

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15902

研究課題名（和文）小腸粘膜内神経ネットワークの構造とその形成過程の解明

研究課題名（英文）Elucidation of structure of mucosal nerve network in small intestine and its formation process

研究代表者

万谷 洋平（Youhei, MANTANI）

神戸大学・農学研究科・助教

研究者番号：30724984

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）：本研究では、serial block face走査型電子顕微鏡（SBF-SEM）を駆使した組織学的解析により、小腸および大腸粘膜内神経ネットワーク構造の特徴やその形成過程についての成果を得ることができた。小腸の粘膜内神経ネットワークを解析した結果、腸絨毛頂部では複雑に分岐する神経ネットワーク構造が形成されることが示された。神経線維の接触する細胞種を定量すると、腸絨毛頂部において線維芽細胞様細胞（FBLC）type III、FBLC type IV、マクロファージ様細胞への接触が豊富に観察された。また大腸の解析も実施することで、腸管各部位の粘膜内神経ネットワーク構造の特徴の部位差も解明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管神経系（ENS）は、腸管内の生理機能を調節する極めて重要な神経系である。本研究では、腸管粘膜内の神経ネットワーク構造について、三次元電子顕微鏡技術を用いることで緻密に明らかにすることができた。その結果、粘膜内神経ネットワークは、とくに一部の細胞種と頻繁に物理的に接触することが示された。従来ENSは傍分泌を介して拡散性に神経支配するとされているが、本結果はENSが物理的な接触を介した新たな神経支配も有する可能性を示している。その支配様式や、支配細胞を今後詳細に調べることにより、腸管粘膜内神経の役割解明がさらに進み、ENSの関与が疑われる腸疾患の病態解明や治療戦略につながることも期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, the characteristics of mucosal nerve network in the small and large intestine were clarified using serial block-face scanning electron microscopy (SBF-SEM). SBF-SEM analysis with small intestine revealed that mucosal nerve network was well-developed with complicatedly branching in the apical portion of the intestinal villus. Histological measurement revealed that nerve fibers were in abundant contact with the fibroblast-like cells (FBLC) type III, FBLC type IV, and macrophage-like cells in the apical portion of the intestinal villus. We analyzed mucosal nerve network in the large intestine, so that regional difference in the mucosal nerve network throughout intestine was also clarified.

研究分野：動物組織学

キーワード：腸管神経系 電子顕微鏡 組織学 腸管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸管粘膜内には神経ネットワークが形成されており、小腸粘膜内の上皮下線維芽細胞への神経線維の近接が報告される等、特定の細胞への神経投射が想定されている。しかしながら、粘膜内には免疫系を含む種々雑多な細胞集団が密在しているために、粘膜内神経ネットワークの接続構造や接続対象を評価することは困難であった。申請者は小腸粘膜における線維芽細胞様細胞について、serial block face 走査型電子顕微鏡 (SBF-SEM) による三次元超微形態学的解析を実施した経験から、この解析が腸管粘膜内神経ネットワーク構造の解析に極めて有用である、との着想を得た。

2. 研究の目的

本研究課題では、SBF-SEM を駆使した組織学的解析により、「小腸粘膜内には、どのような神経ネットワーク構造が存在するかについて形態学的、組織学的に解明すること」を第一の目的とする。さらに、「発生過程においてその神経ネットワーク構造が形成されるプロセスを明らかにすること」を第二の目的とする。

3. 研究の方法

1) 腸管粘膜内細胞集団の組織学的解析

腸管粘膜内には、種々の細胞種が混在していることから、粘膜内神経ネットワークが密接な関係性を築く細胞種を解析するためには、腸管粘膜内細胞集団についての基盤的な組織学的情報が必要になる。そこで、免疫染色および SBF-SEM 解析により、線維芽細胞様細胞 (FBLC)、マクロファージなどの組織学的特徴を調べた。

2) 腸管各部位の粘膜内神経ネットワーク構造の三次元超微形態解析

小腸、大腸各部位 (盲腸、結腸) の粘膜内神経ネットワーク構造について、各種神経関連マーカーに対する免疫染色および SBF-SEM 解析により調べた。とくに、神経ネットワーク構造の複雑さや、粘膜内細胞との接触関係に着目して調べた。また、粘膜内グリア細胞 (mEGC) が腸管各部位でどのように分布し、どのように神経ネットワークを被鞘しているかについても調べた。

3) 小腸粘膜内神経ネットワーク構造の形成過程の解析

上記で明らかにした粘膜内神経ネットワーク構造が、胎子期および新生子期にどのように形成されるのかについて、各種神経関連マーカーに対する免疫染色ないし SBF-SEM 解析により調べた。

4. 研究成果

「研究の方法」の番号と対応させて記載する。

- 1) 代表者は、小腸粘膜内における FBLC が、超微形態や局在の観点から、大きく四種類に分類されることを報告している (Mantani *et al.*, 2019, *J. Vet. Med. Sci.*, 81(3): 454-465)。そこで本研究期間には、大腸各部位 (盲腸、上行結腸、下行結腸) における FBLC 集団の特徴を精査した。その結果、Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) α +FBLC には、大腸各部位間で大きな部位差が認められない一方、CD34+FBLC 数は後位に向かうほど増加し、さらに局在範囲も広くなることが示された。さらに、CD34+FBLC が多く局在する腸陰窩底部側を盲腸と下行結腸間で SBF-SEM 解析により比較解析したところ、FBLC 集団は上皮下 FBLC と非上皮下 FBLC (lamina propria FBLC) に分類された。盲腸の lamina propria FBLC は小胞体の拡張したものが多く、下行結腸の lamina propria FBLC には拡張度の低い小胞体が認められ、様々な拡張度の小胞体を有する細胞が認められた。以上から、大腸粘膜の FBLC 集団には、とくに腸陰窩底部側において、数、局在、超微形態の観点から部位差が存在することが示された (Tamura *et al.*, 2022, *Cell Tissue Res*, 389(3):427-441)。

次いで、FBLC と同様に腸管粘膜固有層内の主要な細胞種の 1 つであるマクロファージについても組織学的解析を実施した。その結果、小腸マクロファージには、CD68+CD4⁺、CD68+CD4⁻、CD163+CD4⁺などの複数のサブセットが存在することが示され、腸絨毛では CD68+CD4⁺細胞が CD163+CD4⁺細胞に比べて有意に多いのに対し、腸陰窩周囲では両者の間に有意な差は認められず、サブセットごとに異なる局在パターンを示すことが示された。次に、豊富なリソソームと空胞を有する不定形細胞をマクロファージの候補 MLC として定義し、SBF-SEM により解析を行った。その結果、MLC 集団には、超微形態と局在部位の観点から、type I~III の三種類の細胞が存在することが示された。Type I および II は腸絨毛に存在し、type III は腸陰窩周囲に存在していた。とくに腸絨毛頂部の MLC type I は、他の type に比べて豊富なリソソームを有していた。以上の情報を考慮すると、MLC type I は CD68+CD163⁻サブセット、MLC type III は CD68+CD163⁺サブセットに相当することが想定され、小腸粘膜マクロファージには超微形態、細胞組成などの観点から腸絨毛 腸陰窩軸に

沿って領域差が存在することが示唆された (Mantani *et al.*, 2021, *Cell Tissue Res*, 385(3):697-711)。また大腸各部位 (盲腸および結腸) でも, 同様の解析を実施し, 大腸粘膜マクロファージ集団には部位差が存在することも明らかにした (村瀬ら, 第 165 回日本獣医学会学術集会, 論文執筆中)。

- 2) SBF-SEM による三次元超微形態解析により, 小腸粘膜の①腸絨毛頂部, ②腸絨毛基部, ③腸陰窩側面, ④腸陰窩底部の神経ネットワークを解析した結果, 腸絨毛頂部では複雑に分岐する神経ネットワーク構造が形成されることが示された。さらに, 神経線維束から分岐する神経線維も, 腸絨毛頂部で頻りに観察された。神経線維が粘膜内で接触する細胞を解析したところ, 粘膜上皮への接触は極めて稀であり, 主に粘膜固有層内の細胞に接触することが示された。また, その接触は腸絨毛頂部において, 他の部位よりも豊富に観察された。次いで神経線維の接触する細胞種を定量すると, 腸絨毛頂部において FBLC type III (上皮下 FBLC), FBLC type IV, MLC への接触が豊富に観察された。また腸陰窩周囲では, FBLC type II への接触が多いこともわかった。さらに, それらの接触箇所に見られる神経線維は, 神経伝達部位の指標となる膨隆構造を有するものを含んでいた。以上のことから, 小腸粘膜内神経ネットワーク構造の特徴を超微形態学的に網羅的に解明できた (Nakanishi *et al.*, 2020, *J. Vet. Med. Sci.*, 82(7): 990-999)。

次いで, 盲腸および下行結腸における粘膜内神経ネットワークについても組織学的解析を行った。各種神経関連マーカーの局在を免疫組織化学の酵素抗体法により定量解析したところ, 大部分の神経関連マーカーの陽性頻度は盲腸と下行結腸で差がないものの, vasoactive intestinal peptide (VIP) の陽性頻度は盲腸で高頻度であることが示された。さらに SBF-SEM により両部位の粘膜内神経ネットワーク構造を比較したところ, 下行結腸のとくに内腔側において, 盲腸よりも複雑な神経ネットワーク構造が発達することが示された。次いで, 小腸と同様に, 神経線維の接触する細胞を解析したところ, 盲腸, 下行結腸ともに, 腸陰窩底部側に比べて内腔側で豊富な接触が認められた。その主要な接触細胞は, 両部位ともに上皮下 FBLC, lamina propria FBLC, マクロファージであった。その接触面積についても解析したところ, とくに盲腸において極めて広い接触面でマクロファージに接触していることが示された。以上の結果から, 大腸内の粘膜内神経ネットワークには, 部位間での普遍性と相違点が存在することが示され, とくに盲腸では神経ネットワークと免疫系との密な関係性が成立することも示された (Nakanishi *et al.*, 2023, *J. Vet. Med. Sci.*, 85(2): 123-134)。

さらに, 粘膜内グリア細胞 (mEGC) についても, 各種グリアマーカー (SOX10, S100 β など) に対する免疫組織化学と SBF-SEM 解析を行った。その結果, 小腸, 盲腸, 下行結腸間において, mEGC の局在部位と, その細胞が形成する被鞘構造には部位差が存在することが示された (万谷ら, 第 164 回日本獣医学会学術集会, 論文執筆中)。

- 3) 上記で明らかにした小腸および大腸各部位の神経ネットワーク構造について, 胎子期および新生子期における形成過程を, 免疫組織化学ないし SBF-SEM 解析により調べた。新生子期の小腸について先行して解析したところ, 回腸の粘膜内神経ネットワークは, 生後から 2 週齢にかけて急激に発達すること, さらにその粘膜内における密度は 4 週齢にかけて減少することが示された (Morishita *et al.*, International Federation of Associations of Anatomists 2022 他学術集会で公表済み, 論文執筆中)。現在, 新生子期の小腸各部位の粘膜内神経ネットワーク構造, 胎子期の小腸粘膜内神経ネットワーク構造の形成過程について解析を進めており, 順次公表予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 MANTANI Youhei, SAKATA Nanami, KUBOTA Naoto, SHIMADA Asaka, NAKANISHI Satoki, YOKOYAMA Toshifumi, HOSHI Nobuhiko.	4. 巻 -
2. 論文標題 Diurnal changes in bacterial settlement on the Peyer's patch and surrounding mucosa in the rat ileum and its effect against the intestinal immune system	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	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/s00441-023-03772-8	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 該当する
1. 著者名 NAKANISHI Satoki, MANTANI Youhei, OHNO Nobuhiko, MORISHITA Rinako, YOKOYAMA Toshifumi, HOSHI Nobuhiko	4. 巻 85
2. 論文標題 Histological study on regional specificity of the mucosal nerve network in the rat large intestine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 123 ~ 134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.22-0433	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 TAMURA Saki, MANTANI Youhei, NAKANISHI Satoki, OHNO Nobuhiko, YOKOYAMA Toshifumi, HOSHI Nobuhiko	4. 巻 389
2. 論文標題 Region specificity of fibroblast-like cells in the mucosa of the rat large intestine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 427 ~ 441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-022-03660-7	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 Sakata Nanami, Mantani Youhei, Nakanishi Satoki, Morishita Rinako, Yokoyama Toshifumi, Hoshi Nobuhiko	4. 巻 389
2. 論文標題 Histological study of diurnal changes in bacterial settlement in the rat alimentary tract	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 71 ~ 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-022-03626-9	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 NAKANISHI Satoki、MANTANI Youhei、HARUTA Tomohiro、YOKOYAMA Toshifumi、HOSHI Nobuhiko	4. 巻 82
2. 論文標題 Three-dimensional analysis of neural connectivity with cells in rat ileal mucosa by serial block-face scanning electron microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 990 ~ 999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.20-0175	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 Mantani Youhei、Haruta Tomohiro、Nakanishi Satoki、Sakata Nanami、Yuasa Hideto、Yokoyama Toshifumi、Hoshi Nobuhiko	4. 巻 385
2. 論文標題 Ultrastructural and phenotypical diversity of macrophages in the rat ileal mucosa	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 697 ~ 711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-021-03457-0	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 -

〔学会発表〕 計13件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Morishita R, Mantani Y, Nakanishi S, Yokoyama T, Hoshi N
2. 発表標題 Histological study on postnatal changes of the nerve network in the rat ileal mucosa.
3. 学会等名 International Federation of Associations of Anatomists 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村瀬翔大, 万谷洋平, 大野伸彦, 中西怜稀, 横山俊史, 星信彦
2. 発表標題 Serial block-face 走査型電子顕微鏡を用いたラット大腸粘膜におけるマクロファージの超微形態学的部位差に関する研究
3. 学会等名 第98回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島田農香, 万谷洋平, 中西怜稀, 横山俊史, 星信彦
2. 発表標題 ラット腸管における免疫担当細胞の局在への日常的な細菌刺激の影響に関する予備的解析
3. 学会等名 第98回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森下理奈子, 万谷洋平, 中西怜稀, 横山俊史, 星信彦
2. 発表標題 ラット回腸粘膜内神経ネットワークの生後変化に関する組織学的研究
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村瀬翔大, 万谷洋平, 大野伸彦, 中西怜稀, 横山俊史, 星信彦
2. 発表標題 ラット大腸粘膜におけるマクロファージの組織学的部位差に関する研究
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森下理奈子, 万谷洋平, 中西怜稀, 横山俊史, 星 信彦
2. 発表標題 ラット回腸粘膜内神経ネットワークの生後変化に関する予備的解析
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中西怜稀, 万谷洋平, 大野伸彦, 横山俊史, 星信彦
2. 発表標題 ラット大腸の粘膜内神経ネットワークに関する組織学的研究
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 万谷洋平, 中西怜稀, 大野伸彦, 春田知洋, 横山俊史, 星 信彦
2. 発表標題 ラット腸管における粘膜内グリア細胞に関する組織学的研究
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中西 怜稀, 万谷 洋平, 大野 伸彦, 横山 俊史, 星 信彦
2. 発表標題 Serial block-face走査型電子顕微鏡を用いたラット大腸粘膜における神経ネットワークに関する研究
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂田奈那美, 万谷洋平, 中西怜稀, 横山俊史, 星 信彦
2. 発表標題 ラット消化管各部位の粘膜上皮表面における常在細菌の定着程度の日内変動に関する組織学的解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土居萌花, 万谷洋平, 中西怜稀, 坂田奈那美, 横山俊史, 星 信彦
2. 発表標題 腸管各部位の集合リンパ小節における細網細胞の部位差に関する免疫組織化学的研究
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 万谷洋平, 田村彩貴, 大野伸彦, 横山俊史, 星 信彦
2. 発表標題 ラット大腸粘膜における線維芽細胞様細胞の部位差に関する組織学的研究
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂田奈那美, 万谷洋平, 中西怜稀, 横山俊史, 星 信彦
2. 発表標題 ラット消化管粘膜上皮表面における常在細菌の定着程度の概日リズムに関する定量組織学的解析
3. 学会等名 第96回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2020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
研究協力者	大野 伸彦 (OHNO Nobuhiko)		

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
研究協力者	春田 知洋 (HARUTA Tomohiro)		

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