

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460380

研究課題名(和文) 神経・免疫系による腸管恒常性維持制御機構とその破綻

研究課題名(英文) Maintenance of intestinal homeostasis by enteric neuron and mucosal immune system

研究代表者

幡野 雅彦 (Hatano, Masahiko)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20208523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：腸管神経細胞の増加により上皮バリア機構の破綻と腸内フローラの異常をきたすことを明らかにした。Ncx KOマウスを用いて腸内細菌層の解析を行った。培養法により好気性菌が増加しており、16SrRNA法、メタゲノム解析によりEnterobacteriaceaeが増加しておりdysbiosisの状態であることが確認された。またNcx KOマウスにおいては、病原性の高いNO還元酵素(NorV)遺伝子を持つ腸内細菌が有意に増加していた。さらに、Ncx KOマウス糞便を野生型マウスに移植したところDSS腸炎が悪化した。以上より腸管神経は腸内細菌叢制御にとっても重要な役割をしていることが示された。

研究成果の概要(英文)：Ncx-deficient (KO) mice exhibited increased number of NO producing enteric neurons. We characterized the fecal microbiota to examine whether increased number of enteric neurons affects enteric flora. CFUs of aerobic bacteria increased 10 to 100-folds in the KO mice compared to those of wild type mice. Since bacterial NO reductase gene V (NorV) which detoxify NO, determine a virulence of bacteria, we further examined frequency of NorV+ bacteria in feces. More NorV+ bacteria were detected from the feces of the KO mice compared to that of wild type mice. To elucidate whether the dysbiosis affect the severity of the DSS-induced colitis, fecal transfer experiments were carried out. C57BL/6 mice were given either wild type or the KO mice derived feces and challenged with DSS. Mice transferred with feces of the KO mice developed more severe colitis than wild type transferred one. Our study implies that NO derived from EN participates in regulation of intestinal homeostasis.

研究分野：分子生物学、発生工学

キーワード：腸管神経系 腸管免疫系 腸管上皮バリア 腸内フローラ

1. 研究開始当初の背景

(1) 腸管神経細胞は神経堤細胞より分化・移動し腸管に定着する。神経堤細胞からの移動の障害により先天性に腸管神経節が欠如した状態となり腸管機能障害がみられ巨大結腸となる。これが Hirschsprung 病であり約 5000 人に 1 人の割合で出生する。一方で腸管神経細胞の過剰によっても同様の腸管機能障害をきたし、Hirschsprung 病類縁疾患と呼ばれている。研究代表者らは神経堤細胞に特異的に発現する遺伝子 Ncx のノックアウトマウスを作製したところ C57BL/6 系統では腸管神経細胞の増加を伴う巨大結腸症を発症した。一方で BDF1 系統では巨大結腸症は発症しないものの、腸管神経細胞の増加は認められた。

(2) 巨大結腸を発症しない系統においては一部のマウスに血便を伴う腸管炎症が認められた。一方で臨床においては Hirschsprung 病や類縁疾患において壊死性腸炎など腸管炎症発症の頻度が高いことが知られている。しかし、腸管神経細胞の増加や減少が腸管免疫系、腸内細菌叢などにおよぼす影響については知られていない。

2. 研究の目的

腸管神経系の腸管免疫、腸内細菌叢及び腸管バリア機構へのかかわりについて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 腸管神経細胞の増加している Ncx KO マウスを用いて DSS 腸炎を発症させ、その重症度、病態について野生型と比較することにより検討する。

(2) Ncx KO マウスにおける腸内細菌叢について培養法および 16SrRNA 解析などから

明らかにする。

4. 研究成果

(1) Ncx KO マウスに DSS を飲水で投与し腸炎を発症させたところ、野生型に比較して感受性が高かった。また、KO マウスにおいては投与初期よりすべての個体において血便が特徴的に認められる。そこで腸管上皮バリア機構についての解析をおこなった。ゴブレット細胞数やムチン層については以上が認められずまた抗菌ペプチドの遺伝子発現にも野生型と比較して差は認められなかった。次に腸管上皮の透過性について FITC-Dextran を経口投与し血中への移行を測定することにより解析した。その結果 Ncx KO マウスにおいては野生型に比較して透過性亢進が確認された。また、上皮細胞間の結合に係るタンパク質である E-cadherin の発現についてウエスタンブロット及び免疫組織学的に調べた。その結果 Ncx KO マウス腸管において E-cadherin の発現が減少していた。このため腸管上皮バリア機構が破たんしており DSS 感受性が高く高率に血便を伴う腸炎が発症したと考えられる。

(2) Ncx KO マウスは腸管神経細胞が増加しているが、特に NADPH diaphorase 陽性一酸化窒素(NO)産生ニューロンの増加が確認されている。そこで腸管において神経細胞由来の NO 合成酵素 nNOS の発現について解析したところ、KO マウスにおいて nNOS の発現が増加していた。一方で iNOS, eNOS の発現は野生型と比べて差を認めなかった。

(3) 腸管神経細胞由来 NO の上皮バリア機構に対する影響を調べるために蛋白のニトロ化について組織学および抗ニトロチロシン抗体を用いたウエスタンブロットで解析した。

Ncx KO マウス腸管においてニトロ化された蛋白の増加が認められた。次に nNOS 特異的阻害剤 L-NPA を投与しニトロ化蛋白および E-cadherin の発現を調べたところ Ncx KO マウスにおいてそれらの発現が野生型と同等まで回復した。これらの結果より神経細胞由来の NO により腸管上皮細胞の蛋白質ニトロ化および E-cadherin 減少をきたしていることが示唆された。

(4) 抗生物質投与により Ncx KO マウスの DSS 腸炎感受性増加は改善したことより KO マウスの腸内細菌叢にも異常をきたしていることが考えられた。そこで Ncx KO マウスにおける腸内細菌叢について培養法で解析した。その結果好気性菌コロニーが野生型の約 100 倍増加していた。また、16S rRNA 法により確認したところ、*Enterobacteriaceae* が有意の増加していた。メタゲノム解析によっても腸内細菌叢の異常が確認され、*Bacteroidaceae*, *Flammeovirgaceae*, *Turicibacteraceae*, *Clostridiaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Enterobacteriaceae* の各ファミリーは野生型に比較して増加しておりまた、*Rikenellaceae*, *S24-7*, *Cyclobacteriaceae*, 及び *Streptococcaceae* は有意に低下していた。これらの結果より Ncx KO マウス腸内細菌叢は Dysbiosis の状態であることが明らかとなった。

(5) NO を無毒化する細菌の酵素 NO reductase をコードする遺伝子 NorV について Ncx KO および野生型マウス腸内細菌で解析した。その結果 Ncx KO マウスにおいて NorV 陽性の腸内細菌が有意に増加していることが明らかとなった。一般に病原性大腸菌においては NorV 陽性の細菌は陰性

のものよりも病原性が高いとされている。これを確認する目的で糞便の移植実験を行った。

(6) 次に Ncx KO マウスの糞便を抗生物質処理した野生型マウスに移植し DSS 腸炎を誘導した。その結果 KO マウスの糞便を移植したマウスは野生型マウスの便を移植した群に比較して臨床症状のスコアがより重症度の高いものとなった。これらの結果より腸管神経由来 NO の増加により Ncx KO マウス腸管上皮細胞内蛋白のニトロ化、E-cadherin の減少をきたしさらに Ncx KO マウス腸内細菌叢は Dysbiosis の状態にありより病原性の高い NorV 陽性細菌が増加することにより DSS 誘導腸炎の感受性も増加していると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

Kobayashi T, Tanaka K, Fujita T, Umezawa H, Amano H, Yoshioka K, Naito Y, Hatano M, Kimura S, Tatsumi K, Kasuya Y Bidirectional role of IL-6 signal in pathogenesis of lung fibrosis. *Respir Res.*, 査読有、2015;16:99.

doi: 10.1186/s12931-015-0261-z.

Hashimoto M, Sato T, Muroyama Y, Fujimura L, Hatano M, Saito T. Nepro is localized in the nucleolus and essential for preimplantation development in mice. *Dev Growth Differ.* 査読有、2015;57:529-38.

doi: 10.1111/dgd.12232

Watanabe-Takano H, Takano K, Hatano M, Tokuhisa T, Endo T.

DA-Raf-mediated suppression of the Ras-ERK pathway is essential for TGF- β 1-induced Epithelial-Mesenchymal transition in alveolar epithelial type 2 cells. *PLoS One*, 査読有、 2015 ;10:e0127888. doi: 10.1371/journal.pone.0127888. Matsushita K, Kitamura K, Rahmutulla B, Tanaka N, Ishige T, Satoh M, Hoshino T, Miyagi S, Mori T, Itoga S, Shimada H, Tomonaga T, Kito M, Nakajima-Takagi Y, Kubo S, Nakaseko C, Hatano M, Miki T, Matsuo M, Fukuyo M, Kaneda A, Iwama A, Nomura F.

Haploinsufficiency of the c-myc transcriptional repressor FIR, as a dominant negative-alternative splicing model, promoted p53-dependent T-cell acute lymphoblastic leukemia progression by activating Notch1. *Oncotarget*, 査読有、 2015;6:5102-17. Watanabe-Takano H, Takano K, Sakamoto A, Matsumoto K, Tokuhisa T, Endo T, Hatano M.

DA-Raf-dependent inhibition of the Ras-ERK signaling pathway in type 2 alveolar epithelial cells controls alveolar formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 査読有、 2014;111:E2291-300. doi: 10.1073/pnas.1321574111. Ikari J, Inamine A, Yamamoto T, Watanabe-Takano H, Yoshida N, Fujimura L, Taniguchi T, Sakamoto A, Hatano M, Tatsumi K, Tokuhisa T, Arima M. Plant

homeodomain finger protein 11 promotes class switch recombination to IgE in murine activated B cells. *Allergy*, 査読有、 2014;69:223-230. doi: 10.1111/all.12328. Takahashi W, Watanabe E, Fujimura L, Watanabe-Takano H, Yoshidome H, Swanson PE, Tokuhisa T, Oda S, Hatano M. Kinetics and protective role of autophagy in a mouse cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Crit Care*, 査読有、 2013;17:R160. doi: 10.1186/cc12839 Kamoda H, Ohtori S, Ishikawa T, Miyagi M, Arai G, Suzuki M, Sakuma Y, Oikawa Y, Kubota G, Orita S, Eguchi Y, Yamashita M, Yamauchi K, Inoue G, Hatano M, Takahashi K. The effect of platelet-rich plasma on posterolateral lumbar fusion in a rat model. *J Bone Joint Surg Am*. 、 査読有、 2013;95:1109-1116. doi: 10.2106/JBJS.L.00320. Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Fujimura L, Hatano M, Miyado K, Toshimori K. Integration of the mouse sperm fertilization-related protein equatorin into the acrosome during spermatogenesis as revealed by super-resolution and immunoelectron microscopy. *Cell Tissue Res*. 、 査読有、 2013;352:739-750. doi: 10.1007/s00441-013-1605-y. Okada K, Ueshima S, Kawao N, Yano M, Tamura Y, Tanaka M, Sakamoto A, Hatano M, Arima M, Miyata S, Nagai N, Tokuhisa T, Matsuo O. Lack of both

2-antiplasmin and plasminogen activator inhibitor type-1 induces high IgE production. Life Sci. 、査読有、2013;93:89-95.
doi: 10.1016/j.lfs.2013.05.02
Tsuruoka N, Arima M, Yoshida N, Okada S, Sakamoto A, Hatano M, Satake H, Arguni E, Wang JY, Yang JH, Nishikura K, Sekiya S, Shozu M, Tokuhisa T. ADAR1 protein induces adenosine-targeted DNA mutations in senescent Bcl6 gene-deficient cells. J Biol Chem. 、査読有、2013;288:826-836. doi: 10.1074/jbc.M112.365718.
Huang J, Li X, Kohno K, Hatano M, Tokuhisa T, Murray PJ, Brocker T, Tsuji M. Generation of tissue-specific H-2Kd transgenic mice for the study of K(d)-restricted malaria epitope-specific CD8+ T-cell responses in vivo. J Immunol Methods、査読有、2013;387:254-61.
doi: 10.1016/j.jim.2012.10.019.

[学会発表] (計 5 件)

Lisa Fujimura, Akemi Sakamoto, Masafumi Arima, Takeshi Tokuhisa, Masahiko Hatano. Role of enteric neurons in regulation of intestinal homeostasis. 第 44 回日本免疫学会、2015 年 11 月 18 日 ~ 20 日、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
藤村理紗、小原由紀子、大崎敬子、神谷茂、幡野雅彦 腸管恒常性維持における腸管神経の役割について 第 19 回腸内細菌学

会、2015 年 6 月 18 日 ~ 19 日、北里大学コンベンションホール (東京都・港区)
Lisa Fujimura, Yukiko Ohara, Akemi Sakamoto, Masafumi Arima, Takeshi Tokuhisa, Masahiko Hatano. Role of enteric neurons in regulation of intestinal epithelial homeostasis. 第 43 回日本免疫学会、2014 年 12 月 10 日 ~ 12 日、国立京都国際会館 (京都府・京都市)
Lisa Fujimura, Yukiko Ohara, Akemi Sakamoto, Masafumi Arima, Takeshi Tokuhisa, Masahiko Hatano. Possible role of enteric neurons in regulation of intestinal microbiota. 第 42 回日本免疫学会、2013 年 12 月 11 日 ~ 13 日、幕張メッセ (千葉県・千葉市)
Toshibumi Taniguchi, Akemi Sakamoto, Masahiko Hatano, Kenji Matsumoto, Hirohisa Saito, Takeshi Tokuhisa, Masafumi Arima Bcl6 regulates production of SLAM-associated protein in follicular helper T cells. 第 42 回日本免疫学会、2013 年 12 月 11 日 ~ 13 日、幕張メッセ (千葉県・千葉市)

[その他]

ホームページ
<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/biomedical/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

幡野 雅彦 (HATANO Masahiko)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 20208523

(2) 研究分担者

藤村 理紗 (FUJUMURA Lisa)

千葉大学・バイオメディカル研究センタ

ー・助教

研究者番号 : 30376363