

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462714

研究課題名(和文)新規ヒルシュスブルング病モデルによる腸管神経ネットワーク形成機序の解明

研究課題名(英文)Network formation of enteric ganglion cells with Hirschsprung disease model

研究代表者

芝田 晋介 (Shibata, Shinsuke)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：70407089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腸管運動不全疾患の中でも最も患者数が多いヒルシュスブルング病は、発生初期の神経堤由来の腸管神経節細胞が欠損したり、分化や移動が障害されたりすることで生じる。今回、神経堤由来細胞が緑色蛍光タンパク質ラベルされたマウスを用いて新規の腸管運動不全疾患のモデル動物を確立し、神経堤由来細胞の分化状態の解析や機能的な経過の詳細を解析したところ、このモデルマウスがヒトの病態と極めて近い表現型と経過を生後も継続的に示すことを新たに示した。新規モデル動物を作成したことで、腸管神経節細胞のネットワーク形成過程における複雑にコントロールされた正常メカニズムとその破綻後の変化を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Hirschsprung disease is one of the major intestinal motility disorder, caused by the partial loss of intestinal ganglion cells derived from the absence or impaired migration of neural crest derived cells in early embryonic period. In this study, we established a new animal model for intestinal motility dysfunction by using the transgenic mouse strain, whose neural crest derived cells are labeled with green fluorescent protein. The analysis of the differentiation status of neural crest-derived cells and the functional abnormality of the gastrointestinal motility indicated that this model mouse continuously showed the similar phenotypes and pathophysiological courses of the human Hirschsprung disease patient. By creating a new disease model animal, it was possible to reveal a part of complicated mechanisms for the normal network formation and also a part of pathogenesis for intestinal motility disorder in vivo.

研究分野：神経発生生物学

キーワード：ヒルシュスブルング病 神経堤 幹細胞 腸管 モデルマウス 蛍光タンパク質 移植治療

## 1. 研究開始当初の背景

これまで我々のグループでは、最初にショウジョウバエで発見された RNA 結合蛋白質 Musashi (Nakamura et al 1994) が、マウスにおいてもファミリー分子として Musashi1 および Musashi2 が存在することを同定し、それらが神経幹細胞に強く発現することを明らかにし (Sakakibara S et al 1996, 2001) 標的遺伝子 m-numb の翻訳抑制を介して神経幹細胞の分化抑制に関与していることを明らかにしてきた (Imai T et al. 2001)。我々は、Musashi1 欠損マウスを作成し、上衣細胞付近の細胞の増殖異常による先天性水頭症を示すことなどを明らかにし (Sakakibara S et al. 2002) 神経幹細胞における各種分子の役割を解明してきた。

近年、我々は神経堤由来組織における幹細胞について、背側神経節や骨髄、末梢神経系を中心に観察を進める過程で、神経堤幹細胞が自己複製能と多分化能を持ち、様々な臓器の発生に重要な役割を担い、成体になっても生存していることを明らかにした (Nagoshi, Shibata et al 2008)。その内在性の神経堤由来細胞が、成体の脊髄損傷後の機能的回復にも重要な役割を担うことも明らかにした (Nagoshi Shibata et al 2011)。また神経堤由来細胞の未分化状態で強く発現する Sox10 に注目し、Sox10 発現細胞を蛍光タンパクでラベルした Sox10-Venus マウスを作成した (Shibata et al 2010)。これらの成果により、神経堤由来の未分化な細胞の分離や同定が容易となった。これにより神経堤由来組織における幹細胞の役割や、腸管における神経堤細胞の未分化状態についての詳細な解析が可能となった。

## 2. 研究の目的

神経堤由来細胞を蛍光蛋白質によって標識した、新規のヒルシウスプルング病モデル動物を用いて、腸管にて神経堤由来細胞が欠損するメカニズムの詳細を解析することで、神経堤幹細胞の未分化性維持・移動調節・分化制御機構を明らかにすることを目的として本研究を実施した。

## 3. 研究の方法

本研究は以下の6つの柱で実験および解析を進め、腸管神経ネットワークの発生・分化メカニズムに迫った。

- (1) 正常腸管の神経堤由来細胞の未分化状態の解析
- (2) 免疫電子顕微鏡観察を用いた正常腸管発生過程における神経堤由来細胞の解析
- (3) 新規ヒルシウスプルング病モデル動物

## の開発

- (4) ヒルシウスプルング病モデル動物における神経堤由来細胞の未分化状態の解析
- (5) ヒト腸管手術検体の神経節細胞の分化状態の解析

具体的には、まず研究計画(1)~(2)にて神経堤由来細胞を GFP でラベルしたモデル動物の腸管することにより腸管の正常発生過程における神経堤幹細胞の挙動を組織学的に可視化し、次に研究計画(3)~(4)にて、新規ヒルシウスプルング病モデル動物を作成することで、発生過程における腸管神経ネットワークの形成過程破綻のメカニズムを、「正常」と「異常」とを時間的・空間的に比較し、さらに研究計画(5)にて、それまでのマウスの知見を基にヒト検体への応用を計画した。

## 4. 研究成果

新規のヒルシウスプルング病モデル動物を開発し、腸管にて神経堤由来細胞が欠損するメカニズムの詳細を解析するために、上述の「3. 研究の方法」に記した、(1)~(5)までの計画に沿って研究を実施した。

### (1) 正常腸管の神経堤由来細胞の未分化状態の解析

まず我々は、正常腸管の神経堤由来細胞の未分化状態の解析を実施した。神経堤由来の細胞を緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein, 以下 GFP) で標識されたトランスジェニックマウスにおいて、様々な神経堤や神経系の幹細胞マーカー、未分化神経マーカーと緑色蛍光タンパク質の共局在を免疫組織化学法にて確認した。

### (2) 免疫電子顕微鏡観察を用いた正常腸管発生過程における神経堤由来細胞の解析

神経堤由来細胞が GFP でラベルされ腸管神経節細胞が GFP で光るマウスの発生途上のマウス腸管を用い、GFP に対する抗体にて染色する免疫電子顕微鏡観察法により正常腸管発生過程における神経堤由来細胞の微細構造の解析を実施した。

### (3) 新規ヒルシウスプルング病モデル動物の開発

新規ヒルシウスプルング病モデル動物開発のために、神経堤由来細胞が GFP ラベルされたマウスにて薬剤性のヒルシウスプルング病モデルマウスを作成した。多くのヒルシウスプルング病モデルマウスが生後まもなく死亡していたのに対し、本モデル動物はヒトのヒルシウスプルング病の症状と極めて近い表現型および臨床経過を生後も継続的に示すことが確認できた。

(4) ヒルシユスプルング病モデル動物における神経堤由来細胞の未分化状態の解析

新規のヒルシユスプルング病モデルマウスがヒトの病態と極めて近い表現型を生後も継続的に示し、その腸管神経節が GFP で標識されていたことから、薬剤性ヒルシユスプルング病モデル動物における神経堤由来細胞の分化状態の解析を行った。生後マウス腸管において神経堤幹細胞の維持や増殖が阻害された病態における、各種の腸管細胞群の分化・増殖および遊走能への影響について詳細に解析し、腸管運動機能への影響も定量的に評価できたことから、ここまでの成果を学術誌に英語論文として報告することができた(下記成果 No. )。

(5) ヒト腸管手術検体の神経節細胞の分化状態の解析

これまでに確立した、腸管神経節細胞を GFP ラベルしたマウス腸管の解析結果を基に、神経堤幹細胞の維持・増殖や分化の制御メカニズムに関連するマーカーの染色をヒト腸管の病理検体を用いて染色を実施した。神経堤由来細胞を GFP ラベルしたマウスを用いて作製した薬剤性ヒルシユスプルング病モデル動物と、ヒトヒルシユスプルング病の中でも最も頻度の高い原因遺伝子の一つを欠損したマウスにて腸管神経節細胞を GFP ラベルしたヒルシユスプルング病モデル動物と、ヒトのヒルシユスプルング病罹患腸管を比較検討した結果から、腸管神経ネットワークの形成が破綻するメカニズムの一部を明らかにすることが出来た。

## 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 18 件)

Takano M, Kawabata S, Shibata S, Yasuda A, Nori S, Tsuji O, Nagoshi N, Iwanami A, Ebise H, Horiuchi K, Okano H, Nakamura M. “Enhanced Functional Recovery from Spinal Cord Injury in Aged Mice after Stem Cell Transplantation through HGF Induction.” *Stem Cell Reports*. 2017 Mar 14;8 (3) :509-518. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.01.013. Epub 2017 Feb 16. PMID: 28216143 (査読・有)

Inagaki E, Hatou S, Higa K, Yoshida S, Shibata S, Okano H, Tsubota K, Shimmura S. “Skin-Derived Precursors as a Source of Progenitors for Corneal Endothelial Regeneration.” *Stem Cells Transl Med*. 2017 Mar;6 (3) :788-798. doi: 10.1002/sctm.16-0162. Epub 2017 Feb 6. PMID: 28186681 (査読・有)

Komaki Y, Hikishima K, Shibata S, Konomi

T, Seki F, Yamada M, Miyasaka N, Fujiyoshi K, Okano HJ, Nakamura M, Okano H. “Functional brain mapping using specific sensory-circuit stimulation and a theoretical graph network analysis in mice with neuropathic allodynia.” *Scientific Reports*, 2016 Nov 29;6:37802. doi: 10.1038/srep37802. PMID: 27898057 (査読・有)

Fujimura K, Mitsuhashi T, Shibata S, Shimozato S, Takahashi T. “In utero exposure to valproic acid induces neocortical dysgenesis via dysregulation of neural progenitor cell proliferation/differentiation.” *J Neurosci*. 2016 Oct 19;36 (42) :10908-10919. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0229-16.2016 PMID: 27798144 (査読・有)

Fox RG, Lytle NK, Jaquish DV, Park FD, Ito T, Bajaj J, Koechlein CS, Zimdahl B, Yano M, Kopp JL, Kritzik M, Sicklick JK, Sander M, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, Shibata S, Pizzo D, Valasek MA, Sasik R, Scadeng M, Okano H, Kim Y, MacLeod AR, Lowy AM, Reya T. “Image-based detection and targeting of therapy resistance in pancreatic adenocarcinoma.” *Nature*. 2016 Jun 6;534 (7607) :407-411. doi: 10.1038/nature17988. PMID: 27281208 (査読・有)

Narumi S, Amano N, Ishii T, Katsumata N, Muroya K, Adachi M, Toyoshima K, Tanaka Y, Fukuzawa R, Miyako K, Kinjo S, Ohga S, Ihara K, Inoue H, Kinjo T, Hara T, Kohno M, Yamada S, Urano H, Kitagawa Y, Tsugawa K, Higa A, Miyawaki M, Okutani T, Kizaki Z, Hamada H, Kihara M, Shiga K, Yamaguchi T, Kenmochi M, Kitajima H, Fukami M, Shimizu A, Kudoh J, Shibata S, Okano H, Miyake N, Matsumoto N, Hasegawa T. “Syndromic Adrenal Hypoplasia Caused by Activating SAMD9 Mutations” *Nature Genetics* 2016 Jul;48 (7) :792-797. doi: 10.1038/ng.3569. Epub 2016 May 16. PMID: 27182967(査読・有)

Ouchi T, Morikawa S, Shibata S, Fukuda K, Okuno H, Fujimura T, Kuroda T, Ohyama M, Akamatsu W, Nakagawa T, Okano H. “LNGFR<sup>+</sup>THY-1<sup>+</sup> Human Pluripotent Stem Cell-derived Neural Crest-Like Cells Have the Potential to Develop Into Mesenchymal Stem Cells.” *Differentiation*. 2016 Dec;92 (5) :270-280. doi: 10.1016/j.diff.2016.04.003. Epub 2016 May 10. PMID: 27178356 (査読・有)

Inagaki Y, Fujioka M, Kanzaki S, Watanabe K, Oishi N, Itakura G, Yasuda A, Shibata S, Nakamura M, Okano HJ, Okano H, Ogawa K. “Sustained Effect of Hyaluronic Acid in Subcutaneous Administration to the

Cochlear Spiral Ganglion.” *PLoS One*. 2016 Apr 21;11 ( 4 ) :e0153957. doi: 10.1371/journal.pone.0153957. eCollection 2016. PMID: 27099926 ( 査読・有 )  
Fujimura T\*, Shibata S\*, Shimojima N, Morikawa Y, Okano H, Kuroda T.  
“Fluorescence Visualization of the Enteric Nervous Network in a Chemically Induced Aganglionosis Model” *PLoS One*. 2016 Mar 4;11 ( 3 ) :e0150579. doi: 10.1371/journal.pone.0150579. eCollection 2016. PMID: 26943905 ( 査読・有 )  
( \*equally contributed first author )  
Morikawa S, Ouchi T, Shibata S, Fujimura T, Kawana H, Okano H, Nakagawa T.  
“Applications of Mesenchymal Stem Cells and Neural Crest Cells in Craniofacial Skeletal Research.” *Stem Cells International*, 2016; 2016:2849879. doi: 10.1155/2016/2849879. Epub 2016 Feb 24. PMID: 27006661 ( 査読・有 )  
Fujiyoshi K, Hikishima K, Nakahara J, Tsuji O, Hata J, Konomi T, Nagai T, Shibata S, Kaneko S, Iwanami A, Momoshima S, Takahashi S, Jinzaki M, Suzuki N, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. “Application of q-Space Diffusion MRI for the Visualization of White Matter” *J Neurosci*. 2016 Mar 2;36 ( 9 ) :2796-808. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1770-15.2016. PMID: 26937016 ( 査読・有 )  
Kawabata S, Takano M, Numasawa-Kuroiwa Y, Itakura G, Kobayashi Y, Nishiyama Y, Sugai K, Nishimura S, Iwai H, Isoda M, Shibata S, Kohyama J, Iwanami A, Toyama Y, Matsumoto M, Nakamura M, Okano H, “Grafted human iPS cell-derived oligodendrocyte precursor cells contribute to robust remyelination of demyelinated axons after spinal cord injury”. *Stem Cell Reports*. 2016 Jan 12;6 ( 1 ) :1-8. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.11.013. PMID: 26724902 ( 査読・有 )  
Shibata S\*, Murota Y, Yoshimura M, Nagai T, Okano H, Siomi MC\*.  
“Immuno-Electron Microscopy and Electron Microscopic In Situ Hybridization for Visualizing piRNA Biogenesis Bodies in Drosophila Ovaries.” *Methods in Molecular Biology*. 2015;1328:163-78. doi: 10.1007/978-1-4939-2851-4\_12. PMID: 26324437, ( 査読・有 )  
( \*co-corresponding author )  
Kanzaki S, Watanabe K, Fujioka M, Shibata S, Nakamura M, Okano HJ, Okano H, Ogawa K. “Novel in vivo imaging analysis of an inner ear drug delivery system: drug availability in inner ear following different dose of systemic drug injections.” *Hearing*

*Research*. 2015 Dec;330 ( Pt A ) :142-6. doi: 10.1016/j.heares.2015.09.018. PMID: 26435094 ( 査読・有 )  
Nishikawa R, Hotta R, Shimojima N, Shibata S, Nagoshi N, Nakamura M, Matsuzaki Y, Okano HJ, Kuroda T, Okano H, Morikawa Y. “Migration and differentiation of transplanted enteric neural crest-derived cells in murine model of Hirschsprung's disease.” *Cytotechnology*. 2015 Aug;67 ( 4 ) :661-70. doi: 10.1007/s10616-014-9754-8. PMID: 25230796 ( 査読・有 )  
Iwai H, Shimada H, Nishimura S, Kobayashi Y, Itakura G, Hori K, Hikishima K, Ebise H, Negishi N, Shibata S, Habu S, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. ” Allogeneic Neural Stem/Progenitor Cells Derived From Embryonic Stem Cells Promote Functional Recovery After Transplantation Into Injured Spinal Cord of Nonhuman Primates” *Stem Cells Translational Medicine*. 2015 May 27. pii: sctm.2014-0215. PMID: 26019226 ( 査読・有 )  
Lin ZY, Hirano T, Shibata S, Seki NM, Kitajima R, Sedohara A, Siomi MC, Sasaki E, Siomi H, Imamura M, Okano H. “Gene expression ontogeny of spermatogenesis in the marmoset uncovers primate characteristics during testicular development” *Developmental Biology*. 2015 Apr 1;400 ( 1 ) :43-58. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.01.014. PMID: 25624265 ( 査読・有 )  
Shibata S, Komaki Y, Seki F, Inouye MO, Nagai T, Okano H, “Connectomics: Comprehensive approaches for whole brain mapping” *Microscopy*. 2015 Feb;64 ( 1 ) :57-67. doi: 10.1093/jmicro/dfu103. pii: dfu103. PMID: 25527636 ( 査読・有 )

[学会発表](計 9 件)

Shibata S, Sasaki E. “霊長類ミクロ・マクロコネクトーム解析” 生体ボリュームイメージング研究部会 & 生理研研究会 合同ワークショップ「電子顕微鏡ビッグデータが拓くバイオメディカルサイエンス」(愛知県岡崎市), 2016年11月16 - 17日(発表日11/17 招待講演として口頭発表)  
Shibata S. “ATUMtome と MultiSEM を用いて世界最高速で広範囲を電子顕微鏡撮影” 第72回日本顕微鏡学会第72回学術講演会サテライト・ワークショップ 仙台国際センター(宮城県仙台市), 2016年6月14 - 16日(発表日6/14 招待講演として口頭発表)

Shibata S; “Preparation for 3D-EM from tissue block or cell culture slide to SEM, especially ATUM” and “Application of the 3D-EM in Harvard and Keio University with ATUM” Array Tomography Workshop, Oxford Brookes University, Department of Biological & Biomedical Sciences (Oxford, UK), October 7–8, 2015 (Invited lecture, October 7<sup>th</sup> oral presentation)

Shibata S, Okano H, Lichtman JW, “電子顕微鏡による大規模高速コネクトミクス解析” 第 121 回日本解剖学会年会 ビックレットふくしま(福島県郡山市), 2016 年 3 月 27 - 30 日 (発表日 3/27 招待講演として口頭発表)

Shibata S, Fujimura T, Kuroda T, Okano H. “Evaluation for the enteric ganglion cells with novel Hirschsprung's disease model” 第 38 回日本神経科学大会 神戸国際会議場(兵庫県神戸市) 2015 年 7 月 28 日-31 日 (7/30 ポスター発表)

Shibata S, “電子顕微鏡を用いて蛋白質と RNA の局在を探る”, 第 140 回 電子顕微鏡技術研究会, 東京大学医学部(東京都文京区), 平成 27 年 6 月 6 日, (招待講演として口頭発表)

Shibata S, Okano H, Lichtman JW, “Approaches for brain connectomics (電子顕微鏡によるコネクトミクス解析)” 日本顕微鏡学会 第 71 回学術講演会 国立京都国際会館(京都府京都市) 2015 年 5 月 13 日~5 月 15 日 (5/15 招待講演として口頭発表)

Shibata S, Okano H, Lichtman JW, “三次元電顕(電子顕微鏡)によるブレインマッピング技術革命” 日本顕微鏡学会「SEM 連続断面観察による生物組織三次元再構築法研究部会」第三回研究会(山梨県勝沼市) 2015 年 3 月 24 日~3 月 25 日 (3/25 招待講演として口頭発表)

Shibata S, Fujimura T, Kuroda T, Okano H. “Evaluation of the Hirschsprung's disease model with the labeling for the neural crest derivatives” 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学学会大会・合同年会(奈良県奈良市) 2014 年 9 月 29 日-10 月 1 日 (9/30 一般口演 session にて口頭発表)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

芝田 晋介 (Shinsuke Shibata)  
慶應義塾大学・医学部・専任講師  
研究者番号：70407089

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

藤村 匠 (Takumi Fujimura)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：80573443

### (4) 研究協力者

なし