

機関番号： 82401
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20590204
 研究課題名（和文）
 腸神経細胞死とヒルシュスプルング病の発症機序に関する個体レベルの研究
 研究課題名（英文）
 Understanding the mechanisms underlying the pathogenesis of Hirschsprung disease
 研究代表者
 上坂 敏弘 (UESAKA TOSHIHIRO)
 独立行政法人理化学研究所・神経分化・再生研究チーム・研究員
 研究者番号： 90304451

研究成果の概要（和文）：

先天的に大腸下部の神経節の欠如により発症するヒルシュスプルング病（HSCR）の主な原因遺伝子である *Ret* の発現レベルが腸管ニューロンにおいて低下すると従来のアポトーシスとは異なる細胞死に至るのが、この細胞死が *Bcl-xL* の発現レベルを高めることで抑えることを見出した。さらにマウスにおいて細胞死を抑えることで HSCR 疾患モデルマウスの発症をほぼ完全に防ぐことができることを証明した。本研究により、神経栄養因子 *GDNF* シグナル不良による細胞死が HSCR 病の主な発症の原因であり、新たな治療法開発のための標的として期待されることを示した。

研究成果の概要（英文）：

RET tyrosine kinase is required for the development of the enteric nervous system (ENS). Hypomorphic *RET* alleles cause intestinal aganglionosis [Hirschsprung disease (HSCR)]. We have shown that elevated expression of *Bcl-xL* inhibits ENS precursor death in both *Ret*-null and hypomorphic states. Moreover, the prevention of cell death allows morphologically and functionally normal ENS formation in *Ret*-hypomorphic mice. These results indicate that ENS precursor death is a principal cause of intestinal aganglionosis in a *Ret* hypomorphic state, and suggest that the inhibition of cell death is a route to the prevention of HSCR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：ヒルシュスプルング病、Ret、細胞死、神経堤細胞、Bcl-xL、腸管ニューロン

1. 研究開始当初の背景

ヒルシュスプルング病（HSCR）はこれまで主に神経堤細胞の移行の異常により、大腸下部の神経節が欠如すると考えられていた。しかしながら、我々は近年、HSCRの原因遺伝子である *Ret* とレセプター複合体を形成する *Gfra1* を不活性化すると、大腸下部のニューロンが非アポトーシス様の細胞死によって消失することを見出した。このことから、RET シグナル不足による細胞死が大腸下部の神経節の消失という病因に大きく関与しているのではと考えた。

2. 研究の目的

Ret 遺伝子の発現低下が HSCR の主な原因である可能性が高いという報告に基づき、我々はマウスにおいて *Ret* 遺伝子を通常の30%に抑えることで HSCR の多くの特徴を満たす事を見出した。この疾患モデルマウスを用いて、*Ret* 遺伝子の発現低下による HSCR の発症メカニズムに細胞死が関与するかどうかを確かめる。次に疾患モデルマウスを用いて、細胞死を抑えることによって、神経節欠損の症状が出なくなるかどうか個体レベルで解析することを目指した。

3. 研究の方法

- (1) 腸管ニューロンを蛍光タンパク質で標識し、RET シグナルの減少により細胞死に至るかどうかを time-lapse 観察した。
- (2) 腸管ニューロンの初代培養系で Bcl-xL

の過剰発現により RET シグナル減少による細胞死が抑えられることが分かったので、Bcl-xL を *Ret* の遺伝子座にノックインして腸管ニューロンに Bcl-xL の発現を高めたマウス (Ret-Bcl-xL マウス) を作製した。

- (3) Ret-Bcl-xL マウスを用いて個体レベルで RET シグナル不良による細胞死が抑えられることを確認し、続いて HSCR 疾患モデルマウスで発症が抑えられるかどうか検証した。

4. 研究成果

- (1) HSCR 疾患モデルマウスにおいて、腸管ニューロン前駆細胞に蛍光タンパク質を発現させ、大腸における神経系の発生過程を組織培養系で time-lapse 観察したところ、ニューロン前駆細胞が消失することを見出した。さらに電子顕微鏡観察で非アポトーシス様の異常な形態の細胞を確認した。
- (2) HSCR 疾患モデルマウスの大腸において細胞死が生じている事を見出したが、同時に神経前駆細胞の移行の遅延も確認された。
- (3) 細胞死が発症にどの程度かかわっているのかを明らかにするために、マウスにおいて細腸管ニューロンの細胞死を抑える条件を検証したところ、Bcl-xL の発現レベルを高めることで RET シグナル不良による腸管ニューロンの消失が抑えられることを見出した。そこで、Bcl-xL を *Ret* の遺伝子座にノックインして腸管ニューロンに Bcl-xL の発現を高めたところ、*Ret* の不活性化による腸管ニューロンの細胞死がかなり抑えられることを明

らかにした。

- (4) マウスにおいて Bcl-xL の発現レベルを高めることで RET シグナル不良による腸管ニューロンの消失が抑えられることを見出し、さらに細胞死を抑えることで、神経前駆細胞の移動の遅延は改善されないが、HSCR 疾患モデルマウスの発症をほぼ完全に抑え生存率が有意に改善された(図1)。このことから、RET シグナル不良による細胞死が HSCR 病の主な発症の原因であり、新たな治療法開発のための標的として期待されることを示した。

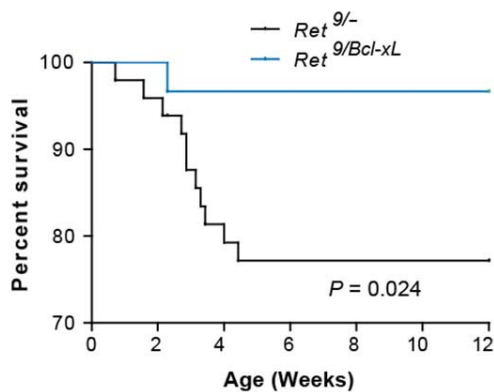


図1 HSCR 疾患モデルマウス (*Ret*^{9/-}) と Bcl-xL の発現を高め細胞死が抑えられた HSCR 疾患モデルマウス (*Ret*^{9/Bcl-xL}) の生存曲線

HSCR 疾患モデルマウスでは、発症率 46% で大腸下部の腸管神経節が欠損しているため、便の通過障害が生じ、死亡するケースもあるが、Bcl-xL により細胞死を抑えた疾患モデルマウスでは発症が抑えられ、生存率が有意に改善された。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Uesaka T and Enomoto H. Neural precursor death is central to the pathogenesis of intestinal aganglionosis in Ret hypomorphic mice. *J. Neurosci.* 30:5211-5218, 2010. 査読有
2. Uesaka T, Nagashimada M, Yonemura S, Enomoto H. Diminished Ret expression compromises neuronal survival in the colon and causes intestinal aganglionosis in mice. *J. Clin. Invest.* 118:1890-1898, 2008. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. Uesaka T and Enomoto H. Neural precursor death is central to the pathogenesis of intestinal aganglionosis in Ret hypomorphic mice. Gordon Research Conference Neurotrophic Factors, June 2009, Newport, RI, USA.
2. Uesaka T and Enomoto H. Bcl-xL-mediated rescue of aganglionosis in a mouse model for Hirschsprung disease. 第 3 2 回日本神経科学会、9 月 2009, 名古屋.
3. Uesaka T and Enomoto H. Bcl-xL-mediated rescue of enteric nervous system formation in a mouse model for Hirschsprung disease. 2nd International Symposium: Development of the Enteric Nervous System-Cells, Signals and Genes. February 2009, London, UK.
4. Uesaka T and Enomoto H. Multiple roles of GDNF signaling in development of the enteric nervous system. 第 3 1 回日本神経科学会、7 月 2008, 東京.

[図書] (計 2 件)

1. 上坂敏弘、榎本秀樹 神経栄養因子によるニューロンの維持と細胞死 実験医学増刊「細胞死研究総集編」28:101-108,2010
2. 上坂敏弘、榎本秀樹 ヒルシュスプルング病の発症メカニズム解明につながるモデルマウスの開発 分子消化器病 5:94-96, 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上坂 敏弘 (UESAKA TOSHIHIRO)
独立行政法人理化学研究所・神経分化・再生
研究チーム・研究員
90304451

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者