

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19367

研究課題名(和文) 腸管自然リンパ球における腸管特異性規定遺伝子の役割

研究課題名(英文) The role of Nr4a3 on intestinal homeostasis

研究代表者

佐伯 恵太(Keita, Saeki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：80528729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：当研究ではNr4a3分子に着目しその腸管恒常性制御につき検討した。ヒトNr4a3遺伝子はヒルシュスプルング病の病因未同定領域である9q31領域に存在し、Nr4a3欠損マウスはヒルシュスプルング病類似疾患様の病態をとり、腸管神経叢が低形成になることが判明した。さらに、Nr4a3欠損マウスは急性腸炎抵抗性であり、一部のセロトニン受容体作動薬によりその差が解消され、消化管神経叢と急性腸炎の新たな制御メカニズムを見出すことに成功した。当研究は過去に報告を見ない消化管神経節形成を介した急性炎症制御メカニズムに迫り、新たな診断ならびに治療応用への突破口になるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：We focused on Nr4a3 orphan receptor and how it regulates intestinal homeostasis. Human Nr4a3 gene is located on chromosome 9q31.1 region where the unidentified causative gene of Hirschsprung disease is. In absence of Nr4a3 in mice, the colon has hypoplastic ganglia in its myenteron and wriggles more slowly than wild type. Furthermore, Nr4a3-deficient mice are resistant to dextran sodium sulfate induced acute colitis. This resistance is partially cancelled by giving 5-HT1A agonist and calcitonin gene related peptide seems to be a key regulator for this. Our findings demonstrate novel mechanism of neuro-gut axis in gut motility and inflammation and make a breakthrough in the diagnosis of HSCR subtypes and therapy for novel intestinal inflammatory diseases.

研究分野：医歯 薬学 内科系臨床医学 消化器内科学 8202

キーワード：カルシトニン関連ペプチド セロトニン 大腸炎 ヒルシュスプルング病 核内オーファン受容体 腸管神経叢

1. 研究開始当初の背景

腸管神経系 (ENS) は、自律性胃腸運動を調節する高度なニューロンネットワークからなる。中枢神経系と連動して、ENS は機能的胃腸障害ならびに消化管炎症性疾患の病因に関与している。先天性消化管拡張と蠕動低下、腸管神経節形成不全を特徴とする Hirschsprung 病 (HSCR) に関する知見から腸管神経細胞は胚の神経堤細胞に由来し、マウスでは神経堤細胞は発生 8.5 日から 14.5 日胚で腸に定着する。移動した細胞は消化器官発達と共に増殖し、成熟した神経節に分化する。受容体チロシンキナーゼ (RET) およびグリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) は、この発生カスケードに寄与する主要な分子である。神経堤細胞が消化管に移動すると、RET および GDNF 受容体 GFR 1 が神経堤細胞で発現され、RET は GFR 1 受容体を介して GDNF によって活性化される。このシグナルは、神経細胞の増殖と分化を調節し、腸管神経節の成熟を誘導する。

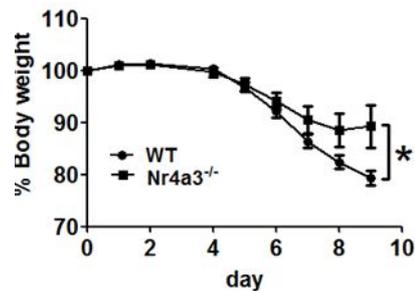
HSCR 疾患において RET およびそれに関連する遺伝子の病態生理学的意義は明らかにされて来たが、対照的に他の HSCR 関連遺伝子の機能はほとんど不明である。興味深いことに、RET 変異浸透度の弱い HSCR 患者は表現型が変動的で、遺伝子座 9q31 に変異を有するケースが多いことが知られている。

核内オーファン受容体 4a3 (Nr4a3) 遺伝子は、ヒトの 9q31 座に位置し、Nr4a1 遺伝子や Nr4a2 遺伝子に相同性が高い核オーファン受容体である。他の核オーファン受容体と同様に、Nr4a3 受容体はニューロン発達だけでなく、グルコース代謝、細胞生存、および免疫系など多くの病態生理学的応答にも関与している。我々は Nr4a ファミリー遺伝子群が制御性 T 細胞の発達や維持に必要であることを報告して来た (Sekiya et al. *Nature Immunol.* 2013, *J. Exp Med*, 2015)). しかし消化管に

おける Nr4a3 の役割はまだ完全には決定されていない。

2. 研究の目的

我々は Nr4a3 遺伝子欠損マウスにおいてデキストラン硫酸 (DSS) 誘導性の腸炎が軽減することを見出した (図 1)。これは当初予想した免疫系の異常によるものではなく、消化管神経叢異常がもたらす neuro-gut axis の異常であると考えられた。そこで本研究では、Nr4a3 遺伝子が筋間神経叢の発達に及ぼす影響を検討し、急性腸炎との因果関係を検討した。



(図 1) DSS 腸炎発症時の体重変化、炎症重症度に相関して体重が減少する

3. 研究の方法

DSS 腸炎: Nr4a3 欠損マウスおよびそれらの同腹仔対照に、2% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS、分子量: 36,000~50,000) を 6 日間経口投与し、その後水を 3 日間自由に与えた。誘導中に 6 時間ごとに CGRP 阻害ペプチド (CGRP8-37) (40 μg/ kg) を皮下投与した。誘導の 9 日後にマウスを安楽死させ、結腸および脾臓を摘出し解析を行った。

組織学的解析: パラフィン包埋組織を 4 μm の厚さにスライスし、通常の免疫蛍光染色を行った。ホールマウントイメージングは結腸筋層を顕微鏡下で剥がし、4% PFA 中で 15 分間固定し、組織を 0.1% TritonX-PBS で 2 時間透過処理した後に一次抗体と共に一晩インキュベートした。

腸通過時間測定: FITC-デキストラン (MW: 70000) を経口投与し、90 分後に胃、小腸 (10 分割)、盲腸、大腸 (3 分割) を合計 15 分割し

管腔内内容物の FITC 蛍光強度によって通過時間を推定した。

4. 研究成果

(1) Nr4a3 陽性細胞の遺伝子解析：Nr4a3 遺伝子の機能を調べるために、まず Nr4a3 を含むマイクロアレイデータをメタ解析した。

NCBI データベースに寄託されている

GSE55078、GSE10787、および GSE31042 の 3 つのデータセットを ExAtlas ソフトウェアによって分析した。これらのデータセットは、それぞれ独立した非ニューロン組織である

ラット 細胞、マウス制御性 T 細胞、および造血幹様 LSK 細胞に由来する。細胞の由来が異なるにも関わらずニューロンに関連する

多くの遺伝子オントロジーが各データセット内で Nr4a 遺伝子の発現と正と負の相関を示した。これらのデータは、Nr4a3 が類似の

ニューロン遺伝子の発現を調節するが、その遺伝子発現パターンは細胞特異性があることが示唆された。

次に結腸組織における Nr4a3 遺伝子の発現を確認するために Nr4a3-GFP レポーターマウスを用いて特異的汎ニューロンマーカー

3-チューブリンの免疫組織化学を行った。GFP(Nr4a3)は、大部分の筋間神経叢ニューロンおよび粘膜下神経叢ニューロンの一部に

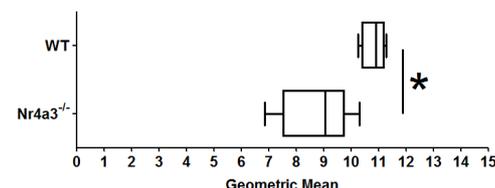
局在した。さらに細分化したところ Nr4a3 はコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 陽性ニューロンの一部およびニューロン特異的 NO 合成酵素 (nNOS) 陽性ニューロンの

大部分で発現するが、サブスタンス P 陽性ニューロンおよび CalbindinD28K / CGRP 陽性ニューロンでは発現しないことがわかった。

(2) Nr4a3 は腸管神経叢成熟を制御する：これらのニューロンにおける Nr4a3 受容体の生理的意義を評価するために、次に Nr4a3 欠損マウスを分析した。Nr4a3 欠損結腸は弛緩しており野生型マウスの結腸より有意に長いことがわかった。消化管の蠕動運動を調べるために FITC 結合難消化性デキストランの輸

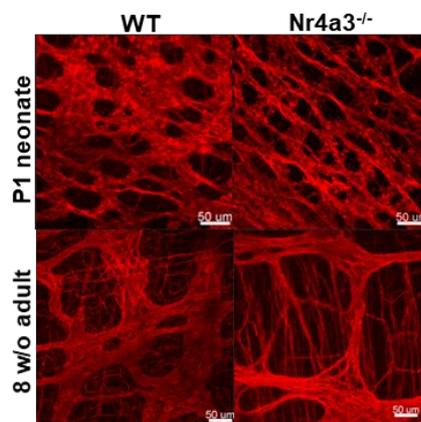
送速度を測定した。FITC-デキストラン輸送は、対照マウスと比較して Nr4a3 欠損マウスで有意に遅延した(図 2)。

送速度を測定した。FITC-デキストラン輸送は、対照マウスと比較して Nr4a3 欠損マウスで有意に遅延した(図 2)。



(図 2)各マウス腸管における平均 FITC 到達距離

次に Nr4a3 欠損マウスにおける消化管神経叢の構造を調べるために、3-チューブリン抗体を用いて近位結腸組織のホールマウント免疫組織化学を行った。その結果 Nr4a3 欠損マウスでは WT に比べて筋間神経節内の推定平均ニューロン数が減少し、小さな神経節が増えていることがわかった(図 3)。



(図 3)各マウス腸管筋層のホールマウント染色

新生腸組織を Bcl-2 抗体で染色したところ、Nr4a3 欠損結腸は、WT 結腸と比較してより多くの Bcl-2 陽性神経節細胞を含むことがわ

かった。筋間神経節における nNOS 陽性およびカルピンジン陽性ニューロンの比は、WT および Nr4a3 欠損マウスで同等であったことから、Nr4a3 は神経節の分化ではなく、神経節の増殖を調節することを示唆している。

これらのことから Nr4a3 欠損マウスは、ヒト HSCR 様の未成熟神経節の新規動物モデルと考えられる。

(3) 腸炎抵抗性は非免疫細胞に起因する：
Nr4a3 欠損マウスは DSS 誘発大腸炎に対して耐性を示した。免疫細胞の DSS 誘発大腸炎への影響を分析するために、次に骨髓細胞移植実験を行った。DSS 大腸炎の重篤度は、WT 骨髓と Nr4a3 欠損骨髓を移植しても同程度であった。一方 WT 骨髓を移植した Nr4a3 欠損マウスは耐性であった。よって DSS 腸炎の重症度の差は免疫細胞にほとんど依存せず、腸内ニューロンに多く依存することを示唆した。また Nr4a3 欠損マウスの T 細胞やマクロファージの機能には大きな差は認められなかった。

(4) DSS 腸炎感受性におけるセロトニンシグナルの関与：セロトニンはセロトニン症候群で知られるように腸の蠕動運動を亢進し、そのシグナルは過敏性腸症候群の病態に関連することが知られている。すなわち消化管神経叢の多くのニューロンがセロトニン作動性神経であり、Nr4a3 欠損消化管神経叢でも受容体発現が保たれていた。そこで DSS 腸炎の重篤度に対する筋間神経叢の調節効果をさらに調べるために、いくつかのセロトニン作動薬の影響を調べた。興味深いことにセロトニン (5-HT) そのものを与えられた Nr4a3 欠損マウスは WT マウスと同程度の DSS 腸炎を示した。消化管神経叢には 5-HT₁₋₄ および 5-HT₇ の 5 種類の主要な受容体発現が見られるが、どの 5-HT 受容体の影響か調べるために、複数の 5-HT 受容体アゴニストを調べたところ、5-HT_{1A} 特異的アゴニスト 8-OHDPAT が Nr4a3 欠損マウスの大腸炎を悪化させた。5-HT_{1A} シグナルは腸炎を抑制する神経ペプチドである CGRP 産生を後シナプ的に抑制することが知られている。予想通り 5-HT または 8-OHDPAT を与えた Nr4a3 欠損筋層において Calca および Calcb (それぞれコードされた CGRP および) mRNA レベルは、これらの刺激後に減少した。最後に CGRP 受容体阻害剤 CGRP8-37 を使用することによって CGRP が Nr4a3 欠損マウスの腸炎耐性に関連

するかどうかを確認した。予想通り、6 時間ごとに CGRP8-37 を与えた Nr4a3 欠損マウスにおいて DSS 大腸炎が野生型並みに悪化した。

(考察)

この研究では、我々は、Nr4a3 が腸管神経系発生に関与し、Nr4a3 欠損が神経節成熟を遅らせて HSCR 様疾患に導くことを初めて示した。また、我々は、腸内ニューロン由来 Nr4a3 が、5-HT_{1A}-CGRP 経路を介した急性 DSS 大腸炎の重篤度を調節することを示した。Nr4a3 が、5-HT_{1A}-CGRP 経路をどのように制御するのは完全には不明であるが、最終分化ニューロンの分布に明らかな差が見られないこと、炎症後欠損マウスで CGRP 発現が上昇していることを考えると、神経節発達異常により炎症時におけるシナプス後抑制性 5-HT_{1A} シグナル伝達が遅延し、結果 CGRP 増加につながっていると予想される。いずれにしろ Nr4a3 は、消化管神経節の発達を調節し、セロトニン作動性内在性求心性神経からの CGRP 発現を抑制することによって DSS 大腸炎の病因に関与する。この発見は、結腸運動障害だけでなく炎症に対する治療戦略のための新しい方法論を提供するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)
現在論文投稿準備中につきなし。

6. 研究組織

研究代表者
佐伯 恵太 (SAEKI Keita)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号: 80528729

(4) 研究協力者

吉村 昭彦 (YOSHIMURA, Akihiko)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 90182815