

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08554

研究課題名（和文）可視化モデルによるセロトニン神経の機能解析と小児腸管蠕動不全症への挑戦

研究課題名（英文）Functional analysis of serotonergic innervation using a visualisation model to challenge paediatric intestinal peristalsis

研究代表者

富山 英紀 (Tomiyama, Hideki)

大阪医科薬科大学・医学部・准教授

研究者番号：20298433

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：腸管神経系におけるセロトニン神経機能及び腸管蠕動不全症の病態を解明するため、透明のまま発生・分化し内部観察が可能なゼブラフィッシュを駆使した実験系モデルを確立した。SONY S18000セルモーションシステムを用いた腸蠕動を解析では、順蠕動および逆蠕動が異なる収縮ベクトルで形成されていた。また心臓ペースメーカー細胞で発現しているhcn4遺伝子が逆蠕動を制御していることを解明した。さらにhcn4遺伝子のノックアウトモデルの育成に成功しており、逆蠕動の低下を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒルシュブルグ病や腸管神経節細胞僅少症などに代表される腸管蠕動不全症は希少疾患であり、癌研究などと比較して研究が遅れている分野である。その克服のためには可能な限り実際の生体内を模倣した良質な実験系モデルが必要である。よってゲノム編集が容易で、胎生変化に加え、透明で全腸の観察が生きた同一個体内で可能なゼブラフィッシュモデルが最適であると考え研究に着手した。神経発生に關与するセロトニン神経の機能を本モデルで解析することは、胎生期に腸管神経系の発達異常をきたす疾患の病態解明に繋がる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the serotonergic neuronal functions within the enteric nervous system and the pathophysiology of intestinal dysmotility, we have established an experimental model using zebrafish, which remain transparent during development and differentiation, allowing for internal observation. Analysis of intestinal motility using the SONY S18000 Cell Motion System revealed that antegrade and retrograde peristalsis are formed with distinct contraction vectors. Moreover, we discovered that the hcn4 gene, which is expressed in cardiac pacemaker cells, regulates retrograde peristalsis. Additionally, we successfully developed an hcn4 gene knockout model and observed a reduction in retrograde peristalsis.

研究分野：小児蠕動機能不全症

キーワード：ゼブラフィッシュ 腸管神経系 蠕動 セロトニン

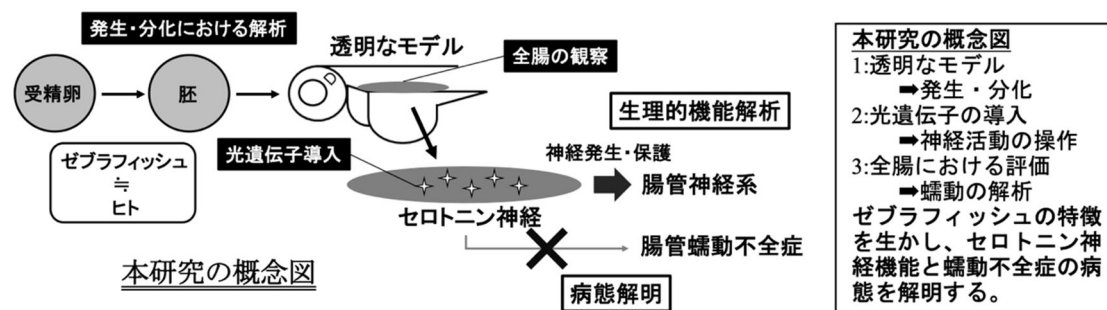
様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

消化管は自律神経と腸管壁内に存在する神経細胞で構成された独自のネットワークである腸管神経系によって支配されており、生命維持に必須である蠕動運動や分泌を行っている。

腸管神経系の神経節細胞が欠如もしくは減少し、腸管蠕動不全をきたす疾患としてヒルシュスプルング病や腸管神経節細胞僅少症などが挙げられる。何れも小児疾患であり、腸瘻・人工肛門造設、腸切除等の外科的治療及び経静脈栄養を行うが、病態に対する根本的な治療法はなく予後は不良である。よって、病態を研究し根本的治療を構築することが必要である。しかしながら、何れの疾患に対しても研究が進んでいるとは言い難い。ヒルシュスプルング病は神経堤からの神経節細胞の遊走分布が途絶し発症するとされ、いくつかの原因遺伝子の報告があるが(*J Pediatr Surg* 2001;36:1685-1688)、多様かつ変異部位も異なり一元的には解明されていない。また腸管神経節細胞僅少症の中には、後天的原因で腸管神経節が消失するものが指摘されているが、原因については全く不明である。このように腸管蠕動不全症は希少疾患という背景もあり研究が遅れている分野で、病態を解明し治療法を開発するためには良質な実験系モデルの確立が必要である。

近年、腸管神経系の中でセロトニン神経が、神経発生・保護に関与することが注目されている(*ACS Chem Neurosci* 2017;8:920-931)。そこで、胚が透明で全腸の発生・分化・蠕動が観察可能なゼブラフィッシュに光遺伝子を融合させ、腸管蠕動運動におけるセロトニン神経の機能と腸管蠕動不全症の病態を解明するために研究を開始した。



2. 研究の目的

ゼブラフィッシュは透明な胚を持ち、任意の遺伝子に GFP や G-CaMP などの光遺伝子を導入することで、可視化することができる。本研究の目的は、この特徴を腸管神経系の解析に応用し、遺伝子発現および神経系の構築における胎生変化、実際の消化管運動に与える影響の解明をセロトニン神経を中心に進めることである。

3. 研究の方法

先行研究により心臓ペースメーカー細胞で発現していた *hcn4* 遺伝子が、ゼブラフィッシュの腸管神経系にも発現し、セロトニン神経に局在していることを見出した(図1)。本研究では、*hcn4* 遺伝子が GFP で標識されたゼブラフィッシュを用いて腸管神経系と蠕動運動の解析を実施した。

蠕動解析は SONY SI8000 セルモーションシステムを用いて、生きた個体内での新規蠕動解析システムを構築した(図2)。このシステムでは、腸管に ROI を設定することで、腸管内の蠕動回数、収縮力、蠕動運動の方向を解析することが可能である。

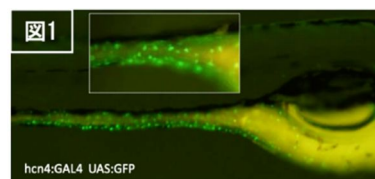


図1: 受精後7日目のゼブラフィッシュ GAL4/UASシステムにより、腸管神経系にGFP標識された *hcn4* 遺伝子の発現が確認でき、セロトニン神経に局在していることを同定した。更に、分布の多い中央(拡大図)より蠕動の存在を確認している。(右: 口側、左: 肛門側)

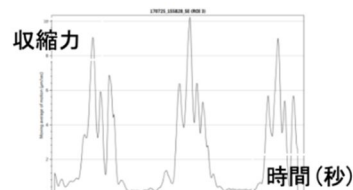
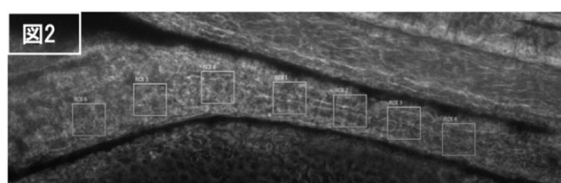


図2: SONY SI8000を用いた蠕動解析システム(左図)と蠕動解析(右図): 受精後10日目 このシステムを用いれば、発生段階別に蠕動発生部位、各ROIにおける収縮力・伝播速度がリアルタイムで解析できる。予備実験で有用な結果を見出しており、本研究の遂行により消化管蠕動をモニタリングする新規システムが確立される。

4. 研究成果

SONY SI8000 セルモーションシステムを用いた解析により、順蠕動および逆蠕動が異なる収縮ベクトルで形成されていることが明らかになった(図3)。これは、輪走筋および縦走筋の特徴を反映していた。

図3

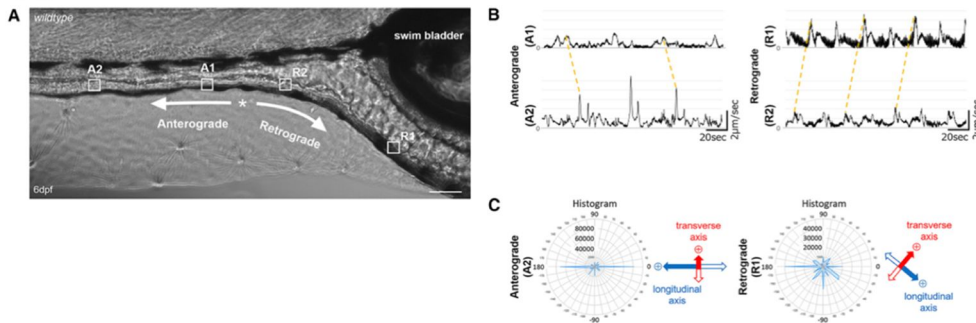


図3: 受精後6日目(野生型)の腸運動解析
(A) 自発的な腸の収縮はアスタリスク(*)で示した位置で発生した。この起点から順行性、逆行性に収縮が進行した。各蠕動に対する2つのROI(順行性はA1とA2、逆行性はR1とR2)をボックスで示す。
(B) 順行性(左)または逆行性(右)の移動におけるROI内運動を時間に対してプロットした。点線はROI間の個々の収縮の移動を示す。
(C) 各ROIにおけるベクトルの数をヒストグラムに示した。特定の角度を持つベクトルの数のみを表し、個々のベクトルの振幅は反映していない順行性(左)では縦軸が優勢で、逆行性(右)では横軸が強い。

次に発生初期にアンチセンスモルフォリン(MO)を使用して、一時的に hcn4 遺伝子を阻害すると、腸管神経系の発達が阻害され、逆蠕動が抑制されることが確認された(図4)。

図4

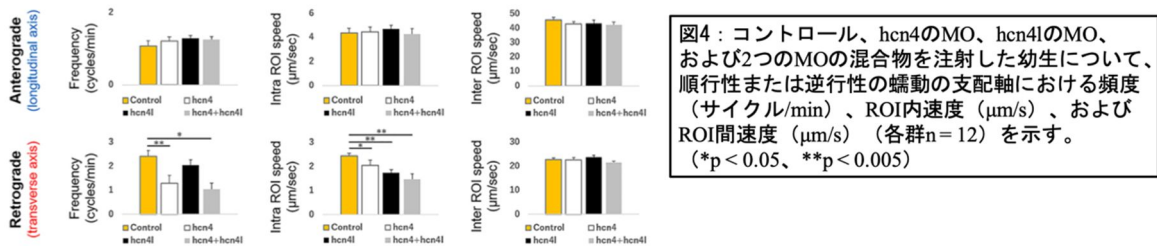


図4: コントロール、hcn4のMO、hcn4IのMO、および2つのMOの混合物を注射した幼生について、順行性または逆行性の蠕動の支配軸における頻度(サイクル/min)、ROI内速度(μm/s)、およびROI間速度(μm/s)(各群n=12)を示す。
(*p < 0.05, **p < 0.005)

また、光遺伝学を用いたトランスジェニックモデルを用いて、セロトニン神経の選択的興奮を誘導し、セロトニン神経が主に輪走筋の動きを選択的に制御することで逆蠕動を制御していることを解明した(図5)。この成果を論文として公表した(*Cell Rep.* 2020;30:2879-2888)。

図5

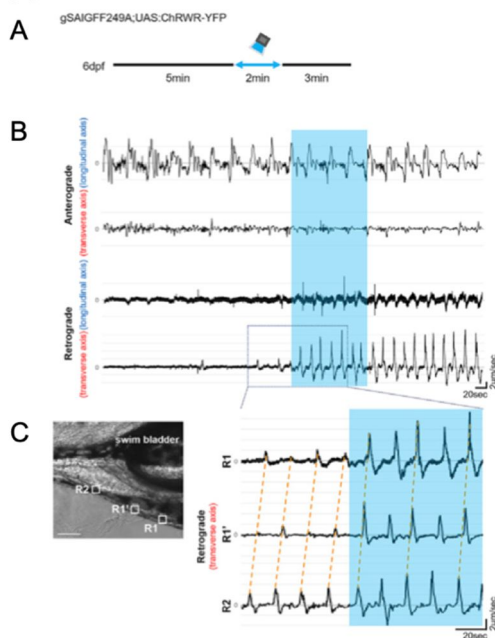


図5: hcn4(+)ニューロンの光遺伝学的刺激による逆行性蠕動の強化
(A) gSAIGFF249A;UAS:ChRWR-YFPに対する青色光刺激時間を示す。5分間の観察の後、青色光を2分間照射してChRWRを活性化させた。光刺激前、光刺激中、光刺激後の蠕動運動を解析した。
(B) 縦軸方向と横軸方向の腸の収縮を時間に対してプロットした。青色刺激に対応する期間を同色の網掛けで示す。逆行性蠕動における横軸方向の腸の動きの増加がみられた。
(C) 隣接する3つのROI(R1、R1'、R2)の腸収縮を時間に対してプロットし、収縮波の移動を可視化した。ROI間の収縮波の移動を点線で示す。

さらに、hcn4 遺伝子のノックアウトモデルを用いて、蠕動運動への影響を解析を進めた。hcn4 遺伝子そのものが欠落すると腸管蠕動にどのような影響を与えるかを検討し、セロトニン神経の機能解析を行った。hcn4 遺伝子には重複遺伝子 (hcn4l 遺伝子) が存在するが、hcn4、hcn4l それぞれのノックアウトモデルの育成に成功しており、それらを交配させてダブルノックアウトモデル (hcn4DKO) を得ることができた (図 6)。

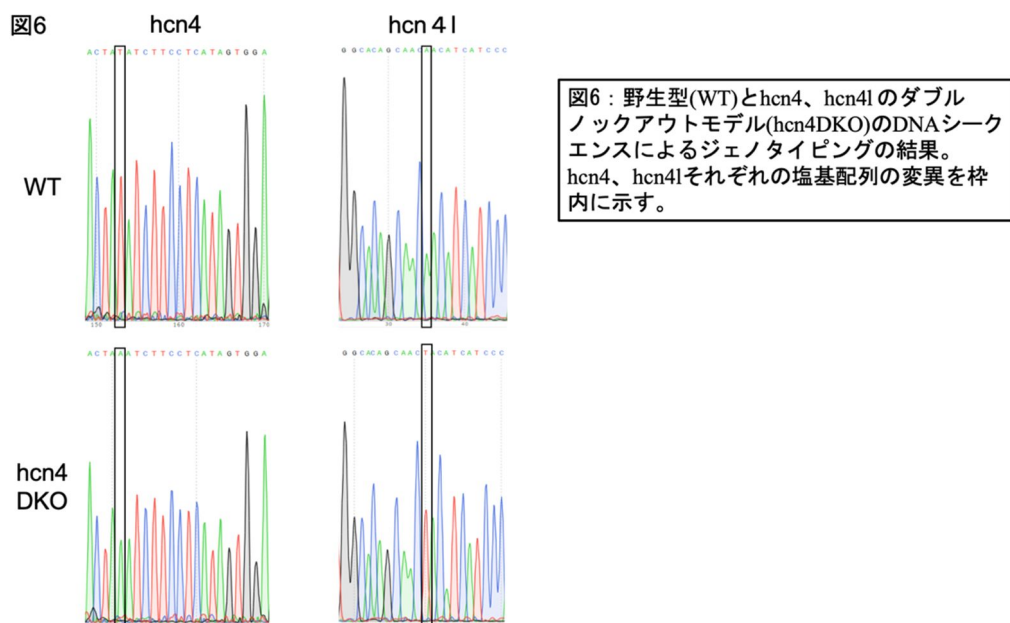


図6：野生型(WT)とhcn4、hcn4lのダブルノックアウトモデル(hcn4DKO)のDNAシーケンスによるジェノタイピングの結果。hcn4、hcn4lそれぞれの塩基配列の変異を枠内に示す。

ダブルノックアウトモデルは幼生期の栄養源である卵黄嚢より吸収した消化管内容物が体内に留まっておらず (図 7A)、逆蠕動の頻度、収縮伝播速度はともに低下していた (図 7B)。そのため給餌をせず飼育すると野生型と比較して生存率が低下したと考えられた (図 7C)。

図7

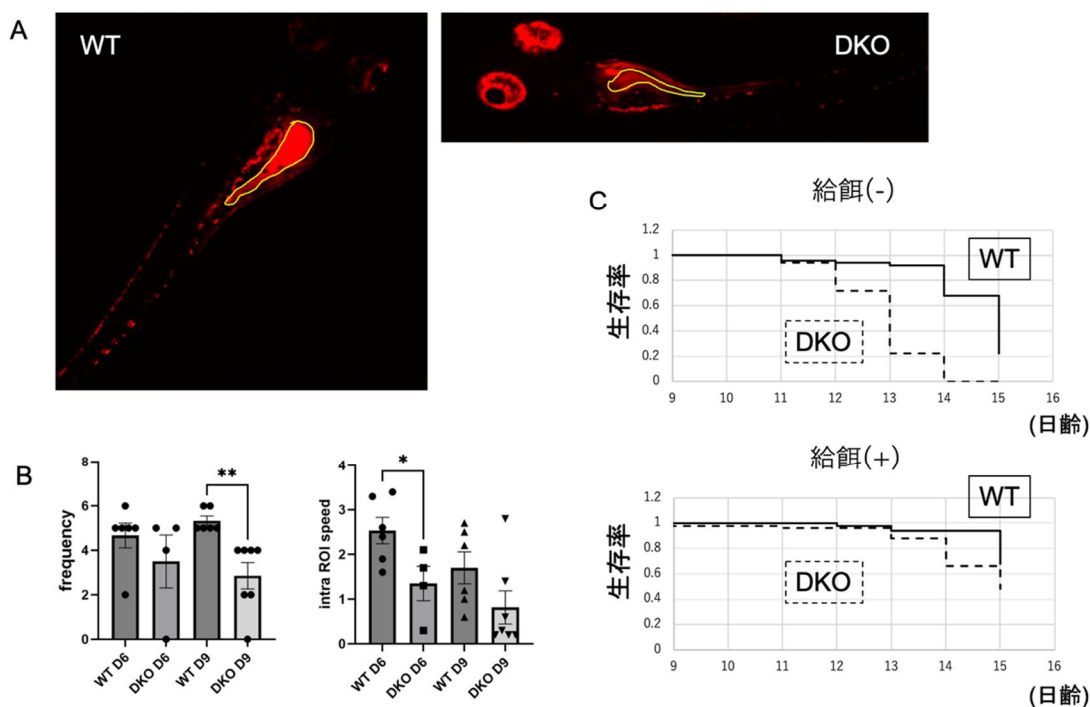


図7：hcn4DKOモデルの逆蠕動の解析と生存率
 (A) NileRedを用いて脂質を蛍光染色することで、卵黄嚢から吸収した消化管内容物の消化速度を推定した。黄色線は消化管を示す。DKOはWTと比較して蛍光色素の残存が少ない。
 (B) 受精後6日目、9日目においてDKOは逆蠕動の頻度と収縮伝播速度が低下した。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)
 (C) 給餌をせず飼育するとDKOの生存率が低下した。

今後はこの遺伝子変異モデルを用いて成魚における逆蠕動の検討や、セロトニン神経と腸管神経の発生および保護の関与を検討する計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kensuke Fujii, Koichi Nakajo, Yoshihiro Egashira, Yasuhiro Yamamoto, Kazuya Kitada, Kohei Taniguchi, Masaru Kawai, Hideki Tomiyama, Koichi Kawakami, Kazuhisa Uchiyama, Fumihito Ono	4. 巻 30(9)
2. 論文標題 Gastrointestinal neurons expressing HCN4 regulate retrograde peristalsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2879-2888
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.02.024.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤井研介、中條浩一、川上浩一、江頭良明、山本耕裕、谷口高平、河合英、富山英紀、内山和久、小野富三人
2. 発表標題 The role of HCN4-positive cells in the gastrointestinal development and motility of zebrafish
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井研介、中條浩一、川上浩一、江頭良明、山本耕裕、河合英、富山英紀、内山和久、小野富三人
2. 発表標題 腸管でのHCN4発現ニューロンの同定と、消化管運動における役割
3. 学会等名 第111回 近畿生理学談話会
4. 発表年 2018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
研究分担者	谷口 高平 (Taniguchi Kohei) (70779686)	大阪医科薬科大学・医学部・講師 (34401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	内山 和久 (Uchiyama Kazuhisa) (80232867)	大阪医科薬科大学・医学部・名誉教授 (34401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関