

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16260

研究課題名(和文)自家細胞移植のための腸管神経節細胞僅少症患者由来乳歯幹細胞の遺伝学的機能的解析

研究課題名(英文) Genetic and functional analysis of dental pulp stem cells derived from patients diagnosed with hypoganglionosis aiming for autologous cell transplantation

研究代表者

吉丸 耕一郎 (Yoshimaru, Koichiro)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：60711190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：<患児由来幹細胞の性質> 健常児由来の幹細胞と比較しても増殖能力は同等であり、また細胞の分化能力としても幹細胞の特徴を変わりなく有していた。

<幹細胞移植効果の検討> 疾患モデルマウスに対する患者由来乳歯幹細胞の移植効果の検討として、移植後の体重増加の推移の観察を終了した。体重増加や腸管の動きの変化、顕微鏡的变化などの結果を得た。患児由来幹細胞移植群においても体重増加は見られ、電気生理学的にも腸管蠕動は改善傾向を示した。今後さらなる解析をする予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ヒルシュスブルング病類縁疾患の患児由来の乳歯幹細胞を用いて自身の腸管蠕動を改善させることを目的とした研究である。既に健常児由来の乳歯幹細胞を用いた疾患モデルマウスの治療効果は証明済みであるため、今後も本研究を継続し、自家細胞移植での治療達成を目指したい。

研究成果の概要(英文)：<Characteristics of stem cells derived from hypoganglionosis> The proliferation ability and differentiation ability were the same as that of stem cells derived from healthy children.

<Examination of stem cell transplantation> As an examination of the transplantation effect of patient-derived dental pulp stem cells on disease model mice, the observation of the body weight gain after transplantation was finished. Results such as weight gain, changes in intestinal movement, and microscopic changes were obtained. Weight gain was also observed in the patient-derived stem cell transplant group, and intestinal peristalsis showed an improving tendency electrophysiologically. Further analysis will be conducted in the future.

研究分野：小児外科

キーワード：ヒルシュスブルング病 歯髄幹細胞 再生医療
ヒルシュスブルング病類縁疾患 腸管神経節細胞僅少症 腸管不全 脱落乳歯 腸管再生

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

小児期に発症する腸管蠕動不全症として、ヒルシュスプルング病(H病)とその類縁疾患(H類縁)がある。後者に属し、厚生労働省指定難病である腸管神経節細胞減少症(hypoganglionosis, HYPO)は、本邦で過去10年間で130例認められ、診断は病理組織学的に著明に減少した腸管神経節細胞を同定することで可能である(Yoshimaru K, et al. 2017.)。しかし、その「希少性」からいまだ「病因病態が不明」であり、このため「治療法が未確立」であり、永続する著明な腹満により、患児は終生にわたり経口摂取が満足にできない(右上図)。HYPOの病因として、H病の原因遺伝子とされているRet, GDNF, EDNRB, Hlx1等が関与していると示唆されているが(吉丸 耕一朗, 他. 2015.)、未だ証明されていない。H病は、胎生期の神経堤から発生した神経節細胞の遊走が障害され成立するが(Okamoto E, et al. 1967.)、HYPOの病因が、H病同様上記異常遺伝子による胎生期の腸管神経節細胞の遊走障害によるものかどうかの議論が未だなされておらず、『HYPOの病因は何であるか。』『HYPOは根治できるか』の問いに根本的に答える画期的研究は未だなされていない。



2. 研究の目的

この学術的「問い」を解明するため、患児由来幹細胞、中でも間葉系幹細胞の一種であるヒト脱落乳歯由来歯髄幹細胞(stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED)に世界に先駆けて着目した。SHEDは、従来捨てられる乳歯より遺伝子導入を必要とせず単離することができ、腸管神経節細胞と同様に神経堤由来の細胞であることに我々は注目し、HYPOの研究に最適であることを発見した。さらに、下図のごとき特徴を有するSHEDは本研究の出口戦略として早期臨床応用に際し、低侵襲・安価・安全に細胞を作製しえ、移植後も、免疫抑制剤が不要であることから、患者のQOL向上に大きく寄与する。研究の目的は、HYPO患者由来のSHEDの機能的特徴を、臨床的・栄養学的・腸管電気生理学的・病理組織学的・分子生物学的に明らかにすること、である。

3. 研究の方法

<HYPO-SHEDの幹細胞生物学的解析>

増殖能: CyQUANT NF cell proliferation assay, PCR, WB, ELISA等にてBrdU及び各成長因子(NGF, FGF, GDNF, SCF, IGF, BDNF等)の発現量を測定する。

分化能: 神経節細胞はHuCDを、神経線維はNeurofilament Mを、そして、カハール細胞はc-kitおよびAno1をマーカーとして検証する。

<H類縁モデルマウスに対する健常児由来SHEDおよび患者由来SHED移植効果の検討>

モデルマウス: commercial baseにて購入する。

臨床的評価: 自由飼料/飲水にて、体重、飼料摂取・飲水量、糞便量、生存の観察

栄養学的評価: 病理組織学的形態学的評価(小腸の絨毛高・長さ)、生化学的評価(糖吸収能の評価、絨毛成熟度の評価)(ELISA, 比色法)

腸管蠕動評価: Tissue Organ Bathを用いた電気生理学的評価(アセチルコリン, エンドセリン, 一酸化窒素, 電気的刺激, ペースメーカー波形の評価)

病理組織学的/分子生物学的評価: 神経節細胞数・神経線維密度・カハール細胞面積(免疫染色)、蛋白発現量の解析(ELISA)

a)移植した歯髄幹細胞のin vivoにおける分化の評価(HuCD: 神経節細胞, Neurofilament M: 神経線維, c-kit: カハール細胞)を用い酵素抗体法及び抗ヒト・ミトコンドリア抗体との二重蛍光抗体法にてSHEDの分化細胞を探る。

b)移植した歯髄幹細胞のTrophic factors (NGF, GDNF, FGF, SCF, IGF, BDNF)の分泌能をELISAにて解析する。

4. 研究成果

HYPOモデルとしてEDNRB遺伝子発現の低下が知られ、腸管蠕動に乏しいJapanese Fancy mouse 1 (JF1)を用い、健常児由来SHEDをJF1に移植したところ、非移植群と比べ、SHED移植群では、体重の増加・アセチルコリン刺激に対する腸管収縮力の改善が認められ、移植SHEDがレシピエント腸管壁で、神経節細胞・神経線維・カハール細胞へ分化し、腸管神経叢の再生並びにGDNF, NGF, FGF等の成長/栄養因子の有意な増加に寄与したことを見出し、SHED移植の有効性を明らかにした。また、他臓器(肺・肝・腎)における形態的機能的変化、血清における炎症性サイトカインの上昇、移植13週経過後の開腹所見にて明らかな腫瘍形成のいずれもが認められなかったことから、SHED静注移植の安全性に関しても確認している。以上の結果を、Sci Repに報告した(2022年)。

続いて、HYPO-SHEDの幹細胞生物学的解析として、健常児由来SHEDとHYPO-SHEDが以下の解析にて遜色のないことを確認し(コロニー形成能、BrdUの取り込み能)、HYPO-SHEDも間

葉系幹細胞の特性を有していること(フローサイトメトリーにおける表面抗原)を確認した。また、PD score においても健常児由来 SHED と同等であることを確認した。以上のように、HYPO-SHED の幹細胞生物学的特徴の確認ならびに安全性の確認を進めている。

HYPO-SHED による JF1 マウスへの移植効果としては、体重増加ならびにアセチルコリン刺激にて非移植群に比較して変化がみられていた。

ヒルシュスプルング病とその類縁疾患を含む腸管不全に対する再生医療は、腸管神経再生という観点から着目されているが今だ、最善の細胞ソース・最善の移植方法、タイミングは確立されていない。また腸管オルガノイドを作成し臓器として移植をする研究も国内外で盛んである。細胞移植がよいか臓器移植がよいかはターゲットとなる疾患次第で変わってくるため、今後もさらなる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 吉丸耕一朗, 桐野浩輔, 柳 佑典, 河野雄紀, 河野 淳, 入江敬子, 高橋良彰, 小幡 聡, 伊崎智子, 松浦俊治, 山座孝義, 田口智章.	4. 巻 119
2. 論文標題 ヒルシユスブルグ病およびその類縁疾患 成因から再生医療まで	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日外会誌	6. 最初と最後の頁 616-622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉丸耕一朗, 園田聡一朗, 山内恵利佳, 河野 淳, 松浦俊治, 山座孝義, 小田義直, 田尻達郎, 田口智章.
2. 発表標題 hypoganglionosisに対するヒト脱落乳歯歯髄幹細胞移植による新規治療法開発
3. 学会等名 第37回日本小児外科学会秋季シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉丸耕一朗, 桐野浩輔, 松浦俊治, 田口智章.
2. 発表標題 腸管神経再生の過去・現在・未来
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉丸耕一朗
2. 発表標題 小児外科領域におけるstem cellを用いた病態解明と治療の展望
3. 学会等名 第56回日本周産期・新生児医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉丸耕一朗, 山座孝義, 梶岡俊一, 松浦俊治, 小田義直, 田口智章.
2. 発表標題 歯髄幹細胞を用いたhypoganglionosisに対する新規治療法～克服すべき課題とひらけてきた未来～
3. 学会等名 第61回日本平滑筋学会総
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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.
2. 発表標題 ひらけてきた未来と克服すべき課題 ～歯髄幹細胞を用いたhypoganglionosisに対する新規治療法の確立～
3. 学会等名 第55回日本小児外科学会
4. 発表年 2018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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関