

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08650

研究課題名(和文)細胞外因子活性化と選択的神経堤細胞移植によるヒルシュスプルング病再生医療の開発

研究課題名(英文)Development of regenerative therapy for Hirschsprung's disease by extracellular matrix molecules activation and selective neural crest cell transplantation

研究代表者

田中 奈々 (Tanaka, Nana)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：50530656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腸管神経堤細胞(ENCC)のみが蛍光発色するヒルシュスプルング病(H病)モデルマウスを作製し、在胎12.5日のENCCが到達していない無神経節腸管の異なる部位に、在胎18.5日のコントロール腸管より分離したENCCから作製したNeurosphereを移植した。ENCCにおけるTuj-1/GFAP陽性細胞の面積比から、移植部位によるENCCの分化の違いが明らかになった。H病に対する細胞治療をさらに発展させるためには、レシピエントの腸内環境が移植ENCCに与える影響を考慮することが重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒルシュスプルング病(H病)では、口側から肛門側へ発達する腸管神経堤細胞(ENCC)が途中で停止することにより無神経節腸管が生じるとされている。しかし、無神経節性腸管の腸内微小環境が、正常腸管と、またH病近位の神経節腸管の腸内微小環境とどのように異なるかはいまだ不明である。本研究で我々は、無神経節腸管の異なる部位にENCCを移植することにより、移植部位によるENCCの分化の違いを初めて明らかにした。H病に対する細胞治療をさらに発展させるためには、レシピエントの腸内環境が移植ENCCに与える影響を考慮することが重要である。

研究成果の概要(英文)：ENCCs were isolated from Sox10 Venus transgenic mouse gut on embryonic day (E) 18.5 and neurospheres (NS) were generated. Then, NS were transplanted into aganglionic KO and wildtype gut that had been transected just distal to the ENCC wavefront (KO-wf, WT), and into distal KO gut transected at a site equivalent to WT (KO-d) on E12.5. ENCC differentiation was evaluated using whole-mount immunohistochemistry with Tuj-1 and GFAP antibodies. The transplanted ENCCs migrated to form the myenteric and submucosal plexus in all groups. The ratio of the area of Tuj-1 positive cells:GFAP-positive cells in migrated cells in recipient gut was significantly lower in KO-d compared to KO-wf and WT, while there was no significant difference between KO-wf and WT. This suggests that neuronal versus glial differentiation was decreased in KO-d compared to that in KO-wf and WT. Our study showed the differences in ENCC differentiation depending on the site of transplantation.

研究分野：小児外科

キーワード：ヒルシュスプルング病 腸管神経系 腸管神経堤細胞 細胞治療

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒルシュスプルング病 (H 病) 5000 出生に 1 人の発生頻度で、肛門側腸管の壁内神経節細胞の先天性欠如により正常な蠕動運動ができず、新生児期より腸閉塞症状きたす、最も代表的な小児外科疾患の一つである。治療は無神経節腸管を切除し正常腸管を引き下ろす手術となるが、無神経節腸管が長域の重症例では、致命的となることもあり、新たな治療法の開発が望まれている。そのニーズに答えるべく、H 病に対する細胞移植治療は動物実験レベルでは多く散見されるようになったが、いまだ効果は限定的で臨床応用には高い壁があるのが現状である。腸管神経系は、腸管神経堤由来細胞 (ENCC) から発生し、消化管壁内で増殖、移動し、ニューロンやグリアに分化する。神経細胞とグリアは、粘膜下神経叢と筋間神経叢という 2 つの神経叢を形成する。ENCC と腸管微小環境との相互作用は、いくつかの転写因子、細胞表面受容体、シグナル伝達経路を介して高度に調節されているが、その過程に何等かの異常をきたすと、口側から肛門側へ移動する ENCC が途中で停止し H 病患者に見られるような無神経性節腸管となる。しかし、H 病における遠位無神経節腸管の腸内微小環境と近位神経節性腸の腸内微小環境がどのように異なっているのか、また、両者が正常腸と比較してどのように異なっているのかはいまだ不明である。

2. 研究の目的

腸管環境の特性を理解し、細胞移植に最適な条件を導き出すことで、将来的に腸管切除にとって代わる、ヒルシュスプルング病に対する新しい細胞移植治療を目指す。本研究の目的は、ENCC を異なる腸管部位に移植し、レシピエント腸管の微小環境が、移植された ENCC の分化に及ぼす影響を調べることである。

3. 研究の方法

動物モデルと Neurosphere (NS) の作製

ENCC が可視化できる *Sox10+Venus Tg* マウスと *Ednrb*(ヘテロ接合: +/-) の交配を行い、ENCC のみが蛍光発色する H 病モデルマウスである、*Sox10+Venus+/Ednrb (-/-)* マウスを作製した。*Sox10+Venus+/Ednrb (+/+)* マウスはコントロールとした。

在胎 18.5 日のコントロールマウス腸管より ENCC を分離し NS を作製した。

レシピエント腸管の準備と NS の移植

次に、在胎 12.5 日に *Sox10+/Ednrb+/+* マウス (WT) または *Sox10+/Ednrb-/-* マウス (KO) から胎仔腸管を摘出し、下降する ENCC の先端部を実体顕微鏡下で確認した。次に、NS を在胎 12.5 日において、KO と WT マウス腸管の、口側から下降する ENCC 最先端のすぐ遠位で切断し得られた無神経節腸管 (それぞれ KO-wf、WT) および WT と同部位で切断した遠位 KO 無神経節腸管 (KO-d) に移植し、72 時間共培養した。

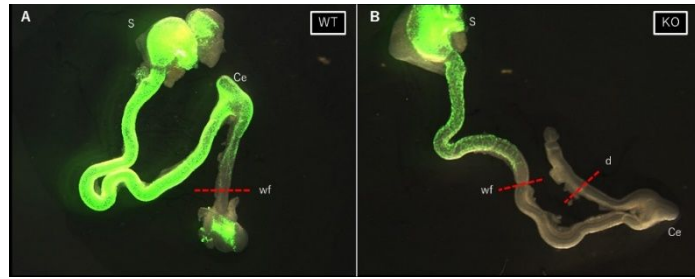
ホールマウント免疫染色と発現の定量解析

ニューロンのマーカーである Tuj-1 とグリアのマーカーである GFAP 抗体を用いたホールマウント免疫染色を行い移植後の ENCC の分化を評価した。ImageJ 画像解析ソフトを用いて Tuj1 及び GFAP の発現を定量解析した。

4. 研究成果

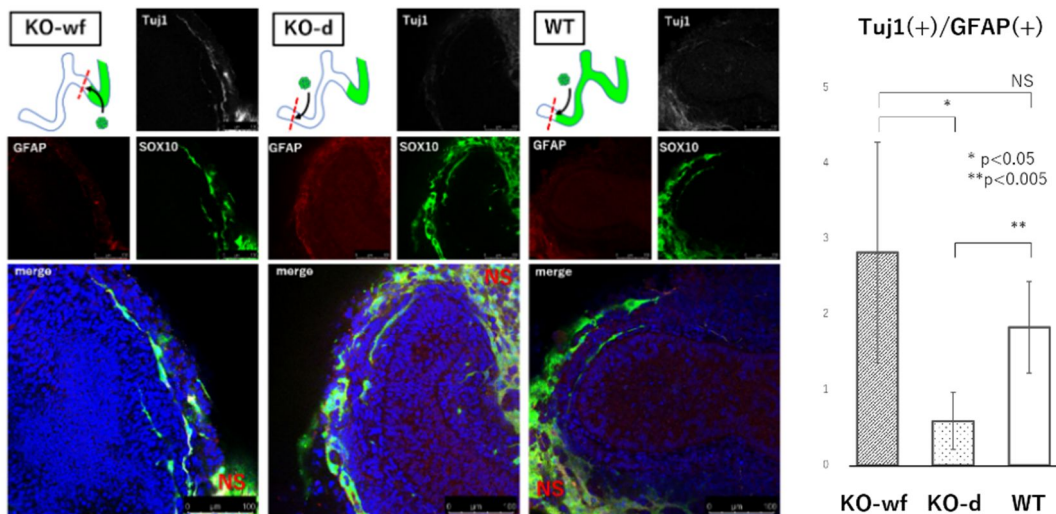
ENCC の先進部の検証

E12.5 において、ENCC の先進部は KO マウスでは遠位中腸に位置し、盲腸には達していなかったが、WT マウスでは後腸に達していた（右図）。



ENCC の移動と分化

移植された ENCC はすべての群で無神経節腸管内に移動し、腸管神経叢と粘膜下神経叢を形成した。レシピエント腸管に移植された ENCC における Tuj-1 / GFAP 陽性細胞の面積の比は、KO-d では KO-wf および WT と比較して有意に低かったが、KO-wf 群と WT 群では有意差は認められなかった。このことから、KO-d では KO-wf 群および WT 群と比較して、グリア細胞への分化に対してニューロンへの分化が低下していることが示唆された（下図）。



本研究で我々は、移植された ENCC が腸管神経叢と粘膜下神経叢の領域に移動することを示すことに成功した。さらに、移植部位によって神経細胞とグリア細胞の分化が変化することを初めて示した。これらの結果より、H 病に対する細胞治療の可能性をさらに発展させるためには、移植された ENCC に対するレシピエント腸管の腸内環境が与える影響を考慮することが重要であることが示唆された。ENCC の分化は、さまざまな遺伝子やシグナル伝達経路を介した ENCC と微小環境との相互作用によって、時空間的に高度に制御されており、分化の変化が最終的に移植 ENCC の機能にどのような影響を及ぼすかについては、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9件（うち査読付論文 9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 Nakazawa-Tanaka N, Fujiwara N, Miyahara K, Akazawa C, Urao M, Yamataka A	4. 巻 39
2. 論文標題 The impact of the recipient intestinal site on the differentiation of transplanted enteric neural crest cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pediatr Surg Int	6. 最初と最後の頁 297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00383-023-05587-8.	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 Fujiwara N, Miyahara K, Lee D, Nakazawa-Tanaka N, Akazawa C, Hatano M, Pierro A, Yamataka A	4. 巻 39
2. 論文標題 A novel mouse model of intestinal neuronal dysplasia: visualization of the enteric nervous system	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pediatr Surg Int	6. 最初と最後の頁 298
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00383-023-05585-w.	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 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 Pediatr Surg Int	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 Fujiwara N, Miyahara K, Nakazawa-Tanaka N, Oishi Y, Akazawa C, Tada N, Yamataka A	4. 巻 39
2. 論文標題 Differentiation of enteric neural crest cells transplanted from SOX10-Venus mouse embryonic stem cells into the gut of the endothelin receptor B null mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatr Surg Int	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00383-022-05318-5	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 -

1. 著者名 Tanaka K, Nakazawa-Tanaka N, Fujimoto T, Urao M, Lane GJ, Yamataka A	4. 巻 39
2. 論文標題 Japan's comprehensive undescended testis screening program: incidence of ascending testis after screening	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatr Surg Int	6. 最初と最後の頁 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-022-05331-8	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 Fujiwara N, Miyahara K, Nakazawa-Tanaka N, Akazawa C, Yamataka A	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 Pediatr Surg Int	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 Tanaka K, Nakazawa-Tanaka N, Urao M	4. 巻 167
2. 論文標題 Do Paramental Urethral Cysts in Children Need Surgical Excision?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Urology	6. 最初と最後の頁 198-200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.urology.2022.05.026	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, Miyano G, Nakazawa-Tanaka N, Shigeta Y, Lane GJ, Doi T, Takahashi T, Urao M, Okazaki T, Ochi T, Koga H, Yamataka A.	4. 巻 31(12)
2. 論文標題 Forty-Year Experience Alleviating Postoperative Hirschsprung-Associated Enterocolitis by Complete Full-Thickness Posterior Rectal Cuff Excision. The Anorectal Line Eliminates Problematic Anastomoses.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Laparoendosc Adv Surg Tech A.	6. 最初と最後の頁 1436-1444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/lap.2021.0340	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 Nagase S, Ogura K, Ashizawa K, Nakazawa-Tanaka N, Urao M, Fukunaga M, Yamazaki Y, Sasano H, Matsumoto T.	4. 巻 22
2. 論文標題 Dysgerminoma with Estrogen-Producing Functioning Stroma Presenting Precocious Puberty.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Case Rep Pathol.	6. 最初と最後の頁 5545645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2021/5545645. eCollection 2021.	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21件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 12件)

1. 発表者名 Nana Nakazawa-Tanaka, Naho Fujiwara, Katsumi Miyahara, Masahiko Urao, Atsuyuki Yamataka
2. 発表標題 The impact of the recipient intestinal site on the differentiation of transplanted enteric neural crest cells.
3. 学会等名 International Symposium on Pediatric Surgical Research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fujiwara N, Miyahara K, Lee D, Nakazawa-Tanaka N, Akazawa C, Hatano M, Pierro A, Yamataka A
2. 発表標題 A novel mouse model of intestinal neuronal dysplasia: visualization of the enteric nervous system
3. 学会等名 International Symposium on Pediatric Surgical Research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中奈々 藤原なほ 宮原克 浦尾正彦 山高篤行
2. 発表標題 ヒルシュスプルング病マウス腸管への腸管神経堤細胞移植における神経分化
3. 学会等名 第60回日本小児外科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中 奈々 矢崎 悠太 浦尾 正彦
2. 発表標題 小児外科におけるロボット支援手術を導入して 今後の課題
3. 学会等名 第36回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nana Nakazawa-Tanaka, Naho Fujiwara, Katsumi Miyahara, Masahiko Urao, Atsuyuki Yamataka
2. 発表標題 SITE-DEPENDENT ENTERIC NEURAL CREST CELL DIFFERENTIATION FOLLOWING EX-VIVO TRANSPLANTATION INTO AGANGLIONIC MOUSE GUT
3. 学会等名 European Paediatric Surgeons' Association Congress
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fujiwara N, Miyahara K, Nakazawa-Tanaka N, Yamataka A
2. 発表標題 Altered expression of semaphorin3a and neuropilin1 in enteric neural crest cells following transplantation into the aganglionic gut
3. 学会等名 European Paediatric Surgeons' Association Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浦尾正彦、田中奈々、矢崎悠太、深田彩加
2. 発表標題 停留精巢に対するLPECの応用
3. 学会等名 第22回日本LPEC研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浦尾正彦、田中奈々、矢崎悠太、藤本隆士
2. 発表標題 LPECを利用した鼠径管低位停留精巣根治術の工夫
3. 学会等名 第61回 日本小児外科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nakazawa-Tanaka N, Fujiwara N, Miyahara K, Urao M, Yamataka A
2. 発表標題 Increased enteric neural crest cell differentiation after transplantation into aganglionic mouse gut.
3. 学会等名 The 35th International Symposium on Pediatric Surgical Research (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 N Fujiwara, Y Oishi, N Tada, K Miyahara, N Nakazawa-Tanaka, A 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 The 35th International Symposium on Pediatric Surgical Research (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tanaka K, Nakazawa-Tanaka N, Fujimoto T, Urao M, Yamataka M
2. 発表標題 INCIDENCE OF ASCENDING TESTIS AFTER NORMAL SCREENING FOR UNDESCENDED TESTIS AT 1 MONTH, 3 MONTHS, 10 MONTHS, 18 MONTHS, AND 3 YEARS OLD IN JAPAN.
3. 学会等名 The 35th International Symposium on Pediatric Surgical Research (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 N Fujiwara, K Miyahara, N Nakazawa-Tanaka, A Yamataka
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 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 N Fujiwara, Y Oishi, N Tada, K Miyahara, N Nakazawa-Tanaka, A Yamataka
2. 発表標題 TRANSPLANTATION OF SOX10-VENUS MOUSE EMBRYONIC STEM CELL-DERIVED ENTERIC NEURAL CREST CELLS FOR THE REGENERATION OF ENTERIC NERVOUS SYSTEM
3. 学会等名 The 23rd European Pediatric Surgeons' Association Congress (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nana Nakazawa-Tanaka, Katsumi Miyahara, Naho Fujiwara Masahiko Urao and Atsuyuki Yamataka
2. 発表標題 BEHAVIOR OF TRANSPLANTED ENTERIC NEURAL CREST CELLS BEHAVIOR IN AGANGLIONIC COLON OF ENDOTHELIN RECEPTOR B DEFICIENT MOUSE
3. 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会 international session (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nana Nakazawa-Tanaka
2. 発表標題 Altered behavior of enteric neural crest derived cells in Hirschsprung disease mouse model
3. 学会等名 The 41st Teaching Seminar of the French Society of Pediatric Surgery (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中奈々 田中圭一朗 足立綾佳 宮野剛 古賀寛之 岡崎任晴 山高篤行 浦尾正彦
2. 発表標題 小児外科ロボット支援手術の立ち上げ 当科での経験
3. 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中奈々, 足立綾佳, 田中圭一朗 小倉加奈子, 浦尾正彦
2. 発表標題 捻転解除後の精巣に対する術中超音波の有用性
3. 学会等名 第31回日本小児泌尿器科学会総会
4. 発表年 2022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 In vitro共培養モデルを用いたマウス腸管神経幹細胞の発生過程の検証
3. 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会 東京、2022年5月20日
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nana Nakazawa-Tanaka, Naho Fujiwara, Katsumi Miyahara, Masahiko Urao, Atsuyuki Yamataka
2. 発表標題 THREE DIMENSIONAL IMAGING OF TRANSPLANTED ENTERIC NEURAL CREST CELLS BEHAVIOR IN AGANGLIONIC COLON OF ENDOTHELIN RECEPTOR B DEFICIENT MOUSE
3. 学会等名 34th International Symposium on Pediatric Surgical Research, December 10-12 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nana Nakazawa-Tanaka, Naho Fujiwara, Katsumi Miyahara, Ryo Sueyoshi, Takanori Ochi, Masahiko Urao, Atsuyuki Yamataka
2. 発表標題 BRANCHING NETWORK FORMATION OF TRANSPLANTED ENTERIC NEURAL CREST CELLS IN AGANGLIONIC COLON OF ENDOTHELIN RECEPTOR B DEFICIENT MOUSE
3. 学会等名 22nd European Paediatric Surgeons' Association, (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 in vitro 共培養モデルを用いたマウス 腸管神経幹細胞の発生過程の検証
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

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Prem Puri, Nana Nakazawa : Puri P, Hollwarth ME (eds)	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer Nature, Switzerland	5. 総ページ数 11
3. 書名 Congenital Diaphragmatic Hernia, Pediatric Surgery Diagnosis and Management Second edition	

〔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	浦尾 正彦 (Urao Masahiko) (00213504)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	

6. 研究組織（つづき）

	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	藤原 なほ (Fujiwara Naho) (20589543)	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