

慢性便秘症に関する神経堤幹細胞移植治療の有用性の検討

藤村 匠

慶應義塾大学小児外科 博士課程

緒言

食事摂取は生命維持に不可欠な行動であり、その食事を支えているのは正常な腸管運動にほかならない。正常な腸管運動は栄養や水分を吸収するためにはなくてはならない機能で、ひいてはヒトの生存には欠かすことができない。その腸管運動を担う神経節細胞の異常、いわゆる便秘に苦しむ人々は多数存在する。筆者の専門である小児外科領域ではヒルシュスプルング病をはじめとする先天的に腸管神経が欠損する疾患や、ヒルシュスプルング病類縁疾患と呼ばれる腸管神経機能が著しく低下する疾患が存在する¹⁻⁴⁾。こうした疾患においては治療に複数回の手術を要したり、手術後も良好な排便機能が得られないために命を落としたりする症例も少なくない。

また、小児において慢性便秘と判断されている中には軽度の腸管運動不全という病態が紛れ込んでいることもあり、1歳を過ぎてからようやく診断される場合もある。これらは命を落とすことはなくても、排便機能不良によるQOLの低下は著しい⁵⁾。このような症例に対して手術を施行するかは小児に対する手術自体のリスク、全身麻酔のリスクを考えると悩ましいことも多い。我々は低侵襲かつ満足な排便機能をもたらす新たな治療戦略の一つとして、腸管に対する新規の幹細胞移植治療法の開発を目標としている。

実験方法

本研究では腸管由来の神経堤細胞を分離・培養し、それらを無神経節腸管を持つモデルマウスに移植した。移植後細胞の生着・分化傾向を調査し(図1)、消化管機能の改善に関する評価も行った。動物実験においては慶應義塾大学の実験動物指針・倫理指針を順守した。また、実験は慶應義塾大学遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を受けて行われた。

1. 薬剤性腸管運動不全モデルマウスの作成

4週齢のC57BL/6マウスに対し、Yonedaらの報告を

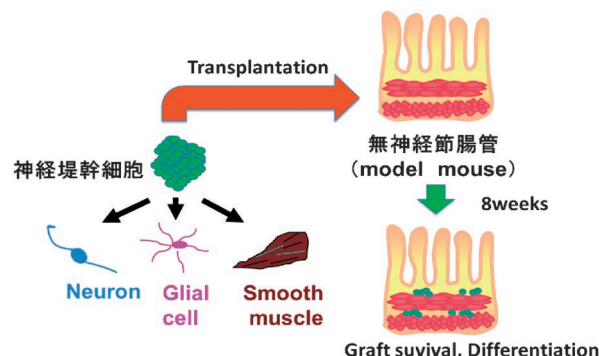


図1 3系統に細胞移植実験の概要

分化する多分化能をもつ腸管由来神経堤細胞を無神経節腸管をもつ腸管運動不全モデルマウスに移植し、一定期間経過中の移植細胞の生着、分化傾向を観察する

参考に全身麻酔下に腸管を体外に挙上し、塩化ベンザルコニウムを浸したガーゼで腸管を包んだ。15分間の神経細胞の焼灼処置を行い、無神経節腸管を持つ薬剤性腸管運動不全モデルマウス⁶⁾を作成した。

2. 移植ドナー細胞の腸管由来神経堤細胞の分離・培養

蛍光 (Venus) と発光 (Luciferase) の両方を介して追跡することを可能にした fLuc と呼ばれる蛍光発光融合蛋白質を恒常的に発現するトランスジェニックマウス (Hara-Miyauchi et al., 2012)、日齢13.5から腸管を摘出し、Trypsin EDTA 0.25%を加えてピペッティングと遠心を行い、神経堤細胞を分離した。分離した腸管由来神経堤幹細胞をDMEM/F12に栄養因子を含めた培地を用いて培養し (Nagoshi et al., 2008)、14日後に sphere を形成したものをドナー細胞とした。

3. 腸管由来神経堤細胞のモデルマウスへの移植

*In vivo*における発光イメージングを可能にするため、2.で調整した神経堤細胞の sphere を機械的に single cell にしたものをPBSで $4.0 \times 10^5 / 5 \mu\text{l}$ 程度の懸濁液に調整したものをガラスマイクロピペットとStereotaxic injector

(KDS Legato 130, Muromachi-kikai, Tokyo, Japan) を用いて全身麻酔下にモデルマウス無神経節腸管に移植した。

4. 発光イメージング

移植細胞に導入されている ffLuc (蛍光発光融合蛋白質) の Luciferase が加えた基質である Luciferin (Summit Pharmaceuticals International Corporation, Tokyo, Japan) を、ATP を利用して発光する性質を活かして、Xenogen 100-IVIS cooled CCD optical macroscopic imaging system (SC BioScience, Tokyo, Japan) を用いて生着細胞を検出した。腸管由来神経堤細胞を無神経節腸管に移植したマウスに $500\mu\text{l}$ の Luciferin を腹腔内投与し、1回/週のペースで8週間にわたり、発光イメージングによる観察を行った。

5. 免疫組織化学

移植部位腸管における蛍光蛋白質および神経細胞マーカー、グリア細胞マーカーによる多重免疫染色で細胞の分化系譜を確認した。

6. 消化管機能評価

移植細胞観察期間内に2回/週のペースで体重を測定し、移植後腸管内の便量測定による消化管機能評価を行い、シャム手術群とモデルマウス群、細胞移植群間で比較を行った。

結 果

- 作成した腸管運動不全モデルマウスは8週間にわたり、経時的な病理学的所見の変化 (図2)、体重増加率と便量測定による消化管機能評価を行い、消化管機能低下モデルとして有用であることを確認した。
- 腸管由来神経堤幹細胞を用いた薬剤性ヒルシュスプルング病モデルマウスへの移植実験は8週間にわたって移植細胞が生着することを発光を利用して証明できた (図3)。移植細胞は腸管内で神経、グリアのマーカー陽性を発現する細胞に分化していた。腸管内残便量と体重増加率を用いた機能評価で明らかな消化管機能の改善傾向も示すことができた。

考 察

中枢神経を中心に細胞移植による神経再生の報告が続々となされ⁷⁾、近年、腸管神経でも同様の報告が認め

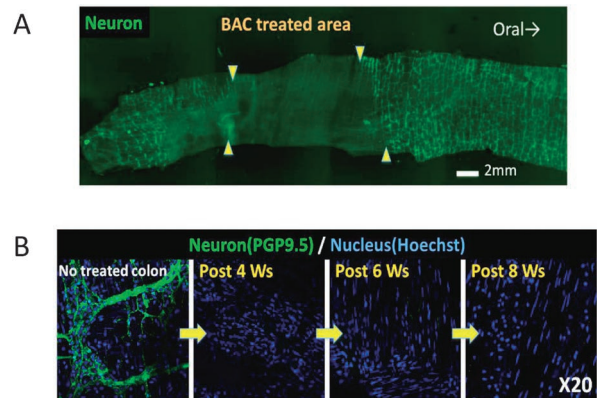


図2 A. 塩化ベンザルコニウムを用いた腸管運動不全モデルマウスの腸管

神経堤細胞を蛍光標識したマウスを用いて作成したモデルを作成後2週間経過した時点で腸管を摘出し、蛍光顕微鏡で観察した。(矢印(黄色)で挟まれた部分が無神経節部分) B. モデル作成から2~8週間の間、経時的に免疫組織化学染色を行い、薬剤処置を行った部分の腸管神経に可逆性がないことを確認した。

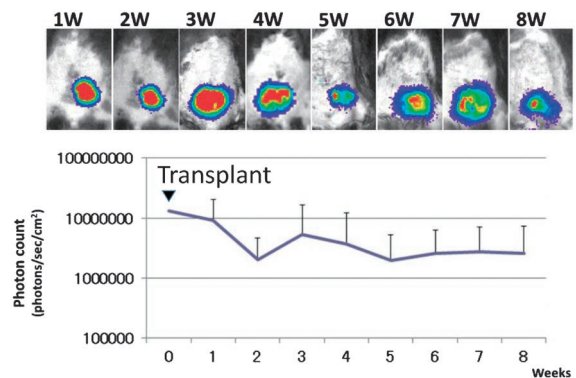


図3 発光イメージングを用いた移植細胞の観察

移植細胞は Luciferin を加えた際の発光を利用して、観察することが可能である。移植細胞一時的に減少するが、生着後は 3.0×10^6 photons/sec/cm² 程度の発光強度を維持しており、一定の細胞数の生着が示唆される。

られるようになった⁸⁾。本研究は腸管神経領域では移植細胞が生着し、分化したことに加え、移植細胞の生着後の挙動を提示した初めての報告である。機能的に移植群はモデル群に比較して体重は増加し、観察期間終了後の腸管内残便量は減少していることから、細胞移植は腸管運動機能改善にも寄与すると考えられる。

今後の課題として、腸管由来神経堤細胞は臨床では非常に限られた場面ではしか採取できないため、より簡単にアクセスできるドナーソースの検索、開腹手技を必要としない細胞移植法の開発が必要である。また、近年、腸管神経は神経節を構成しているが、神経節中には腸管運動亢進性神経・抑制性神経など異なる機能を持つもの

が混在している可能性が示唆されており、今後は移植細胞の性質の詳細な解析が必要である。

小児の慢性便秘の治療で悩む症例の初期治療として、また、手術後の排便機能低下に苦しむ症例の補助治療としてこの細胞移植治療の有用性が期待される。本治療法がさらに内視鏡を用いたさらに低侵襲な治療に発展すれば、小児に限らず、高齢者の薬物治療に反応しない便秘症例に対しても用いることが可能であり、あらゆる便秘の治療法として発展していく可能性がある。

要 約

生命維持に不可欠である食物摂取を可能にするのは正常な腸管運動である。それらに異常をきたすいわゆる便秘に対する新たな治療戦略として、腸管神経節細胞の起源である神経堤細胞に注目した細胞移植治療の開発を目指し、その有用性を検討した。

腸管由来神経堤幹細胞を、無神経節腸管を持つ腸管運動不全モデルに移植した。移植後に、発光を用いた観察で移植細胞の生着・生存を確認し、移植部位腸管における細胞の分化系譜を評価し、腸管運動機能の変化も評価した。

発光イメージングシステムで8週間にわたって移植細胞の生存を確認することができ、移植腸管切片で神経に分化しており、細胞移植により腸管機能の改善を示唆する結果が得られた。これらの結果から、腸管運動不全モ

デル動物に対し、神経堤由来の幹細胞を移植し、腸管神経の再生と腸管運動機能改善が可能であり、神経堤細胞移植治療が慢性便秘の新たな治療戦略の一つとなる可能性が示唆された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の皆様に深く感謝申し上げます。貴財団助成は大きな励みになり、本研究の結果をもって海外学会に挑戦することもできました。また、本研究では慶應義塾大学医学部小児外科の黒田達夫先生、下島直樹先生および医局の皆様、生理学の岡野栄之先生、芝田晋介先生および研究室の皆様にご助力頂きましたことを感謝致します。

文 献

- 1) J. A. Badner, et al.: *Am. J. Hum. Genet.*, **46**, 568-580, 1990.
- 2) J. Amiel, et al.: *J. Med. Genet.*, **38**, 729-739, 2001.
- 3) M. A. Parisi, et al.: *Curr. Opin. Pediatr.*, **12**, 610-617, 2000.
- 4) E. Passarge: *Nat. Genet.*, **31**, 11-12, 2002.
- 5) 日本小児栄養消化器肝臓学会, 日本小児消化管機能研究会: 小児慢性機能性便秘診療ガイドライン 初版, pp. 26-36, 2013.
- 6) A. Yoneda, et al.: *Pediatr. Surg. Int.*, **18**, 234-237, 2002.
- 7) S. Okada, et al.: *FASEB J.*, **19**, 1839-1841, 2005.
- 8) R. Hotta, et al.: *J. Clin. Invest.*, **123**, 1182-1191, 2013.