

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17767

研究課題名(和文)ヘッジホッグシグナリングに基づく腸管発生と神経コネクトミクス

研究課題名(英文)Functional analysis of hedgehog signaling in intestinal development and mapping analysis of the enteric nervous system

研究代表者

橋本 隆 (Hashimoto, Takashi)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：60712891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：消化管組織におけるソニックヘッジホッグ関連分子の分布について、特にGli1およびGli2転写因子について局在解析を行い、平滑筋細胞への分布を主とする他、一部はカハール介在細胞や繊維芽細胞においても発現していることを発見した。また、中枢神経系におけるムスカリン受容体の分布について、これまで検討が十分にされていなかったサブタイプのM2受容体に着目し、終脳・間脳・脳幹の特定領域に局在することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管組織におけるヘッジホッグ関連分子の役割については、ノックアウト動物を用いた研究から炎症性ストレスに対する増悪や消化管奇形に繋がることが知られていたが、本研究成果はこれらの病態発症や正常組織構造の構築のメカニズムを知るための組織学的基盤を与えるものと考えられる。また中枢神経系におけるM2受容体の局在解析については、既知の他のサブタイプとは異なる分布様式が観察され、M2に特有の脳機能調節機構の存在を新たに示唆する結果となった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the distribution of Gli1 and Gli2, transcriptional factors of hedgehog signaling, in the mouse gastrointestinal tract. Using Gli1 and Gli2-lacZ transgenic mouse and X-gal staining technique, we found that Gli1 and Gli2 are mainly expressed in the smooth muscle cells. Immunopositive reactions of Gli1 and Gli2 also detected in the interstitial cells of Cajal and fibroblasts in the lower digestive tract. These histochemical data provide some insight into molecular mechanisms underlying exacerbation of inflammatory response and gastrointestinal anomalies caused by lack of Gli1 and/or Gli2 genes. In addition, we investigated the localization of muscarinic acetylcholine receptor M2 in the adult rat brain and our histological data show that distribution pattern of M2 protein is surely correlate with that of acetylcholine, but is not always correspond to that of other muscarinic receptors, suggesting its unique functions in the brain.

研究分野：医歯薬学

キーワード：解剖 発生 消化器 解剖学 発生・分化 ヘッジホッグ Gli 転写因子

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

#### 1) 腸管組織におけるヘッジホッグシグナリング

自律性を有した臓器としての腸管形成のメカニズムについて、最近の研究からマウスや人 ES 細胞を扱った研究から内胚葉系譜である小腸上皮細胞への分化に Wnt および Notch シグナリングの関与が明らかにされている (Ogaki et al., Stem Cell, 2013)。しかしながらソニックヘッジホッグ (Shh) については神経発生で重要な役割を果たすことが報告され胚発生時に腸発生部位に発現することも知られながらも、その関連分子の発現動態や腸管形成への寄与について論じた詳細な研究は存在せず、発癌等に関する研究が現在の主流であった。

#### 2) 中枢神経系におけるムスカリン受容体

腸管神経系の神経連絡様式をコネクトミクスに基づいて立体解析することを予定していたが、透明化法の至適条件検討の難航と連続ブロック表面走査型電子顕微鏡 (SBF-SEM) 法によるデータ取得のための環境構築が未達成のため、当初の計画を変更して本テーマを進めた。

アセチルコリン受容体の内、ムスカリンがアゴニストとして働く代謝調節型のをムスカリン受容体と呼び、サブタイプとして M1 から M5 の 5 種が知られている。M1 は大脳皮質や海馬を含む中枢神経系に顕著に発現し、記憶学習といった高次機能に関与することが報告されている。M5 は黒質に発現し、報酬行動に関係すると考えられている。M2 は心臓の洞房結節に局在しているが、加えて消化管平滑筋等にも分布することを福井大学 解剖教室から報告した (Iino and Nojyo, Neuroscience, 2006)。しかし中枢神経系における M2 の分布については十分に明らかにされていなかった。

### 2. 研究の目的

1) マウス腸管における Shh シグナリングの発生学的意義や機能的関与について検討を行う。

胎生期の腸管をサンプルとして、各ステージ間の発現変動や細胞種の同定を行う。

2) ムスカリン受容体 M2 の中枢神経系における詳細な局在分布を調査し、解剖組織学的知見を得る。

### 3. 研究の方法

1) 胎生期や 8 週齢の成獣雄マウスの腸管組織を用いてヘッジホッグシグナリングにおけるリガンド Shh、膜受容体 Ptch、そして Gli1 および Gli2 転写因子の発現動態を、Gli1-lacZ および Gli2-lacZ マウスも使用して免疫組織学的に局在分布を解析した。

2) M2 の中枢神経系における分布について生後 8 週齢の成獣雄ラットを用いて標本作製を行い、嗅球から延髄にわたって M2 の陽性反応の全脳検索を実施した。特異抗体を使用し酵素抗体法により免疫組織化学的に検討を加えた。

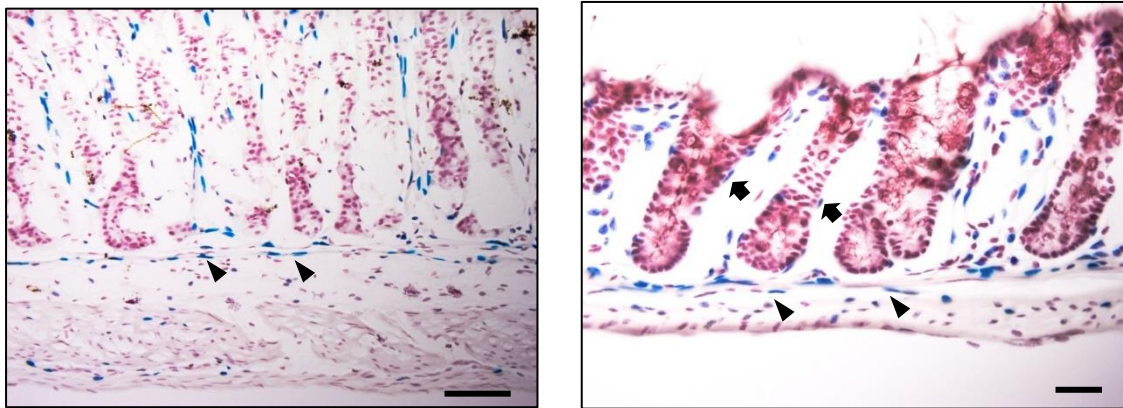
#### 4. 研究成果

##### 1) マウス腸管における Shh シグナリング関連分子の局在解析

ヘッジホッグシグナリングに関連する分子から、特に成体マウスの腸管における Gli1 および Gli2 の分布について限定し、調査を実施した。組み換えタンパクを利用した Gli1 および Gli2 の抗体作製を試みたが、成功に至っていない。また、文献および学会参加で得た情報を元に出した市販抗体についても染色態度に問題あったため、最終的に Gli1-LacZ と Gli2-LacZ トランスジェニックマウスを利用した X-gal 染色と多重標識法により、両分子を発現する細胞の同定を行った。

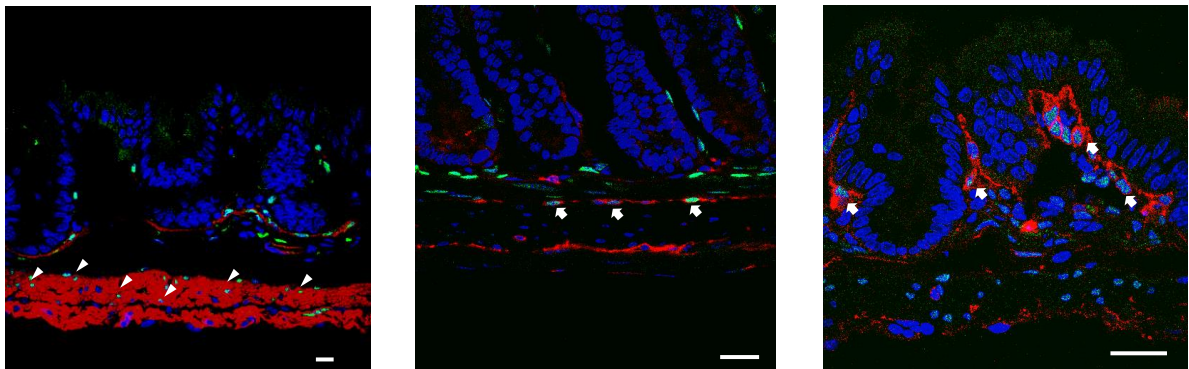
Gli1 陽性細胞は胃体部以降結腸までにおいて、主に粘膜間質と筋層における分布を示した。粘膜間質においては粘膜筋板（下図矢頭）の他、上皮細胞直下でも陽性細胞（下図矢印）が認められた。

\*下図左は Gli1-lacZ マウスの胃体、右は大腸における Gli1 陽性細胞（青）の存在を示す。



筋層では主に輪走筋内層に Lac-Z 陽性細胞が観察された。蛍光多重染色法により Gli1 陽性細胞の大多数は平滑筋細胞（下図左 矢頭）であるが、盲腸と結腸では輪走筋周縁でカハール介在細胞（下図中 矢印）、粘膜組織で線維芽細胞にも Gli1 が発現していることが示された（下図右 矢印）。

\*下図はそれぞれ、盲腸 における平滑筋細胞（左・赤）、大腸におけるカハール介在細胞（中・赤）および、盲腸における繊維芽細胞細胞（右・赤）と Gli1（緑）との共存を示す。

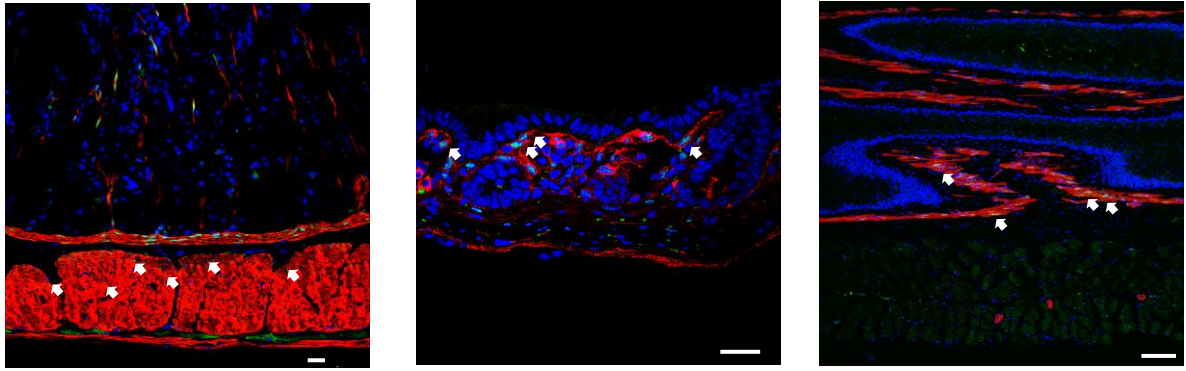


Gli2 陽性細胞も消化管全域において多くは平滑筋細胞であり（下図左）、加えて下部消化管の粘膜組織では線維芽細胞に発現を示したが、一方で食道にも存在するなど一部 Gli1 と異なる分布を示すことも明らかとなった。

\*下図はそれぞれ、胃体 における平滑筋細胞（左・赤）、盲腸における繊維芽細胞（中・赤）お



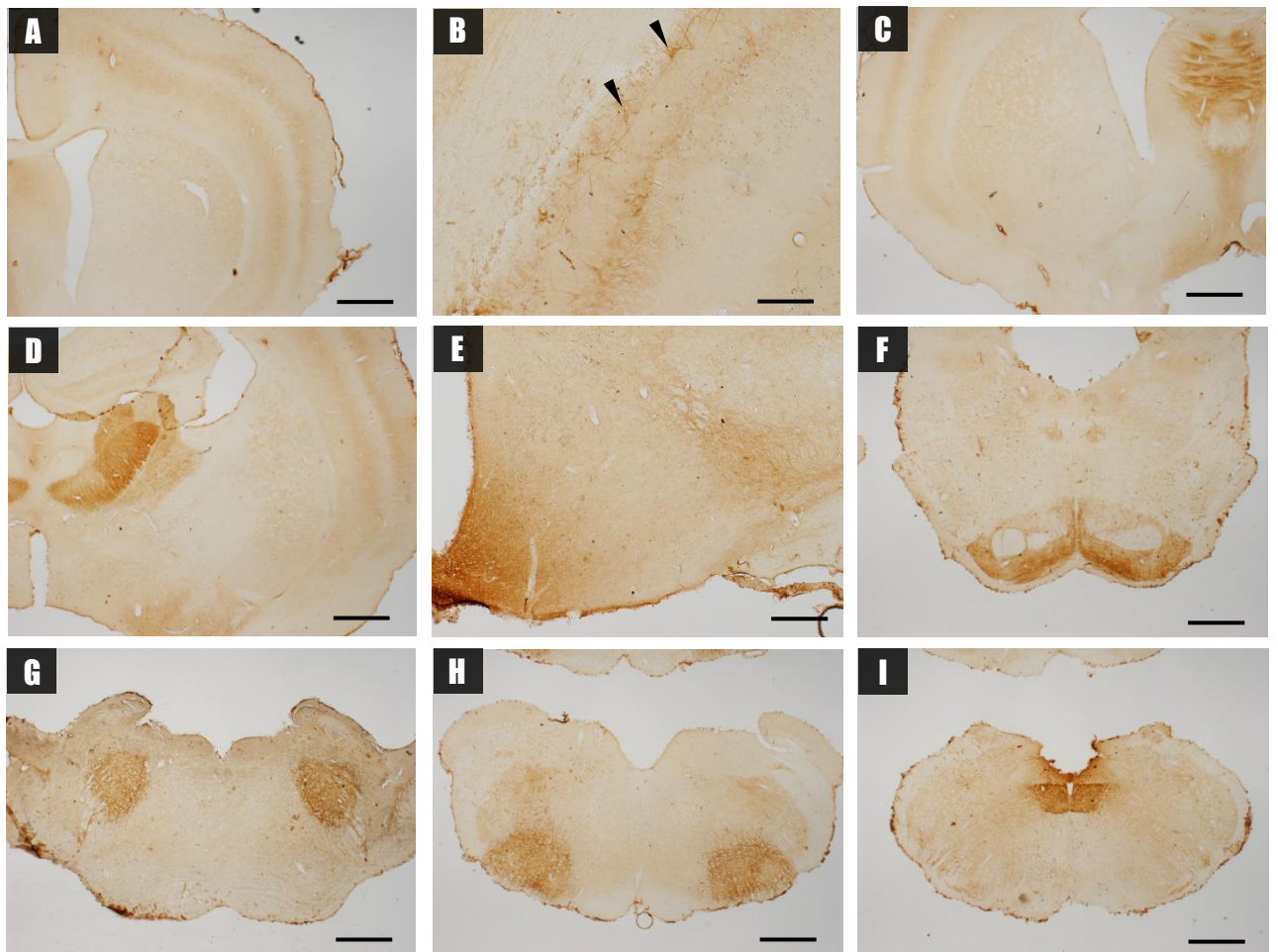
よび、食道における繊維芽細胞細胞（右・赤）と Gli2（緑）との共存を示す。



本研究で得られた Gli 転写因子の腸管組織における分布に関する知見は、消化管の炎症反応などにおいて病態理解に向けた組織学的基盤を与えると考えられるが、一方で正常組織の構築についての同転写因子の役割を知るためには、胎児期からの細胞系譜の追跡を含めたさらなる解析が課題として残る。

## 2) ラット中枢神経系における M2 受容体の局在解析

大脳皮質では主にIV・V層(下図 A)に、海馬 CA1 から CA3 野にかけては錐体細胞および上昇層に M2 の陽性反応を細胞体・樹状突起ともにみとめた(下図 B 矢頭)。前脳基底部では内側中隔から対角帯核・水平帯核にかけて顕著な陽性反応を示すとともに(下図 C)、視床では前腹側核で強度の高い M2 の反応が見られる他、網様核でも観察された(下図 D)。視床下部領域では脳弓周囲から外側野にかけて繊維状の陽性反応を観察した(下図 E)。橋核の他(下図 F)、延髄で三叉、顔面、舌下神経の各運動核で M2 の局在が明らかになった(下図 G-I)。



本研究で得られた成果より、M2 はアセチルコリンの脳内分布や投射と対応するがその局在は M1 を含む他のムスカリン受容体サブタイプとは異なる領域にもみとめられ、M2 を介した特有の脳機能調節が存在することが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本 隆、堀口 和秀、堀口 里美、飯野 哲
2. 発表標題 成体マウス消化管における転写因子Gliの局在解析
3. 学会等名 第58回平滑筋学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 飯野 哲、堀口 里美、堀口 和秀、橋本 隆
2. 発表標題 c-Kitシグナル異常を持つマウスにおける小腸カハール介在細胞の発生
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第73回学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本 隆、堀口 和秀、堀口 里美、飯野 哲
2. 発表標題 成体マウス消化管におけるGli1陽性細胞の同定
3. 学会等名 第58回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本 隆、堀口 和秀、堀口 里美、飯野 哲
2. 発表標題 成体マウス消化管における転写因子Gli1の局在解析
3. 学会等名 第59回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本 隆、堀口 和秀、堀口 里美、飯野 哲
2. 発表標題 成体マウス消化管における転写因子Gli1とGli2の局在解析
3. 学会等名 第123回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本 隆、永野 宏、海野 年弘、飯野 哲
2. 発表標題 成体ラット脳におけるムスカリン受容体M2の局在解析
3. 学会等名 第124回 日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本 隆、永野 宏、海野 年弘、飯野 哲
2. 発表標題 Localization analysis of the muscarinic receptor type2 in the adult rat brain
3. 学会等名 第42回 神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本 隆、永野 宏、海野 年弘、飯野 哲
2. 発表標題 成体ラット脳におけるムスカリン受容体M2の脳内局在
3. 学会等名 第60回 日本組織細胞化学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----