

201442040A

厚生労働科学研究委託費  
難治性疾患等克服研究事業  
(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業))

ヒルシュスプルング病及び類縁疾患の幹細胞を用いた  
病因病態解明と新規治療法の開発

(H26-委託(難)-一般-040)

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 田口 智章

平成 27(2015) 年 3 月

厚生労働科学研究委託費  
難治性疾患等克服研究事業  
(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業))

ヒルシュスプルング病及び類縁疾患の幹細胞を用いた  
病因病態解明と新規治療法の開発

(H26-委託(難)-一般-040)

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 田口 智章

平成 27(2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の平成26年度厚生労働科学研究委託事業（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）））による委託業務として、国立大学法人九州大学 総長 久保 千春 代理人 産学官連携本部長 若山 正人が実施した平成26年度「ヒルシュスプルング病及び類縁疾患の幹細胞を用いた病因病態解明と新規治療法の開発」の成果を取りまとめたものです。

# 目 次

## I. 委託業務成果報告(総括)

ヒルシュスプルング病及び類縁疾患の幹細胞を用いた病因病態解明と 新規治療法の開発 .....	1
田口 智章	

## II. 委託業務成果報告(分担)

1. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた疾患解析と新規治療法開発の可能性に 関する研究 .....	13
中畑 龍俊	
2. CHARGE 症候群の患児由来 iPS 細胞の神経堤細胞への誘導 .....	20
奥野 博庸	
3. H 類縁に対する腸管神経再生療法の開発の研究 .....	22
吉丸 耕一朗、山座 孝義、小田 義直、家入 里志、田口 智章	
4. 乳歯幹細胞による肝障害モデルマウスにおける肝再生に関する研究 .....	26
山座 孝義、山座 治義、吉丸 耕一朗、柳 佑典、林田 真、井原 健二、 大賀 正一、野中 和明、中山 功一、田口 智章	
5. 間葉系幹細胞を用いた Wilson 病治療の基礎研究 .....	30
藤吉 順子、山座 孝義、野中 和明、井原 健二、大賀 正一、田口 智章	
6. 乳歯幹細胞ならびに乳歯幹細胞由来肝細胞の安全性に関する研究 .....	32
山座 孝義、山座 治義、野中 和明	
7. 治療適応基準作成 .....	35
金森 豊、工藤 豊一郎	

III. 学会等発表実績 .....	43
--------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	53
-----------------------	----

## V. 資料

1. 班會議 .....	185
a) 第 1 回班會議	
b) 第 2 回班會議	
c) 第 3 回班會議	
2. 研究班名簿 .....	192

## I. 委託業務成果報告(総括)

## ヒルシュスプルング病及び類縁疾患の幹細胞を用いた 病因病態解明と新規治療法の開発 (H26—委託(難)—一般—040)

研究代表者 田口 智章 国立大学法人九州大学医学研究院 教授

### 研究要旨

広範囲型ヒルシュスプルング病(広範H病)及びヒルシュスプルング病類縁疾患(H類縁)は、小児期から恒常的な腸管蠕動不全をきたす難治性疾患である。本研究はこれら疾患の特異的iPS細胞の樹立により病因病態を解明し、脱落乳歯幹細胞(SHED: Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth)を用いた腸管神経再生による蠕動改善および腸管不全関連肝障害(IFALD)に対する肝再生治療の開発を目的とする。

今年度はH病ならびに神経節細胞の異常であるCHARGE疾患群の疾患特異的iPS細胞作成に成功した。また、SHEDをH類縁モデルマウスに投与し、体重増加ならびに腸管の収縮力の増強が認められた。さらにIFALDの治療法でSHEDを肝不全マウスやウィルソン病ラットに投与し有効性が証明された。また臨床例での本治療の適応疾患についても検討した。

### 研究分担者

中畑 龍俊 京都大学 iPS細胞研究所 臨床応用研究部門・再生医学 教授

野中 和明 九州大学歯学研究院・口腔保健推進学講座小児口腔医学分野 教授

中山 功一 佐賀大学・工学系研究科先端融合専攻医工学講座(医工学) 教授

大賀 正一 山口大学大学院医学系研究科・小児科学 教授

井原 健二 大分大学医学部・小児科学講座 教授

小田 義直 九州大学大学院医学研究院・形態機能病理学分野 教授

奥野 博庸 慶應義塾大学医学部総合医科学研究センター/生理学教室 特任助教

山座 孝義 九州大学歯学研究院・分子口腔解剖学分野 講師

山座 治義 九州大学歯学研究院・口腔保健推進学講座小児口腔医学 講師

金森 豊 独立行政法人国立成育医療研究センター・臓器・運動器病態外科部・外科(小児外科学、消化管免疫学) 医長

工藤豊一郎 独立行政法人国立成育医療研究センター・器官病態系内科部・肝臓内科(小児肝臓病学、臨床ウイルス学) 医長

家入 里志 九州大学医学研究院・小児外科学分野 准教授

林田 真 九州大学 大学病院・小児外科 助教

柳 佑典 九州大学医学研究院・小児外科学分野 共同研究員

吉丸耕一朗 九州大学 大学病院・小児外科 医員

#### 研究協力者

岡野 栄之 慶應義塾大学医学部生理学 教授

尾崎 正雄 福岡歯科大学 成長発達歯学講座 成育小児歯科学分野 教授

岡 暁子 福岡歯科大学 成長発達歯学講座 成育小児歯科学分野 講師

田村 忠士 株式会社サイフューズ テクニカルスタッフ

藤吉 順子 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 大学院生

桐野 浩輔 京都大学iPS細胞研究所 臨床応用研究部門疾患再現研究分野 大学院特別研究学生

松浦 俊治 九州大学医学研究院・小児外科 助教

神保 教広 九州大学大学病院・小児外科 医員

久田 正昭 九州大学大学病院・小児外科 医員

小幡 聡 九州大学大学病院・小児外科 医員

RATIH YUNIARTHA 九州大学医学研究院・小児外科 大学院生

#### A. 研究目的

広範H病及びH類縁は腸管神経系の異常により恒常的に腸管蠕動不全となる難治性疾患であり、希少性から解明は進んでいない。当教室の全国調査では広範H病の生存率は65%、平成23-25年度厚労省難治性疾患等克服研究事業(田口班)の調査結果ではH類縁の代表・Hypoganglionosisの生存率は65%と不良であり、生存例も静脈栄養の離脱が困難である。腸管不全とIFALDは、肝臓小腸を含めた多臓器移植が唯一の根治手段だが、小腸移植の成績不良及びドナー不足から本邦での実施は困難である。また安倍首相はこの疾患を筆頭に難病対策が天命であると施政方針演説をされ、行政的にもこの疾患の新規治療の開発は急務である。

我々は厚労省の研究班でH類縁の実態を把握し診断基準や重症度分類、ガイドライン作成を行っているため、全国調査に基づいた適応基準を作成できる。また多くのH病及びH類縁疾患児や小児の肝臓小腸移植の治療経験を有している。

我々はさらにH病疾患特異的iPS細胞を樹立し、神経堤細胞への分化誘導に成功した。神経再生の研究に精通した岡野らと共に、H26年度に疾患特異的iPS細胞を用いたH病とH類縁の病因病態を解明することは独創的である。

本研究の目的は、広範H病及びH類縁の疾患特異的iPS細胞の樹立とそれを用いた病因病態解明を行い、乳歯幹細胞を用いた腸管神経再生療法による蠕動改善及びIFALDに対する肝再生治療法の開発である。

#### B. 研究方法

##### ①疾患特異的iPS細胞を用いた疾患解析と新規治療法開発の可能性

hiPSCsから分化させた腸管神経前駆細胞を使った機能評価を行い、Hirschsprung病モデルを作成する。さらに、H病患者より採取・作成したiPS細胞から神経堤細胞へ分化させ、疾患責任細胞を



解明し、疾患モデルを樹立する。

## ②CHARGE症候群の疾患特異的iPS細胞に関する研究

H類縁類似モデルマウスにSHEDを移植し治療効果を病理組織学的、分子生物学的、生化学的、臨床的手法で解析する。その際SHEDの腸管神経細胞への分化誘導系の確立の後、細胞形態（SHEDもしくは分化させた神経細胞）や投与方法（静脈投与、腹腔内投与）による移植成績の差を検討する。

ヒルシュスプルング病及び類縁疾患と同じく神経堤細胞の発生異常が関与するCHARGE症候群の患児より樹立した疾患特異的iPS細胞より神経堤細胞を誘導し、in vitro モデルを作成する。これを応用して、同じく神経堤細胞の異常が関与するヒルシュスプルング病及び類縁疾患のin vitroモデルの作成へ応用する。

## ③H類縁に対する腸管神経再生療法の開発

ヒト脱落乳歯歯髄幹細胞（SHED）をマウスに移植した移植群と非移植群に対し、臨床的評価（体重推移、糞便個数の推移）、電気生理学的腸管蠕動機能評価、病理組織学的評価の各評価を行った。

## ④乳歯幹細胞による肝障害も出るマウスにおける肝再生に関する研究

肝障害の治療に対する乳歯幹細胞治療法の有効性を試験するために、薬剤誘導性慢性肝障害モデルマウスに、乳歯幹細胞を投与し、その治療効果を解析することを目的とした。

## ⑤ウィルソン病ラットの肝障害に対するヒト乳歯幹細胞の効果

ウィルソン病(WD)に対する間葉系幹細胞による細胞治療の開発を目指し、モデルラットを用いた基礎研究を行った。

## ⑥乳歯幹細胞ならびに乳歯幹細胞由来肝細胞の安全性に関する研究

ヒルシュスプルング病およびその類縁疾患における肝障害に対し、乳歯幹細胞治療法を確立するために、そのドナー細胞の安全性を確保する必要がある。本研究では、乳歯幹細胞の分化誘導細胞である乳歯幹細胞由来肝細胞の造腫瘍性について解析した。

### （倫理面への配慮）

iPS細胞作成、脱落乳歯の採取においては、当該研究機関の倫理委員会の承認を得ている。

ヒト脱落乳歯の採取に関しては九州大学倫理委員会に承認された形式に基づき、研究対象者が未成年であるため代諾者の同意を得ている。

動物実験については、九州大学動物実験委員会での承認形式に基づき、動物愛護を充分考慮し、施行された。

### C. 研究結果

- ①ヒト多能性幹細胞(human pluripotent stem cells; hPSCs)を腸管神経およびその前駆細胞に分化誘導する分化系を構築した。Hirschsprung疾患特異的的人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells; iPSCs)をを樹立した。
- ②CHARGE症候群患者iPS細胞由来神経堤細胞において、層間剥離、遊走極性、遊走能のいずれも低下を認めた。
- ③SHED移植群において非移植群に比較し、体重増加・糞便量増加を有意に認め、電気生理学的評価にて、ACh刺激に対する収縮の有意な改善を認めた。
- ④乳歯幹細胞投与群では、血清学的解析ならびに病理組織学的解析により、著しい肝機能の改善が認められた。移植細胞のレシピエント肝組織への生着ならびにヒト肝細胞への分化も確認された。
- ⑤無治療群と比較し、細胞投与群では有意に高い生存率を示した。生化学的解析により肝機能の有意な改善効果を確認した。病理学的解析では、細胞投与群に炎症細胞浸潤と銅沈着が少なかった。肝組織の炎症性サイトカインと酸化ストレスのmRNA発現も低かった。
- ⑥移植後8週まで移植部位を観察した所、非移植部位と比較して異常増殖は認められなかった。また、飼育期間中のマウスの体重減少等の全身的異常も認められなかった。また四塩化炭素誘導性肝障害モデルでも、レシピエント肝組織に腫瘍増殖を思わせる所見は認められなかった。

### D. 考察

- ①Hirschsprung病の病態解明を目指した研究を行うにあたり、まず我々は疾患特異的iPSCsを樹立した。樹立されたiPSCsの質的評価を行い、iPSCsとして既報に矛盾しないことを証明した。また、hPSCsを比較的短期間でかつ高効率に神経堤細胞に分化誘導することに成功した。
- ②CHARGE症候群と同じ神経堤症であるヒルシュスプルング病及び類縁疾患の病態を解明するために、我々が用いたiPS細胞由来神経堤細胞は有用なin vitroモデルの材料となると考えられる。
- ③SHEDが腸管筋間神経叢に生着し、腸管神経細胞に分化もしくは、神経細胞の増殖を促し、神経細胞の量的もしくは質的改善、ないし、腸管神経系細胞への分化をしえ、その結果、腸管蠕動が改善し、体重増加をなしえたと考察される。
- ④血清肝機能検査から、乳歯幹細胞移植群では、四塩化炭素による肝障害におけるAST,ALT異常上昇ならびに線維沈着の増加が著しく軽減化されたこと、さらに線維化を増悪化させる活性化肝星細胞を抑制していたことから、障害肝に対する乳歯幹細胞移植治療の有効性が示された。

⑤SHEDの効果は移入した間葉系幹細胞の肝細胞分化あるいは分化促進効果というより、この間葉系幹細胞に由来する抗炎症作用あるいは抗酸化作用を有する何らかの液性因子により発揮されている可能性が考えられた。

⑥レシピエント生体内におけるドナー細胞（乳歯幹細胞および乳歯幹細胞由来肝細胞）ならびにレシピエント細胞の腫瘍化は認められなかった。今後は、分子生物学的指標を用いた培養乳歯幹細胞ならびに乳歯幹細胞由来肝細胞様細胞の造腫瘍能力について検討する必要がある。

## E. 結論

①hPSCsを用いることにより、これまで困難であったヒト神経堤細胞の機能異常を解析することが可能となった。本研究はこれらの疾患原因を解明する糸口になると考えた。

②CHARGE症候群の疾患特異的iPS細胞を用いて、神経堤症のin vitroモデルを作成した。

③H類縁モデルマウスにおけるSHEDの有効性が示唆された。

④ヒルシュスプルング病およびその類縁疾患の長期生存者に対する肝障害の治療ならびに予防に乳歯幹細胞治療の可能性が考えられた。

⑤WDモデルラットの肝不全に対する間葉系幹細胞を用いた細胞療法の有効性の一部には間葉系幹細胞が産生する液性因子が関与している可能性が考えられた。

⑥乳歯幹細胞ならびに乳歯幹細胞由来肝細胞が腫瘍化するリスクが少ない事が判明し、ドナー細胞としての安全性の一部が示された。

【謝辞】 本研究は科研費(H26-委託(難)一般-040)の助成を受けたものである。

## F. 健康危険情報

該当する情報はなし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) 国内

永田公二, 手柴理沙, 木下義晶, 田口智章. 特集 小児NST病態栄養シリーズ: 中心静脈栄養法の諸問題. 長期中心静脈カテーテル管理中の微量元素欠乏症 (銅, 亜鉛, セレンなど) 小

児外科. 45(4)442-446, 2013

田口智章, 林田真, 松浦俊治, 副島雄二. 特集 プロが見せる手術シリーズ(3): 難易度の高い肝・胆・膵・脾・横隔膜手術. 肝移植後の門脈閉塞に対するRex shunt手術. 小児外科. 45(11)1253-1258, 2013

田口智章, 前田貢作, 仁尾正記. 総論 小児外科から成人内科への移行 (トランジション) 101(12), 2013

位田忍. 小児科から内科へのシームレスな診療をめざして小腸不全. 診断と治療101:1873-187, 2013

位田忍. 乳幼児および小児期の疾患と栄養管理. 消化器の病気. 臨床栄養学概論 病態生理と臨床栄養管理を理解するために. 化学同人, 京都. 189-196, 2013

永井良三, 太田健, 位田忍, 他. イレウス. 疾患・症状別今日の治療と看護. 南江堂, 東京, 1267-1269, 2013

仁尾正記, 佐々木英之, 田中拡, 岡村敦. 小児から成人に至る外科 こどもからおとなへ胆道閉鎖症術後の成人期の問題日本外科学会雑誌. 114(4)201-205

藤野明浩, 山田耕嗣, 石濱秀雄, 高橋正貴, 山田和歌, 大野通暢, 佐藤かおり, 渡邊稔彦, 田中秀明, 瀧本康史, 金森豊, 黒田達夫. リンパ管腫術後のリンパ漏を持続する皮膚隆起病変 (限局性リンパ管腫) に対するエタノール局注療法. 日本小児外科学会雑誌. 49(1): 156, 2013

高橋正貴, 松岡健太郎, 大喜多肇, 中澤温子, 藤野明浩. リンパ管関連疾患の臨床病理学的検討. 日本病理学会会誌. 102(1): 476, 2013

藤野明浩. 頭頸部炎症疾患の画像診断と治療5「頸部瘻・嚢胞性疾患の炎症」. 小児科. 54, 1221-1228, 2013

斎藤潤, 中畑龍俊. 疾患特異的iPS細胞. 再生医療. 12(1):19-29, 2013

中畑龍俊. 総論 疾患iPS細胞の樹立と臨床病態解析への応用. Medical Science Digest(MSD) 39 (11) : 4(504)-6(506), 2013

## 2) 海外

Taguchi T, Ieiri S, Miyoshi K, Kohashi K, Matsufuji H, Watanabe Y, Kobayashi H, Yagi M, Ueno S, Kawahara H, Hamada Y, Masumoto K, Fukazawa M, Kuroda T, Kubota A, Iwanaka T, Nio M, Tajiri T, Tomomasa T, Ushijima K, Ida S, Nakazawa A, Matsui A. The incidence and criteria of allied disorders of Hirschsprung's disease in Japan -Results from the preliminary nationwide survey-. J Pediatr Gastroenterol Nutr, on submission, 2013

Nagata K, Esumi G, Teshiba R, Kinoshita Y, Taguchi T. Current profile and outcome of 100 esophageal atresia patients in the Kyushu area of Japan. Open Journal of Pediatrics. 3 (3) :239-242, 2013

Watanabe Y, Kanamori Y, Uchida K, Taguchi T Isolated hypoganglionosis: results of a nationwide survey in Japan Pediatr Surg Int. 29(11):1127-30, 2013

Muto M, Kaji T, Mukai M, Nakame K, Yoshioka T, Tanimoto A, Matsufuji H. Ghrelin and glucagon-like peptide-2 increase immediately following massive small bowel resection. Peptides. 43:160-166, 2013

Ohkubo H, Kessoku T, Fuyuki A, Iida H, Inamori M, Fujii T, Kawamura H, Hata Y, Manabe N, Chiba T, Kwee TC, Haruma K, Matsushashi N, Nakajima A, Takahara T. Assessment of Small Bowel Motility in Patients with Chronic Intestinal Pseudo-Obstruction Using Cine-MRI. Am J Gastroenterol. 108(7):1130-1139, 2013

Ohkubo H, Masaki T, Matsushashi N, et al Histopathologic findings in patients with idiopathic megacolon: a comparison between dilated and non-dilated loops. Neurogastroenterol Motil. 2014 (in press)

Nio M, Sasaki H, Takana H, Okamura A. Redo surgery for biliary atresia. Pediatr Surg Int. 29(10):989-93, 2013

Hussein MH, Hashimoto T, Suzuki T, Daoud GA, Goto T, Nakajima Y, Kato T, Hibi M, Tomishige H, Hara F, Kato S, Kakita H, Kamei M, Ito T, Kato I, Sugioka A, Togari H. Children undergoing liver transplantation for treatment of inherited metabolic diseases are prone to higher oxidative stress, complement activity and transforming growth factor- $\beta$  1. Ann Transplant. 18:63-68, 2013

Kuroda T, Hoshino K, Nosaka S, Shiota Y, Nakazawa A, Takioto T: Critical hepatic hemangiomas in infants: from the results of a recent nationwide survey in Japan Pediatr Int 2014 (in press)

Ozeki M, Kanda K, Kawamoto N, Ohnishi H, Fujino A, Hirayama M, Kato Z, Azuma E, Fukao T, Kondo N: Propranolol as an alternative treatment option for pediatric lymphatic malformation. *Tohoku J Exp Med* 229, 61–66, 2013

Morishima T, Watanabe KI, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T. Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica*. 99(1):19–27, 2014

Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK: Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell-free conditions. *PLoS ONE*. 8(4): e59243, 2013

Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein W.K, Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H.: Modeling Alzheimer's disease using iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A $\beta$  and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell*. 12(4):487–496, 2013.

Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo T, Okita K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Yamada Y, Morizane A, Takahashi J, Ayaki T, Ito H, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Watanabe D, Hioki H, Kaneko T, Makioka K, Okamoto K, Takuma H, Tamaoka A, Hasegawa K, Nonaka T, Hasegawa M, Kawata A, Yoshida M, Nakahata T, Takahashi R, Marchetto M.C, Gage F.H, Yamanaka S, Inoue H. Response to Comment on "Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells". *Sci Transl Med*. 5(188):188lr2, 2013

## 2. 学会発表

### 1) 国内

田口智章. 創始と継志—Memorial Lectures— (11) 「小児—小児外科—」 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. 平成25年4月11～13日, 福岡

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, 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11～13日,

福岡

林田真, 江角元史郎, 柳佑典, 田口智章. 肝移植導入による胆道閉鎖症の予後に関する検討. 第113回日本外科学会定期学術集会. 平成25年4月11~13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50回日本小児外科学会学術集会. 平成25年5月30日, 東京

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. 我が国における多施設共同研究「ヒルシュスプルング病類縁疾患の多施設共同研究」. 第50回日本小児外科学会学術集会. 平成25年6月1日, 東京

Budianto IR, Kinsohita Y, Obata S, Yanagi Y, Miyata J, Nagata K, Ieiri S, Taguchi T. Acetylcholinesterase Staining Examination for the diagnosis of Constipation Children. 第12回九州・沖縄小児救急医学研究会. 平成25年8月17日, 熊本

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5~7日, 京都

渡邊芳夫, 金森豊, 内田恵一, 田口智章. Hypoganglionosis における初期治療の重要性. 第50回日本小児外科学会学術集会. 平成25年5月30日~6月1日, 東京

渡邊芳夫, 住田互, 高須英見. Hypoganglionosis 診断と治療. 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

大久保秀則, 中島淳, 冬木晶子, 秦康夫, 菅原和彦. 症状に周期性変化を認めた代償期偽性腸閉塞症の1例. 日本消化器病学会関東支部例会. 平成25年9月14日, 埼玉

大久保秀則, 中島淳, 河原弥生, 西田茂. 突然発症し結腸垂全摘にて改善した結腸限局型偽性腸閉塞の1例. 第326回日本消化器病学会関東支部例会. 平成25年9月14日, 埼玉

中島淳. 慢性偽性腸閉塞症患者の腸管全層生検の病理学的解析: 拡張部と非拡張部の比較. 第15回日本神経消化器病学会 慢性偽性腸閉塞ミニシンポ. 平成25年11月8日, 島根

中島淳. シネMRIは慢性偽性腸閉塞症の小腸蠕動を明確に描出する: 症例対照研究. 第15回

日本神経消化器病学会 慢性偽性腸閉塞ミニシンポ。平成25年11月8日，島根

河村晴信，大久保秀則，中島淳。シネMRIで診断しルビプロストーンが奏功した巨大結腸症の1例。第327回 日本消化器病学会関東支部例会。平成25年12月7日，茨城

小島伸一郎，浅桐公男，深堀優，石井信二，七種伸行，古賀義法，吉田索，小松崎尚子，田中芳明，八木実。バルーン付サークル型8chインフュージョンカテーテルと動態モニタソフトを用いたCurrarino症候群症例の消化管機能評価。第43回日本小児消化管機能研究会。平成25年2月9日，久留米

浅桐公男，小松崎尚子，吉田索，古賀義法，七種伸行。Hirschsprung病類縁疾患の診断基準と治療戦略 長期予後の目指したMMIHSに対する治療戦略 第113回日本外科学会学術集会。平成25年4月11-13日，福岡

和田友香，藤野明浩，兼重昌夫，花井彩江，高橋重裕，藤永英志，塚本桂子，瀧本康史，金森豊，中村知夫，伊藤裕司。当院における乳糜胸水に対する治療。第49回日本周産期・新生児医学会学術集会。平成25年7月14日-16日，横浜

藤野明浩，大庭真梨，森川康英，上野滋，岩中督。小児外科医によるリンパ管腫の重症・難治性の臨床診断基準。第10回血管腫・血管奇形研究会。平成25年7月19日-12日，盛岡

藤野明浩，山田耕嗣，石濱秀雄，高橋信博，藤村匠，富田紘史，星野 健，黒田達夫，瀧本康史，金森豊。リンパ漏を呈する限局性リンパ管腫に対する無水エタノール局注療法。第24回日本小児外科QOL研究会。平成25年10月5日，福岡

畑中政博。免疫組織化学染色を用いたヒルシュスプルング病類縁疾患に対する病理学的評価。第50回日本小児外科学会学術集会，平成25年6月1日，東京

畑中政博，中野夏子，加賀千都子。免疫組織化学染色を用いた腸管神経叢発育の評価。第102回日本病理学会総会。平成25年6月7日，北海道

中畑龍俊。特別講演，iPS細胞研究が切り開く未来の医療。日本学術会議公開学術講演会「未来社を築く生命科学と医療のフロンティア」平成25年8月3日，京都

中畑龍俊。特別講演，iPS細胞の小児医療への応用。第38回東日本小児科学会。平成25年11月23日，埼玉



中畑龍俊. 教育講演, iPS細胞の臨床応用. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会. 平成25年11月29日-12月1日, 福岡

## 2) 海外

Taguchi T, Hayashida M, Matsuura T, Yanagi Y, Yoshimaru K. 招待講演 : A Single-Center Experience of Biliary Atresia in Transplantation Era. 第53回台湾小児外科学会学術講演会. Sep 28, 2013, Taiwan, China

Watanabe Y, Kanamori Y, Uchida K, Taguchi T. Hepatology and Nutrition Symposium Symposium Congenital Isolated Hypoganglionosis: Results of a Nationwide Survey in Japan. 13th APPSPGHAN&40th JSPGHAN. Oct 31, 2013, Tokyo

Matsufuji H, Taguchi T, Tomomasa T, Mushikae S, Ida S, Nakajima J. Clinical aspect of Chronic Intestinal Pseudo-obstruction in children / the nationwide survey in Japan, Japanese CIIP study Group, 13th APPSPGHAN&40th JSPGHAN. Oct 31, 2013, Tokyo

Ohkubo H. Histopathologic features of surgical specimens in patients with chronic intestinal pseudo-obstruction: Analysis in Japanese population. DDW 2013 Poster Session, May 21, 2013, Orland, USA.

Ohkubo H. Histopathologic features of surgical specimens in patients with chronic intestinal pseudo-obstruction in Japanese population. UEGW 2013 Poster Session, Oct 16, 2013, Berlin, German.

Okada T, Honda S, Miyagi H, Minato M, Cho K, Taketomi A,. Outcomes are Different between Prenatal and Postnatal Diagnosed Cystic Biliary Atresia Infants. 13th APPSPGHAN&40th JSPGHAN. Nov 1, 2013, Tokyo.

Sasaki H, Tanaka H, Wada M, Sato T, Nishi K, Nakamura M, Okamura A, Sekiguchi S, Kawagishi N, Nio M. Analysis of 59 biliary atresia patients who required liver transplantation following with Kasai operation in a single institution 45th Annual Meeting of The Pacific Association of Pediatric Surgeons, 2013, April,

Fujino A, Ozeki M, Kanamori Y, Tanka H, Watanabe T, Takeda N, Yamada W, Takahashi M, Yamada K, Ishihama H: Propranolol for intractable lymphatic malformation (lymphangioma): a report of 4 cases. ISSVA 2012 (International Society of Studying Vascular Anomaly, 国際血管奇形研究学会) . Jun 16-19, Malmo, Sweden

Fujino A, Ooba M, Morikawa Y, Ueno S, Iwanaka T. The clinical criteria for “intractable” lymphangioma led by decisions of Japanese pediatric surgeons. 4th World Congress of Pediatric Surgery. Oct 13–16,2013, Berlin, Germany.

Takahashi M, Fujino A, Suzuhigashi M, Tanaka H, Watanabe T, Satou K, Ohno M, Yamada W, Yamada K, Fuchimoto Y, Kanamori Y, Umezawa A. Direct effects of each drugs (especially OK-432) for human lymphangioma derived lymphatic Endothelial Cell. PAPS 2013. Apr.7–11, 2013, Sydney, Australia

Fujino A, Ooba M, Morikawa Y, Ueno S, Iwanaka T. The clinical criteria for “intractable” lymphangioma led by decisions of Japanese pediatric surgeons. EUPSA 2013. Jun 5–8, 2013, Leipzig, Germany

Nakazawa A. Pathological Evaluation of Hypoganglionosis using Immunohistochemistry. PAPS2013. Apr 10, 2013, Hunter Valley, Australia.

Suzuki N, Hira A, Niwa A, Matsuo K, Takata M, Yabe M, Nakahata T, Saito M.: Mesodermal development from reprogrammed Fanconi anemia cells is affected by ALDH2 enzymatic activity. 11th Annual Meeting of international Society for Stem Cell Research (ISSCR). Jul 12–15, 2013, Boston, MA, USA.

Yoshida M, Kitaoka S, Yamane M, Tsukita K, Inoue H, Saito M, Nakahata T.: Spinal moter neurons generated from induced pluripotent stem cells derived from spinal muscular atrophy patients failed to cluster acetylcholine receptors at the neuromuscular junctions. 11th Annual Meeting of international Society for Stem Cell Research (ISSCR). Jul 12–15, 2013, Boston, MA, USA.

#### H. 知的財産の出願・登録状況

なし

## Ⅱ. 委託業務成果報告(分担)

## 疾患特異的iPS細胞を用いた疾患解析と新規治療法開発の可能性 に関する研究

担当責任者 中畑 龍俊 京都大学iPS細胞研究所 副所長・特定拠点教授

### 【研究要旨】

Hirschsprung病は先天性消化蠕動不全を来す疾患であり、発生段階に生じる腸管神経堤細胞の機能異常が原因と考えられているが、不明な点が多い。本研究はヒト多能性幹細胞を用いて腸管神経発生を*in vitro*で再現し、Hirschsprung病の原因解明を目的としたものである。

今回我々は、ヒト多能性幹細胞(human pluripotent stem cells; hPSCs)を腸管神経およびその前駆細胞に分化誘導する分化系を構築した。また、我々が樹立したHirschsprung疾患特異的人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells; iPSCs)を用いることで、H病疾患モデルを提唱して原因解明につなげたい。

本研究によりHirschsprung病の病態像が明らかになり、新規治療法の開発につながれば、患者や家族に福音をもたらすのみならず、医学研究領域に本邦発の大きなインパクトを与えることが期待される。

### 研究協力者

桐野 浩輔

(京都大学iPS細胞研究所 臨床応用研究部門  
疾患再現研究分野 大学院特別研究学生)

### A. 研究目的

Hirschsprung病(以下H病)は、小児期より腸管蠕動不全をきたす疾患である。胎生期における腸管神経系の発生異常によって生じ、腸管神経系細胞の前駆細胞である神経堤細胞の機能異常が主な疾患原因と考えられている。モデルマウスにおける表現型がヒトでの表現型と異なること、胎生期にのみ存在するヒト神経堤細胞を実験材料として手に入れることが困難であることなどから、ヒトにおける疾患解析は進んでいない。

分化万能性を持つ幹細胞であるヒト人工多

能性幹細胞(human induced pluripotent stem cells; hiPSCs)は様々な細胞に分化するため、ヒトの発生を*in vitro*で再現することができる。また、患者由来の細胞から樹立した疾患特異的iPSCsを用いることで、疾患と相同の発生異常を再現することが期待される。

iPSCsを用いることで、Hirschsprung病に起因する腸管神経前駆細胞の機能異常、つまり遊走能・増殖能・分化能などを*in vitro*で再現する。

本研究は、京都大学iPS細胞研究所・臨床応用研究部門を中心として、Hirschsprung病疾患特異的iPSCsを用いてHirschsprung病の疾患モデルを作成することを目的とする(図1)。