

Title	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
Sub Title	Gene analyses and neural crest stem cell therapy in Hirschsprung's disease and allied disorders.
Author	下島, 直樹(Shimajima, Naoki) 黒田, 達夫(Kuroda, Tatsuo) 芝田, 晋介(Shibata, Shinsuke) 岡野, 栄之(Okano, Hideyuki) 工藤, 純(Kudo, Jun) 小崎, 健次郎(Kosaki, Kenjiro) 藤村, 匠(Fujimura, Takumi)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>腸管神経の先天性異常により外科的手術を含めた治療が必要な疾患に対して、幹細胞移植治療により腸管神経の再生が可能になることを最終的な目標として研究を行ってきた。再生治療を計画する上で病気の原因を知ることが必要との考えの下、hypoganglionosisの検体を用いて網羅的遺伝子解析を行い、2つの病因に関連する候補遺伝子を同定した。また腸管における神経とグリアの比率を定量的に解析し、hypoganglionosisにおいては神経よりもグリアがより減少していることを示した。病態解明の観点から重要な所見であり、将来的には神経のみならずグリアについても再生を促す必要があると考えている。</p> <p>A final goal of our project is to establish a cell transplant therapy for Hirschsprung's disease and allied disorders. Understanding the etiology of diseases is very important, so we began with gene analyses using human samples from patients with hypoganglionosis. To date, we identified 2 candidate genes which might be causative genes. For a better understanding of etiology of hypoganglionosis, populations of ganglion cells and glial cells were analyzed quantitatively. Immunohistochemical staining for enteric nerves and glial cells were performed. Ganglion cells and glial cells were both decreased in number but the ratio of glial cells to ganglion cells was significantly lower in hypoganglionosis. Thus, the result from a disturbed generation of trophic factors by accompanying glial cells might be an etiological factor for the decreased number of ganglion cells in hypoganglionosis.</p>
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2012～2014 課題番号：24592700 研究分野：小児外科学
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24592700seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24592700seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592700

研究課題名(和文) ヒルシュスブル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 analyses and neural crest stem cell therapy in Hirschsprung's disease and allied disorders.

研究代表者

下島 直樹(Shimajima, Naoki)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30317151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：腸管神経の先天性異常により外科的手術を含めた治療が必要な疾患に対して、幹細胞移植治療により腸管神経の再生が可能になることを最終的な目標として研究を行ってきた。再生治療を計画する上で病気の原因を知ることが必要との考えの下、hypoganglionosisの検体を用いて網羅的遺伝子解析を行い、2つの病因に関連する候補遺伝子を同定した。また腸管における神経とグリアの比率を定量的に解析し、hypoganglionosisにおいては神経よりもグリアがより減少していることを示した。病態解明の観点から重要な所見であり、将来的には神経のみならずグリアについても再生を促す必要があると考えている。

研究成果の概要(英文)：A final goal of our project is to establish a cell transplant therapy for Hirschsprung's disease and allied disorders. Understanding the etiology of diseases is very important, so we began with gene analyses using human samples from patients with hypoganglionosis. To date, we identified 2 candidate genes which might be causative genes. For a better understanding of etiology of hypoganglionosis, populations of ganglion cells and glial cells were analyzed quantitatively. Immunohistochemical staining for enteric nerves and glial cells were performed. Ganglion cells and glial cells were both decreased in number but the ratio of glial cells to ganglion cells was significantly lower in hypoganglionosis. Thus, the result from a disturbed generation of trophic factors by accompanying glial cells might be an etiological factor for the decreased number of ganglion cells in hypoganglionosis.

研究分野：小児外科学

キーワード：腸管神経 発生 分化 幹細胞 再生医療 神経堤細胞

### 1. 研究開始当初の背景

ヒルシュスプルング病やその類縁疾患は先天的な腸管神経の異常により腸管運動障害があり、外科的手術を必要とする疾患である。これに対して、手術に代わる新しい治療として近年、腸管神経の起源である神経堤幹細胞移植などの再生医療を応用する研究が報告されるようになってきた。しかし、これらの疾患の成因や原因遺伝子はいまだ不明の点が多く、幹細胞移植研究も実験動物での報告にとどまっているのが現状である。

### 2. 研究の目的

我々は、再生治療を臨床応用する上で、それぞれの症例の成因を把握した上で、それに合わせた治療を選択する必要があると考え、臨床検体を用いての病気の成因を知ることとを目的として研究を計画した。

### 3. 研究の方法

临床上、難治性であり実際に治療している患者数が比較的多い類縁疾患のひとつである hypoganglionosis の病因解析に焦点を当てて研究を進めた。

hypoganglionosis は腸管全体の神経が極度に減少しており、腸管運動障害を引き起こす疾患である。

#### (1) 原因遺伝子の解析

hypoganglionosis の4例とその両親2名の合計6名より採血からゲノム情報を抽出し、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析を行った。得られた変異を日本人の参照データに照らし合わせ、病気の成因に関係のありそうな関連遺伝子の特定を試みた。

#### (2) 腸管病理検体からの病因解析

hypoganglionosis について、手術時に切除された腸管の検体を用いて、下記の仮説を立てて病因の解析を行った。

仮説1：神経堤幹細胞が神経とグリアに分化していく過程に異常があり腸管神経の数が減少している。

仮説2：腸管神経のうち、ある種のサブタイプのみが減少した結果として腸管神経の数が減少している。

### 4. 研究成果

#### (1) 原因遺伝子の解析

4例の hypoganglionosis 症例のうち、1例で既知のヒルシュスプルング病関連遺伝子にアミノ酸置換を認めた。また、他の1例においてマウスモデルでヒルシュスプルング病との関連が知られている遺伝子にアミノ酸置換を認めた。hypoganglionosis の発症との関連がある可能性があり、興味深い知見と言えた。今後、これらの候補遺伝子をノックアウト、ノックダウンした動物モデルを作成し腸管の運動機能評価、病理所見評価などを行うこと、また他の患者さんからの遺伝情報にておなじ候補遺伝子に変異を認めるかどうかを検討することが必要と考えている。

#### (2) 腸管病理検体からの病因解析

hypoganglionosis 24例、正常コントロール 26例の臨床検体を用いて、神経マーカーとして Hu C/D、グリアマーカーとして Sox10 の抗体を用いて免疫染色を行い、定量的に評価をした。検討した臨床検体の内訳を表1に、代表的な染色結果を図1に示す。

表1 臨床検体のうちわけ

	Hypoganglionosis	Control
Number of cases	24	26
Age	47.8 ± 59.7 (months) 1day - 15 years	28.9 ± 65.7 (months) 1day - 25 years
Gender		
male	13	12
female	11	14
Location		
jejunum	13	8
ileum	8	16
colon	3	2

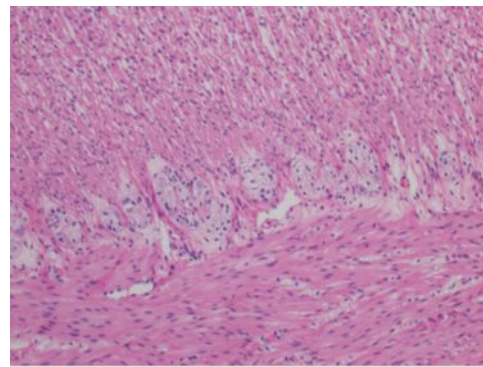


図1a.

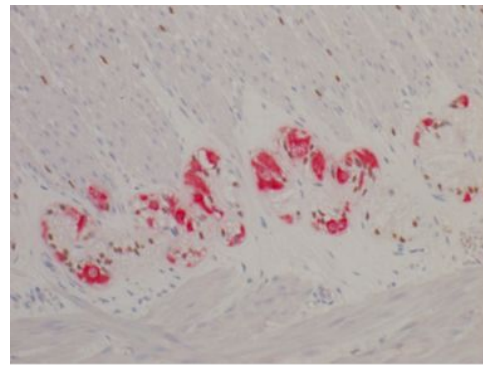


図1b.

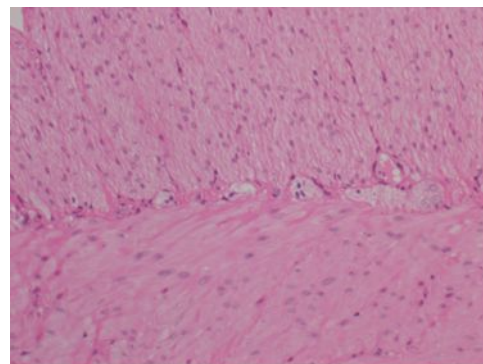


図1c.

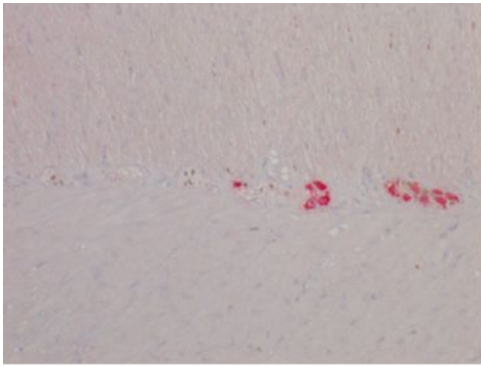


図 1d.

正常コントロールの検体 (図 1a, b) と hypoganglionosis の検体 (図 1c, d) を示す。いずれも検体は小腸 (回腸) で、筋層間の強拡大図 (400 倍) で、上が内輪筋、下が外縦筋、中央に筋層間神経叢が存在している。図 1a, c はヘマトキシリンエオジン染色で、b, d は二重免疫染色である。神経マーカーである HuC/D が赤、グリアマーカーの Sox10 が茶で染まっている。正常コントロールに比べて hypoganglionosis では明らかに筋層間に存在する神経叢の大きさが小さく、また、神経の数もグリアの数も少ないのがよく分かる。解析した正常コントロール 26 例と hypoganglionosis 24 例で HuC/D 陽性の神経と Sox10 陽性のグリアの数を定量化してみると、図 2 の様に明らかに神経もグリアも hypoganglionosis において数が減少している。

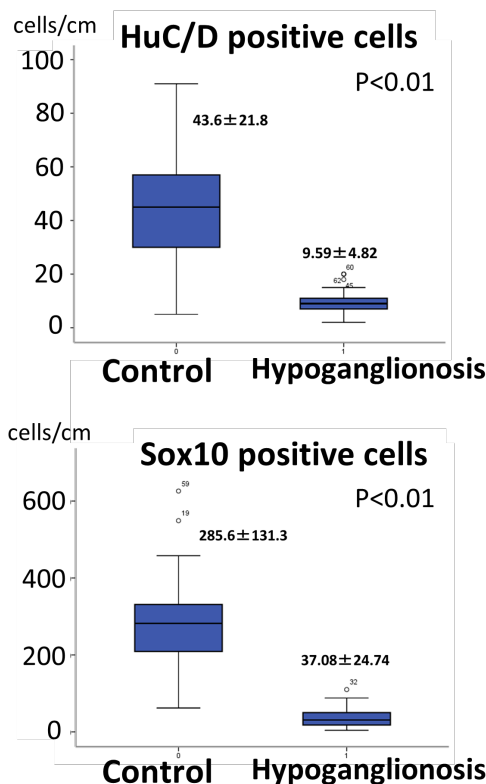


図 2 正常コントロールと hypoganglionosis における神経 (HuC/D) とグリア (Sox10) の数

ここで、HuC/D 陽性の神経と Sox10 陽性のグリアの数の比をとってみると、図 3 のように hypoganglionosis では正常コントロールに比べて有意にグリアがより少ないという結果が出た。

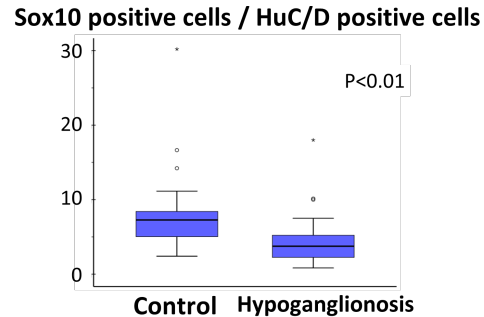


図 3 正常コントロールと hypoganglionosis における神経 (HuC/D) とグリア (Sox10) の比

グリアは神経の支持細胞であると共に、神経が少ないような環境においてはグリアから神経に形態を変化させることが動物実験では明らかになっており、hypoganglionosis の病因を探る上で興味深い知見と考えられた。また、このように臨床検体を用いて病因を探ることは、その先にある腸管神経の再生治療を考える上でも重要な知見と考えられた。

hypoganglionosis 5 例、正常コントロール 6 例を用いて、全神経マーカーの HuC/D および抑制性神経のマーカーである nNOS により両群における nNOS 陽性の割合を比較した。結果として、全神経 (HuC/D 陽性細胞) のうち nNOS 陽性神経の割合は hypoganglionosis で 38.4%、正常コントロールで 44.7% であり、統計学的な有意差を認めなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. 下島直樹、廣部誠一、福澤龍二、Hirschsprung 病、小児科診療、査読無、77 巻、2014 年、699-701

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Shimojima N. et al., Population of ganglion cells and glial cells in congenital hypoganglionosis, 4<sup>th</sup> International Symposium, Development of the enteric nervous system: cells, signals, genes, and therapy. 2015.4.19-22, Rotterdam, Holland

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

下島 直樹 (Naoki Shimojima)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：30317151

### (2) 研究分担者

黒田 達夫 (Tatsuo Kuroda)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号 60170130

芝田 晋介 (Shinsuke Shibate)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：70407089

### (3) 連携研究者

岡野 栄之 (Hideyuki Okano)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：60160694

工藤 純 (Jun Kudo)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：80178003

小崎 健次郎 (Kenjiro Kosaki)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：30234743

藤村 匠 (Takumi Fujimura)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：80573443