

令和元年6月28日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20347

研究課題名(和文) 神経ガイダンス因子によるヒルシュスブルング病に対する新規再生治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of the role of axon guidance in the enteric nervous system for novel therapeutic approach for Hirschsprung's disease.

研究代表者

藤原 なほ (FUJIWARA, NAHO)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：20589543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腸管神経の発生に関連する遺伝子SOX10に緑色蛍光タンパクを標識させたSOX10-VENUSトランスジェニックマウスとエンドセリンレセプターB(EDNRB)ノックアウトマウスの交配により作成したH病モデルマウスの胎仔腸管を日齢13.5、15.5採取。免疫組織染色を行い、SEMA3AがH病腸管では正常腸管と比較して直腸側で強く発現していることを明らかにした。これにより、H病腸管では正常腸管よりも有意にSEMA3Aの発現が高いことが示され、SEMA3Aがこの時期の腸管神経の発生過程に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、H病腸管では正常腸管よりも有意にSEMA3Aの発現が高いことが示され、SEMA3Aがこの時期の腸管神経の発生過程に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。さらに正常とH病腸管神経の発生過程での相違を細胞レベルで検証することを目的に細胞培養技術を導入した。SOX10-VENUS陽性の神経堤由来細胞のみをFACSを用いて選択し、培養を行った。そして、神経堤由来細胞からglia細胞への分化の程度が正常とH病腸管では異なることを明らかにし、その結果を発表した。これらの結果により、新しい技術を導入し、H病での腸管神経発生過程の相違について理解を深めることが出来たと考えている。

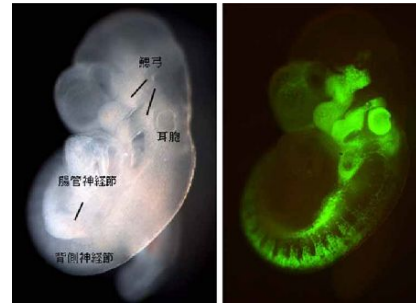
研究成果の概要(英文)：Semaphorin 3A (SEMA3A) is a secreted type of semaphorins that is recognized as the most potent repulsive or repelling neurite outgrowth of central and peripheral nervous system. Pregnant SOX10-VENUS+/EDNRB mice were sacrificed on days 13.5 and 15.5 of gestation (E13.5 and E15.5, respectively). Immunofluorescent analyses using DAPI, Venus, and SEMA3A were performed to evaluate protein expression/distribution of SEMA3A. Slides were then examined using laser scanning microscopy. There was markedly increased muscle layer SEMA3A immunoreactivity observed in EDNRB null mice specimens (both E13.5 and E15.5) compared with control mice. Our results provide the first evidence that SEMA3A expression is increased in the EDNRB null mouse HD model (both E13.5 and E15.5), suggesting that increased expression of SEMA3A may interfere with ENCC development, resulting in absence of enteric neurons.

研究分野：小児外科

キーワード：ヒルシュスブルング病 神経ガイダンス因子 セマフォリン3A

## 1. 研究開始当初の背景

Hirschsprung 病 (以下 H 病) は、小児外科領域における最も代表的な機能的腸閉塞疾患であり、出生児 5000 人に 1 人の頻度で発生し、腸管運動障害を呈するニューロクリストパチー (神経堤症) の一つとして知られている。治療は侵襲が大きい外科的手術のみで、無神経節腸管部位が長域にわたる場合には、腸管移植手術が必要となることもある。近年、神経堤幹細胞を用いた移植治療に関する実験の報告がされているが、未だ臨床応用するには決して満足のいくものではなく、新たな治療法の開発が望まれている。



(図1)

今回の申請では申請者が近年確立した新規な H 病モデルマウス (EDNRBKO-SOX10 VENUS Tg) を用いることで、内科的治療の可能性を検討する。すなわち神経堤由来の細胞のみが緑色蛍光タンパクで標識されること (図1) を用いて、正常な腸管神経系 (ENS) のダイナミックな形成過程がライブイメージとして観察可能になることを見出した。これを用いることで、まだ未踏である ENS における神経ガイダンス因子を検証し、神経堤細胞との関連を明らかにすることに着想した。この方法により、神経遊走や突起伸長の制御の機構を解明することが可能となる。ガイダンス因子については、最近、Ret-GDNF シグナル経路改変による H 病モデルマウスを用いて H 病腸管と神経伸長を制御する神経ガイダンス因子であるセマフォリン (SEMA) との関連が報告された (Luzón-Toro et al. PLoS One:8(1)2013)。神経ガイダンス因子は中枢神経系 (CNS) において神経細胞発生の過程で軸索のみならず、樹状突起の伸展を制御していることが示されている (図2)。さらに神経損傷後の再生に寄与することが知られており、将来的な再生医療への応用に期待されている (Kaneko S, et al. nature medicine:12(12)1380-9 2006)。末梢神経系 (PNS) においても、セマフォリン 3A 阻害剤を用いた角膜の感覚神経の再生に有効性が確認されている (Omoto M, et al. PLoS One 2012)。このことから、今後我々のモデルマウス腸管に SEMA をはじめとするガイダンス因子を投与し ENS の変化を観察することで、H 病腸管へのガイダンス因子の作用機構を明らかにする。さらにガイダンス因子をマウスに直接投与することで神経を伸長させ、H 病を今までは不可能であった内科的治療で根治するという新たな治療と神経堤細胞の再生治療技術の開発と臨床応用を目指す。

## 2. 研究の目的

### A. マウス胎仔の腸管における神経ガイダンス因子の探索

正常腸管の異なる発生時期 (E9-E15) におけるガイダンス因子の発現の分布を免疫染色・in situ hybridization・PCR にて解析する。ガイダンス因子としては反発因子として知られるセマフォリンとその受容体であるプレキシン、ニューロピリン、誘導因子としてはネトリンを検証する。

平成 29 年度

### B. ENS の発達におけるガイダンス因子の役割の検討

ラミニンの添加方法に準じて (Nakazawa N et al. Pediatr Surg Int. 2013 Jan;29(1)) ガイダンス因子の投与方法を培養環境下にて器官培養を行い、CNS と同様に神経遊走や突起伸長に関わるのかを検証する。

さらに、腸管神経細胞を用いた細胞培養実験を Young らのプロトコールに準じて (Young HM et al. Dev Biol. (229) 2001) 行い、細胞レベルでのガイダンス因子投与培地での神経細胞の増殖の様子を観察。神経伸長が誘導もしくは阻害されるかを正常培地と比較検討。

### C. 生体マウスへのガイダンス因子の投与方法の決定

B) と C) により導かれた結果を基にして、生体マウスに直接投与し組織培養下でガイダンス因子の最も有効かつ実践的な投与時期・投与方法の検討を行う。

まずは正常腸管で検討し、そこで得られた条件を H 病腸管にも試行する。

## 3. 研究の方法

腸管の神経堤細胞の分化・遊走に関連する遺伝子である sox10 に緑色蛍光タンパク VENUS を標識し、神経堤細胞の発生過程が観察できるトランスジェニックマウス (Sox10-VENUS Tg マウス) の E13. と E15.5 の胎仔腸管を用いて SEMA3A 抗体を用いて免疫染色を行い、腸管組織で SEMA3A がどのように発現しているかを検証。

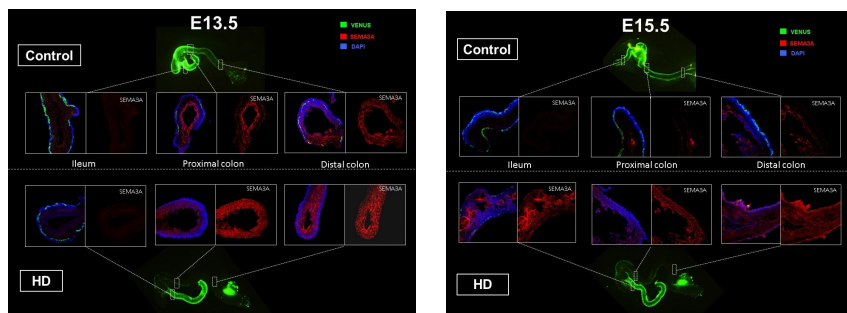
ヒルシュスプルング病モデルマウス (EDNRBKO-SOX10 VENUS Tg) からの腸管も同様に組織を回収し、E13. と E15.5 の胎仔腸管を用いて SEMA3A 抗体を用いて免疫染色を行い、との発現の相違を検証する。

ラミニンの添加方法に準じて (Nakazawa N et al. Pediatr Surg Int. 2013) ガイダンス

因子の投与方法を培養環境下にて器官培養を行う。  
 さらに、細胞レベルでの働きを解明するために腸管神経細胞を用いた細胞培養実験を Young らのプロトコルに準じて (Young HM et al. Dev Biol. (229) 2001) 行い、細胞レベルでのガイダンス因子投与培地での神経細胞の増殖の様子を観察。神経伸長が誘導もしくは阻害されるかを正常培地と比較検討。  
 リアルタイムイメージングにて経時的变化 (共焦点レーザー顕微鏡) を撮影する。

#### 4. 研究成果

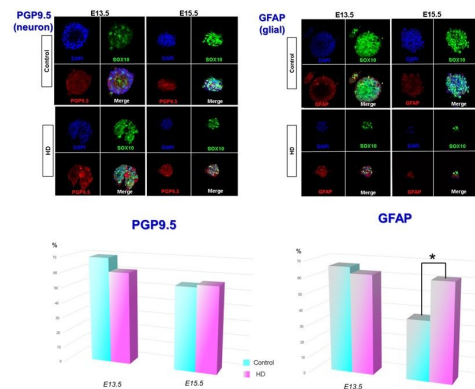
腸管神経発生過程での神経ガイダンス因子の作用を明らかにするために、まず正常腸管とヒルシュスプルング病 (H 病) 腸管での反発性軸索ガイダンス因子であるセマフォリン 3A (SEMA3A) の発現を解析した。腸管神経の発生に関連する遺伝子 SOX10 に緑色蛍光タンパクを標識させた SOX10-VENUS トランスジェニックマウスとエンドセリンレセプター-B (EDNRB) ノックアウトマウスの交配により作成した H 病モデルマウスの胎仔腸管を E13.5、15.5 採取。免疫組織染色を行い、SEMA3A が H 病腸管では正常腸管と比較して直腸側で強く発現していることを明らかにした。さらに解析ソフトを用いて定量化を行った (図 2)。



(図 2) E13.5、15.5 の胎仔正常腸管と H 病腸管での SEMA3A の発現。E13.5、15.5 とともに正常腸管よりも H 病腸管では SEMA3A の高発現が認められた。

これにより、H 病腸管では正常腸管よりも有意に SEMA3A の発現が高いことが示され、SEMA3A がこの時期の腸管神経の発生過程に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。これらの結果を順次学術集会において報告した。

さらに正常と H 病腸管神経の発生過程での相違を細胞レベルで検証することを目的に細胞培養技術を導入した。SOX10-VENUS 陽性の神経堤由来細胞のみを FACS を用いて選択し、培養を行った。当初は細胞培養に関してはより効率的な培養・分離方法の開発を試行したが、個体数・検体量が少なく有効な結果は得られなかった。そして、神経堤由来細胞から glia 細胞への分化の程度が正常と H 病腸管では異なることを明らかにし、その結果を学術論文として発表した (図 3)。これらの結果により、新しい技術を導入し、H 病での腸管神経発生過程の相違について理解を深めることが出来たと考えている。

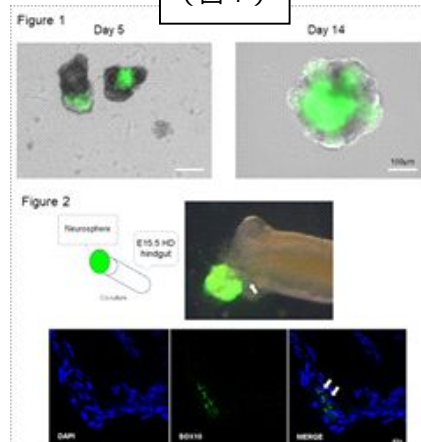


われわれは同時に、この細胞培養技術を用いて細胞移植に挑戦した。

胎生 15.5 日の正常胎児マウスより腸管を採取し、細胞分離を行い培養開始。浮遊培養開始後 5 日目ころから細胞増殖が開始され、21 日後にその細胞塊を胎生 15.5 日の病的胎児マウスの無神経節腸管部分と共培養を行った。4 日後に実体蛍光顕微鏡下で観察を行うと、無神経節部分腸管に SOX10 陽性細胞の侵入が見られたため、固定し組織検査での解析を行うこととした。すると、腸管断面でも SOX10 陽性細胞が無神経節腸管壁内に存在していることが確認された (図 4)。このことから、病的マウス腸管のうち無神経節腸管部分でも、正常腸管神経細胞が侵入し、生存することがわかった。今後はこの細胞が生着し、神経ネットワークを作製するのか、さらには分化し機能するのかなどを検証していく。

(図 3) 神経堤由来細胞から glia 細胞への分化の程度が正常と H 病腸管では異なることが検証された

(図 4)



## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計5件)

1. Nakazawa-Tanaka N, Fujiwara N, Miyahara K, Nakada S, Arikawa-Hirasawa E, Akazawa C, Urao M, Yamataka A. The effect of laminin-1 on enteric neural crest-derived cell migration in the Hirschsprung's disease mouse model. *Pediatr Surg Int.* 10.1007/s00383-017-4181-5 2018 (査読あり)
2. Fujiwara N, Miyahara K, Nakazawa-Tanaka N, Akazawa C, Yamataka A. Increased expression of Semaphorin 3A in the endothelin receptor-B null mouse model of Hirschsprung disease. *J Pediatr Surg* 10.1016/j.jpedsurg.2017.11.034.2018 (査読あり)
3. Nakazawa-Tanaka N, Miyahara K, Fujiwara N, Urao M, Akazawa C, Yamataka A. Three- and four-dimensional analysis of altered behavior of enteric neural crest derived cells in the Hirschsprung's disease mouse model. *Pediatric Surgery International* 10.1007/s00383-015-3806-9 2016 (査読あり)
4. Fujiwara N, Miyahara K, Nakazawa-Tanaka N, Akazawa C, Yamataka A. Altered differentiation of enteric neural crest-derived cells from endothelin receptor-B null mouse model of Hirschsprung's disease. *Pediatric Surgery International* 10.1007/s00383-016-3964-4 2016 (査読あり)
5. Fujiwara N, Nakazawa-Tanaka N, Miyahara K, Arikawa-Hirasawa E, Akazawa C, Yamataka A. Altered expression of laminin alpha1 in aganglionic colon of endothelin receptor-B null mouse model of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 10.1007/s00383-017-4180-6.2016 (査読あり)

### 〔学会発表〕(計14件)

1. 藤原なほ Hirschsprung 病モデルマウス腸管を用いた神経ガイダンス因子セマフォリン3A(SEMA3A)の発現の検討 第53回 日本小児外科学会学術集会、2016
2. Fujiwara N Increased expression of Semaphorin3A in the Endothelin-B null mouse model of Hirschsprung's disease. 23rd International Meeting of the Pediatric Colorectal Club, 2016
3. Fujiwara N Semaphorin 3A expression upregulated in the EDNRB(-/-) mouse model of Hirschsprung's disease 17th European Paediatric Surgeons Association's Annual Congress, 2016
4. Fujiwara N Altered differentiation of enteric neural crest-derived cells from endothelin receptor-B null mouse model of Hirschsprung's disease. The 28th International Symposium on Paediatric Surgical Research 2016
5. Fujiwara N. LAMININ PROMOTES NEURITE GROWTH IN THE ENTERIC NERVOUS SYSTEM OF THE EMBRYONIC MOUSE GUT 18th Congress of the European Paediatric Surgeons' Association 2017

### 〔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：  
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：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。