

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791736

研究課題名(和文)

ヒルシュスプルング病の神経堤幹細胞移植治療に必要とされるニッチ因子の研究

研究課題名(英文)

Investigation of neural crest stem cell therapy and niche factors for Hirschsprung's disease

研究代表者

西川 竜平 (NISHIKAWA RYUHEI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30534531

研究成果の概要(和文):

P0-Cre/CAG-CAT-EGFP マウスを用い神経堤幹細胞を含む細胞群を濃縮するシステムを確立した。ヒルシュスプルング病のモデル Ret<sup>[-/-]</sup>マウス胚腸管への神経様体(NLB)共培養を行い GFP・神経核マーカーPGP9.5 の二重陽性細胞浸潤する様子を確認した。GFP 陽性細胞から無血清浮遊培養で NLB 形成に成功。10%血清存在下で神経・グリア・平滑筋の3系統の細胞への分化誘導可能を確認した。

研究成果の概要(英文):

Hirschsprung's disease, also called aganglionosis or megacolon, is a developmental disorder of large intestine (colon) which occurs in 1 in 5000 children. Ret KO (Ret<sup>[-/-]</sup>) mouse were one of the Hirschsprung's disease model mouse which have no intestinal nerve systems. An object of this NLB co-culture study with Ret<sup>[-/-]</sup> KO mouse aganglionic colon is to research regenerative medicine tactics for Hirschsprung's disease using de novo Neurosphere-like Bodies (NLBs) generation protocol with serum free culture to regenerate enteric nervous system.

Although there are several report described Generation of NLBs in gut but serum free culture procedure have not reported.

P0-Cre/floxed-EGFP mice are known to be used to target neural crest derived stem cells (NCSCs) population using EGFP fluorescent and could separate NCSCs rich cell population using FACS cell sorter.

We generated Neurosphere-like Bodies (NLBs) from the E13.5 embryo gut of transgenic mice P0-Cre/floxp-EGFP and then cells were cultured in the serum-free medium successfully. After 10 days to 3 w cultures, serum-Free-cultured EGFP-positive cells formed Neurosphere-like structures that expressed NCSC genes. Neurons, glial cells, and myofibroblasts marker protein expression were confirmed after 4days culture of NLBs using poly-D-lysine-laminin coated slide chamber and 10% FBS contained medium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：neural crest-derived stem cells NCSCs Hirschsprung's disease Neurosphere-like Bodies NLBs Ret

### 1. 研究開始当初の背景

ヒルシュスプルング病（以下本症）とは、新生児期腹部膨満を主訴とする疾患で、その本態は消化管の神経節細胞の欠如である。腸管神経細胞は神経堤幹細胞（NCSCs: Neural crest stem cells）から分化することが知られている。NCSCsは自己増殖しsphereと呼ばれる細胞塊を形成する。我々は分離直後の神経堤幹細胞及びsphereを用いることで腸管疾患への移植治療の可能性を検討した。

### 2. 研究の目的

我々は分離直後の神経堤幹細胞及びsphereを用いることで腸管疾患への移植治療の可能性を検討した。

[本研究で明らかにしたい点] 移植するsphereがどれだけ神経堤幹細胞の供給元として有効であるかを評価する。腸管神経を欠失した本症モデルマウス腸管への器官培養条件における神経堤幹細胞の移植を行い移植による神経節再生を確認する。

### 3. 研究の方法

我々のグループは幹細胞を効率よく回収するドナー動物として、P0 Cre/CAG-CAT-EGFP マウスを用いた。これにより神経堤幹細胞をGFP蛍光で標識することが可能となった。また、E11.5マウス胚腸管への神経堤幹細胞移植をニューロトロフィックファクター（GDNF）処理した条件と処理しない条件のそれぞれで試みた。マウス胚腸管由来細胞は2週間から3週間の間、EGFおよびFGFを含有した無血清培地を用いて培養を行うことで浮遊細胞塊を形成させることが可能である。我々は上記マウスの浮遊細胞塊を用いてpoly-D-lysineコーティングされ laminine 処理されたガラスチャンバー内で10%血清含有培地により4日間接着培養することで、神経堤幹細胞特有の神経・グリア・平滑筋の3系統への分化が見られるかどうかを検証した。また、無血清浮遊培養によって得られた神経幹細胞を含んだ細胞塊を用いて無神経節腸管へ移植することによる神経形成能を組織免疫染色に

より検証した。

ヒトにおいても同様に、20例の手術検体を用いて腸管由来細胞を浮遊培養条件で培養を行った（表1）。得られた細胞塊に対しマウスと同様にpoly-D-lysineコーティングされ laminine 処理されたガラスチャンバー内で10%血清含有培地により4日間接着培養することで、神経堤幹細胞特有の神経・グリア・平滑筋の3系統への分化が見られるかどうかを検証した。また、ヒト無神経節への移植を行い、神経形成が見られるかどうかを検証した。

症例	年齢	性別	原疾患	切除部位	増殖細胞塊形成
1	0.9	男	ヒルシュスプルング病	回腸	Yes
2	0.6	男	ヒルシュスプルング病	結腸、直腸	Yes
3	11	男	Hypoganglionosis	空腸、回腸、結腸	No
4	13	男	Hypoganglionosis	結腸	Yes
5	16	男	Hypoganglionosis	結腸	No
6	17	男	Hypoganglionosis	結腸	No
7	0.6	男	Hypoganglionosis	空腸、回腸	Yes
8	1	男	鎖肛	結腸	Yes
9	0.4	女	特発性腸管穿孔	回腸	Yes
10	0.3	男	特発性腸管穿孔	回腸	Yes
11	0.1	女	特発性腸管穿孔	回腸	Yes
12	0.1	女	先天性胆道拡張症	空腸	Yes
13	3	女	先天性胆道拡張症	空腸	No
14	0.7	女	胆道閉鎖症	空腸	No
15	8	男	Peutz-Jeghers syndrome	空腸	No
16	10	女	メッケル憩室	回腸	No
17	8	男	小腸粘膜下腫瘍	空腸	Yes
18	52	女	クローン病	回腸	No
19	53	女	大腸癌	結腸	No
20	64	女	大腸癌	結腸	No

表1. 神経堤幹細胞を含んだ細胞塊形成実験に用いられた20例の患者検体

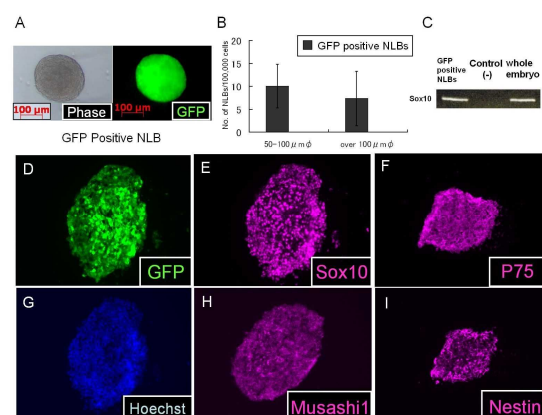


図1. 浮遊培養による神経堤細胞塊形成

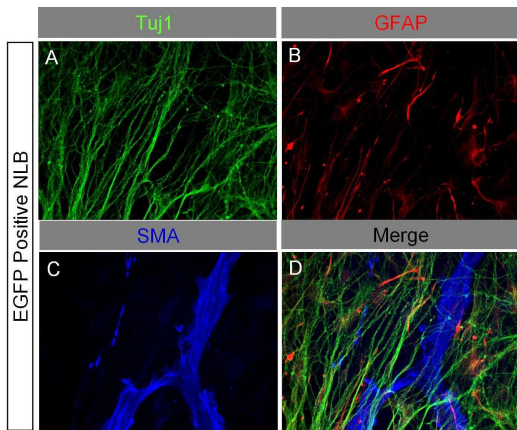


図 2 . マウス神経堤幹細胞を含んだ細胞塊の神経・グリア・平滑筋への分化

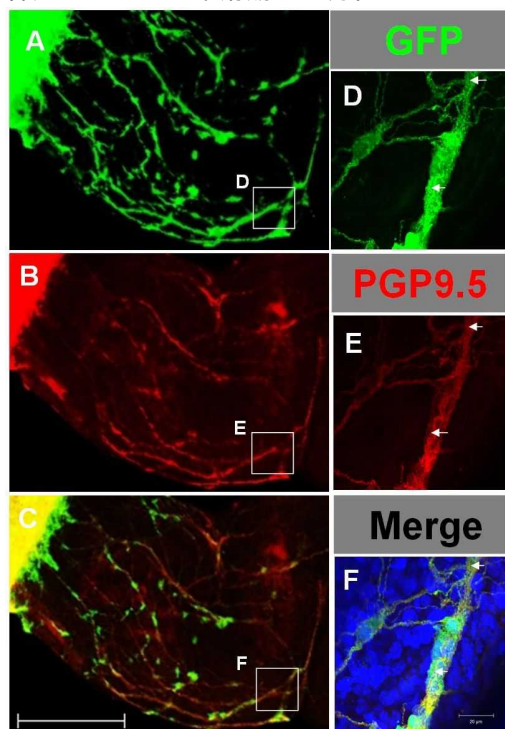


図 3 . ヒルシュスプルング病モデルマウス無神経節腸管に対するマウス神経堤細胞塊 (GFP) 共培養による神経形成 (PGP9.5) を確認

#### 4 . 研究成果

##### 高純度神経堤幹細胞塊移植によるヒルシュスプルング病モデルマウス (Ret<sup>-/-</sup>) への神経節形成に成功

セル・ソーターを用いた高純度マウス神経堤幹細胞塊の作製と分化能評価に成功した (図 1) 。マウス腸管から自己増殖してくる細胞塊の形成と、神経、グリア、平滑筋の三系統への分化を確認した。神経堤幹細胞の分

離、培養に成功したと言える (図 2) 。また、ヒルシュスプルング病モデルマウス無神経節腸管に対する高純度神経堤幹細胞移植により神経節形成誘導することに成功した (図 3) 。

##### ヒト腸管由来の神経堤幹細胞の分離、培養に成功

マウスを用いた実験系をヒトに応用し、ヒト腸管から自己増殖してくる細胞塊の形成に成功した (成功例は表 1 参照) 。また、神経、グリア、平滑筋の三系統への分化を確認した。神経堤幹細胞の分離、培養に成功したと言える (図 4) 。

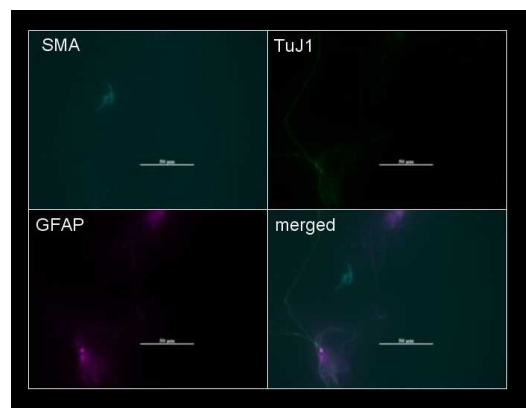


図 4 . ヒト神経堤幹細胞を含んだ細胞塊からの神経・グリア・平滑筋への分化

##### ヒト正常腸管と無神経節腸管からの細胞塊の形成および神経への分化異常の発見

ヒルシュスプルング病患者より得られた腸管の正常部と無神経節部において、細胞塊形成の差異や、神経への分化能の差異を証明した。ヒルシュスプルング病の疾患発現の原因として、また再生治療を行う上での方略を考慮する上で、極めて重要かつ希少なデータとして注目される。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

西川 竜平, 下島, 直樹, 森川, 康英, 森, 昌玄, 山本, 裕輝, 山田, 洋平, 堀田, 亮, 瀧本, 康史, 星野, 健, 名越, 慈人, 中村, 雅也, 芝田, 晋介, 岡野, ジェイムス洋尚, 岡野, 栄之

『ヒルシュスプルング病の神経堤幹細胞移植治療に必要とされるニッチ因子の研究』日本小児外科学会雑誌, 査読無, 2009, 第 45 巻 5

号 884 -884

〔学会発表〕(計6件)

Naoki Shimojima, Yasuhide Morikawa,  
Ryuhei Nishikawa

『 Isolation, proliferation, and differentiation of neural crest stem/progenitor cells from human gut in normal and motility disorder patients』ハンガリー外科学会、September 17 -18,2010、Szeged, Hungary

下島直樹、森川康英、西川竜平 『腸管神経再生治療の実験的検討 - 胎仔無神経節腸管への神経堤幹細胞移植』第46回日本周産期・新生児医学会学術集会、2010年7月12日、神戸国際会議場、兵庫

下島直樹、森川康英、西川竜平 『ヒルシュスプルング病および類縁疾患の病態解析と腸管神経再生治療に関する基礎的研究』第47回日本小児外科学会学術集会、2010年6月17日 -18日、慶應義塾大学、東京

Naoki Shimojima, Yasuhide Morikawa,  
Ryuhei Nishikawa 『 Isolation, proliferation, and differentiation of neural crest stem cells from human gut』43th Annual meeting of Pacific Association of Pediatric Surgery , 2010, May23 -27, Kobe, Japan

下島直樹、森川康英、西川竜平 『ヒト腸管を用いた腸管神経再生治療の可能性に関する研究(続報)』第22回小腸移植研究会、招待講演、2010年3月5日~6日、慶應義塾大学、東京、三田講堂

Ryuhei Nishikawa,Naoki Shimojima,  
Yasuhide Morikawa

『Investigation of neural crest stem cell therapy for Hirschsprung's disease』第7回 幹細胞シンポジウム、2009年5月15 -16日、東京都港区六本木 Izumi Garden Gallery

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/surgery/ps/staff/studies.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西川 竜平 (NISHIKAWA RYUHEI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30534531

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし