

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16273

研究課題名(和文) Ncxノックアウトマウスを用いた腸管神経発生の分子機構と巨大結腸発症機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of intestinal neurogenesis and mechanism of megacolon development in Ncx-/-mice.

研究代表者

笈田 諭 (OITA, Satoru)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90813543

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)：本研究では、NcxとEcel1及び腸管神経との関わりを明らかにした。マイクロアレイ解析により転写因子であるNcxの標的分子としてEcel1を同定した。Ecel1が腸管神経に発現し、Ncx-/-マウスで発現が上昇していることを示した。また、SH-SY5Y細胞におけるNCXのknock down実験、及びEcel1のpromoter解析から、NcxがEcel1のpromoter領域に作用し、Ecel1の発現を負に制御していることを明らかにした。また、腸管神経の初代培養を用い、Ncx-/-マウスでcaspase3陽性神経細胞数が減少し、アポトーシス抑制によって腸管神経の過形成が起こる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、NcxをノックアウトすることでEcel1が過剰発現し、正常な腸管神経細胞死が妨げられ、腸管神経過形成を引き起こす可能性が考えられた。また、Ncx-/-腸管神経初代培養ではシナプス形成数が減少していることが示されたことから、異常なシナプス形成がNcx-/-マウスに腸管機能不全を起こしている可能性が考えられた。これにより、腸管神経の発生に新たな知見を加えるとともに、ヒルシュスプルング病類縁疾患の一つである腸管神経形成異常症を含む、原因不明の腸管蠕動不全を起こす疾患の病因説明や新たな診断ツールとして役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified the relationship between Ncx and Ecel1 and the enteric nervous system. Ecel1 was identified as a target molecule of the transcription factor Ncx by microarray analysis. It was shown that Ecel1 was expressed in the enteric neuron and the expression was increased in Ncx-/-mice. Knockdown of NCX increased the expression of ECEL1 in SH-SY5Y neuroblastoma cells. In addition, reporter gene analysis revealed that Ncx acts on the promoter region of Ecel1 and negatively regulates the expression of Ecel1. The number of cleaved caspase3-positive neurons was decreased in Ncx-/-mice compared to that of wild type mice in primary enteric neuron culture. That indicates the inhibition of neuronal apoptosis may lead to hyperplasia of enteric nervous system in Ncx-/-mice.

研究分野：小児外科

キーワード：Ncx Ecel1 腸管神経培養 アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

ヒルシュスプルング病類縁疾患とは、腸管の神経節細胞が存在するにも関わらず腸閉塞症状、腸管拡張、慢性便秘等のヒルシュスプルング病と類似した症状や所見を示す疾患群である。今なおその病因は全くの不明であり病因の解明と革新的な新規治療の開発が望まれる。

我々が作成した *Ncx*<sup>-/-</sup>マウスは巨大結腸と腸管神経の過形成を呈し、ヒルシュスプルング病類縁疾患の1つである腸管神経形成異常症(intestinal neuronal dysplasia: IND)のモデルマウスに位置づけられている。*Ncx* はホメオボックスを含む転写因子であるが、その標的分子は不明であり、腸管神経細胞数が増加する詳細な分子機構も不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、*Ncx* の下流の転写ネットワークを調べることにより、腸管神経発生と機能形成及び腸管蠕動不全に至る分子機構を解明し、本疾患に対する新規治療の可能性を探ることとした。

## 3. 研究の方法

(1) *Ncx* の標的分子を明らかにするため、1週齢の野生型(WT)及び *Ncx*<sup>-/-</sup>マウスの結腸から RNA を抽出し、micro array 解析による *Ncx* 標的候補分子の探索を行った。同定された候補遺伝子について、腸管における mRNA 発現を RT-qPCR で定量し、免疫組織染色で局在及び発現量を観察した。

(2) *Ncx* が標的候補分子を制御しているかを調べるため、*Ncx* を内因性に発現しているヒト神経芽細胞腫株 SH-SY5Y 細胞を用いて *NCX* のノックダウンを行い、候補遺伝子の発現を解析した。また、*NCX* の発現はレチノイン酸 (RA) 刺激によって誘導されるため、RA 刺激後の標的候補遺伝子発現に対する *NCX* ノックダウンの影響を調べた。

(3) 候補遺伝子のプロモーター領域の解析を行い、その転写活性への *Ncx* の影響を検討した。

(4) 腸管神経の増殖・分化を評価するため、腸管神経初代培養を行い神経節様構造及び内部の神経細胞数を WT と *Ncx*<sup>-/-</sup>で比較した。また、Sholl 解析を用いて神経分岐の複雑さを、Synapsin の免疫染色を用いてシナプス形成を評価した。

(5) 腸管神経過形成の機序を調べるため、EdU (ethynyldeoxyuridine) を用いて神経細胞の増殖能を、Cleaved-caspase3 の免疫染色を行い、アポトーシスを評価した。

## 4. 研究成果

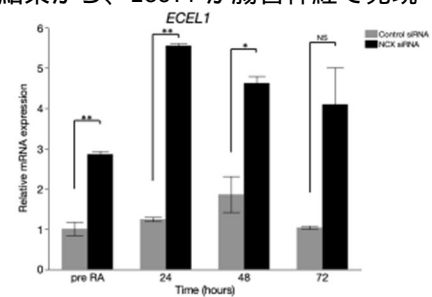
(1) RNA micro array 解析により、神経系に重要な役割を果たしている遺伝子の中で、最も有意に *Ncx*<sup>-/-</sup>で発現が上昇していた分子として *Ecel1* を同定した。

1週齢マウス結腸サンプルの RT-qPCR で *Ecel1* の発現上昇を確認した。

また、蛍光免疫組織染色により *Ecel1* は筋層間神経叢でシグナルが検出され、かつ WT マウスよりも *Ncx*<sup>-/-</sup>マウスで *Ecel1* の蛍光強度が高かった。これらの結果から、*Ecel1* が腸管神経で発現し、*Ncx*<sup>-/-</sup>で発現上昇していることが示された。

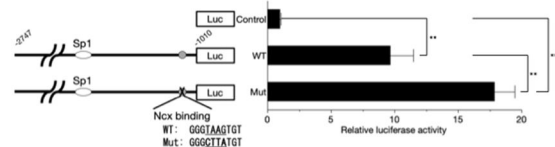
(2) SH-SY5Y 神経芽腫細胞株を用いて *NCX* のノックダウンを行うと、*ECEL1* の mRNA 発現が約 3 倍に増加した。同様の系で RA 刺激を行うと、*NCX* をノックダウンした細胞では *ECEL1* 発現は RA 刺激前に高く、RA 刺激後 24 時間で増加した。一方、コントロールの細胞では、RA 刺激後に *ECEL1* 発現の増加を示さなかった。これらの結果は、*NCX* が RA 刺激下において *ECEL1* の発現を抑制することを示唆している。(図 1)

(3) マウスおよびヒトの *Ecel1* のプロモーター領域で *Ncx* コンセンサス結合配列を検索したところ、共に転写開始部位



(図 1: レチノイン酸刺激時の *Ecel1* の mRNA 発現)

の近傍に *Ncx* コンセンサス結合配列を同定した。*Ecel1* プロモーター領域の reporter gene construct を、*Ncx* 結合配列に変異を入れたもの (Mutation) 入れないもの (WT) をそれぞれ作成した。SH-SY5Y 細胞を用いて両者のルシフェラーゼアッセイを行ったところ、Mutation は WT と比較して、ルシフェラーゼ活性が大幅に増加した。(図 2)



(図 2: *Ecel1* プロモーター領域のルシフェラーゼアッセイ)

この結果は、*Ncx* が神経細胞における *Ecel1* の発現を負に調節することを示唆している。

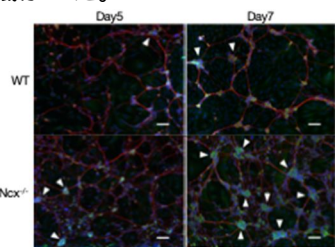
(4) *Ecel1* はシナプス形成と神経保護に関与しているため、腸管神経を初代培養し、分化、増殖、細胞死を評価した。

腸管神経初代培養において、*Ncx*<sup>-/-</sup>細胞では、WT よりも多くの神経節様構造がみられた。

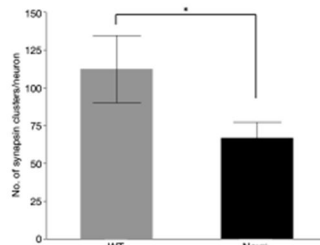
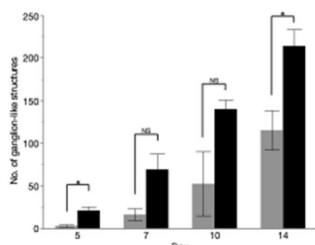
さらに各神経節様構造は WT よりも *Ncx*<sup>-/-</sup>でより多くの神経細胞を含んでいた。

Sholl 解析での神経分岐の複雑さは、WT と *Ncx*<sup>-/-</sup>の間に違いは見られなかった。

Synapsin の染色で評価した神経細胞 1 つあたりのシナプスの形成数は、WT よりも *Ncx*<sup>-/-</sup> で有意に低かった。



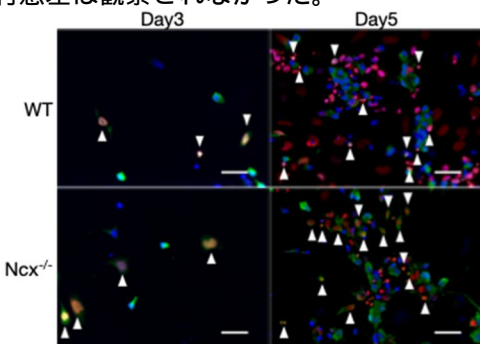
(図 3: 初代培養における神経節様構造と数)



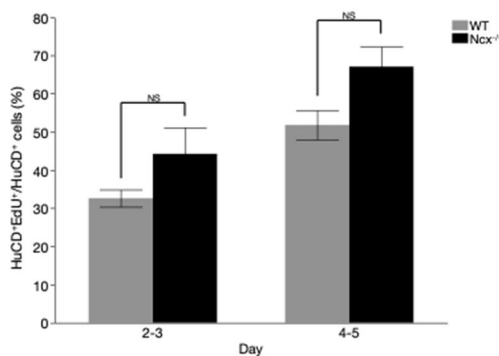
(図 4: 神経細胞 1 つあたりのシナプス形成数)

(5) 初代培養された *Ncx*<sup>-/-</sup> の腸管神経は、WT よりも多数かつ大きな神経節様構造を形成するため、培養神経の増殖能と細胞死を評価した。

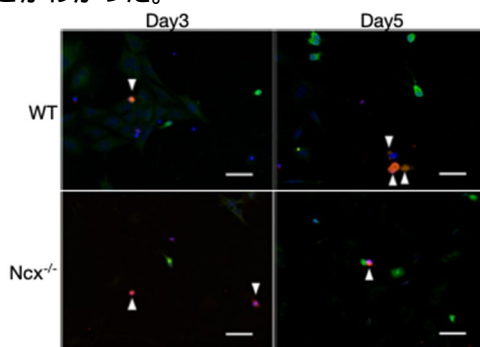
EdU を培養 2 日目または 4 日目に培養液に加え、それぞれ 24 時間後に EdU 陽性神経細胞の割合を測定することにより神経細胞増殖を評価した (EdU<sup>+</sup>HuCD<sup>+</sup>細胞/HuCD<sup>+</sup>細胞) が、*Ncx*<sup>-/-</sup> と WT の間に有意差は観察されなかった。



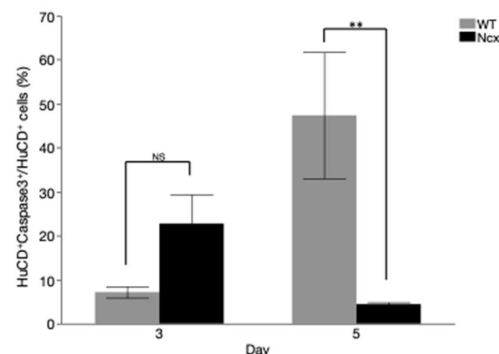
(図 5: EdU 陽性神経細胞とその割合)



同様に培養 3 日目または 5 日目に cleaved-caspase3 免疫染色を行い、cleaved-caspase3 陽性神経細胞の割合を測定することにより神経細胞死を評価した (cleaved-caspase3<sup>+</sup>HuCD<sup>+</sup>細胞/HuCD<sup>+</sup>細胞)。3 日目では有意な両者で有意な差はみられなかったが、5 日目では WT よりも *Ncx*<sup>-/-</sup> で cleaved-caspase3<sup>+</sup>HuCD<sup>+</sup>細胞の割合が低下しており、神経細胞のアポトーシスが抑制されていることがわかった。



(図 6: Caspase 陽性神経細胞数とその割合)



Ece11 はエンドセリン変換酵素 (ECE) ファミリーに属する膜結合メタロプロテアーゼである。神経損傷時に著明な発現上昇を示し、「damage-induced neuronal endopeptidase」(DINE) とも呼ばれる。Ece11 は、神経細胞死からの保護、末梢の運動神経の分岐形成、神経筋接合部の形成といった機能が報告されているが、その基質は未だ特定されておらず、腸管神経系での Ece11 の役割は調査されていない。

Ece11 を過剰発現させた細胞ではアポトーシス誘導刺激に抵抗性を示したことが報告されている。本研究で得られた結果から、*Ncx* ノックアウトにより Ece11 が過剰発現することで、正常な腸管神経細胞死が妨げられ、腸管神経過形成を引き起こす可能性が考えられた。

また、*Ece11* ノックアウトマウスは、神経の最終的な分岐が減少し、神経筋接合部の形成が損なわれ、横隔膜の機能不全から呼吸不全を起こし出生直後に死亡する。本研究で *Ncx*<sup>-/-</sup> 腸管神経初代培養ではシナプス形成数が減少していることが示され、Ece11 の過剰発現が異常なシナプス形成をもたらし、*Ncx*<sup>-/-</sup> マウスに腸管機能不全を起こしている可能性が考えられた。

これらの知見は、*Ncx* が発達中の腸管神経において、Ece11 発現を抑制し、シナプス形成と腸管神経細胞死を調節している可能性を示唆しており、腸管神経の発生に新たな知見を加えるとともに、ヒルシュスプルング病類縁疾患の一つである腸管神経形成異常症を含む、原因不明の腸管蠕動不全を起こす疾患の病因究明や新たな診断ツールとして役立つ可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 笈田 諭, 齋藤 武, 坂本 明美, 照井 慶太, 中田 光政, 小松 秀吾, 原田 和明, 秦 佳孝, 勝海 大輔, 古金 遼也, 藤村 理紗, 幡野 雅彦, 吉田 英生
2. 発表標題 胆道閉鎖症の病態形成における制御性T細胞の意義
3. 学会等名 第45回日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoru Oita, Takeshi Saito, Akemi Sakamoto, Keita Terui, Shugo Komatsu, Kazuaki Harada, Yoshitaka Shinno, Lisa Fujimura, Masahiko Hatano, Hideo Yoshida
2. 発表標題 Analysis of the frequency and function of regulatory T-cell using human
3. 学会等名 The Pacific Association of Pediatric Surgeons 52nd Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笈田諭、坂本明美、藤村理紗、齋藤武、照井慶太、中田光政、小松秀吾、菱木知郎、幡野雅彦
2. 発表標題 Ncx-/-マウスを用いた腸管神経異常疾患発症の分子機構解析
3. 学会等名 第57回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笈田諭, 照井慶太, 中田光政, 小松秀吾, 秦佳孝, 勝保善夫, 佐永田友季子, 小関元太, 齋藤武
2. 発表標題 口唇口蓋裂を共有する一絨毛膜二羊膜双胎の1児にのみ発症した胆道閉鎖症(BA)の1例
3. 学会等名 第46回日本胆道閉鎖症研究会
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
--	---------------------------	-----------------------	----