

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791890

研究課題名(和文) ヒルシュスプルング病および類縁疾患の原因遺伝子解析と神経堤幹細胞移植治療

研究課題名(英文) Gene Analysis and Neural Crest Stem Cell Transplant Therapy for Hirschsprung's disease and the Related disorders.

研究代表者

藤村 匠 (Fujimura, Takumi)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80573443

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)：腸管神経節細胞の欠失が本態と言われるヒルシュスプルング病(HSCR)は無神経節腸管が長いために手術でも十分な機能改善を得られない場合がある。これらの病態に対する新規治療開発手術治療として、腸管神経の起源である神経堤細胞を用いた細胞移植治療の有用性を検討した。マウス腸管由来神経堤幹細胞を薬剤性HSCRモデルへ移植し、8週間に渡って移植細胞が生存していることを発光を利用した観察で証明した。移植細胞は移植腸管内で神経、グリアのマーカーを発現していた。さらに腸管内残便量と体重増加率を用いた機能評価で消化管機能改善傾向を認めた。神経堤細胞移植治療がHSCRの新規治療戦略の一つになりうると思われた。

研究成果の概要(英文)：A lack of enteric ganglion cells is the main feature of Hirschsprung's disease (HSCR). Some patients were not fully recovered because of the long aganglionic segment. For the future transplantation therapy, the neural crest derived cell (NCC) is one of the best candidates which can give rise to the neural lineage cells. The transplanted cells were detected in the aganglionic segment of the gut for several months after operation and they showed the neural lineage differentiation. Only HSCR model mice from transplanted group showed an improvement of the bowel function. Transplanted NCCs survived and facilitated the improvement of the gut motility in the HSCR model. These results suggest that usefulness of the cell transplantation therapy for future HSCR treatment.

研究分野：小児外科

キーワード：再生医療 神経堤細胞 小児難治性疾患 腸管運動不全 細胞移植治療

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒルシュスプルング病の原因はその起源である神経堤細胞の腸管内遊走障害と言われており、その治療方は手術のみであった。

(2) 1999年に神経堤細胞の回収が可能であることが示され、神経節細胞の欠損した部分に、神経堤細胞を移植する再生医療が有効である可能性が示され始めていた。

(3) 我々の研究グループで開発した蛍光発光融合タンパク ffluc を用いて移植細胞の生着を *in vivo* で観察することが可能であった。これにより、腸管への移植細胞の生存を生体内で経時的に観察することが可能であり、かつ分化系譜を評価する際の目印にもなる点が独創的で有用性があると考えた。

2. 研究の目的

(1) マウスおよびヒトから神経堤細胞を分離・回収し、これを無神経節腸管に移植し、腸管神経再生治療の有用性を示すこと。

(2) 治療の有用性が確認された場合、その結果に有効であった因子を特定すること。

3. 研究の方法

(1) マウスおよびヒト腸管から神経堤細胞を分離し、自己増殖能を持つ細胞塊(Sphere)を作成する。得られた Sphere を無神経節腸管を持つモデルマウスに移植してその分化傾向、腸管運動機能を評価した(図 1)。

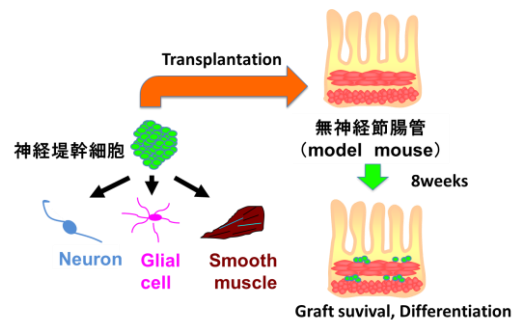


図 1

(2) モデル動物はマウスを用い、腸管に塩化ベンザルコニウムを作用させて、腸管神経を焼灼することで人工的に無神経節腸管を作成した(ヒト腸管由来細胞移植のために免疫不全動物が望ましいため)。

(3) 移植細胞は蛍光発光融合タンパク ffluc を全身の細胞に持つ遺伝子改変マウスから腸管由来神経堤細胞を分離・回収することで移植細胞を得た。

(4) 無神経節腸管に細胞を移植し、発光を用いて経時的に細胞の生存を確認し、移植後

一定期間経過した時点で、マウス腸管を採取した。経時的に細胞の観察を行っている期間には体重増加を観察し、一定期間の観察修旅後に採取した腸管に残った便量を測定し、機能評価とした。摘出した腸管は免疫組織化学染色で分化系譜を確認した。

4. 研究成果

(1) 塩化ベンザルコニウムを用いた安定したヒルシュスプルング病モデルの作成に成功(野生型 ICR、B57BL/J を使用)し、神経堤細胞を蛍光標識したマウスを用いた同モデルの病理組織像と腸管内残便量・体重増加率による機能評価で消化管機能障害モデルであることを示した(図 1)。

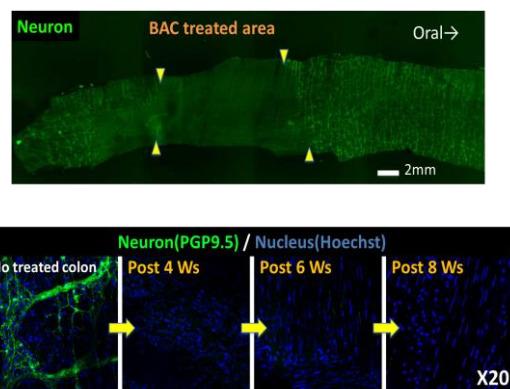


図 1

(2) マウス腸管由来神経堤細胞を薬剤性ヒルシュスプルング病モデルマウスへ移植し、8週間という期間にわたり、移植細胞が生着し続けることを発光を利用した *In Vivo Imaging* による経時的観察で証明した(図 2)。

移植腸管内では移植細胞が神経、グリアのマーカーを発現する細胞に分化していることが確認された(図 3)。

腸管内残便量と体重増加率による機能評価を行ない、シャム手術群、モデルマウス群、移植群と比較し、消化管機能が改善していることも確認できた

(図 4)。

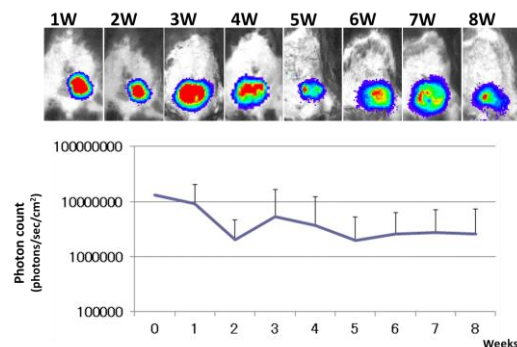


図 2

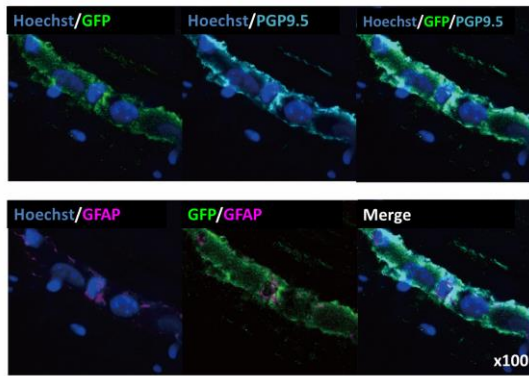


図 3

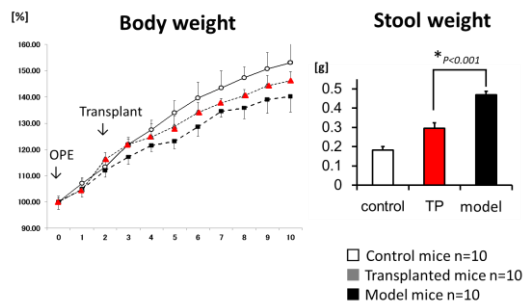


図 4

(3) ヒト腸管由来神経堤細胞の分離同定とその解析は検体数が少なく、明確な神経堤細胞の分離・回収プロトコールが定められなかった。神経堤細胞を回収できたと考えられたケースでも継代は非常に困難で、2回の継代を行ったが細胞は減少する一方であった。細胞増殖に必要と思われる GDNF, Wnt3a の因子も添加してみたが明らかな効果を確認することはできなかった。

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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

1, Takumi Fujimura, Shinsuke Shibata, Naoki Shimojima, Keiko Hori, Go Itakura, Soraya Nishimura, Masaya Nakamura, Yasuhide Morikawa, Tatsuo Kuroda, Hideyuki Okano. Transplanted Neural Crest Cells Support the Improvement of the Motility for a Mouse Model of Hirschsprung's Disease.

ENS meeting2015:

2015.4.19-22, Mainport Hotel, Rotterdam, Netherland.

2, 藤村匠、芝田晋介、下島直樹、阿部陽友、高橋信博、石濱秀雄、清水隆弘、狩野元大、加藤源俊、山田洋平、藤野明浩、星野健、堀桂子、板倉剛、西村空也、中村雅也、森川康英、黒田達夫、岡野栄之。腸管運動不全に対する神経堤幹細胞移植治療の有用性に関する研究。2015.4.17-19, 第115回日本外科学会定期学術集会, 名古屋国際会議場, 名古屋

3, 藤村匠, 下島直樹, 高橋信博, 石濱秀雄, 加藤源俊, 富田紘史, 藤野明浩, 星野健, 森川康英, 黒田達夫. 腸管運動不全に対する神経堤幹細胞を用いた細胞移植治療に関する研究, 2014.3.15, 第26回小腸移植研究会, 自治医科大学 地域医療情報研修センター, 栃木

4, Takumi Fujimura, Shinsuke Shibata, Naoki Shimojima, Tatsuo Kuroda, Hideyuki Okano. Evaluation of the drug-induced Hirschsprung's disease model with the genetic labeling for the neural crest derivatives. Neuro2013: 2013.6.20-23, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan

5, 藤村匠、下島直樹、芝田晋介、岡野栄之、森川康英、黒田達夫. 神経堤由来細胞を蛍光標識したマウスを用いた薬剤性ヒルシュスプルング病モデルの有用性に関する検討. 第19回, 大腸肛門機能障害研究会, 2013.9.7. ホテルニューオータニ東京, 東京

[図書] (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤村 匠 (FUJIMURA TAKUMI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：80573443