様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ５ 月 ３０ 日現在

機関番号：１４５０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：２５４６０２７９

研究課題名（和文）腸神経系におけるニューロン新生の新たな細胞ソースの同定とその生理的意義の解明

研究課題名（英文）Schwann cell precursors are a novel cellular source of enteric neurons

研究代表者
上坂　敏弘（Uesaka, Toshihiro）

神戸大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：９０３０４４５１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：腸管を支配している腸管神経系は主に頸部の神経堤に由来し、前腸に入ってきた神経堤由来の前駆細胞は中腸、後腸と腸管全体に行き渡り、ニューロンやグリア細胞になることが知られていた。我々は本研究により、腸管へ投射する外来神経線維を伝って腸管に移動してくるグリア細胞様の細胞が大腸のニューロンになることを見出し、このグリア細胞由来のニューロン新生が大腸終末部の神経節形成に欠かせないことを明らかにした。腸管神経系は主に頭部の神経堤に由来すると考えられていたが、本研究により、体幹部の神経堤由来のグリア細胞からも生じることが初めて見いだされ、形成過程の新たな様相が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Elucidating the cellular identity of neuronal precursors provides novel insights into development and function of the nervous system. The enteric nervous system (ENS) is innervated richly by extrinsic nerve fibers, but little is known about the significance of extrinsic innervation to the structural integrity of the ENS. This research reveals that a subset of Schwann cell precursors (SCPs), which invades the gut alongside the extrinsic nerves, adopts a neuronal fate and differentiates into specific neuronal subtypes. SCP-specific ablation of the Ret gene leads to colonic oligoganglionosis, demonstrating a crucial role of SCP-derived neurogenesis in ENS development. Cross-lineage differentiation capacity in SCPs suggests their potential involvement in the development and pathology of a wide variety of neural crest-derived cell types.

研究分野：神経発生学

キーワード：腸管神経系　神経堤細胞　ニューロン新生　シュワン細胞

１．研究開始当初の背景

腸管神経系の発生には神経栄養因子GDNFシグナルが必須であり、マウスにおいて、GDNFやその受容体を欠損させると迷走神経堤由来の腸管神経前駆細胞が小腸以降に移動してこないことが知られていた。しかしながら、マウス胚発生後期に観察してみると、本来先に形成される腸管壁内にはニューロンは存在しなかったが、粘膜下層には幼弱なニューロンができていることを見出した。この細胞はどこから生じたのか？　この疑問が本研究に取り組む最初のきっかけである。

２．研究の目的

腸管神経系を形成する迷走神経堤由来の前駆細胞を欠損したマウス胚において、小腸粘膜下層にできてくるニューロンは腸管に投射する外来神経線維に付随する形で見つかった。我々は、外来神経線維上を移動してくるシュワン細胞前駆細胞が、腸管に入って神経細胞になる仮説を立てた。その根拠の一つとして当時、色素細胞の一部は、末梢神経線維上を移動してきたシュワン細胞系譜から産生されることが報告された。シュワン細胞は分化可塑性を有している可能性が強く腸管神経の細胞ソースになっていると考えた。腸管神経系は、生命維持に必須であり、先天的な発生異常による疾患も知られている。発生過程や発症機序を新たに理解する上でも新規の細胞起源を明らかにすることは重要な課題である。

具体的な目的としては、

① マウスにおいて、遺伝学的細胞系譜追跡により、迷走神経堤由来の腸管神経系の細胞と外来神経線維上のシュワン細胞系譜とを区別する方法を確立する。
② 腸管神経系にシュワン細胞系譜のニューロンが存在するのかどうか検証する。
③ シュワン細胞系譜から生じたニューロンの特徴を組織化学的に明らかにする。
④ シュワン細胞系譜のニューロンの存在が確認できれば、遺伝学的手法を用いてシュワン細胞前駆細胞由来のニューロンを選択的に除去することで、生理学的意義を検証する。

３．研究の方法

シュワン細胞系譜においてシュワン細胞前駆細胞の時期からCre組換え酵素を選択的に発現することが知られているDesert hedgehogの下流にCre遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス(Dhh::Cre)を用いて、種々のレポーターマウスと掛け合わせることで、外来神経線維上のシュワン細胞系譜の細胞が標識され、一方腸管神経系は、シュワン細胞が侵入してくるまで標識されないことを確認した。

培養条件下において、遺伝学的に標識されたシュワン細胞前駆細胞が、ニューロンに分化するかどうか観察した。

マウスの腸管においてシュワン細胞系譜のシュワン細胞およびニューロンがどのように分布しているかを観察した。特に全体のニューロンに対して、シュワン細胞系譜のニューロンはどのくらいかを定量した。また発生過程においてどの時期にグリア細胞からニューロンへ分化転換が起きているのかを経時的に観察することで検証した。

*Dhh::Cre*による標識が非特異的発現によるものではないことを示すために、Cre抗体を用いて、ニューロンが標識される時期にCreは既に発現していないことを検証した。さらにGDNFシグナルを欠損させて、腸管神経前駆細胞を欠いたマウスにおいて、小腸粘膜下に生じるニューロンがシュワン細胞系譜であるかどうか検証する。

シュワン細胞系譜から生じたニューロンの重要性を検証するためにシュワン細胞由来のニューロン選択的に生存シグナルを欠損させて消失させることで、腸神経系の形成に影響をもたらすかどうか検証した。

腸管神経系は多様な神経伝達物質作動性ニューロンを含んでいる。シュワン細胞由来のニューロンは主にどのようなニューロンになるのかを組織化学的手法で解析した。

４．研究成果

*Dhh::Cre*ドライバーの細胞選択性を検証した結果、マウス胚において、迷走神経堤に

由来する腸管神経系の細胞は遺伝学的に標識されないが、腸管に投射する神経線維上のシュワン細胞前駆細胞は標識されることを確認した。そこで次に腸管におけるシュワン細胞系譜の局在を解析したところ、小腸では筋層間神経叢にはほとんど存在せず、輪状筋層や粘膜下において認められた。一方、大腸では筋層間、粘膜下神経叢ともに認められた。シュワン細胞系譜の多くは腸管においてグリア細胞になっているが、大腸遠位部においては、ニューロンの約 2 割近くがシュワン細胞系譜であることが明らかになった。

シュワン細胞前駆細胞が腸管に到達するマウス胚 14.5 日目において、これら細胞は神経前駆細胞の特徴は示しておらず、グリア細胞の分化マーカーで標識されることを確認した。その後、新生児期になるとニューロン系譜の分化マーカーを発現する神経前駆細胞が *Dhh::Cre* で標識されることを確認した。これら細胞は Cre を発現していないことから、非特異的な Cre の発現により神経前駆細胞が標識されたのではないと考えられた。さらに、腸管神経前駆細胞を欠損したマウスにおいて現れる神経前駆細胞は、Dhh::Cre で標識されたことから、迷走神経堤由来の前駆細胞とは異なるシュワン細胞系譜からニューロンが産生されることが強く示唆された。

腸管膜の外来神経線維から *Dhh::Cre* で標識されたシュワン細胞前駆細胞を単離し、培養条件下での分化特性を解析した。培養開始時はグリア細胞の分化マーカーで標識されていたが、培養 5 日目にはニューロン系譜の分化マーカーを発現するようになり、10 日目には形態もニューロンの特徴を示すものが現れた。これらの結果から、外来神経線維に由来するシュワン細胞系譜からニューロンが産生されることが示された。

シュワン細胞系譜からできる腸管ニューロンは生後現れ、これら 9 割以上のニューロンは、興奮性の運動、および介在ニューロンのマーカーである Calretinin 陽性であることを明らかにした。

シュワン細胞系譜からのニューロン新生が腸管神経系の形成にどのくらい寄与しているのかを調べるために、シュワン細胞系譜のニューロン選択的に生存シグナルを不活性化させたところ、大腸終末部のニューロンの数が有為に減少した。このことから、シュワン細胞系譜からのニューロン新生は特に大腸における神経系の形成に欠かせないことが明らかになった。

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 1 件）

Uesaka T, Nagashimada, M., Enomoto H. (2015) Neuronal differentiation in Schwann cell lineage underlies postnatal neurogenesis in the enteric nervous system. J. Neurosci. （査読有）35: 9879-9888. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1239-15.2015.

〔学会発表〕（計 5 件）

1) Uesaka T, Nagashimada M, Enomoto H. Enteric neurogenesis from Schwann cell lineage in mouse models of Hirschsprung disease. 第 38 回日本分子生物学会 2015.12.3 神戸ポートアイランド（神戸)
2) Uesaka T, Nagashimada, M. Enomoto H. Neurogenesis from Schwann cell lineage in mouse models of Hirschsprung disease. 4th International Symposium “Development of the enteric nervous system: cells, signals, genes, and therapy. 2015.4.19. Rotterdam, Holland.
3) Uesaka T, Enomoto H. Schwann cell precursor-like cells are a novel neuronal origin of the enteric nervous system. 第 47 回日本発生生物学会 2014.5.27. WINC AICHI（名古屋）
4) Uesaka T, Enomoto H. Schwann cell precursor-like cells from the mesentery are a cellular source of enteric neurons. Gordon Research Conference Neural crest

& Cranial placodes 2013.7.22, Easton, USA.

5) Uesaka, T, Enomoto H. Schwann cell precursor-like cells from the mesentery are a cellular origin of enteric neurons. **第 36 回日本神経科学大会** 2013.6.20 **国立京都国際会館（京都）**

〔図書〕（計　0 件）

〔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）
神戸大学大学院　医学研究科　講師
研究者番号：90304451

(2)研究分担者
（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
（　　）

研究者番号：