

歯髄幹細胞による先天性腸神経症の治療 ～多能性幹細胞による腸運動の再生～

名古屋大学大学院医学系研究科細胞生理学の岩田尚子（いわたなおこ）、高井千穂（たかいちほ）研究補助員と中山晋介（なかやましんすけ）准教授のグループは、九州大学、福岡歯科大学、国際医療福祉大学などとのモデル動物での共同研究を通じて、乳歯の歯髄幹細胞（dDPSCs）に先天性腸神経障害への治療効果があることを明らかにしました。またこの事実は、腸の複雑な協調運動が複数のモーターシステムの連携で組織的に運営されることを、疾患モデル動物での治療効果により実証したものです。

ヒルシュスプルング病(HSCR)とその類縁疾患は、日本で 5000 出生に 1 程度の発生率の先天性腸神経障害です。現在の治療は患部腸管の切除やバイパス手術ですが、多くの患儿が生涯に亘り合併症に苛まれる難病で、その合併症は手術時に「正常」と判断され残された消化管の機能不全などに起因します。

そこで本研究では、新たな細胞治療の可能性を探索しました。乳歯歯髄幹細胞は、神経堤由来細胞マーカーを発現し、クラス II HLA^{*1} の低い多能性幹細胞です。一方、先天性腸神経障害のモデル動物として用いた JF1 マウスは、エンドセリン B 受容体 Ednrb 遺伝子変異をもち、特に近位部結腸において疎らな壁内神経叢を特徴とします。この JF1 マウスへヒト乳歯歯髄幹細胞を経静脈的に細胞移植したところ、生存率と栄養状態が回復しました（図 1）。

JF1 マウスの結腸近位部では、速い電位と緩徐な電位で構成される電気複合体が頻繁に発生しますが、正常な野生型（B6）マウスの結腸近位部では、3-4 秒周期の緩徐な基礎電気リズムが発生しています。ヒト乳歯歯髄幹細胞を移植したところ、JF1 マウスに野生型のような基礎電気リズムが見事に回復しました（図 2）。また、移植されたヒト乳歯歯髄幹細胞は、SDF1 α と CXCR4^{*2} の相互作用により JF1 マウスの患部消化管へ移動し、近位部結腸ではペースメーカー細胞と神経の両方に分化しました（図 1c）。さらにヒト型 GDNF, NGF と SCF^{*3} 等も増加しており、パラクリン作用も併せ持つことが確認されました。

19 世紀末におけるヒルシュスプルング(1888)およびベイリスとスターリング(1899)によって報告^{*4}された臨床と生理学研究のエビデンスは論理的に強固に一致し、その後、「内在神経系による腸の協調運動」という概念が定着しました。20 世紀末にカハール間質細胞のペースメーカー細胞としての働きが見いだされましたが、この「内在神経制御腸運動」の概念は、依然として治療ガイドラインなどに強く影響を与えているようです。私たちの多能性幹細胞（乳歯歯髄幹細胞）移植研究は、複雑な腸運動ではペースメーカー細胞ネットワークを含めた複数のモーターシステムの協調が働く事実を示した成果でもあります。本研究成果が、消化管運動障害での治療概念の適切な修正と根治的治療開発に繋がることを期待します。

本研究成果は、学際的オンライン・オープンアクセス誌「Scientific Reports」（2022 年 4 月 28 日付）に掲載されました。

ポイント

- ヒルシュスプルング病とその類縁疾患は、5000 出生に 1 人程度の発生率の先天性腸神経障害である。現在の治療は患部腸管の切除やバイパス手術だが、多くの患児が生涯に亘り合併症に苛まれる。
- 乳歯の歯髄幹細胞(dDPSCs)は、神経堤由来細胞マーカーを発現し、HLA クラス II の低い多能性幹細胞である。JF1 マウスは、Ednrb 遺伝子変異をもつ先天性腸神経障害モデルで、特に近位部結腸で疎らな壁内神経叢が特徴である。この JF1 マウスにヒト乳歯歯髄幹細胞を経静脈的に細胞移植したところ、生存率と栄養状態の回復が見られた。
- 野生型 B6 マウスの近位結腸では 3-4 秒周期の基礎電気リズムが見られ、一方、JF1 マウス近位結腸では速い電位と緩徐な電位の電気複合体が発生していた。ヒト乳歯歯髄幹細胞の移植は、JF1 マウスに野生型のような基礎電気リズムを回復させた。
- JF1 マウスでは、移植されたヒト dDPSCs が患部消化管へ移動し、近位結腸ではペースメーカー細胞と神経の両方に分化していた。さらに、マウス型 NGF と GDNF、及びヒト型 GDNF、NGF と SCF も増加しており、パラクリン作用も併せ持つことが確認された。
- ヒルシュスプルング(1888)とベイリス・スターリング(1899)が臨床的、生理学的に一致したエビデンスを報告し、その後、内在神経系による腸の協調運動という概念が定着した。私たちの研究は、実際の腸の複雑な運動は、ペースメーカー細胞ネットワークを含む複数のモーターシステムの統合により構築されることを細胞治療によって実証した。

1. 背景

ヒルシュスプルング病(HSCR)とその類縁疾患は、日本で 5000 出生に 1 程度の発生率の先天性腸神経障害です。現在の治療は患部腸管の切除やバイパス手術ですが、多くの患児が生涯に亘り合併症に苛まれる難病で、その合併症は手術時に「正常」と判断され残された消化管の機能不全などに起因します。

ヒルシュスプルング病は、1888 年のデンマークの小児科医ヒルシュスプルングの報告、「腸の壁内神経を部分的に欠損した乳児の 2 例」に由来する名称で、その病因の理解は未だ不完全ですが、胎児期での神経堤細胞の消化管遠位部における移行・定着不良と考えられています。ヒルシュスプルングと同時期に、英国のベイリスとスターリング(1899)が、「腸蠕動運動における内在神経回路の必要不可欠な働き(所謂、腸の法則)」を論文報告し、内在神経による腸運動の概念が定着しました。しかしながら、この概念が現在の医学的な治療方針に対して与える過度な影響について懸念されるようになりました。1990 年代になり、カハール間質細胞(ICCs)が消化管で特殊なペースメーカー細胞として働くことが分かり、加えて、筋層間神経叢領域においてネットワーク構造で分布するカハール細胞は、空間的組織活動への貢献が示唆されています。

2. 研究成果

そこで本研究では、3 種類の幹細胞を比較して新たな細胞治療を探索しました。その中で乳歯歯髄幹細胞は、神経堤由来細胞マーカーを発現し、クラス II HLA が低い特徴をもつ多能性幹細胞です。一方、先天性腸神経障害のモデル動物として用いた JF1 マウスは、エンドセリン B 受容体

Ednrb 遺伝子変異をもち、特に近位部結腸において疎らな壁内神経叢が特徴です。

その JF1 マウスへヒト乳歯髄幹細胞を経静脈的に細胞移植したところ、腸運動性の改善とともに、生存率と栄養状態が回復しました（図 1）。正常な野生型（B6）マウスの結腸近位部では、3-4 秒周期の緩徐な基礎電気リズムが発生しますが、JF1 マウスの結腸近位部では速い電位と緩徐な電位で構成される電気複合体が頻繁に発生していました（図 2）。これらの事実は、JF1 マウス結腸近位部では、ネットワーク状ペースメーカー細胞が発生する緩徐な自発性リズムの喪失は、比較的機能が維持されている壁内神経系の活動によって補完されていることを示唆しました。

ヒト乳歯髄幹細胞の JF1 マウスへの移植は、結腸近位部に野生型に近い基礎電気リズムを、見事に回復させました（図 2）。この細胞治療後に結腸の同部位に自発性収縮が回復することも確認しました。また、移植されたヒト乳歯髄幹細胞は、SDF1 α と CXCR4 の相互作用により JF1 マウスの患部消化管へ移動し、近位部結腸ではペースメーカー細胞と神経の両方に分化していました（図 1c）。さらに、ヒト型 GDNF, NGF, SCF 等も増加しており、パラクリン作用も併せ持つことも確認できました。

3. 今後の展開

本研究は、先天性腸神経障害はペースメーカー細胞の欠陥も含む病態であることを示唆し、また乳歯髄幹細胞に新規治療開発のポテンシャルがあることを示しました。エンドセリン B 受容体 Ednrb 遺伝子変異をもつ JF1 マウスでは、近位部結腸でペースメーカーと内在神経という複数のモーター細胞システムが障害されるので、多系列細胞分化能とパラクリン作用も併せ持つことが細胞治療に有効に働いたと想定しています。将来の研究において、いろいろな病因に基づき発生する腸運動障害や患者個人の病状に適した治療特性をもつ多能性幹細胞の作成、さらに移植技術の改良などが期待されます。安全性の検証やタイプの異なる複数の消化管疾患モデル動物での治療効果の比較が、有用な知見を与えると考えます。

本研究が、協調的腸運動メカニズムについての教科書的説明の修正と、先天性腸神経障害を含む難治性消化管運動障害の根治的治療開発に繋がることを期待しています。

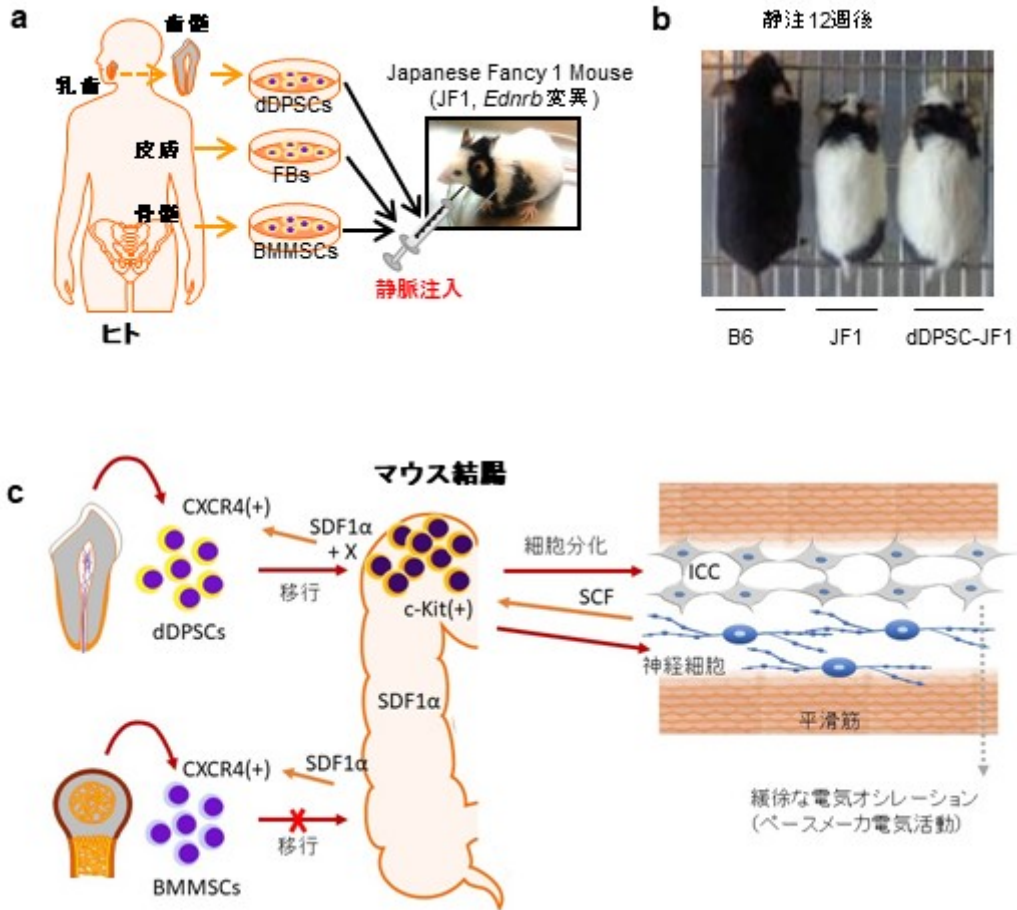


図 1 : 幹細胞治療。a. 細胞移植に使用された乳歯歯髄幹細胞 (dDPSCs)、骨髄間葉系幹細胞 (BMMSCs)と皮膚線維芽細胞 (FBs)。b. 野生型 B6 マウス、JF1 マウス、乳歯幹細胞移植 dDPSC-JF1 マウス (移植 12 週後)の比較。c. 乳歯歯髄幹細胞の JF1 マウスにおける移住、分化と結腸運動性への有益な作用メカニズムを示す模式図。

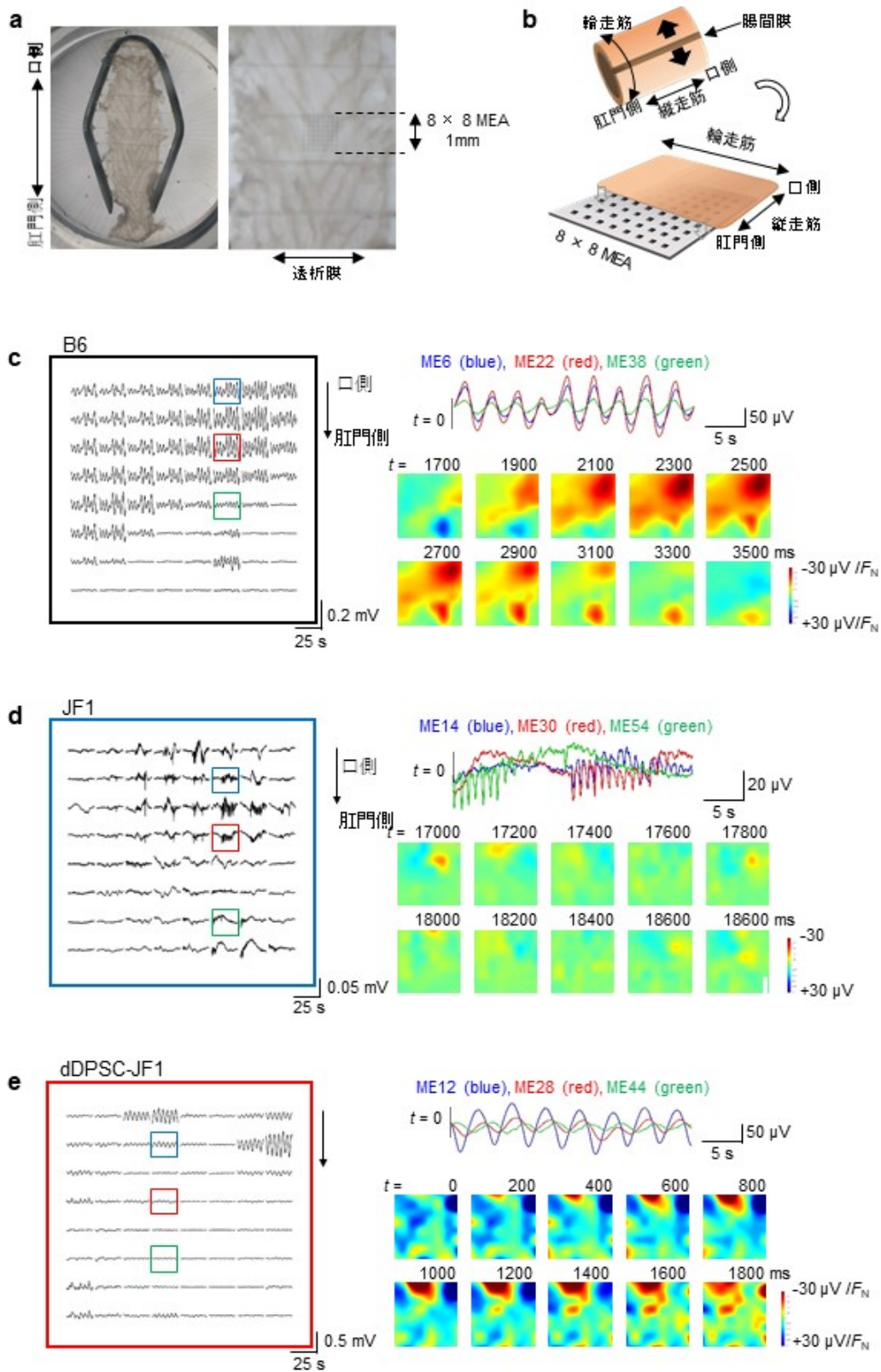


図 2 : 電場電位^{*5}。a. 8×8 微小電極アレイ(MEA)を用いた結腸標本での電位計測例。b. 標本作成法。近位部結腸を腸間膜に沿って切り開き、粘膜を除去した。その腸筋層標本(含筋層間神経叢、ペースメーカーネットワーク)は、縦走筋側を電極アレイに向けて固定された。c-e. 野生型 B6 マウス、JF1 マウス、乳歯幹細胞移植 dDPSC-JF1 マウスの近位部結腸から記録した自発性電位のプロットと、再構成した疑似カラー電位図。

4. 用語説明

※1 HLA (ヒト白血球型抗原) :

HLA 抗原は、クラス I、クラス II などがあり、クラス II は細胞外から来たタンパク質をペプチドとして抗原提示するという役割を担う。古典的なクラス II 抗原として HLA-DR、DQ、DP の 3 種が知られる。HLA 適合度が高いと移植時の生着不全などのリスクが少ない。

※2 SDF1 α /CXCR4 :

ケモカイン Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1 α) は、CXC モチーフ型ケモカイン受容体 4 (CXCR4) のリガンドとして細胞遊走などに働く。

※3 GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor)/NGF (Nerve Growth Factor)/SCF (stem cell factor) :

グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) は GDNF 遺伝子にコードされるタンパク質で多くのタイプの神経細胞の生存を促進する低分子量タンパク質である。

神経栄養因子 (NGF) は神経細胞の増殖維持に特異的に作用する物質で、脳や顎下腺に含まれる。

幹細胞因子 (SCF) は c-kit 受容体のリガンドで、主に多能性幹細胞に作用して分化増殖を促す。

※4 ヒルシュスプルング(1888)およびベイリスとスターリング(1899)による報告 :

デンマークの小児科医ヒルシュスプルング (Harald Hirschsprung) が、腸の壁内神経を部分的に欠損して巨大結腸を来した (ヒト) 乳児 2 例を報告した : Hirschsprung H. Stuhlträchtigkeit neugeborener in folge von dilatation und hypertrophie des colons. Jahrb. Kinderheilkd. Phys. Erzieh. 27, 1-7 (1888).

一方、英国の生理学者ベイリスとスターリングは動物で実験結果から、小腸での局所刺激で惹起される蠕動運動は、内在する局所神経のメカニズムで作られること (所謂、腸の法則「局所刺激による上部 (口側) 興奮と下部 (肛門側) の抑制」) を報告した。: Bayliss WM, Starling EH. The movements and innervation of the small intestine. J Physiol. 24, 99-143 (1899).

※5 電場電位 :

フィールド電位 (field potential)。神経・筋組織などにおいては、とくに局所の細胞外電流が、伝導体となる細胞外スペースを容積伝導 (volume conduction) する総和として形成される。

5. 発表雑誌

掲雑誌名 : Scientific Reports

論文タイトル : Dental pulp stem cells as a therapy for congenital entero-neuropathy

著者 : Koichiro Yoshimaru¹, Takayoshi Yamaza², Shunichi Kajioka³, Soichiro Sonoda², Yusuke Yanagi¹, Toshiharu Matsuura¹, Junko Yoshizumi⁴, Yoshinao Oda⁵, Naoko Iwata⁶, Chiho Takai⁶, Shinsuke Nakayama^{6*}, Tomoaki Taguchi¹

所属名 :

¹Department of Pediatric Surgery, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan.

²Department of Molecular Cell Biology and Oral Anatomy, Kyushu University Graduate School

of Dental Science, Fukuoka, Japan.

³Department of Clinical Pharmacology, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan.

⁴Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Fukuoka Dental College, Fukuoka, Japan.

⁵Department of Anatomic Pathology, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan.

⁶Department of Cell Physiology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.

DOI : 10.1038/s41598-022-10077-3

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Sci_220511en.pdf