植細胞は *in vitro* で IVIS を使用して発光観察が可能、蛍光顕微鏡下で蛍光観察が確認できることを確認した上で実験に使用した。

移植する歯髄細胞は DMEM, L-glu, FBS を含む培地で 10-14 日間の培養の後に分化傾向を評価し、腸管由来神経堤細胞同様に神経 (PGP9.5)、グリア (S-100)、平滑筋 (SMA) へ分化することを、それぞれ神経マーカー PGP9.5、グリアマーカー S-100、平滑筋マーカー α SMA を用いて確認できた。

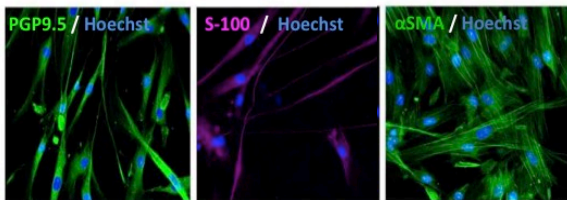


図3 歯髄細胞も神経、グリア、平滑筋の3系統への分化傾向を持つことを確認した。

(3) 歯髄細胞は上記の培地を用いて接着培養で増殖・維持し、移植は細胞懸濁液として施行した。

全身麻酔下にモデルマウスを開腹し、無神経節腸管を露出し、細胞懸濁液を腸管筋層内に注入移植した。移植後は十分に腹腔内を生理食塩水で洗浄し、閉腹した。移植する際に

細胞にルシフェリンを作用させ、移植直後に腹腔内を洗浄して、移植部位から漏れた細胞を除去しても、発光タンパクで細胞が検出できることを確認した。

対照群の野生型マウスはモデルマウス同様に開腹し、腸管を露出し、同部には同様の手技で生理食塩水のみを注入した。

移植後1週間から移植群の経時的観察を開始し、予定していた8週間の経時的な観察を行った。移植細胞に組み込まれた発光タンパクを体外から容易に検出できたのは一部の個体でのみであり、開腹して腸管を露出することでのみ検出できるものも存在する状況であった (図4)。

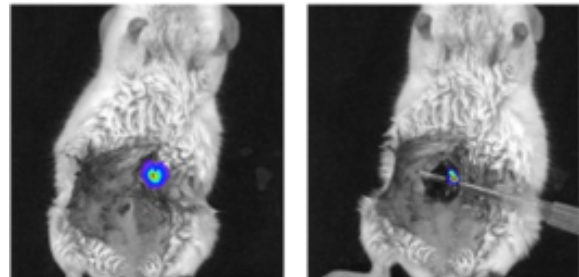


図4 発光タンパクで標識した細胞を IVIS で検出した。左: 体外からでも検出可能だった個体、右: 腸管を露出して検出できた個体

経時的観察の後、腸管を摘出し、免疫組織化学染色で移植細胞を同定し、分化傾向をヒト細胞のマーカー STEM121、神経マーカー PGP9.5、グリアマーカー S-100、平滑筋マーカー α SMA を用いて免疫組織化学染色を行おうとしたが、移植細胞は蛍光顕微鏡下にも同定できず、十分な分化評価に至らなかった。

同様の実験をマウス歯髄細胞を用いて行ったところ (N=5)、予定観察期間の8週間発光タンパク検出を用いた観察が可能であり、現在、発光タンパク GFP を移植細胞のマーカーとして、その他の神経マーカー PGP9.5、グリアマーカー S-100、平滑筋マーカー α SMA を用いた免疫組織化学染色での評価を予定している。

腸管由来神経堤細胞は細胞塊 (sphere) で移植できたが、歯髄細胞は細胞塊を形成しない増殖方法で維持される。それが今回の生着状況に影響した可能性がある。

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 1 件)

Fujimura T, Shibata S, Shimojima N, Yasuhide Morikawa, Hideyuki Okano, Tatsuo Kuroda: Fluorescence Visualization of the Enteric Nervous Network in a Chemically Induced Aganglionosis Model. PLoS One, 11 : e0150579, 2016.

Doi:10.1371/journal.pone.0150579. eCollection 2016. 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

藤村匠、下島直樹、阿部陽友、森禎三郎 1、高橋信博、石濱秀雄、山田洋平、藤野明浩、星野健、森川康英、黒田達夫、シート培養法を用いた神経堤幹細胞移植法の検討、第 53 回小児外科学会総会、2016.5.24-26、ヒルトン福岡シーホーク

[図書] (計 1 件)

藤村匠、芝田晋介、黄地健仁、下島直樹、岡野栄之、黒田達夫

小児外科領域の先端医療の展開: 先端治療開発の方向性-神経堤細胞治療
東京医学社 小児外科 49 巻 6 号, 2017 年 6 月号 (in press) 総ページ数 5 ページ

藤村匠、内田豪気、春松敏夫、加藤源俊、石岡茂樹、小森広嗣、下島直樹、佐藤裕之、廣部誠一

Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser 症候群を合併した直腸膣前庭瘻に鎖肛根治術と同時に小腸グラフトを用いた膣形成を施行した 1 例

日本小児外科学会雑誌

Vol. 53 (2017) No. 2 p. 310-31

Doi: http://doi.org/10.11164/jjsps.53.2_310

[産業財産権]

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤村 匠 (FUJIMURA, Takumi)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号: 80573443