

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09103

研究課題名(和文) 神経幹細胞移植によるヒルシュスプルング病に対する機能再生医療の開発

研究課題名(英文) Development of Functional Regenerative Medicine for Hirschsprung's Disease Using Neural Stem Cell Transplantation

研究代表者

藤原 なほ (Fujiwara, Naho)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20589543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：SOX10-VENUSトランスジェニックマウスの胎仔腸管を採取し、腸管神経幹細胞塊(Neuerosphere)を作成。正常腸管、さらにはH病モデル無神経節腸管とのin vitro共培養実験により、正常腸管から作成した神経幹細胞の正常発達には腸管環境が大きく影響しており、有神経幹細胞区域であったもH病モデル腸管と正常マウスの有神経幹細胞区域と全く同じとはいえないことがわかった。このことにより、将来的に細胞移植等の治療開発には移植先となる腸管環境の検証および改善が必須であることが判明した。今までの結果をまとめ、国際学術集会、英語論文にて成果発表を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根治治療となる細胞移植を模索しているが、レシピエントとなる腸管環境が移植細胞の神経発達には大きな影響を与えることが証明された。さらには、移植する腸管の部位によって移植細胞に与える影響も異なるため、慎重な選択が必要となる。

これは、いかに正常もしくは分化機能に長けた移植細胞であろうとも、効果的な生着・分化を促すためには、移植する腸管部位の移植時タイミングの環境を整えることが必須となることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Fetal guts from Sox10-Venus mice were dissected on embryonic day 13.5 and cells were dissociated then cultured to generate neurospheres. These neurospheres, which were co-cultured with either dissociated control or HD gut from Sox10-Venus(-) mice on embryonic day 13.5. After 4 days, transplanted enteric neurospheres had undergone abundant neuronal migration and ENS had differentiated in the control gut compared with the HD gut. There were many Tuj1-positive neurites in the control and HD groups except in the colons of the HD group. We have shown that neurite outgrowth and branches in both ganglionic and aganglionic segment of HD are significantly decrease compared with controls. We demonstrated that transplanted ENCC did not differentiate properly in HD colon. These results highlight the importance of the neuronal environment of the recipient gut for the ENS development. These results were presented at international scientific meetings and in English papers.

研究分野：小児外科

キーワード：腸管神経系 Hirschsprungs disease 再生医療 細胞治療 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

Hirschsprung 病 (H 病) は現状では有効な治療法のない原因不明の難病であり、再生医療 (失われた細胞・組織・器官などを再生し、機能を回復させるための医療) の手法を用いた治療研究の進歩により、H 病における再生医療の基礎研究も進捗が見られている。2007 年のヒト iPS 細胞の樹立の報告からわずか 1 年後の 2008 年に最初の疾患特異的 iPS 細胞の論文が報告されたが、末梢神経系では 2010 年に iPS 細胞から NCSCs を分化誘導した報告がされ (Lee G et al. Nature Protocols, April, 2010)、H 病のみならず他の腸管神経疾患への臨床応用が望まれているがその後の解析・検証は未だされていない。最近、ヒト ES 細胞から腸管神経幹細胞の分化誘導に成功し、さらに H 病モデルマウスとして汎用されている出生後のエンドセリンレセプター B (以下 EDNRB) ノックアウトマウスへの移植実験が報告された (Fattahi et al. Nature March 531 2016)。これは今までの細胞治療に関しては胎児期の治療が必須と考えられていた概念を覆すものであり、胎児期ではなく、生後の移植でも神経伸長を促し、H 病の治療につながる実証され、大きな衝撃となった。しかし、多能性幹細胞の安全性や質の評価は未達であり、長い人生を歩む小児患者への臨床応用にはまだ高いハードルがある。

2. 研究の目的

本研究は腸管神経幹細胞の移植による神経再生の誘導を実現させ、これによって H 病の新たな治療法の確立を目指す。以前よりわれわれはマウスを使った腸管神経系の研究を細胞レベルで行ってきた。(1) 正常マウス腸管から作出した神経堤幹細胞塊 (Neurosphere) をマウス腸管に細胞移植 (2) 移植部位のドナー細胞の生着性・分化を検証 (3) 生体マウスへの投与方法・生着・分化の検討 (4) ヒト由来の神経堤幹細胞を分離しマウスへの細胞移植の検証 を順番に行うことを目的とした。

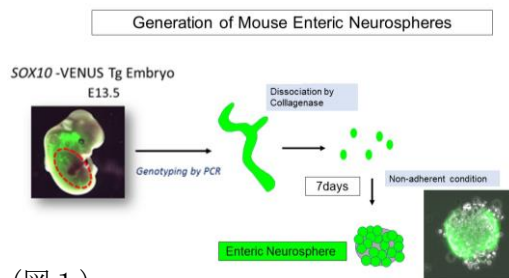
3. 研究の方法

(1) Neurosphere 作成

WT マウス e13.5 の胎仔腸管を採取し、Collagenase を用いて科学的分離を行い、DMEM・F/12 培地を基本とした培地で培養を行う (図 1)。

(2) Co-culture (共培養実験)

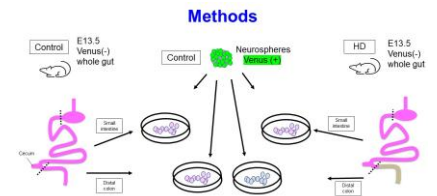
Neurosphere を e13.5 の胎仔腸管から採取した WT マウス腸管細胞と共培養を行い、生着・分化を評価する。同様に、Neurosphere を e13.5 の *Ednrb*-KO mouse 腸管細胞との共培養を行い、生着・分化を評価する (図 2)。



(図 1)

(3) 生体マウスへの Neurosphere の移植

(4) ヒト由来神経堤幹細胞の分離・生体マウスへの細胞移植の検証



(図 2)

4. 研究成果

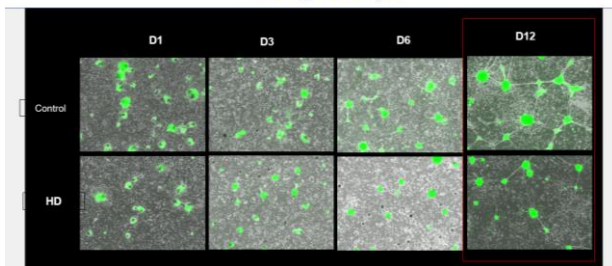
(1) Neurosphere 作成

SOX10-Venus(+)マウスの胎仔 E13.5 の腸管を採取し、Collagenase で分離し、DMEM・F12 を基本とした培地を用いて浮遊培養を開始すると、D4 ころから Neurosphere 様の塊が確認できる。

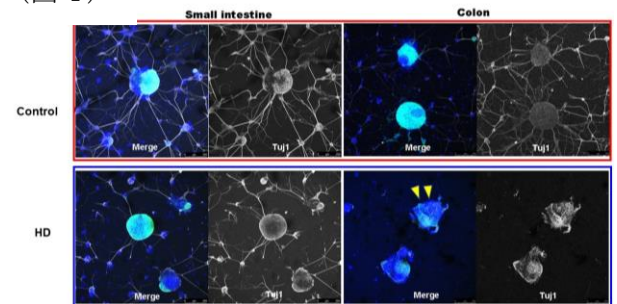
(2) 共培養実験

図 3 のように、Neurosphere がレシピエントの細胞とネットワーク形成する様子が観察された。WT 細胞と比較して、KO 細胞では乏しかった (図 3)。免疫染色 (Tuj1:neuronal marker) では分化の様子が確認された (図 4)。

(図 3) **Growth of neurospheres with the gut during 12 days**



(図 4)



以上の結果より、正常な腸管幹細胞から作成して Neurosphere を移植することを想定すると、疾患モデル腸管での生着・分化は正常腸管とは異なることが証明された。今後の分子生物学的な検証が課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Fujiwara Naho, Miyahara Katsumi, Nakazawa-Tanaka Nana, Akazawa Chihiro, Yamataka Atsuyuki	4. 巻 38
2. 論文標題 In vitro investigation of the differentiation of enteric neural crest-derived cells following transplantation of aganglionic gut in a mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 755 ~ 759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-022-05105-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sueyoshi R, Miyahara K, Nakazawa-Tanaka N, Fujiwara N, Ochi T, Yamataka A.	4. 巻 36
2. 論文標題 DPP4 Inhibitor Reinforces Cell Junction Proteins in Mouse Model of Short Bowel Syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 :49-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-019-04571-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakazawa-Tanaka N, Miyahara K, Fujiwara N, Ochi T, Sueyoshi R, Nojiri S, Akazawa C, Urao M, Yamataka A.	4. 巻 36
2. 論文標題 Decreased Expression of α 1 Integrin in Enteric Neural Crest Cells of the Endothelin Receptor B Null Mouse Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 43-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-019-04578-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Miyake H, Seo S, Fujiwara N, Miyahara K, Lee C, Li B, Chen Y, Yamataka A, Pierro A	4. 巻 35
2. 論文標題 Endothelin Receptor B Affects the Perfusion of Newborn Intestine: Possible Mechanism of Necrotizing Enterocolitis Development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1339-1343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-019-04559-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Naho, Nakazawa-Tanaka Nana, Yamataka Atsuyuki	4. 巻 29
2. 論文標題 Animal Models of Hirschsprung's Disease: State of the Art in Translating Experimental Research to the Bedside	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Pediatric Surgery	6. 最初と最後の頁 361 ~ 367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0039-1694745	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 -

1. 著者名 Shigeta Y, Fujiwara N, Koike M, Yamataka A, Doi T	4. 巻 35
2. 論文標題 Bone Mineral Density Is Increased in the Cadmium-Induced Omphalocele Chick Model by Using Three-Dimensional Micro-Computed Tomography	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 911-914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-019-04501-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Koga Hiroyuki, Murakami Hiroshi, Seo Shogo, Ochi Takatori, Nakamura Hiroki, Miyake Yuichiro, Kosaka Seitaro, Takeda Masahiro, Fujiwara Naho, Arii Rumi, Tsuboi Koichi, Lane Geoffrey J., Yamataka Atsuyuki	4. 巻 58
2. 論文標題 Retropertoneoscopic Pyeloplasty for Ureteropelvic Junction Obstruction in Children: Value of Robotic Assistance	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Surgery	6. 最初と最後の頁 1291 ~ 1295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpedsurg.2023.02.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakazawa-Tanaka N, Fujiwara N, Miyahara K, Akazawa C, Urao M, Yamataka A.	4. 巻 39
2. 論文標題 Increased enteric neural crest cell differentiation after transplantation into aganglionic mouse gut.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-022-05324-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suda Kazuto, Yamada Shunsuke, Miyahara Katsumi, Fujiwara Naho, Kosaka Seitaro, Abe Kumpei, Seo Shogo, Nakamura Shinji, Lane Geoffrey J., Yamataka Atsuyuki	4. 巻 39
2. 論文標題 High intestinal vascular permeability in a murine model for Hirschsprung's disease: implications for postoperative Hirschsprung-associated enterocolitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-022-05308-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 N Fujiwara, K Miyahara, N Nakazawa-Tanaka, A YamatakaT.
2. 発表標題 COMPARATIVE DIFFERENTIATION OF ENTERIC NEURAL CREST-DERIVED CELLS CO-CULTURED WITH GANGLIONIC GUT IN A MOUSE MODEL.
3. 学会等名 22nd European Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 N Fujiwara, K Miyahara, N Nakazawa-Tanaka, A YamatakaT.
2. 発表標題 IN-VITRO INVESTIGATION OF DIFFERENTIATION OF ENTERIC NEURAL CREST-DERIVED CELLS FOLLOWING TRANSPLANTATION OF AGANGLIONIC GUT IN A MOUSE MODEL COMPARATIVE DIFFERENTIATION OF ENTERIC NEURAL CREST-DERIVED CELLS CO-CULTURED WITH GANGLIONIC GUT IN A MOUSE MODEL.
3. 学会等名 34th International Symposium on Pediatric Surgical Research (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原なほ, 宮原克, 田中奈々, 山高篤行
2. 発表標題 マウスモデルをもちいた腸管神経再生治療法の開発
3. 学会等名 第58回 日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原なほ, 宮原克, 田中奈々, 山高篤行
2. 発表標題 Comparative differentiation of enteric neural crest-derived cells co-cultured with aganglionic gut in a mouse model
3. 学会等名 第37回 日本小児外科秋季シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中奈々, 宮原克, 藤原なほ, 末吉亮, 越智崇徳, 浦尾正彦, 山高篤行
2. 発表標題 9 エンドセリンレセプターB欠損マウスの腸管 神経堤細胞における 1インテグリンの発現低下
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮原克, 田中奈々, 藤原なほ, 末吉亮, 越智崇徳, 山高篤行
2. 発表標題 ヒルシユスプルング病モデルマウス腸管神経 細胞におけるアセチル化チューブリンの発現異常
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 末吉亮, 宮原克, 田中奈々, 藤原なほ, 越智崇徳, 世川修, 山高篤行
2. 発表標題 短腸症候群モデルマウスにおける糖尿病薬 DPP4阻害薬による細胞間結合の増強効果
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1 . 発表者名 Naho Fujiwara, Anne-Marie O'donnell, Hiroki Nakamura, Prem Puri
2 . 発表標題 Downregulation of the VAP-1 gene in Hirschsprung's disease
3 . 学会等名 Pediatric Colorectal Club 26th International Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Fujiwara N, Miyahara K, Nakazawa-Tanaka N, Akazawa C, Yamataka.
2 . 発表標題 In vitro transplantation of enteric neural crest cells from SOX10-Venus mouse embryonic stem cells in the gut of the endothelin receptor B null mouse model.
3 . 学会等名 35th International Symposium on Pediatric Surgical Research
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Fujiwara N, Miyahara K, Nakazawa-Tanaka N, Akazawa C, Yamataka A.
2 . 発表標題 Transplantation of SOX10-Venus mouse embryonic stem cell-derived enteric nervous system.
3 . 学会等名 23rd European Congress
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Fujiwara N, Miyahara K, Nakazawa-Tanaka N, Akazawa C, Yamataka A.
2 . 発表標題 Migration and differentiation of enteric neural crest-derived cells following transplantation of aganglionic gut in a mouse model.
3 . 学会等名 29th International meeting of the Pediatric Colorectal Club
4 . 発表年 2022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・大学院医学研究科・技術員 (32620)	
研究分担者	山高 篤行 (Yamatata Atsuyuki) (40200703)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	
研究分担者	田中 奈々 (Tanaka Nana) (50530656)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	

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
---------	---------