

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670744

研究課題名(和文) ヒルシュスブルング病および類縁疾患の乳歯歯髄幹細胞を用いた新規治療法の開発

研究課題名(英文) New therapeutic method of Hirschsprung's disease and its variants by using the stem cells from human exfoliated deciduous teeth

研究代表者

田口 智章 (TAGUCHI, Tomoaki)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20197247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：小児期に発症し蠕動不全のため機能的腸管不全をきたす疾患に、ヒルシュスブルング病とその類縁疾患がある。このうち、腸管神経節細胞僅少症(本症)は神経節細胞は存在するもののその数が少なく、腸管運動不全をきたす難病であり、現在唯一の根治術は小腸移植であるが、強い拒絶反応から本邦での実施は容易ではない。

小腸移植に代わる新規治療法として我々は再生医療に注目した。脱落乳歯より抽出した細胞を投与することで、腸管の運動を改善させることができれば、この病気を治すことができる。現在われわれは動物倫理に則った上で行っている実験において本症モデル動物に対して腸管の運動の改善に成功した。

研究成果の概要(英文)：Hirschsprung's disease and its variants are known as disorders with intestinal peristaltic dysfunction developed from childhood. Congenital Hypoganglionosis (Hypo) is a representative disease of the variants with few intestinal ganglion cells. Currently, the patients are treated with bowel resection and enterostomy palliatively. Unfortunately, the survival rate show 78%, and the patients are hard to withdraw intravenous nutrition after the surgery. Small bowel transplantation is the only curative treatment for the patients; however, it is hard to perform in Japan, because of varied problems such as severe immune rejection and expensive cost resulting in severe outcomes.

Therefore the alternative therapeutics has been desired. Recently, stem cell-based regenerative therapy has been focused on a variety of refractory diseases. Currently, we transplanted stem cells into Hypo model mice, and improved the phenotype, pathological findings and electrophysiological motility.

研究分野：小児外科学分野

キーワード：移植・再生医療 歯学 神経科学 病理学 臨床

1. 研究開始当初の背景

小児期に発症し腸管蠕動不全のために機能的腸管不全をきたす疾患は、腸管神経節細胞が欠如するヒルシュスプルング病と、神経節細胞は存在するものの腸管運動不全をきたすヒルシュスプルング病類縁疾患がある。前者のうち無神経節領域が小腸に及ぶものや後者のうち神経節細胞は正常に存在するがペースメーカー細胞のCajal細胞が減少している慢性特発性偽性腸閉塞(Chronic Idiopathic Intestinal Pseudo-obstruction, CIIP)と神経節細胞の数が少ない腸管神経節細胞僅少症(Hypoganglionosis, Hypo)が重症例の代表的なものである。これらは我々が行った本邦の全国調査では10年間にCIIPが100例、Hypoが120例発症している(厚生労働省科学研究費平成23年度難治性疾患克服事業:H類縁疾患、研究代表者:田口智章)。現在、有効な治療法はなく腸瘻や人工肛門の造設、繰り返す腸切除、静脈栄養などで治療が行われているがいずれの疾患においても予後不良である。現在の根治的な治療法としては、小腸移植があり、世界でも約2000例以上行われている治療法であるが、強い拒絶反応を初めとする多くの合併症に起因する治療成績不良や本邦においては未だ保険適応ではないことから本邦での実施は容易ではなく、低侵襲で安全性の高い新規治療法が望まれ、再生医療が注目されている。

腸管神経系細胞を再生させるために最適なソースを検討するにあたり、ES細胞やiPS細胞、神経堤細胞、腸神経前駆細胞(Enteric Nervous System Progenitor Cells; ENSPCs)、間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells; MSCs)が挙がる。ES細胞は、奇形腫形成能や細胞採取時の倫理的側面での改題を残し、iPS細胞もその作製過程にて遺伝子導入を必要とすることや腫瘍化の可能性から十分な配慮を要する。ENSPCsは自家移植が可能になれば、終生にわたる免疫抑制剤の服

用から免れる事も期待されるが、患児由来のENSPCsがH病原因遺伝子を発現していない場合はその利用方法に注意が必要である。

間葉系幹細胞の一種である乳歯歯髄由来幹細胞(SHED, Stem cells from human exfoliated deciduous teeth)は多分化能と強い増殖能を持つだけでなく、細胞性免疫に不可欠なHLAの発現が乏しいため、免疫寛容性が高いことが知られている。歯髄組織は胎生期の頭部神経外胚葉から分化した神経堤細胞に由来すると考えられており、SHEDをこれらの細胞へ分化するのは容易と考える。

また、細胞移植の投与経路として、腹腔内投与、局所投与、静脈内注射など様々な方法が報告されている。腹腔内投与や腸管局所投与法は侵襲的操作となりうることが想定され、腹腔内投与法では、効果が未だ一定しないことが懸念され、局所的投与法では範囲が限局的になることが予測される。静脈内細胞投与は低侵襲でかつ全身投与が可能であることから、本症の如く広範囲の疾患に関して有効な投与方法であると考えられる。

2. 研究の目的

研究をすすめるにあたり、対象疾患をHypoに絞り、Hypoに対するSHEDを用いた新規再生医療の有効性と安全性に関する検討を行うこととした。

Hypoは対症療法が基本で現在、根治療法はなく、腸瘻や人工肛門を造設するなどの姑息的な治療のみが現状であり、多くの患児が中心静脈栄養に依存している。合併症により中心静脈栄養の継続が困難な場合は小腸移植の適応となるが、小腸移植は拒絶反応が強く他の臓器移植ほど良好な成績は現時点では、得られていない。この治療法が確立されれば、患児の腸管を温存でき、免疫抑制剤も不要であるため、Hypo患児のQOLを飛躍的に向上させる極めて低侵襲で新しい治療法の開発につながると思われる。

3. 研究の方法

Material

Commercial base より、Wild type として、C57BL/6(B6)及びHypoモデルマウスとして、JF1マウス(Japanese Fancy Mouse 1, JF1)を購入するJF1はwild typeに比較し体重が少なく、腸管神経節細胞が少ないことが知られている。飼育方法として、飼料及び水分は自由に与え、12時間毎に室内照明を切り替えた。

Methods

群はB6、JF1、SHEDを投与したJF1の3群とした。

移植可能な週令に達した段階で、JF1にSHEDを経静脈的に移植する。

移植の有効性の評価として、1)臨床的解析、2)腸管電気生理学的解析、3)病理組織学的解析を行う。

以下にそれぞれの手法を述べる。

1)臨床的解析

解析項目としては、体重、糞便数、飼料摂取量、水分摂取量である。一定期間ごとにデータをとり解析を行った。

2)腸管電気生理学的解析

腸管を適切に処理した後に、ティシュー・オーガンバスにて薬剤刺激を施し、収縮や弛緩の程度をリアルタイムで記録し、解析を行った。

3)病理組織学的解析

SHEDの生着の評価として、抗HLA-ABC抗体を用い、またSHEDの分化性の証明のため、神経節細胞のマーカー(抗HuC/D抗体)、神経叢のマーカー(CD56抗体)を用い、神経線維の評価としてAChE染色を行い、解析を行った。

4. 研究成果

1)臨床的解析

3群間において、飼料及び水分摂取量の経時的変化に有意差は認めなかったが、JF1群に比較し、細胞移植群では体重増加及び糞便数の有意な増加を認めた。

2)腸管電気生理学的解析

SHEDを移植したJF1は非移植群に比較して腸管電気生理学的な収縮能及び弛緩能の改善を認めた。

3)病理組織学的解析

SHEDを移植したJF1において神経節細胞の増加を認め、また、幹細胞の腸管筋間神経叢における生着を確認した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計13件)

Sakamoto S, Kasahara M, Mizuta K, Kuroda T, Yagi T, Taguchi T, Inomata Y, Umeshita K, Uemoto S. Nationwide survey of the outcomes of living donor liver transplantation for hepatoblastoma in Japan. *Liver Transpl.* 査読有
20(3):333-46, 2014

Taguchi T, Kobayashi H, Kanamori Y, Segawa O, Yamataka A, Sugiyama M, Iwanaka T, Shimojima N, Kuroda T, Nakazawa A, Oda Y, Miyoshi K, Ieiri S. Isolated intestinal neuronal dysplasia Type B (IND-B) in Japan: results from a nationwide survey. *Pediatr Surg Int.* 査読有
30(8):815-822, 2014
DOI: 10.1007/s00383-014-3542-6.

Yuniartha R, Alatas FS, Nagata K, Kuda M, Yanagi Y, Esumi G, Yamaza T, Kinoshita Y, Taguchi T. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell transplantation in a nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia rat model. *Pediatr Surg Int.* 査読有
30(9):907-14, 2014
DOI: 10.1007/s00383-014-3576-9.

Muto M, Matsufuji H, Tomomasa T,

Nakajima A, Kawahara H, Ida S, Ushijima K, Kubota A, Mushiake S, Taguchi T. Pediatric chronic intestinal pseudo-obstruction is a rare, serious, and intractable disease: A report of a nationwide survey in Japan. *J Pediatr Surg*. 査読有 49(12):1799-803, 2014
DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2014.09.025.

田口智章、渡邊芳夫、松藤 凡、藤澤正洋
Hirschsprung 病類縁疾患の分類. *小児外科*. 査読有 47(4) : 372-376, 2015

Teshiba R, Tajiri T, Sumitomo K, Masumoto K, Taguchi T, Yamamoto K. Identification of a KEAP1 Germline Mutation in a Family with Multinodular Goitre. *PLOS ONE*. 査読有 8(5):1-8, 2013
DOI: 10.1371/journal.pone.0065141.

Watanabe Y, Kanamori Y, Uchida K, Taguchi T. Isolated hypoganglionosis: results of a nationwide survey in Japan. *Pediatr Surg Int*. 査読有 29(11) : 1127-1130, 2013
DOI: 10.1007/s00383-013-3378-5.

Kohashi K, Nakatsura T, Kinoshita Y, Yamamoto H, Yamada Y, Tajiri T, Taguchi T, Iwamoto Y, Oda Y. Glypican 3 expression in tumors with loss of SMARCB1/INI1 protein expression. *Hum Pathol*. 査読有 44(4):526-33, 2013
DOI: 10.1016/j.humpath.2012.06.014.

Souzaki R, Ieiri S, Uemura M, Ohuchida K, Tomikawa M, Kinoshita Y, Koga Y, Suminoe A, Kohashi K, Oda Y, Hara T, Hashizume M, Taguchi T. An augmented reality navigation system for pediatric oncologic surgery based on preoperative CT and MRI images. *J Pediatr Surg*. 査読有 48:2479-2483, 2013
DOI: 10.1016/j.jpedsurg.

田口智章、林田 真、松浦俊治、副島雄二. 肝移植後の門脈閉塞に対する Rex shunt 手術. *小児外科*. 査読有 45(11) : 1253-1258, 2013

林田 真、柳 佑典、田口智章. 治療の今後の展望. 新・胆道閉鎖症のすべて. 査読有 75-79, 2013

木下義晶、手柴理沙、江角元史郎、永田公二、田口智章. 当科における腹壁破裂の治療戦略. *日本周産期・新生児医学会雑誌*.

査読有 49(1) : 40-42, 2013

田口智章. 新生児外科の最近の進歩と今後の展望. 第 113 回日本外科学会定期学術集会 創始と継志-Memorial Lectures-. 査読無 113-118, 2013

[学会発表](計 27 件)

田口智章. ヒルシュスプルング病類縁疾患(H 類縁)の歴史, 定義, 分類, 予後. 第 51 回日本小児外科学会学術集会. 平成 26 年 5 月 8 日 ~ 10 日、大阪

柳 佑典、Fatima Safira Alatas、吉丸耕一朗、林田 真、大賀正一、山座治義、山座孝義、田口智章. 四塩化炭素誘導肝硬変モデルマウスに対するヒト脱落乳歯幹細胞移植療法の有効性に関する研究. 第 51 回日本小児外科学会学術集会. 平成 26 年 5 月 8 日 ~ 10 日、大阪

Yuniartha R, Nagata K, Alatas FS, Kuda M, Yanagia Y, Esumia G, Yamazaki T, Kinoshita Y, Taguchi T. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell transplantation in nitrofen induced Congenital Diaphragmatic Hernia rat model. 第 51 回日本小児外科学会学術集会. 平成 26 年 5 月 8 日 ~ 10 日、大阪

Taguchi T, Ieiri S, Miyoshi K, Watanabe Y, Kobayashi H, Fukuzuwa M, Hamada Y, Yagi M, Matsufuji H, Nakazawa A, Kubota A, Iwanaka T, Matsui A. Current status and prognosis of allied disorders of Hirschsprung's disease in Japan-A report from Japanese Study Group of allied disorders of Hirschsprung's disease-. PAPS2014. May 25-29, 2014, Banff, Alberta

Taguchi T, Miyoshi K, Ieiri S, Kobayashi H, Yamataka A, Shimojima N, Kuroda T. ISOLATED INTESTINAL NEURONAL DYSPLASIA TYPE B IN JAPAN-RESULTS FROM NATIONWIDE SURVEY-. 21st INTERNATIONAL MEETING OF THE PEDIATRIC COLORECTAL CLUB. June 15-17 2014, Dublin.

Taguchi T, Miyoshi K, Ieiri S, Kobayashi H, Yamataka A, Shimojima N, Kuroda T. Isolated intestinal neuronal dysplasia Type B in Japan-results from nationwide survey. EUPSA2014. June 18-21 2014, Dublin, Ireland

永田公二、江角元史郎、宗崎良太、林田真、松浦俊治、家入里志、木下義晶、田口智章. Congenital hypoganglionosis と超短腸症候群の治療方針に関する検討. 日本外科代謝栄養学会第 51 回学術集会. 平成 26 年 7 月 4 日～5 日、大阪

福原雅弘、永田公二、江角元史郎、宗崎良太、林田真、松浦俊治、家入里志、木下義晶、田口智章. Congenital hypoganglionosis における治療方針の検討. 第 44 回九州小児外科研究会. 平成 26 年 9 月 6 日、福岡

Obata S, Ieiri S, Jinbo T, Yoshimaru K, Miyoshi K, Miyata J, Taguchi T. Clinical Courses of “Suspected” Intestinal Neuronal Dysplasia Type B in Infant: A Single Institution Experience. XXVIIth INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PAEDIATRIC SURGICAL RESEARCH. September 22-23, Toronto, Canada

田口智章、木下義晶、宗崎良太、川久保尚徳、松浦俊治、林田真、柳佑典. 小児血液・がんと肝移植および肝再生医療. 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会. 平成 26 年 11 月 28 日～30 日、岡山

田口智章、渡邊芳夫、金森豊、松藤凡、曹英樹、福澤正洋、家入里志、松浦俊治、林田真、吉丸耕一朗、柳佑典. Hirschsprung 病類縁疾患の小腸移植の適応. 第 27 回日本小腸移植研究会. 平成 27 年 3 月 14 日、岡山

家入里志、岩中督、窪田昭男、渡邊芳夫、小林弘幸、上野滋、仁尾正記、松藤凡、増本幸二、孝橋賢一、牛島高介、松井陽、田口智章. Hirschsprung 病類縁疾患の現状調査と診断基準に関するガイドライン作成」に関する研究班報告. 第 113 回日本外科学会定期学術集会平成 25 年 4 月 11 日～13 日、福岡

柳佑典、林田真、中山功一、田口智章. バイオラピッドプロトタイプピングシステム (BRP system) を用いた肝組織再構築の試み. 第 113 回日本外科学会定期学術集会. 平成 25 年 4 月 11 日～13 日、福岡

田口智章、家入里志、岩中督、窪田昭男、松藤凡、渡邊芳夫、小林弘幸、

上野滋、八木実、増本幸二、金森豊、黒田達夫、濱田吉則、仁尾正記、孝橋賢一、友政剛、牛島高介、位田忍、松井陽. ヒルシュスプルング病類縁疾患の多施設共同研究. 第 113 回日本外科学会定期学術集会. 平成 25 年 4 月 11 日～13 日、福岡

林田真、柳佑典、江角元史郎、池上徹、吉住朋晴、副島雄二、調憲、前原喜彦、田口智章. 当院における小児肝移植の術後合併症と予後. 第 113 回日本外科学会定期学術集会. 平成 25 年 4 月 11 日～13 日、福岡

林田真、柳佑典、江角元史郎、池上徹、吉住朋晴、副島雄二、調憲、前原喜彦、田口智章. 成人に到達した胆道閉鎖症症例に対する生体肝移植. 第 113 回日本外科学会定期学術集会. 平成 25 年 4 月 11 日～13 日、福岡

永田公二、林田真、手柴理沙、江角元史郎、柳佑典、増本幸二、田口智章. 当科における超短腸症候群の栄養管理. 第 113 回日本外科学会定期学術集会. 平成 25 年 4 月 11 日～13 日、福岡

柳佑典、林田真、中山功一、田口智章. バイオラピッドプロトタイプピングシステム (BRP system) を用いた立体的肝組織の構築. 第 113 回日本外科学会定期学術集会. 平成 25 年 4 月 11 日～13 日、福岡

林田真、柳佑典、江角元史郎、田口智章. 九州大学小児外科における脳死下臓器移植の経験. 第 27 回日本小児救急医学会. 平成 25 年 6 月 14 日～15 日、沖縄

永田公二、林田真、手柴理沙、江角元史郎、柳佑典、増本幸二、田口智章. 当科における超短腸症候群の栄養管理の実践. 第 50 回日本外科代謝栄養学会. 平成 25 年 7 月 4 日～5 日、東京

21 林田真、副島雄二、柳佑典、江角元史郎、池上徹、吉住朋晴、調憲、杉本真樹、前原喜彦、田口智章. 乳児生体肝移植における臓器立体モデルを用いた術前シミュレーションの有用性. 第 31 回日本肝移植研究会. 平成 25 年 7 月 4 日～5 日、熊本

22 林田真、江角元史郎、柳佑典、吉丸耕一朗、田口智章. ヒルシュスプルング病類縁疾患に対する脳死小腸移植後急性拒

絶の1例.第49回日本移植学会総会.平成
25年9月5日~7日、京都

- 23 家入里志、松浦俊治、宗崎良太、林田 真、
橋爪 誠、田口智章.小児生体肝移植にお
けるグラフト肝容量と脾容量に関する検
討.第20回日本門脈圧亢進症学会.平成
25年9月19日~20日、名古屋
- 24 林田 真、松浦俊治、宗崎良太、家入里
志、橋爪 誠、田口智章.生体肝移植後の
遅延する血小板減少と脾容量に関する検
討.第20回日本門脈圧亢進症学会.平成
25年9月19日~20日、名古屋
- 25 Hayashida M,Esumi G,Yanagi
Y,Yoshimaru K,Takimoto T,Hara
T,Taguchi T.Living donor liver
transplantation for fulminant hepatic
failure due to familial hemophagocytic
lymphohistiocytosis in the neonatal
period. 第13回アジア汎太平洋小児栄
養消化器肝臓学会・第40回日本小児栄養
消化器肝臓学会.October 30-November
3,2013,Tokyo,Japan
- 26 田口智章.「ヒルシュスプルング病(巨大結
腸症)および類縁疾患の基礎と治療」(招
待講演).静岡県立こども病院オープンセ
ミナー.平成26年1月10日、静岡
- 27 田口智章.日本におけるヒルシュスプル
ング類縁疾患の現状.第26回日本小腸移
植研究会.平成26年3月15日、栃木

〔図書〕(計3件)

田口智章、玉井 浩、友政 剛、松井 陽
編集主幹、診断と治療社、小児栄養消化
器肝臓病学、2014、560

田口智章、木下義晶、永田公二、メジカ
ルビュー社、スタンダード小児外科手術
押さえておきたい手技のポイント、2014、
387

田口智章、岩中 督 監修、猪股裕紀洋、
黒田達夫、奥山宏臣 編集、メジカルビ
ュー社、スタンダード小児外科手術 押
さえておきたい手技のポイント、2013、
387

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

田口 智章 (TAGUCHI, Tomoaki)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号:20197247

(2)研究分担者

黒田 達夫 (KURODA, Tatsuo)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授
研究者番号:60170130

野中 和明 (NONAKA, Kazuaki)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号:90128067

山座 孝義 (YAMAZA, Takayoshi)
九州大学・歯学研究院・講師
研究者番号:80304814

山座 治義 (YAMAZA, Haruyoshi)
九州大学・歯学研究院・講師
研究者番号:30336151

柳 佑典 (YANAGI, Yusuke)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号:30596664

家入 里志 (IEIRI, Satoshi)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号:00363359

三好 きな (MIYOSHI, Kina)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号:20621709