

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08355

研究課題名(和文) 迷走神経遠心性神経による消化管SIP Syncytium制御機構の解析

研究課題名(英文) The interaction between vagal efferent nerves and gut motility SIP syncytium regulation system

研究代表者

玉田 宏美 (Tamada, Hiromi)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：60712817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、消化管の内在性運動制御機構(Smooth muscle cells - interstitial cells of Cajal - PDGFR cells syncytium: SIP Syncytium)と中枢神経とのインタラクションの構造基盤を理解するため、FIB/SEM(Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy)を用いた解析を行った。その結果、迷走神経運動神経線維は、胃のみならず小腸や大腸にも投射していることを明らかにし、それらに注目したFIB/SEM解析を展開することで、それらの新しい形態所見や細胞間連絡様式を提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管は日常的な不調も身近なものであり、特に脳との関係は近年腸内細菌叢の観点からも注目されている。これらの構造基盤の理解は、時間・部位特異的に複雑な消化管運動機能の説明を可能にし、それらに付随する疾患や不調に対するアプローチなどの臨床応用を加速する可能性も期待できる。

また、迷走神経の走行部位である腸間膜の研究に関しては、炎症や外科手術などによる物理的な刺激も受けやすく、損傷後の修復の加速が急がれるほか、スムーズな消化管運動の維持には最適な組織構造を維持する必要がある。本研究で明らかにされたマクロファージに着眼することでこれらの制御が可能になることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, the morphological interactions between intrinsic gut motility regulation system and central nervous system were explored with FIB/SEM (Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy). Vagal efferent nerves were certainly run into not only the stomach but also the small and large intestine. Furthermore, the detail three-dimensional ultrastructure images showed completely new images about cell-cell interactions and explored the details of nerves making contacts with several coordinating cells, like interstitial cells of Cajal (ICC). These results could be usable information to understand very complicated gut motility and could be new approaches for gut disorders.

As for the pathway of vagal nerves running into the gut, mesentery was also focused. In this region, some specific macrophages were detected and their response under injured condition was also characteristic. Some injury model studies suggested that these responses might be critical for recovery.

研究分野：細胞組織学

キーワード：脳腸関連 SIP Syncytium FIB/SEM 腸間膜 マクロファージ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

消化管は、腸管神経系と呼ばれる非常に発達した独自の神経回路が存在するとともに、平滑筋細胞や、ペースメーカー細胞として知られるカハールの介在細胞などが協調して(Smooth muscle cells - interstitial cells of Cajal - PDGFR cells syncytium: SIP Syncytium)、複雑な消化管運動を制御している。これらは、中枢神経から独立して機能することができるが、当然のことながら脳からの影響も受けており、近年では腸内細菌叢との関連から脳腸連関は特に注目されている。しかしながら、これらが構成する複雑な消化管運動制御機構の調整に、中枢神経系がどのように関与しているかは不明な点は多い。これまでの研究では、中枢神経系からの交感・副交感神経支配による消化管機能の亢進・抑制に注目したもの、あるいは消化管を体内から取り出し、中枢神経支配を受けない環境下での研究がほとんどであった。そこで本研究では、消化管内におけるこれらの神経要素や細胞間の相互作用を理解することを目指し、新たな中枢性の腸管運動制御の仕組みを説明するための構造基盤を明らかにする。

### 2. 研究の目的

本研究では、マウス小腸を用い、そこに投射する副交感遠心性神経である迷走神経 Vagal nerve を対象として以下の研究を行う。

#### 研究目的 (1) Vagal Nerve と内在性消化管制御機構との間のコネクティブ解析

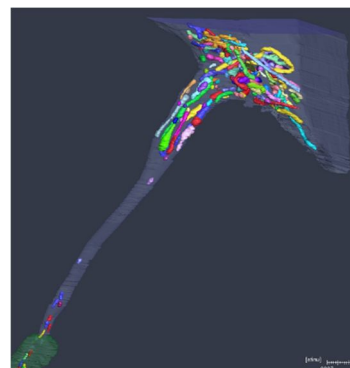
Vagal nerve の遠心性神経線維と SIP Syncytium の消化管内での形態的インタラクションを、先端電子顕微鏡イメージング法である光電子相関顕微鏡観察法 (Correlative Light and Electron Microscopy: CLEM) (脚注 1) および FIB/SEM (Focused Ion Beam / Scanning Electron Microscopy) により解析を行う(脚注 2)。この方法を用いることで、極めて細い突起による細胞連絡や細胞間連絡における細胞内構造、膜の連絡様式などを三次元的に理解することができる。

(脚注 1) 光電子相関顕微鏡法 (Correlative Light and Electron Microscopy: CLEM)

近年、後述する三次元電子顕微鏡観察法の発展に伴い、予めタンパク発現を光学顕微鏡で同定後、同一の場所を電子顕微鏡で解析する CLEM と呼ばれる解析技法が確立されつつある。

(脚注 2) FIB/SEM (Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy :FIB/SEM)

三次元電子顕微鏡観察法 (Serial Section SEM: SSSEM) の一つで、イオンビームを用いて顕微鏡内で連続的に新しい面を製作し、走査型電子顕微鏡での撮像を繰り返すことで、膨大なボリュームの X,Y,Z 平面電顕像を取得することができ、立体微細構造 (細胞内オルガネラなど) を得ることができる。



神経細胞軸索起始部 (Axon initial segment: AIS) の全長とその中に含まれるミトコンドリア分布の詳細 (Tamada et al 2017 J Comp Neurol: Tamada 2023 Anat Sci Int)

#### 研究目的 (2) Vagal Nerve 流入の場である腸間膜構成細胞の解析

vagal nerve は腸間膜を介して腸に至り、筋層内に侵入してくる。そこには、血管の流入も伴い、腸間膜は消化管内外をつなぐ移行の場である。そのことから、免疫制御の観点からも重要な場であると考えられることができ、さらに特徴的なマクロファージの存在が予備実験で明らかになっている。そこで、これらの細胞の細胞特性を免疫組織化学的手法と損傷時応答を理解することにより、消化管と内外とのインタラクションの統合的な理解を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) CLEM、FIB/SEM を用い Vagal nerve-SIP Syncytium 間インタラクションの有無を微細構造レベルで解析

順行性トレーサ Dextran または膜タンパクに移行する GFP を発現するウイルス(AAV-palGFP)を、迷走神経遠心性神経の中枢である迷走神経背側核に injection することにより、消化管筋層間神経叢に投射する遠心性 Vagal nerve と ICC および Fibroblast-like cells などの間葉系細胞とのインタラクションを光学顕微鏡レベルで解析する。さらに、上記で蛍光標識した vagal nerve の位置を同定後 FIB/SEM により微細構造レベルのインタラクションを解析する (CLEM)。その後、画像解析ソフトウェア Amira / Dragonfly などで区画化 (Segmentation) 後、三次元再構築像を得る。

## (2) 腸間膜損傷時の漿膜および腸間膜内の細胞の解析

正常時および損傷時の漿膜・腸間膜内の細胞特性を免疫組織学的手法および遺伝子発現解析を行う。特にこの部分に分布するマクロファージや損傷後修復に必要な線維構造を産生するための線維芽細胞などの応答や修復への影響について注目する。

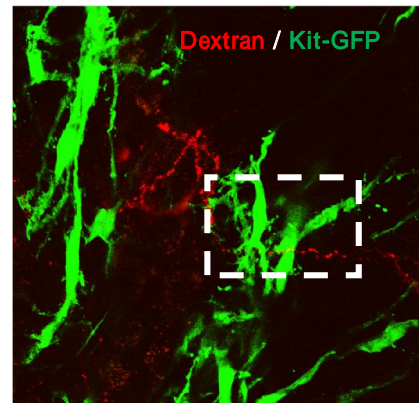
## 4. 研究成果

### (1) Vagal Nerve の消化管への投射および間葉系細胞とのインタラクション

DMNV にトレーサ (Dextran や AAV-palGFP) をインジェクションしたのち、3 週間で、胃、小腸、大腸に蛍光を発現した線維が流入していくことを示すことができた。通常、迷走神経支配は胃では発達していることはよく知られているが、小腸や大腸部分でも数本の線維が神経節に入り込む様子が観察された。このことから、迷走神経知覚枝だけでなく、運動枝も上部消化管、下部消化管を通して神経支配をもたらしていることが分かった。また、ICC に GFP が発現しているトランスジェニックマウス (Kit-copGFP) にインジェクションを行うことにより、その神経線維が ICC にも接着することを示唆する所見も得ることができた。それを蛍光顕微鏡にて観察して物理的マーキングを施した後、FIB/SEM 用のサンプルとして作成した。

特に ICC とのインタラクションに注目し、FIB/SEM 画像から三次元微細構造解析を進めた結果、様々な種類の神経線維 (数珠状構造形成の有無・シナプス小胞の形状・ミトコンドリアの有無などで分類可能) が多数、特徴的な傾向をもってコンタクトしていることや、平滑筋細胞とのコンタクトについても特徴的な傾向を捉えることができ、定量的評価につなげている。

これらの構造基盤の理解は、時間・部位特異的に複雑な消化管運動機能の説明を可能にし、それらに付随する疾患や不調に対するアプローチなどの臨床応用を加速する可能性も期待できる。



Kit-copGFP マウスの DMNV に赤の蛍光 (TexasRed) が付与された Dextran をインジェクションした後の消化管像。点線四角で囲んだ部分で、ICC と外来性の神経線維のコンタクトが見られる。

### (2) 腸間膜に分布する細胞特性とマクロファージの損傷時応答

腸間膜内に分布するマクロファージは、マクロファージマーカーとしては比較的珍しいリンパ管内皮細胞マーカーとして知られる Lyve-1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1) を、一般的なマーカーである CD206 と同時に発現していることが明らかになった。さらに、腸間膜の損傷後には、CD206 を発現するマクロファージは損傷部位に凝集するにも関わらず、Lyve-1 の発現は消失することが分かった。修復時のタイムコースを追った解析を行うことにより、この応答に関連した線維芽細胞 (PDGFR 陽性細胞) の活性化とのインタラクションも捉えることができ、損傷からの修復に必要とされる応答であることが示唆された。

腸間膜は炎症や外科手術などによる物理的な刺激も受けやすく、損傷後の修復の加速が急がれ、また、スムーズな消化管運動の維持には最適な組織構造を維持する必要がある。本研究で明らかにされたマクロファージに着眼することにより、これらの制御が可能になることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tamada H	4. 巻
2. 論文標題 Three-dimensional ultrastructure analysis of organelles in injured motor neuron.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anat Sci Int	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12565-023-00720-y	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 -
1. 著者名 Tamada Hiromi, Kiryu Seo Sumiko, Sawada Sohgo, Kiyama Hiroshi	4. 巻 529
2. 論文標題 Axonal injury alters the extracellular glial environment of the axon initial segment and allows substantial mitochondrial influx into axon initial segment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 3621 ~ 3632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.25212	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato T, Konishi H, Tamada H, Nishiwaki K, Kiyama H	4. 巻 384(1)
2. 論文標題 Morphology, localization, and postnatal development of dural macrophages.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res	6. 最初と最後の頁 49-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-020-03346-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Elgendy Mahmoud, Tamada Hiromi, Taira Takaya, Iio Yuma, Kawamura Akinobu, Kunogi Ayusa, Mizutani Yuka, Kiyama Hiroshi	4. 巻 396
2. 論文標題 Dynamic changes in endoplasmic reticulum morphology and its contact with the plasma membrane in motor neurons in response to nerve injury	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 71 ~ 84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-024-03858-x	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 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 玉田 宏美、木山 博資
2. 発表標題 先端電子顕微鏡技術FIB/SEMを用いた損傷神経細胞のオルガネラ形態解析
3. 学会等名 第95回日本生化学大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉田 宏美、桐生 寿美子、沢田 蒼梧、木山 博資
2. 発表標題 Morphological analyses for mitochondrial localization in the axon initial segments (AIS) of nerve injured-motor neuron and microglial activation around AIS
3. 学会等名 第45回日本神経科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉田 宏美、片岡 直也、中村 和弘、飯野 哲、木山 博資
2. 発表標題 消化管外来性神経支配ネットワークの三次元コネクトミクス解析
3. 学会等名 第64回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉田 宏美、飯野 哲、木山 博資
2. 発表標題 消化管壁内における中枢神経 内在性神経制御機構相互連関の形態解析
3. 学会等名 第82回日本解剖学会中部支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉田 宏美
2. 発表標題 脳 腸管神経制御機構コネクトミクス解析
3. 学会等名 第9回平滑筋学会若手の会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉田 宏美、木山 博資
2. 発表標題 神経細胞損傷時におけるオルガネラ形態変化のFIB/SEM解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉田 宏美、木山 博資、飯野 哲
2. 発表標題 腸間膜内Lyve-1陽性マクロファージと線維芽細胞による損傷応答
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 玉田 宏美、木山 博資
2. 発表標題 小腸腸間膜 LYVE-1+マクロファージの損傷時応答
3. 学会等名 第63回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉田 宏美、木山 博資
2. 発表標題 小腸腸間膜内LYVE-1 + マクロファージの細胞特性と損傷応答
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉田宏美、木山博資
2. 発表標題 マウス小腸腸間膜内マクロファージの分布および損傷応答の形態学的解析
3. 学会等名 第62回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 玉田 宏美、片岡 直也、中村 和弘、木山 博資、飯野 哲
2. 発表標題 間葉系細胞 中枢神経 腸管神経制御機構コネクトミクス解析への挑戦
3. 学会等名 第65回日本平滑筋学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 玉田 宏美、片岡 直也、中村 和弘、飯野 哲、木山 博資
2. 発表標題 消化管壁内の迷走神経運動神経線維と腸管神経系制御機構の形態学的インタラクションの微細構造解析
3. 学会等名 第76回自律神経学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 玉田 宏美
2. 発表標題 先端電子顕微鏡を用いたオルガネラ研究とコネクトミクス研究
3. 学会等名 第2回神経化学会若手KYOUEN (招待講演)
4. 発表年 2024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

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