

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591969

研究課題名(和文) ES腸管を利用した選択的神経分化法の確立

研究課題名(英文) Selective neural differentiation method using ES gut

研究代表者

三澤 裕美 (Misawa, Hiromi)

奈良県立医科大学・医学部・その他

研究者番号：50281275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胚性幹(ES)細胞から「蠕動様」の運動を発生する腸管(ES腸管)を安定してつくること
ができる。この腸管には「蠕動様」運動を発生させるペースメーカー細胞(ICC)は分化誘導因子なしで安定的に分化誘
導させることができる。

本研究では、このES腸管の作成過程で特定の神経分化誘導因子(セロトニン4受容体刺激薬)を作用させ、より完全な
蠕動運動を示すES腸管の作成に成功した。

この研究成果は腸壁内神経欠損による腸疾患の病態解明や治療への手がかりとなりうる。

研究成果の概要(英文)：From mouse embryonic stem (ES) cells, the gut-like organ expressing peristalsis-li
ke movements could be stably formed. In this gut, pacemaker cells (ICC) generating peristalsis-like moveme
nts could be stably differentiated without any differentiation inducing factors.

In the present study, during the process forming the ES gut, a special neuron differentiation inducing fac
tor (serotonin 4 receptor agonist) was applied, succeeding in formation of ES guts expressing more perfect
peristalses.

The results of this study would provide many hints to clarify the conditions and explore therapies of bowe
l diseases lacking enteric neurons.

研究分野：生理学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胚性幹細胞 ES腸管 セロトニン4受容体 腸壁内神経

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の再生医学のめざましい発展により、ES 細胞から様々な『細胞』が *in vitro* で分化誘導できることが判ってきたが、ES 細胞が器官である腸管へ分化するという報告はなかった。しかし、我々は ES 細胞から *in vitro* で腸管を分化誘導することに世界で初めて成功した (Stem Cells, 2002)。我々が分化誘導した腸管 (以下、ES 腸管) は、「蠕動様」運動 (完全な蠕動ではない) を発生し、電気生理学的にも運動に連動した活動電位が認められた。さらに、正常腸管の pacemaker 細胞として知られるカハール間質細胞 (ICC 細胞) に特徴的な pacemaker 電位や Ca^{2+} オシレーションも検出された。事実よく発達した ICC 細胞のネットワーク構造が存在した (AJP Cell Physiol, 2004)。もちろん、上皮細胞や、杯細胞も認められた (Stem Cells, 2002)。さらに、Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) を適切に処理することにより腸壁内神経系を分化させることに成功し刺激に対する Ca^{2+} 上昇反応も得られた (Stem Cells, 2006)。

(2) 最近、我が国で、マウス体細胞に 4 つの因子 (Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4) をレトロウイルスベクターで導入することにより、この ES 細胞と同様の形態や増殖能をもった人工万能幹細胞 (iPS 細胞) を樹立することに成功したが (Nature, 2007)、その iPS 細胞からも c-kit 陽性、NF 陽性細胞を含む腸管様構造物の分化誘導がなされた (Ueda T et al. Biochem Biophys Res Commun. 2010)。但し、誘導された腸管様構造物の運動機構については検証されていない。

2. 研究の目的

(1) これまでの ES 腸管の研究の集大成として、さらには可能であれば iPS 腸管というあらたな研究対象について、「適切な神経分化誘導因子により選択的な神経を分化誘導させた腸管の作成」を行い、重要な生理学的機能である運動機能に対する神経の役割を明らかにする。さらに、実験を進める中で解明される神経の発生機構を応用し、ヒルシユスプルグ病の治療法を探り、また、加齢に伴う神経減少による排便障害の治療や、消化管損傷や手術による排便機能低下からの回復促進等への応用について検討する。

(2) さらに、本研究は、基礎生物学的にも、臨床医学的にも、意義あるのみならず、様々な神経欠損による腸疾患 (老齢やヒルシユスプルグ病も含まれる) の病態解明と発生・再生医学を応用した 21 世紀の新たな治療戦略の展開に資することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 胚様体 (EB) ボールから腸管様器官を作製する。ES 細胞は、理化学研究所発生・再生化学総合センター多能性幹細胞研究チーム丹羽仁史先生より供与してもらった ES 細胞

を用いる。iPS 細胞は京都大学産官学連携本部に誓約書を送付後、理研 BRC の HP から入手した同意書が受理されると理研 BRC から実費で提供を受けることができるが iPS 腸管の論文発表がなされてしまったので我々が優位性を持っている ES 細胞にしばって実験を進めた。

(2) 細胞の未分化維持のための培養は、10%FBS/ES-DMEM 培養液に分化抑制因子として Leukemia Inhibitory Factor (LIF) を添加し、5%CO₂ の条件下でインキュベートする。EB ボールは、LIF 無添加培養液を用いてディッシュ上で浮遊培養して作製する。6-7 日後に LIF 非存在下のハンギングドロップ中で分化した EB を回収後、付着培養する。培養 14-21 日間で動き始める ES 腸管を作製する (Stem Cells 20: 41-49, 2002; AJP Cell Physiol 286: C1344-C1352, 2004)。

(3) ハンギングドロップ中に BDNF で得られた結果を参考にしてセロトニン 4 受容体刺激薬やセロトニン 4 受容体阻害薬 (GR113808) を処理した ES 腸管の DV 記録を行い、蠕動様自動運動を記録する。

(4) 腸壁内神経が分化誘導できたと思われる ES 腸管のホールマウント標本を対象として、抗 neurofilament 抗体を用いて免疫染色を行い、神経の分化を確定するとともに、抗 c-kit 抗体を用いて免疫染色を行い、カハールの間質細胞 (ICC) の分化を確定する。

(5) ES 腸管の全 RNA を抽出し、cDNA を合成し、qRT-PCR で様々な処理をした ES 腸管のセロトニン 4 受容体 (SR4) の mRNA 発現量を内部標準のアクチン B の mRNA 発現量と比較検討した。

(6) セロトニン 4 受容体刺激薬の効果が先行研究で報告した BDNF (Stem Cells, 2006) の遊離を介して生じている可能性を検討するために新たに開発された BDNF specific blocker である N2-(2-[(2-oxo-azepan-3-yl)amino]carbonyl)phenyl) benzo[b]thio-phene-2-carboxamide (ANA-12) の効果を検討する。

これも ES 腸管のホールマウント標本を対象として、抗 neurofilament 抗体を用いて免疫染色を行い、神経の分化を確定する。

(7) 選択的な神経を備えたサイズの大きな腸管を作るために Insulin Growth Factor (IGF) 等の成長因子の添加や、self-assembling peptide scaffold (Nagai et al. 特願 2009-54983) の譲渡を受け、ペプチドゲルによる 3 次元培養を行う。

4. 研究成果

(1) セロトニン 4 受容体刺激薬の ES 腸管における腸壁内神経の特異的分化作用
セロトニン 4 受容体刺激薬クエン酸モサブリド (MOS) 1 μ M-10 μ M を ES 腸管の作成過程のハンギングドロップ中に加えると図 1 に示すように腸壁内神経系が分化誘導された。

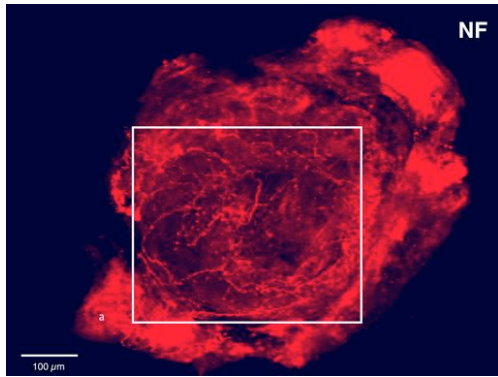


図1 ES腸管にMOS投与でできた腸壁内神経系

腸壁内神経のできたES腸管にはICCのネットワークも形成されておりこのES腸管の運動をDV記録により解析をすると、細胞塊の中身を絞り出すような蠕動運動を発生した。

(2) 一方、これらのES腸管にはMOSの溶剤のDMSOをハンギングドロップ中に加えるのみで図2に示すようにc-kit陽性細胞群からなるICCのネットワークが形成された。このES腸管の運動をDV記録により解析をすると、細胞塊の中身を絞り出すような運動ではなく、単なる自動運動の繰り返しであった。

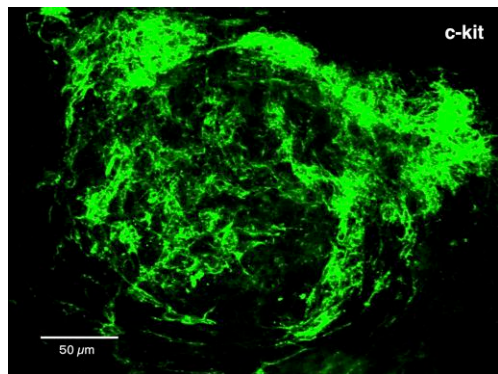


図2 ES腸管にできたICCのネットワーク

(3) セロトニン4受容体阻害薬(GR 113808)によるセロトニン4受容体刺激薬(MOS)のES腸管における腸壁内神経の特異的分化作用の抑制

MOSの生体内腸壁内神経の再生・新生作用でも抑制効果を示したセロトニン4受容体阻害薬(GR 113808)をMOSの10倍量投与するとほぼ完全にその効果を抑制した。

一方、ICCに対しては何の影響も与えなかった。

このES腸管のDV記録を行い、運動について検討すると、多くの例で「蠕動様」自動運動は示していたが蠕動運動は示さず動かない場合もあった。

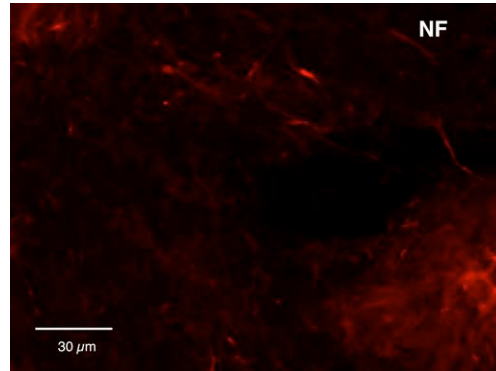


図3 GR 113808 10 μMによるMOS 1 μMの効果の抑制

(4) MOS処理をしたES腸管とGR 113808とMOS処理をしたES腸管のSR4のmRNAの発現量

MOSの効果はセロトニン4受容体の活性化を介して起こっているかどうかを調べるためにSR4のmRNAの発現量を調べた結果、図4黒塗りバーに示したように非処理や溶剤のDMSO処理ES腸管に比べて4倍以上に増加しており、また、GR 113808とMOS処理をしたES腸管ではその増加が完全に抑えられていた(図4灰色バー)。一方、セロトニンそのものもセロトニン4受容体の活性化を起こしうるので調べたところ、1回目の実験ではSR4のmRNAの発現量は増加せず、別のES腸管を使った2回目の実験では図4に示すように3倍弱増加しており、MOSと比べると作用にばらつきがあるという結果を示した。

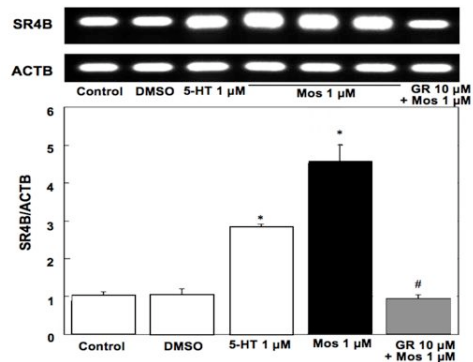


図4様々な処理をしたES腸管のSR4のmRNAの発現量の比較

(5) セロトニン4受容体刺激薬の効果に対するBDNF specific blockerであるANA-12の効果

セロトニン4受容体刺激薬が、先行研究で報告したBDNF (Stem Cells, 2006)の遊離を介して生じている可能性を検討するために新

しく開発された ANA-12 を購入してセロトニン4受容体刺激薬による神経分化促進作用が抑制されるかどうか調べた。まず、あたらしく開発された BDNF specific blocker なので、BDNF の効果を抑制するかどうかを調べた (図5)。

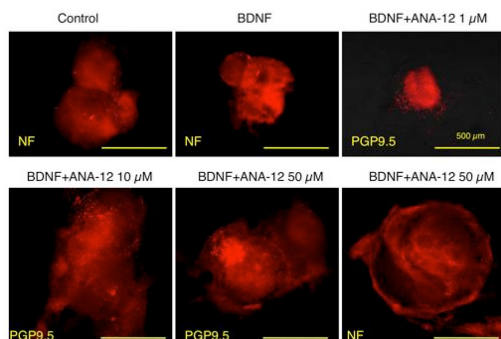
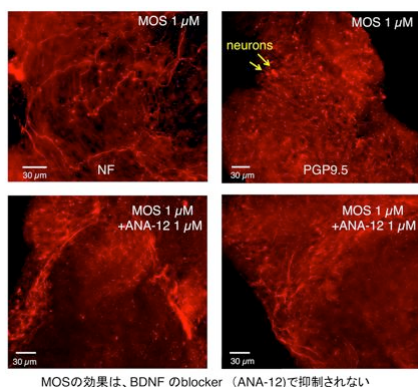


図5 BDNF の作用に対する ANA-12 の効果

ANA-12 は BDNF の ES 腸管における神経分化作用を 1 μM の濃度で阻害する事が確認できた。そこで、MOS 1 μM の効果に対する ANA-12 1 μM の効果を調べた。その結果、MOS の ES 腸管における神経分化作用を 1 μM の濃度で阻害する事ができなかった (図6)。



MOS の効果は、BDNF の blocker (ANA-12) で抑制されない

図6 MOS の作用に対する ANA-12 の効果 ES 腸管において、腸壁内神経系のネットワークの形成が ANA-12 投与後も認められた。

(6) ペプチドゲルによる 3次元培養の試み 選択的な神経を備えたサイズの大きな腸管を作るために Insulin Growth Factor (IGF) 等の成長因子の添加や、self-assembling peptide scaffold (Nagai et al. 特願 2009-54983) の譲渡を受けたので、ペプチドゲルによる 3次元培養を試みた。しかし、EB ボールさえ作れなかったため、この方法は不採用とした。

(7) まとめ

本研究は、基礎生物学的にも、臨床医学的にも、意義あるのみならず、様々な神経欠損による腸疾患 (老齢やヒルシュスプルング病も含まれる) の病態解明と発生・再生医学を応用した 21 世紀の新たな治療戦略の展開に資すると考えられる。

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 4 件)

- ① Goto K, Kato G, Kawahara I, Luo Y, Obata K, Misawa H, Ishikawa T, Kuniyasu H, Nabekura J, Takaki M. In vivo imaging of enteric neurogenesis in the deep tissue of mouse small intestine. PLoS One 査読有 2013;8(1):e54814. doi: 10.1371/journal.pone.0054814.
- ② Ohbuchi T, Takaki M, Misawa H, Suzuki H, Ueta Y. In vitro morphological bud formation in organ-like three-dimensional structure from mouse ES cells induced by FGF10 signaling. Commun Integr Biol 査読有 5(4) 1-4, 2012. doi:10.4161/cib.20093.
- ③ Kawahara I, Kuniyasu H, Matsuyoshi H, Goto K, Obata K, Misawa H, Fujii H, Takaki M. The comparison of effects of a selective 5-HT reuptake inhibitor versus a 5-HT₄ receptor agonist on *in vivo* neurogenesis at the rectal anastomosis in rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 査読有 302:G588-G597, 2012. doi: 10.1152/ajpgi.00284.2011.
- ④ Takaki M, Misawa H, Matsuyoshi H, Kawahara I, Goto K, Zhang GX, Obata K, Kuniyasu H. In vitro enhanced differentiation of neural networks in ES

gut-like organ from mouse ES cells by a 5-HT₄-receptor activation. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有 406 : 529-533, 2011.
doi: 10.1016/j.bbrc.2011.02.072.

[学会発表] (計3件)

- ① 高木 都, 三澤 裕美, 松吉 ひろ子, 川原 勲, 後藤 桂, 小畑 孝二, 國安 弘基
5-HT₄受容体活性化を介した *in vitro* 神経分化促進作用と *in vivo* 神経再生・新生促進作用 第85回日本薬理学会年会 [シンポジウム 消化器疾患における5-HT受容体を標的にした新たな創薬展開] 国立京都国際会館 京都, 2012/3/14-16.
- ② 高木 都, 川原 勲, 三澤裕美, 後藤 桂, 松吉ひろ子, 小畑孝二, 國安弘基
選択的セロトニン再取り込み阻害薬 fluvoxamine (SSRI) の *in vitro* 神経分化, *in vivo* 神経再生・新生作用に対する効果:セロトニン4受容体刺激薬との比較 第13回日本神経消化器病学会 栃木総合文化センター 栃木, 2011/11/5.
- ③ Takaki M, Misawa H, Matsuyoshi H, Kuniyasu H. ES gut-like organ.
An annual meeting of The Korean Society of Smooth Muscle Research in Seoul National University Bundang Hospital, 18, June, 2011. [Invited special lecture]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三澤 裕美 (MISAWA, Hiromi)
奈良県立医科大学・医学部・教務職員
研究者番号：50281275

(2) 研究分担者

高木 都 (TAKAKI, Miyako)
奈良県立医科大学・医学部・特任教授
研究者番号：00033358

松吉 ひろ子 (MATSUYOSHI, Hiroko)
奈良県立医科大学・医学部・助教