

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20655

研究課題名(和文)脱細胞化由来細胞外マトリックスが腸管神経幹細胞の分化・遊走に与える影響の解析

研究課題名(英文)Effect of extracellular matrix from decellularized tissues on differentiation and migration of enteric nerve stem cells

研究代表者

澁谷 聡一 (Shibuya, Soichi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80795203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒルシュスプルング病の原因解明と新治療法開発を目指す本研究では、手術で取り除かれた腸の健康部分と病的部分から組織サンプルを採取し、特殊な化学処理で細胞を取り除きました(脱細胞)。この処理により、腸の細胞外マトリックス(ECM)が保持されると同時に、DNAが効果的に除去されることが確認されました。このECMを利用して、幹細胞の培養基を作り、これが将来の神経幹細胞研究や新たな治療法の開発に貢献する可能性を探る研究を進めています。

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は先天的な病気であり、腸管の発生過程で腸管神経幹細胞の遊走が停止することにより腸管神経節が欠如する病気ですが、遊走が呈する原因は明らかになっていません。現在の治療法は異常な腸管を切除する手術治療のみですが、病変が広範囲に及ぶ症例では腸管の大量切除に伴う合併症が問題になります。本研究ではヒルシュスプルング病の発症とECMの関連性に注目し、その原因を究明することで手術以外の治療選択肢を開発することを目的としております。

研究成果の概要(英文)：This study aims to elucidate the causes of Hirschsprung's disease and develop new treatments. We collected tissue samples from both healthy and diseased parts of intestines removed during surgery and removed the cells through a special chemical process (decellularization). This process effectively removed DNA while preserving the intestinal extracellular matrix (ECM). We are using this ECM as a platform for stem cell culture, with the potential to contribute to future studies of neural stem cells and the development of new treatments.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 組織工学 脱細胞 ヒルシュスプルング病 神経幹細胞 腸管神経節 小腸機能不全

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。

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は腸管の一部が神経の発生異常により蠕動機能を持たないために、先天的に腸閉塞症状を呈し、時に重篤となる疾患である。無神経節腸管が比較的短い軽症例は根治的の外科治療により正常児と近い生活を送れるようになったが、広範囲の腸管が無神経節である重症例は、新生児期より長期的な入院生活や人工肛門による管理を余儀なくされ、児の発育に大きな悪影響を及ぼすだけでなく、重度の栄養障害や排便機能障害にも長期的に苛まれる。この問題に対する新たな解決方法として、幹細胞の移植により無神経節腸管の蠕動を回復させることで、腸切除を行わずに治療をする新規再生医療の研究が盛んに行われている。

近年、その中でもニューロン、グリア細胞といった主要な神経系細胞に分化する多能性を有する腸管神経幹細胞(Enteric neural stem cells: ENSCs)が成熟した腸管からも分離し得ることが明らかになり、自家細胞を用いた幹細胞移植治療の候補として注目を集めている。しかし、移植された ENSCs が腸管内を遊走した上で機能的な神経細胞に分化し、中枢の神経細胞と適切なネットワークを構築するという理想的な動態は単に細胞を移植するだけでは誘導することができない。細胞の増殖・遊走・分化には細胞外マトリックス(ECM)との相互作用が必要であり、その機序を理解することが再生医療の臨床応用に必要である。

我々は過去に肺を脱細胞化した組織を薄切することにより得た、ECM スライス上で肺の幹細胞を培養することで、細胞動態に変化が起き、分化・遊走が促されるということを見出した。その経験から、同様の現象を神経細胞に応用することにより、ENSCs 移植の成功率を向上させることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

組織の脱細胞化、ECM 上での細胞培養を組み合わせることにより、ECM の違いが神経細胞の分化・遊走にどのような影響を与えるのかを遺伝子発現レベルで明らかにすることを本研究の目的とする。ECM の違いが神経幹細胞の分化・遊走にどのような影響を与えるのかを明らかにすることで、将来的にはヒルシュスプルング病に対する神経幹細胞移植治療の臨床適用を目指す。

3. 研究の方法

(1)手術検体の脱細胞による ECM の解析、およびスライスの作成

ヒルシュスプルング病に対する根治術時や人工肛門閉鎖術における腸管部分切除の際に腸管検体を獲得し、それを脱細胞することで ECM を得る。ヒルシュスプルング病患者の腸管に混在する有神経節領域と無神経節領域で ECM の成分・構造に、差異があるかに関して ELISA を用いた定量的タンパク質解析、および免疫蛍光染色や電子顕微鏡を用いた定性的手法により評価を行う。クライオスタットを用いて脱細胞化によって得られた ECM を薄切し、細胞培養の足場として使用可能な ECM スライスを作成する。

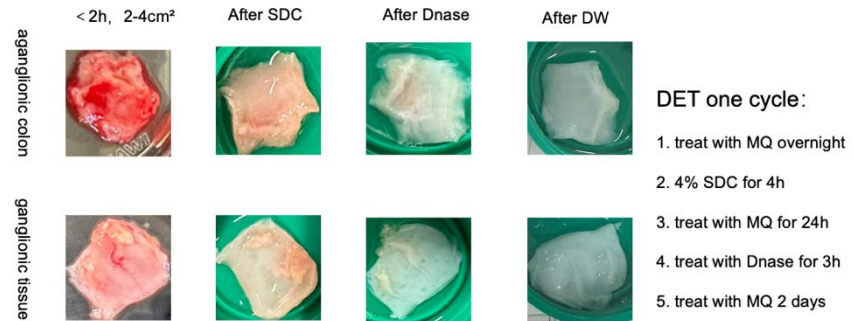
(2)ECM スライス上での ENCCs の培養による、細胞動態の変化の評価

ECM スライス上で SOX10-Venus ENCCs を培養することで ECM の違いが細胞の遊走にどのような影響を与えるかを評価する。また免疫蛍光染色を用いたタンパク質発現の比較や、qPCR および RNA sequence を用いた遺伝子発現の解析により、細胞の分化についても評価する。また、細胞の分化・遊走を促進させる因子が特定された場合は、それを元に細胞培養環境を最適化させることで細胞動態に変化を加えることができるかを検証する。

4. 研究成果

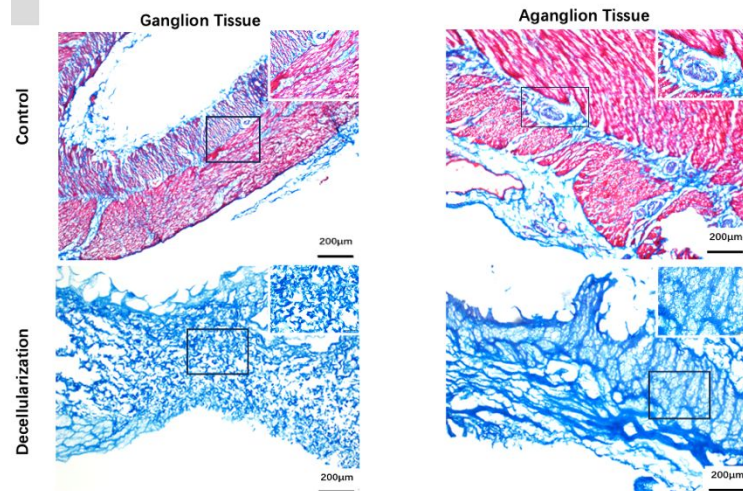
(1) ヒルシュスプルング病患者の手術時に切除された腸管組織を Sodium Deoxycholates、DNase による還流と洗浄を繰り返す方法 (Detergent enzymatic treatment: DET 法) により脱細胞化するプロトコルを確立させた (図 1)。組織片は還流することが困難であるため、脱細胞のプロセスはチューブ内で溶液の中に組織片を入れ、シェイカーにより浸透させる方法により行なった。脱細胞の前後で DNA 定量

を行うことにより脱細胞の効率性を評価し、シェイカーの振動数や溶液量を最適化させた。



(2) 脱細胞前後で組織学的比較 (H&E 染色、Masson Trichrome 染色、Alcian Blue 染色、Sirius Red 染色) を行い、脱細胞後も ECM の構造が保たれていることを確認した。既報の論文と同様に GAG に関しては脱細胞後に脱落することが明らかになった。さらに切除腸管検体において神経節細胞が成熟している口側腸管と神経節細胞が欠損している肛門側腸管との比較を行うために両部位より検体を採取し組織学的

評価を行った。脱細胞前では口側腸管には神経節細胞が確認され、肛門側腸管には神経繊維の増殖が確認され ECM の差異が形態的に示された。脱細胞後に残存する ECM 成分に違いが生じるかどうかに関して現在、定量評価を行っている。



(3) Optimal Cutting Temperature (OCT) Compound に包埋し、クライオスタットを用いて 50 µm の厚さにスライスし、13mm のカバースリップ上に回収した。カバースリップ状に回収された ECM のスライスが生着するために 0.01% (v/w) Poly-L-lysine でカバースリップをコーティングする方法を用いた。生着した ECM を PBS で洗浄後に紫外線照射で 25 分間滅菌することで培養の足場として使用することができるプロトコルを確立した。これらの足場を利用し、今後 ENCCs の ECM 上培養を行う実験を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------