

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22669

研究課題名(和文) ヒルシュスブルング病に対する新たな移植療法の試み～多様分化混合細胞シートの開発～

研究課題名(英文) Development of a new cell based therapy for Hirschsprung's disease

研究代表者

桑原 強 (KUWAHARA, Tsuyoshi)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：30566906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒルシュスブルング病は、腸管神経系の一般的な疾患で、出生時から存在し、その発生率は1/5,000生誕とされている。治療法は患部の外科的切除が行われ、特に長大型や広範囲型の症例では、長期予後が散発的に不良となる。細胞療法は、神経前駆細胞の供給源として、欠損または異常な腸管神経細胞を置換することにより、神経腸管疾患の治療オプションとなる可能性がある。本研究では、in vivo移植モデルを用いて、コラゲナーゼとフィブロネクチンで処理することにより、移植した腸管神経堤細胞(ENCC)の大腸内腔への浸潤を促進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒルシュスブルング病の治療法は外科的処置が行われるが、25%の患者で便秘の合併症があり、患者が多感な小児であることから術後のQOLが問題となっている(Gosemann JH. et al. Eur J Pediatr Surg 2013)。HSCRを発症したすべての児童が健康で文化的な生活を送れるようにするため、外科的処置以外の再生医療や薬剤治療法の開発が望まれている。我々の研究成果は、無神経節結腸の状態を改善する細胞治療の可能性を引き上げることにつながる。

研究成果の概要(英文)：Hirschsprung's disease is a common disorder of the enteric nervous system, which is present from birth and has an incidence of 1/5,000 live births. Surgical removal of the affected segment has some success, but the long-term outcomes are sporadically poor, especially in cases of the long or extensive type. Cell-based therapy is a potential treatment option for neurointestinal diseases by serving as a source of neural progenitor cells to replace missing or abnormal enteric neurons. In this study, using an in vivo transplantation model, we demonstrated that treatment with collagenase and fibronectin promotes infiltration of transplanted enteric neural crest cells toward the colon lumen.

研究分野：小児外科学

キーワード：腸管神経系 ヒルシュスブルング病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒルシュスプルング病 (HSCR)は、新生児期に重度の便秘や腸閉塞を主訴とする疾患で、腸管筋層や粘膜下層の神経叢である腸管神経系(ENS)の欠如が原因とされる。ENS は腸管神経堤由来細胞(ENCCs)が、発生期に腸管壁内を口側から肛側に向けて移動することで形成される。この形成過程が阻害されることで HSCR が発症すると考えられている。HSCR における腸管神経の欠損は、結腸の口側から肛側にかけてさまざまな長さのものがある。HSCR の治療は一般的に、無神経節腸管の切除と肛門への吻合が根治術となるが、全結腸や小腸まで腸管神経を欠損するような症例では死亡率が高く(全結腸型 16%、小腸型 36%)、短領域型でも 25%の患者に弁失禁の合併症が確認されており、新しい治療法として小腸移植や神経堤幹細胞移植による再生医療が強く望まれている。

### 2. 研究の目的

HSCR は、腸管および粘膜下神経叢に腸管神経節がないことを特徴としている(1, 2)。主な治療法に、無神経節腸管の外科的除去が行われるが、広範囲の無神経節腸管を持つタイプの場合、術後に便失禁または便秘を持つ場合があり、永久的な人工肛門造設術を必要とすることがある。ヒルシュスプルング病に代表される腸管神経節異常症に対する新しい治療法として、病変部に腸管神経堤由来細胞 (ENCCs) を移植する Cell Therapy が研究されている。我々の以前の研究から腸管漿膜に含まれる VI 型コラーゲンが腸管神経移植の障害となることを示唆し(3)、さらにコラーゲナーゼとフィブロネクチンが移植された ENCC の筋層への浸潤を促進することを *in vitro* の移植実験で示した(4)。本研究では、この新しい方法が生体マウスの腸管神経移植でも有用性を示すことをできるか検証した。

### 3. 研究の方法

#### (1) ENCCs の培養

ENCC は、E13.5 胚からのマウス腸管を PBS で洗浄し、TrypLE Express 処理後に機械的に破壊した。腸管から剝離した細胞は、低接着培養皿を使い神経選択培地で培養しニューロスフィアを形成させた。ニューロスフィアは、3 日おきに継代し、2~4 週間、神経選択培地で培養および維持した(5)。移植に使用するニューロスフェアのサイズは直径  $93 \pm 11 \mu\text{m}$  であった。

#### (2) マウス結腸へのニューロスフェアの *in vivo* 移植

マウスをイソフルランで麻酔し(誘導用に 2%、維持用に 1%)、レシピエントマウスに正中切開をおき開腹した後、結腸をガーゼに移し、20 mg/mL の I 型コラーゲナーゼまたは PBS に浸した濾紙 (5×2 mm) で 3 分間 3 回覆った。PBS で 1 回洗浄した後、結腸を 5  $\mu\text{L}$  の 0.1 mg/mL フィブロネクチンまたはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で処理し、KikGR を発現するニューロスフェアを結腸に滴下した。3 分間のインキュベーション後、腹筋膜と皮膚を Reflex7mm 創傷クリップで閉腹した。組織学的検査は移植後 7 日と 2 ヶ月に行った。

#### (3) 免疫蛍光法

切除した大腸を 4%パラホルムアルデヒド-PBS で 1-2 日間固定し、30%スクロース/PBS に浸透させた後、Tissue-Tek に包埋し凍結させた。クライオスタットで凍結切片を作成し、免疫蛍光染色を行った。コラーゲン III、コラーゲン VI、Tuj1、及び SMA を免疫抗体染色に使用した。蛍光画像は、Zeiss LSM 710 レーザー走査共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss) で取得した。

### 4. 研究成果

#### (1) 移植マウスにおけるコラーゲナーゼおよびフィブロネクチン投与の副作用

移植されたマウスにおけるコラーゲナーゼおよびフィブロネクチン投与の副作用を評価するために、我々は、コラーゲナーゼおよびフィブロネクチンで処理された結腸への ENCCs の *in vivo* 移植を行った。しかし、結腸全体のコラーゲナーゼ処理後、結腸の漿膜損傷、毛細血管の破綻、腸管の癒着、マウスの死亡などの副作用が観察された。これらの副作用を軽減するために、I 型コラーゲナーゼを染み込ませた濾紙の薄片を使用して結腸の体側側のみコラーゲナーゼ処理を限定した。この方法により、致死的な合併症を生じず、処理した部分のみの漿膜除去ができ、結果としてコラーゲナーゼ処理マウスの 2 か月生存率は、対照マウス (PBS 処理マウス、実験マウス 7 匹あたり 7 匹の生存、コラーゲナーゼおよびフィブロネクチン処理マウス、12 匹あたり 12 匹の生存)と同程度であった。

## ( 2 ) In vivo ENCC 移植

平滑筋層への移植神経細胞の成長を検証するために、ニューロスフィアを移植した結腸の短軸像を、凍結切片を用いて蛍光免疫染色で観察した。PBS やフィブロネクチンで処理した結腸の平滑筋層へのニューロスフィアの浸潤は見られなかったが、I 型コラゲナーゼとフィブロネクチンを併用した結腸に移植されたニューロスフィアの筋層への浸潤が観察された。我々の発見は、フィブロネクチンおよび I 型コラゲナーゼ処理結腸に移植された ENCCs が、ex vivo 実験と同様に生きたマウスの平滑筋層に浸潤したことが示された。移植された神経細胞は、移植後 7 日目には筋層に浸潤し、移植後 2 ヶ月目には腸管平滑筋層に充填されていることが観察された。これらの結果は、移植されたニューロスフィアが筋層に浸潤しているだけでなく、正しい位置にあることを示唆するものであった。

## ( 3 ) 結論

本研究で、生きたマウスの腸管で、結腸内腔の方向に向かって移植されたニューロスフィアの浸潤が観察された。ex vivo 移植実験と比較して、in vivo 実験でも同様の結果が得られ、我々の移植方法が生きたマウスでも有効であることが示された。この方法で ENCCs を移植したマウスは、移植後 2 カ月でほぼ正常な結腸へ回復した。この結果は Cell Therapy の実現に貢献する可能性がある。

## 参考文献

1. Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, Pelet A, Arnold S, Miao X, Griseri P, Brooks AS, Antinolo G, de Pontual L, Clement-Ziza M, Munnich A, Kashuk C, West K, Wong KK, Lyonnet S, Chakravarti A, Tam PK, Ceccherini I, Hofstra RM, Fernandez R, Hirschsprung Disease C (2008) Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *Journal of medical genetics* 45 (1):1-14. doi:10.1136/jmg.2007.053959
2. Goyal RK, Hirano I (1996) The enteric nervous system. *The New England journal of medicine* 334 (17):1106-1115. doi:10.1056/NEJM199604253341707
3. Nishida S, Yoshizaki H, Yasui Y, Kuwahara T, Kiyokawa E, Kohno M (2018) Collagen VI suppresses fibronectin-induced enteric neural crest cell migration by downregulation of focal adhesion proteins. *Biochemical and biophysical research communications* 495 (1):1461-1467. doi:10.1016/j.bbrc.2017.11.184
4. Yasui Y, Yoshizaki H, Kuwahara T, Nishida S, Kohno M, Okajima H (2022) Transplanted neural crest cells migrate toward Auerbach's plexus layer instead of the colon surface in recipient colon pretreated with collagenase and fibronectin. *Biochemical and biophysical research communications* 601:116-122. doi:10.1016/j.bbrc.2022.02.094
5. Nagashimada M, Ohta H, Li C, Nakao K, Uesaka T, Brunet JF, Amiel J, Trochet D, Wakayama T, Enomoto H (2012) Autonomic neurocristopathy-associated mutations in PHOX2B dysregulate Sox10 expression. *The Journal of clinical investigation* 122 (9):3145-3158. doi:10.1172/JCI63401

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kido Miori, Kuwahara Tsuyoshi, Yasui Yoshitomo, Okajima Hideaki, Kohno Miyuki	4. 巻 63
2. 論文標題 Hypertrophic pyloric stenosis at birth: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 231 ~ 233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14392	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 Yasui Yoshitomo, Yoshizaki Hisayoshi, Kuwahara Tsuyoshi, Nishida Shoichi, Kohno Miyuki, Okajima Hideaki	4. 巻 601
2. 論文標題 Transplanted neural crest cells migrate toward Auerbach's plexus layer instead of the colon surface in recipient colon pretreated with collagenase and fibronectin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 116 ~ 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.02.094	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 桑原強
2. 発表標題 鎖肛におけるNixon肛門形成術の有用性
3. 学会等名 第57回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hisayoshi Yoshizaki, Shoichi Nishida, Yoshitomo Yasui, Tsuyoshi Kuwahara and Miyuki Kohno
2. 発表標題 The role of extracellular matrix proteins in enteric neural crest cell migration
3. 学会等名 The 13th World Congress of The International Cleft Lip and Palate Foundation, The 59th Annual Meeting of The Japanese Teratology Society (国際学会)
4. 発表年 2019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	吉崎 尚良  (YOSHIZAKI Hisayoshi)  (00443490)	金沢医科大学・医学部・講師    (33303)	

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