

令和元年6月23日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11346

研究課題名(和文) 疾患特異的歯髄幹細胞を用いたヒルシュブルグ病モデル腸管の作製及び機能解析

研究課題名(英文) Establishment and characterization of Hirschsprung disease-model intestine using disease-specific SHED

研究代表者

伊崎 智子 (Izaki, Tomoko)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：90423491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：乳歯歯髄由来幹細胞(SHED)は他の間葉系幹細胞と同様に、多分化能と高い増殖能を持つ。乳歯は従来「捨てる」ものであるため入手が容易であることから幹細胞研究において大変魅力のあるソースであり、すでにSHEDの細胞単離と増殖・分化誘導法が開発され、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、肝細胞などへの分化誘導が成功している。今回ヒルシュブルグ病(以下、H病)患者から、H病特異的SHEDを単離し、腸管への誘導を行いモデル腸管の作成を行い、疾患特異的な腸管粘膜機能、特に腸管免疫機構の解析を予定していたが、残念ながら、乳歯を取得することができず、実験系の樹立に至らず基盤整備に留まった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Hirschsprung病(H病)は腸管神経節細胞の分布異常による腸管蠕動障害が原因であることはわかっているが、分布異常の原因はまだ完全に明らかではない。現在複数の原因遺伝子とその遺伝形式が同定され、多様な生物学的システムが絡んでいると考えられる。疾患特異的乳歯歯髄由来幹細胞(SHED)を作成、利用して解析を行うことは、患児のわずかな負担で機能解析が可能だが、今回は研究系が樹立できなかった。

研究成果の概要(英文)：The SHED, the stem cells derived from dental pulp of deciduous teeth have multi-differentiation potency and proliferation capability as like as other mesenchymal stem cells. Because easiness of acquisition of deciduous teeth which are things "to throw away" conventionally, the SHED is an attractive source. Moreover, isolation, differentiation and proliferation method of SHED are already developed and differentiation to osteocytes, chondrocytes, adipocytes, hepatocytes, and so on is also achieved.

We planed the isolation of disease-specific SHED from a Hirschsprung's disease (HD) patients, the establishment of disease-specific intestinal model of HD and the analysis of intestinal mucosal function and intestinal immune system particularly. However, we could not acquire the deciduous teeth and we did only preparation without establishment of experimental system.

研究分野：小児外科

キーワード：ヒルシュブルグ病 疾患特異的歯髄幹細胞 SHED

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳歯歯髄由来幹細胞 (SHED) は他の間葉系幹細胞と同様に、多分化能と高い増殖能を持つ。乳歯は従来「捨てる」ものであるため入手が容易であることから幹細胞研究において大変魅力のあるソースであり、すでに SHED の細胞単離と増殖・分化誘導法が開発され、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、肝細胞などへの分化誘導が成功している。よって、本細胞は幹細胞研究において、魅力ある細胞ソースの一つと考えられている。遺伝疾患を有する患児から得た SHED は同様の遺伝情報を有することが予想されている。(疾患特異的 SHED) この疾患特異的 SHED を用いて解析を行えば、遺伝的要因の詳細な検討が可能となりうることを期待され、さらに SHED を分化させて臓器を形成し、モデル臓器を作ることができれば、機能解析も可能となると考えられている。

ヒルシュスプルング病は、小児の器質的腸閉塞を生じる疾患の一つである。腸管蠕動を司る腸管神経節細胞の分布の異常が確認されている。現在、発症に関与する遺伝子として、Ret 遺伝子やエンドセリンレセプター遺伝子、エンドセリン 3 遺伝子などの複数の原因遺伝子が同定されているが、単一遺伝子異常ではなく、複数の遺伝的要因が絡んでいることが推察されている。また、ヒルシュスプルング病の児は、健常児に比べ、腸炎を起こしやすく、無神経節領域腸管を切除し正常腸管を肛門にひきおろし根治とされた後にも腸炎を起こし、また、時には致死的となりうる。この、ヒルシュスプルング病関連腸炎についても研究が進められているところであり、腸管のバリア機能の低下、異常な免疫反応、異常な腸管細菌叢などが複合的に発症に絡んでいると考えられている。腸管のバリア機能の低下は腸管内容の鬱滞による微小環境の変化や、粘液層の減少、腸管上皮の tight junction の破綻などが影響するとされているが、完全には解明されておらず、発症の完全な予防には至っていない。

2. 研究の目的

ヒルシュスプルング病患児から SHED を作成すると、この SHED はヒルシュスプルング病の遺伝情報を有することが予想され、この細胞を利用してヒルシュスプルング病(以下、H 病)特異的 SHED を単離し、腸管への誘導を行いモデル腸管の作成を行い、機能解析を行う。特に、前述した H 病関連腸炎の仕組みを明らかにするため、腸管粘膜機能、特に腸管免疫機構の解析を行いたい。

3. 研究の方法

① ヒルシュスプルング病患者より脱落乳歯を提供していただき、歯髄幹細胞の単離、培養をおこなう。歯髄幹細胞の単離、培養については、すでに確立された手法が報告されている。(Ma L, Makino Y, Yamaza H et al. PLoS One 2012 7 e51777) この歯髄幹細胞を腸管上皮に誘導し、人工腸管モデルを作製する。Ueda らが 2010 年に iGut (induced Gut) と名付けたマウス iPSC 細胞から人工腸管を分化誘導することに成功し、2017 年には多能性幹細胞 (ES 細胞と、iPS 細胞) からの腸管の作成について Workman らが報告を行っている (Workman MJ, Mahe MM, Trisno, S et al: Nature Medicine 2017:23:49)。これらの報告では、幹細胞を浮遊培養系を用いて幹細胞から細胞塊を形成し、これを付着培養系に移して培養を継続する。植田らの報告によると iGut の構造解析を行ったところ、通常の腸管同様、内側から内胚葉由来の粘膜上皮細胞、中胚葉由来の平滑筋細胞や Interstitial Cell of Cajal, 最外層や外胚葉由来の神経繊維のネットワークの順に一定の秩序をもって配列される。腸管モデル形成については、このため疾患特異的 SHED から分化した腸管モデルは同疾患患者での腸管内での環境と同等と考えられており

(Ueda T, Yamada T, Hokuto D et al. Biochem Biophys Res Commun. 2010 391:38) (Yamada T, Yoshikawa M, Takaki M et al. Stem Cells 2002 20:41) (植田剛ら. 日外会誌 113(5) 434-428 2012)。本研究で SHED を用いて 3 次元培養まで行う系の確立を行い、同腸管が正常の腸管上皮細胞と同様の形態を示すことの確認を行う。その方法として電子顕微鏡での形態解析、微絨毛をともなった粘膜上皮細胞や Goblet 細胞などの形態観察を予定している。また、腸管上皮は apical-basal polarity を有するため、それらを構成するのに必要なことが知られているタンパク質の局在の観察を行う。その方法として tight junction (以下 TJ) や adherence junction への局在が知られている ZO-1 タンパク質、オクルーディンタンパク質、 β -カテニンタンパク質などを免疫染色し蛍光顕微鏡で観察を行う。

② その後に炎症時、感染応答時などの腸管上皮細胞の機能解析を行う。管腔としてのモデル腸管が作成できれば内腔へ、しかし、実際には薬剤、stimulant などの投与が難しくなるため、2 次元培養の系を確立して腸管内腔側とみなす側に菌体成分を投与し、粘膜上皮の形態変化などを観察する。ボイデンチャンバーを利用し、apical-basal の極性を維持させた状態は疑似管腔モデルとなりうる。炎症が惹起された際には細胞の TJ が乱れ、細菌の侵入が助長されると考えられている。Calcium switch 法は培養液中のカルシウム濃度を変化させることにより細胞接着因子の変化を誘導する方法であり TJ の破壊、再形成を観察する方法である。この方法を用い ZO-1 タンパク質の局在を観察することで、TJ が破壊されているかどうか検討することができる。また細胞間接着が破壊されると透過性亢進が認められるが、この透過性の亢進は電気抵抗の変化を計測することで測定可能である。よって、H 病患者由来の疑似腸管モデルにおいて Ca switch 法を用いて TJ の挙動の観察を行う。次に炎症を惹起した場合に TJ の破壊がおきる

かどうか観察するために、腸管内に Endotoxin などを腸管上皮側に投与し TJ が変化するかどうか観察してみたい。また、腸管の透過性に影響を与える因子として腸管神経節細胞から分泌される VIP が知られている。この因子を投与することで、腸管上皮で TJ の変化がおこるか観察してみる。SHED 由来の腸管モデルの作製を引き続き行う H 病患者から得た歯髄幹細胞を用いた腸管モデルの作製を行う。

③複数の細胞系を用いて、異なる遺伝バックグラウンドをもつ腸管モデルの形成をめざす。感染応答などの免疫反応も個々の症例によって異なることが考えられる。このことを検証するために、複数の患児から脱落乳歯の提供を依頼し、別の遺伝学的バックグラウンドをもつ H 病特異性細胞系を作製し、幹細胞バンクとし、複数の細胞ラインを用いて実験系を作成する予定である。複数の患児より SHED を採取し、多様な遺伝学的バックグラウンドを持つ歯髄幹細胞からの腸管モデルが作製できれば、どの因子が最も HAEC の原因となり、悪化させる要因となっているか検討可能になる。腸管上皮機能の研究ソースとして有効であり、更に研究をすすめることで、HAEC に対する有効な薬剤などの研究につなげることが可能と考えられる。腸管上皮の陰窩に存在する腸管上皮幹細胞を粘膜生検にて採取し、研究のソースとすることで同様の実験は可能と考えられるが、SHED は本来廃棄されていた乳歯を用いることで、患児に負担をかけることなくソースを得られ、また、オーダーメイド治療にもつなげられる可能性がある。

4. 研究成果

今回の研究では、対象となるヒルシュスプルング病患児の脱落乳歯がなかなか得られず、研究の第 1 段階で進めることができなくなった。原因として、乳歯脱落の年齢層の外来受診中のヒルシュスプルング病罹患患児が予想よりも少なかったこと、う蝕のない脱落乳歯が必要であり、齶蝕歯で適応外となった児がいたこと、また、来院できない日に脱落した場合でも牛乳などに浸漬していただき冷蔵で送付していただければ受け取りは可能としていたが、検体授受の方法が説明不足となっており、乾燥してしまった脱落乳歯などを提供されるといったエピソードがあり、十分な説明、情報提供ができていなかったことが原因と思われる。本研究では、患児、患者家族の善意に基づいて脱落乳歯を提供していただくことで、患児に負担をかけることなく素材を取得できることがシステムとしての利点がある。元来ヒルシュスプルング病の罹患頻度が 3000~5000 出生に 1 人でありそれほど多いものではなく、かつ乳歯脱落が起きうる期間という時間的制約もあるため、ソースを取得することが容易とはいえない。そのため、可能であれば、まずは疾患特異的 SHED の cell bank が作成できるように、今後も乳歯提供のお願いについては情報提供を続けていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：田口智章

ローマ字氏名：TAGUCHI, tomoaki

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：教授

研究者番号（8桁）：20197247

研究分担者氏名：岩中 剛

ローマ字氏名：IWANAKA, tsuyoshi

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：共同研究員

研究者番号（8桁）：70741198

研究分担者氏名：吉丸耕一郎

ローマ字氏名：YOSHIMARU, koichiro

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：助教

研究者番号（8桁）：20419568

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。