

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11520

研究課題名(和文) 臍帯由来幹細胞の腸管神経再生によるヒルシュスブルング病の新たな治療戦略

研究課題名(英文) Regenerative medicine as a new therapeutic for Hirschsprung's disease using umbilical cord stem cells

研究代表者

山高 篤行(Yamataka, Atsuyuki)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：40200703

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)：臍帯は幹細胞や前駆細胞を豊富に有している。今回我々は、SOX10-Venusトランスジェニックマウスを用いて、臍帯由来幹細胞(UCSCs)を腸管神経系(ENS)へ分化誘導を行った。予備実験において、膀胱損傷モデルマウスを用いてUCSCsを静脈投与すると、10日後に膀胱損傷部位に確認され、組織の再生に関与していることが示唆された。UCSCsの単離及びENSへの分化誘導法の確立に至らなかった。我々はすでに無神経節腸管部位への腸管神経幹細胞移植の技術開発を報告しており、今後UCSCsの分化や神経ネットワークを形成するかどうか、ヒルシュスブルング病に対する新しい治療としてさらなる研究が必要となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、トランスジェニックマウスを用いることで臍帯由来幹細胞が障害組織に集積することが容易に観察され、他組織での再生に寄与する可能性も示唆された。今回我々が初めて臍帯由来幹細胞の腸管神経系への分化誘導を試行したため、新規治療法開発への足掛かりになることができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：The umbilical cord is a rich source of stem and progenitor cells. We tried to establish the differentiation from umbilical cord stem cells (UCSCs) to enteric nervous system using SOX10-Venus mice. A preliminary experiment had shown that transplanted UCSCs were observed damaged bladder wall after 10 days intravenous injection. These findings suggested that UCSCs might regenerate to area of damaged bladder wall. We could not isolate UCSCs and establish of methods for the differentiation of UCSCs. Previous experiments by our group reported that transplanted SOX10-Venus mouse enteric neural crest-derived cells colonise the aganglionic colon in the Hirschsprung's disease. Further study is needed to determine whether UCSCs differentiate and generate functioning neuronal networks as a new therapeutic for Hirschsprung's disease.

研究分野：小児外科

キーワード：ヒルシュスブルング病 臍帯由来幹細胞 腸管神経再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

Hirschsprung 病 (以下 H 病) は、出生児 5000 人に 1 人の頻度で発生し、小児外科領域における最も代表的な機能的腸閉塞疾患であり、腸管運動障害を呈するニューロクリストパチー (神経堤症) の一つとして知られている。根本的治療は侵襲が大きい外科的手術のみで、無神経節腸管部位が長域である場合には、腸管移植手術が必要となることもある。胎児期の腸管神経の食道から肛門までの移動・分化・増殖の発生過程でおこる何らかの障害が原因とされ、出生後に腸管蠕動運動に異常を呈する。近年、神経堤幹細胞を用いた移植治療に関する実験の報告がされているが (Lindley et al. *Gastroenterology Jul 135(1) 2008*)、未だ臨床応用するには決して満足のいくものではなく、新たな治療法の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

近年、再生医療・細胞治療における臍帯由来幹細胞はその多分化能や免疫調節能から再生医療における有用な資源として知られている。採取が容易であることや倫理的問題がほとんどなく、移植時の安全性の点でも優れ、また後天的な遺伝子発現変異が少ないことから、小児医療への臨床応用が期待される。しかし、臨床研究につながるような基礎研究の報告はまだ少数であるため、臍帯由来幹細胞から腸管神経前駆細胞を分化誘導する方法を確立し、その細胞をレシピエントに投与する新たな再生治療法の開発を目的とした研究が必要であると考えられた。

まずは、妊娠マウスから臍帯血を採取し、臍帯由来幹細胞の単離を行い、腸管神経前駆細胞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。先だって、予備実験として、膀胱損傷マウスを作成し、実際に臍帯由来幹細胞を投与し組織再生に関与するかを検証することとした。

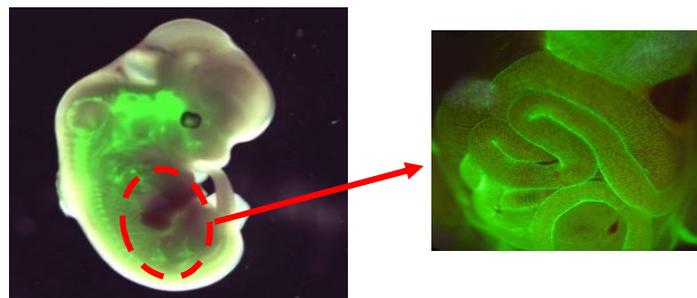
## 3. 研究の方法

腸管神経幹細胞の分化・遊走に関連する遺伝子である SOX-10 に緑色蛍光タンパク Venus を標識し、神経堤細胞の発生過程が蛍光顕微鏡で観察することを可能とする SOX10-Venus トランスジェニックマウスを使用した (図 1)。

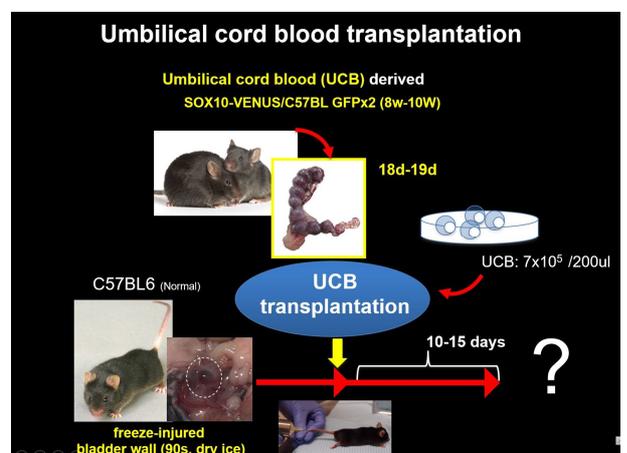
予備実験に用いるために、膀胱前壁を凍結・損傷し、膀胱損傷モデルマウスを作成。経尾静脈的に採取した SOX10-Venus マウスの臍帯由来幹細胞を投与し、その細胞の生着および神経再生過程の検証のための実験を以下のようにおこなった (図 2)。

我々のグループはすでに腸管神経前駆細胞と H 病無神経節腸管組織の共培養による移植実験でドナーの腸管神経前駆細胞の生着をレシピエント腸管で確認しており、本研究も同様に、この SOX10-Venus マウスから採取した臍帯血を採取し、臍帯血幹細胞を腸管神経前駆細胞への分化誘導方法を確立し、移植実験を行うことを目指した。

(図 1)



(図 2)



#### 4 . 研究成果

予備実験として行った膀胱損傷モデルマウスは、マウス膀胱にドライアイスで冷却した金属棒を押し当て、主に膀胱平滑筋層に傷害を与えた凍結傷害膀胱モデルを作成した(図3)。

このモデルマウスに SOX10-Venus トランスジェニックマウスから採取した臍帯血を尾静脈に静注。投与 10 日後および 15 日後に蛍光実体顕微鏡を用いた観察で、傷害部付近への SOX10-Venus 陽性細胞の発現を認めた(図4)。

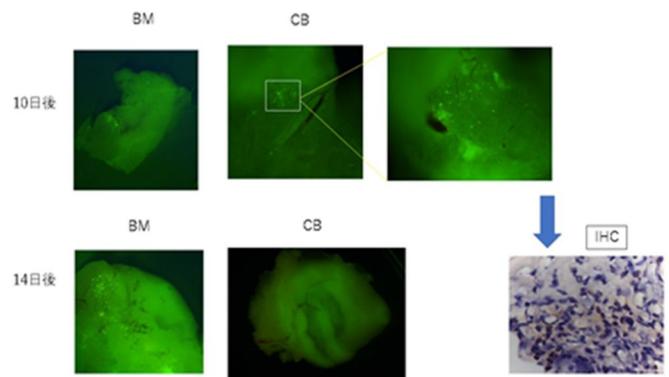
一方で正常マウスへも静注を行ったが、発現は認められなかった。このことより、傷害部位への臍帯由来幹細胞の移植細胞の遊走が確認され、組織再生・修復作用に関与することが示唆された。今後、実際の修復過程等の検証が必要であると考えられた。臍帯由来幹細胞の腸管神経前駆細胞への分化誘導は iPS 細胞等で報告されている培養方法に準じて試行したが、十分な結果が得られなかった。

我々のグループの実験ではすでに無神経節腸管神経部位への腸管神経幹細胞移植を行い、生着を確認していることから引き続き臍帯由来幹細胞からの分化誘導方法の検証を行うことで、未踏の地である H 病治療の新たな治療開発の足がかりとなると考えられる。

( 図 3 )



( 図 4 )



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 351.Fujiwara N, Nakazawa-Tanaka N, Miyahara K, Arikawa-Hirasawa E, Akazawa C, Yamataka A	4. 巻 34
2. 論文標題 Altered expression of laminin alpha1 in aganglionic colon of endothelin receptor-B null mouse model of Hirschsprung's diseases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatr Surg Int	6. 最初と最後の頁 137-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00383-017-4180-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 352.Fujiwara N, Miyahara K, Nakazawa-Tanaka N, Akazawa C, Yamataka A	4. 巻 53
2. 論文標題 Increased expression of Semaphorin 3A in the endothelin receptor-B null mouse model of Hirschsprung disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pediatr Surg	6. 最初と最後の頁 326-329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpedsurg.2017.11.034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi Y, Nishimura E, Shimizu S, Miyano G, Okawada M, Nagae I, Lane GJ, Katsumata K, Yamataka A, Tsuchida A	4. 巻 52(12)
2. 論文標題 Sigmoidocolocystoplasty for neurogenic bladder reviewed after 20 years.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Pediatr Surg	6. 最初と最後の頁 2070-2073
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpedsurg.2017.08.029.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamataka A, Miyano G, Takeda M.	4. 巻 44(4)
2. 論文標題 Minimally Invasive Neonatal Surgery: Hirschsprung Disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clin Perinatol	6. 最初と最後の頁 851-864
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.clp.2017.08.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeda M, Miyahara K, Akazawa C, Lane GJ, Yamataka A.	4. 巻 33(8)
2. 論文標題 Sensory innervation of the anal canal and anorectal line in Hirschsprung's disease: histological evidence from mouse models.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pediatr Surg Int	6. 最初と最後の頁 883-886
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-017-4112-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 12件)

1. 発表者名 Nakazawa-Tanaka N, Miyahara K, Fujiwara N, Urao M, Yamataka A
2. 発表標題 The altered expression of acetylated tubulin in enteric neurons in Hirschsprung disease mouse model
3. 学会等名 The 51st Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons (PAPS) (太平洋小児外科学会) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujiwara N, Miyahara K, Nakazawa-Tanaka N, Akazawa C, Yamataka A
2. 発表標題 Transplanted SOX10-Venus mouse enteric neural crest-derived cells colonise the aganglionic colon in the Hirschsprung's mouse model
3. 学会等名 The 31st International Symposium on Paediatric Surgical Research (ISPSR) (国際小児外科リサーチシンポジウム) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakazawa-Tanaka N, Miyahara K, Fujiwara N, Urao M, Yamataka A
2. 発表標題 The altered expression of acetylated tubulin in enteric neurons in Hirschsprung disease mouse model
3. 学会等名 The 25th Paediatric Colorectal Club Meeting (IPCCM) (国際小児直腸肛門奇形学術会議) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujiwara N, Miyahara K, Nakazawa-Tanaka N, Akazawa C, Yamataka A
2. 発表標題 Transplanted SOX10-Venus mouse enteric neural crest-derived cells colonise the aganglionic colon in the Hirschsprung's mouse model
3. 学会等名 The 25th Paediatric Colorectal Club Meeting (IPCCM)(国際小児直腸肛門奇形学術会議) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡和田 学
2. 発表標題 神経因性膀胱に対する再生医療
3. 学会等名 日本小児泌尿器科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fujiwara N., Miyahara K., Nakazawa-Tanaka N., Akazawa C., Yamataka A.
2. 発表標題 LAMININ PROMOTES NEURITE GROWTH IN THE ENTERIC NERVOUS SYSTEM OF THE EMBRYONIC MOUSE GUT
3. 学会等名 18th Congress of the European paediatric Surgeons' Association (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Koga H., Miyano G., Okawada M., Doi T., Yamataka A.
2. 発表標題 FACILITATING PULMONARY LOBECTOMY IN CHILDREN WITH CONGENITAL CYSTIC LUNG DISEASE. ADVANTAGES OF AN EXTRA TROCAR IN THE LOWER THORAX
3. 学会等名 18th Congress of the European paediatric Surgeons' Association (国際学会)
4. 発表年 2017年

1 . 発表者名 N. Fujiwara, N. Nakazawa-Tanaka, K. Miyahara, E. Arikawa-Hirasawa, C. Akazawa, A. Yamataka
2 . 発表標題 ALTERED EXPRESSION OF LAMININ ALPHA1 IN AGANGLIONIC COLON OF ENDOTHELIN RECEPTOR-B NULL MOUSE MODEL OF HIRSCHSPRUNG ' S DISEASE
3 . 学会等名 30thINTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PEDIATRIC SURGICAL RESEARCH, AND AN UPDATE ON NEWBORN AND FETAL SURGERY ( 国際学会 )
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 N. Nakazawa-Tanaka, N. Fujiwara, K. Miyahara, S. Nakada, E. Arikawa-Hirasawa, C. Akazawa, M. Urao, A. Yamataka
2 . 発表標題 THE EFFECT OF LAMININ-1 ON ENTERIC NEURAL CREST DERIVED CELLS MIGRATION IN THE HIRSCHSPRUNG ' S DISEASE MOUSE MODEL
3 . 学会等名 30thINTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PEDIATRIC SURGICAL RESEARCH, AND AN UPDATE ON NEWBORN AND FETAL SURGERY ( 国際学会 )
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 G. Miyano, M. Takeda, N. Nakazawa-Tanaka, T. Doi, H. Koga, M. Okawada, J. Ishii, G.J. Lane, T. Okazaki, M. Urao, A. Yamataka
2 . 発表標題 HIRSCHSPRUNG ' S DISEASE IN THE LAPAROSCOPIC TRANSANAL PULL-THROUGH ERA. DOES AGE AT SURGERY INFLUENCE POSTOPERATIVE BOWEL FUNCTION?
3 . 学会等名 30thINTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PEDIATRIC SURGICAL RESEARCH, AND AN UPDATE ON NEWBORN AND FETAL SURGERY ( 国際学会 )
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 N. Fujiwara, N. Nakazawa-Tanaka, K. Miyahara, C. Akazawa, A. Yamataka
2 . 発表標題 INCREASED GENE EXPRESSION OF SEMAPHORIN 3A IN THE ENDOTHELIN RECEPTOR-B NULL MOUSE MODEL OF HIRSCHSPRUNG ' S DISEASE
3 . 学会等名 64th Annual British Association of Paediatric Surgeons Congress ( 国際学会 )
4 . 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamataka A., Miyano G., Koga H., Okawada M., Doi T., Okazaki T., Urao M
2. 発表標題 FURTHER EXPERIENCE OF TRANSANAL ENDORECTAL PULL-THROUGH FOR HIRSCHSPRUNG ' S DISEASE USING THE ANORECTAL LINE TO DEFINE THE STARTING POINT OF RECTAL DISSECTION AND RECTAL MUSCLE CUFF DIVISION.
3. 学会等名 Pediatric Colorectal Club, 24th International Meeting ( 国際学会 )
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takeda M., Miyahara K., Akazawa C., Lane G., Yamataka A
2. 発表標題 SENSORY INNERVATION OF THE ANAL CANAL AND ANORECTAL LINE IN HIRSCHSPRUNG ' S DISEASE. HISTOLOGICAL EVIDENCE FROM MOUSE MODELS
3. 学会等名 Pediatric Colorectal Club, 24th International Meeting ( 国際学会 )
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮原 克  (Miyahara Katsumi)  (00420844)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・技術員   (32620)	
研究分担者	藤原 なほ  (Fujiwara Naho)  (20589543)	順天堂大学・医学部・准教授   (32620)	
研究分担者	岡和田 学  (Okawada Manabu)  (60433778)	順天堂大学・医学部・非常勤講師   (32620)	