

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10929

研究課題名(和文) ヒルシュスブルグ病の新規バイオマーカー探索：新たな外来神経増生機構に着目して

研究課題名(英文) Searching for the novel biomarker of Hirschsprung disease: focusing on the mechanism of extrinsic nerve fiber development

研究代表者

宮原 克 (MIYAHARA, Katsumi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・研究技師

研究者番号：00420844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒルシュスブルグ病のモデルマウス有神経細胞領域の腸管神経細胞において、アセチル化チューブリンの発現が正常発生マウスと異なることを免疫染色による形態学的解析により明らかにした。この結果より、肛門側消化管の腸管神経細胞の一部が先天性に欠如する疾患であるヒルシュスブルグ病モデルマウス(エンドセリンレセプターBノックアウトマウス)の腸管神経系の形成異常に、細胞骨格である微小管の安定化の指標であるチューブリンのアセチル化が関与することが示された。

研究成果の概要(英文)：Tubulin acetylation is involved in the regulation and stability of microtubule structure and plays an important role in various neuronal functions. In this study, the relationship between the expression of acetylated α -tubulin (Ac-Tub) in enteric neurons of the endothelin receptor B-knockout (EDNRB KO) mouse, which is a mouse model of Hirschsprung disease (HD), and developmental abnormalities of the enteric nervous system (ENS) were examined. Fluorescent immunohistochemical analysis with Ac-Tub antibody was performed to assess the expression pattern of Ac-Tub in neuronal cells, and the expression in the EDNRB KO embryos was found to be increased compared to that in the normal embryos. The results indicated that the change in Ac-Tub expression in the developing enteric neurons may be associated with developmental abnormalities related to the innervation of the ENS in HD.

研究分野：小児外科病理学

キーワード：ヒルシュスブルグ病 腸管神経系 アセチル化チューブリン エンドセリンレセプターB

1. 研究開始当初の背景

腸管神経系は胎生期において後脳から発生した迷走神経由来の神経堤細胞が前腸に侵入し分化増殖しながら尾側へと遊走して、外来神経より生じた神経堤細胞と融合し消化管を形成する。ヒルシュスプルング病はこの胎生期に食道から肛門まで下降性に分布していく迷走神経由来神経堤細胞が途中で停止することにより停止部以降の腸管が神経節細胞を欠如することにより無神経節腸管となる。この領域では外来神経線維が増生することが知られており、これは、本来連絡すべきターゲットである神経堤細胞が存在しないために、外来神経堤由来の神経線維が異常増生するものと考えられている。本研究計画申請当時、我々のヒルシュスプルング病モデルマウスの発生中において、神経細胞を有する領域の腸管神経系が形成される際、正常発生のコントロールマウス腸管神経系に比べ神経細胞数が少なく、粗な神経ネットワークが観察された。このヒルシュスプルング病モデルマウス無神経節部の腸管神経線維増生の機構と有神経節部腸管のネットワーク発生機構はどのような仕組みにより制御されているのか、そしてこの仕組みを制御する新しい因子を見いだすことがしばしば確定診断に難渋する場合のある本疾患のバイオマーカーとなりうるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

腸管神経系は、神経堤から発生した腸管神経系の前駆細胞である神経堤細胞が神経細胞とグリア細胞に分化しながら神経線維を伸ばして腸管神経ネットワークを形成するが、我々はヒルシュスプルング病腸管神経系の発生において、この神経線維を構成する主要な細胞骨格である微小管を形成するタンパク質、チューブリンの化学的変化(翻訳後修飾)が正常と異なると想定した。本申請課題では、このチューブリンの化学的変化のうち、微小管安定化の指標であるチューブリンのアセチル化修飾に焦点を絞り、腸管神経系細胞の前駆細胞である神経堤細胞における移動・分化との関連を以下のように調べることを目的とした。

正常に発生するマウス腸管神経系の発生期において、腸管組織内でチューブリンのアセチル化はどの細胞でどの程度行われているか検証する。

腸管神経堤細胞の分化の過程でチューブリンのアセチル化がどのように行われるか検証する。

ヒルシュスプルング病モデルマウスでの腸管神経堤細胞の分化、移動の際でのチューブリンアセチル化の異常を正常発生マウスと比較し検証する。ヒルシュスプルング病モデルマウスで観察される、外来神経増生機構での神経分布とチューブリンのアセチル

化の異常を検証する。

3. 研究の方法

腸管の神経堤細胞の分化・遊走に関連する遺伝子である Sox10 に緑色蛍光タンパク VENU を標識し、神経堤細胞の発生過程が観察できるトランスジェニックマウス (Sox10-Venus Tg マウス) の胎仔腸管を用いて神経細胞マーカーである PGP9.5 抗体とアセチル化チューブリン抗体を用いてホールマウントによる免疫染色を行い、腸管組織の神経細胞でどのようにアセチル化チューブリンが発現しているかを検証した。

Sox10-Venus Tg マウスの胎生 (E) 13 日と 16 日の胎仔腸管の神経堤細胞が移動完了した部位である小腸を用いて組織切片を作成し、Tuj-1 抗体とアセチル化チューブリン抗体による蛍光免疫染色を行い、神経堤細胞から神経細胞へ、または腸管グリア細胞の分化への過程でどのようにチューブリンのアセチル化が行われているか検証した。

ヒルシュスプルング病モデルマウス (エンドセリンレセプター B 欠失マウス: EDNRB KO) と同腹の野生型マウスの胎生 13 日と 16 日での小腸神経叢におけるアセチル化チューブリン発現を免疫染色で評価した。

EDNRB KO と同腹の野生型マウスそれぞれの肛門管と周囲組織における感覚神経のマーカーであるサブスタンス P と CGRP の発現を免疫蛍光染色により評価した。

胎生後期におけるヒルシュスプルング病モデルマウス結腸で観察される通常発生では見られない、増生した外来神経である Venus 陽性の神経線維におけるアセチル化チューブリンの発現を検証した。

4. 研究成果

今回の最初の検討では、アセチル化チューブリンは腸管組織全体の細胞で観察されたが、特に神経細胞で強く発現することを確認した。腸管神経系の形成が完了した部位と移動中の部位での神経細胞における発現の差は確認されなかった。腸管神経系細胞の正常な発生過程でのチューブリンのアセチル化を組織切片上で検証したところ、神経細胞に分化している細胞である Tuj-1 陽性細胞においてアセチル化チューブリンが神経細胞体、神経突起に発現していた。神経堤細胞から神経細胞に分化する際、分化初期の未熟な神経細胞において Sox10 のマーカーである Venus 陽性となるが、その未熟な腸管神経細胞においてもアセチル化チューブリンが観察された。

次に EDNRB KO マウスにおいてアセチル化チューブリンがどのように発現しているか、正常発生マウスと比較検証したところ、神経細胞の発生過程での発現は正常同様、Tuj-1 陽性細胞に発現しており EDNRB KO マウス腸管においても神経細胞に分化した細胞にチューブリンのアセチル化が認められることが分かった。

作製した標本を共焦点レーザー顕微鏡で撮影し、正常発生 (WT) マウスと EDNRB KO マウスを比較すると、胎生 16 日において EDNRB KO マウスの神経ネットワークの配列の乱れが観察され、神経細胞体と神経突起の両方でアセチル化チューブリンの強い発現が見られた。(図 1)

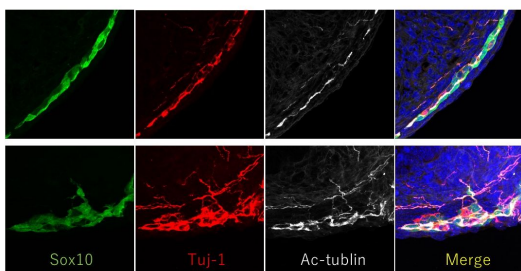


図 1
胎生 16 日の腸管組織における Sox10 (緑) アセチル化チューブリン (白) Tuj-1 (赤) の発現 (上) EDNRB WT、全周性に腸管神経ネットワークが認められた。(下) EDNRB KO 腸管神経叢における神経細胞の配列の乱れとチューブリンとアセチル化チューブリン共局在の神経線維・突起の過剰な伸長が見られた。

この発現の変化を評価するために Tuj-1 陽性の神経細胞におけるアセチル化チューブリン陽性細胞を数えたところ、正常マウスにおいては胎生 13 日と 16 日において発現率に変化はなかったが、EDNRB KO マウスにおいて上昇する傾向がみられ、胎生 16 日においては WT マウスに比べ EDNRB KO マウスの神経細胞におけるアセチル化チューブリンの発現率が有意に高かった。(図 2)

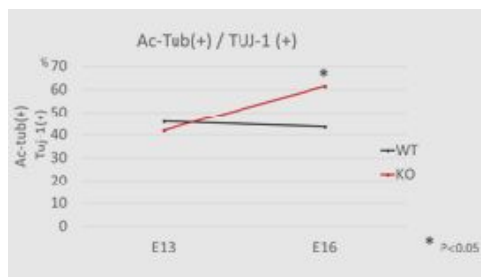


図 2
胎生 13 日と 16 日におけるヒルシュスプルング病モデルマウス (KO) と正常発生マウス (WT) 腸管神経細胞におけるアセチル化チューブリンの発現率の変化。胎生 16 日において WT マウスと KO マウスにおいて発現率に有意差を認めた。

このことから発生期の腸管神経細胞におけるアセチル化チューブリンの発現と、ヒルシュスプルング病モデルマウスである EDNRB KO マウスの腸管神経系の発生異常に関連があることが示された。

また、増生する外来神経線維のアセチル化チューブリンの発現の評価は現在進めている最中であるが、本申請課題研究期間中においては、ヒルシュスプルング病腸管組織において、その外来神経の増生が発生する部位である大腸遠位部の神経分布、特に肛門直腸移行部における感覚神経の分布を組織学的に調べた。ヒルシュスプルング病に対する根治手術の際、肛門・直腸線 (ARL) は肛門直腸移行部の境界として観察され、ARL より肛門側は排便機能 (肛門の感覚) において特に重要な位置であり、ヒルシュスプルング病の根治術において感覚神経の分布を知ることが術後の排便機能障害を避けるためには重要であると考えられている。

Sox10-Venus Tg マウスを使用し作製された、EDNRB KO と WT マウスを用いて肛門直腸移行部における腸管神経と感覚神経の分布が以下のようになっていることを報告した。ARL は肛門組織と腸管組織の境界であるということ、腸管神経においてもおおよその終了地点であることが EDNRB KO と WT マウスすべての個体で観察された。

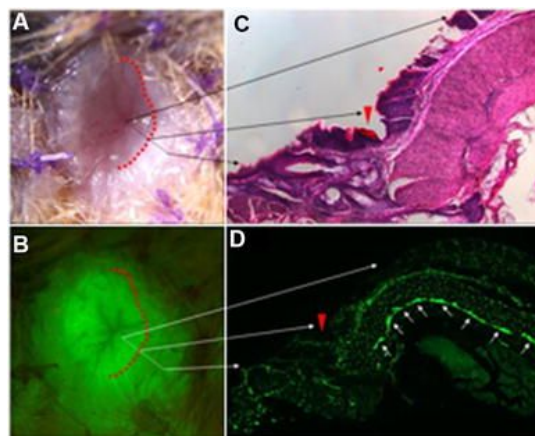


図 3
マウス肛門部における肛門・直腸線 (ARL) の肉眼画像 (A) とその組織画像 (C)、および蛍光実体画像 (B) とその蛍光組織画像 (D)、ARL が (A)(B) の赤い点線と (C)(D) の赤い矢印で示されている。(C) の組織画像で腸管と肛門組織の移行部であること、(D) の蛍光組織画像で腸管神経系の終了地点であることを確認した。

次に EDNRB KO マウス、WT マウスそれぞれ肛門管と周囲組織のそれぞれの検体を採取し凍結切片を作成、感覚神経のマーカである抗サブスタンス P 抗体と抗 CGRP 抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で SP と CGRP の発現を撮影し、画像解析ソ

フトにより発現輝度と面積により発現量を比較した。結果は全ての個体で、肛門管内のサブスタンス P と CGRP の発現は明らかに直腸よりも強く発現していた。またヒルシュスプルング病、コントロール群の両者の肛門管内のサブスタンス P と CGRP の発現に差は見られなかった。この検討で肛門直腸移行部の感覚神経系はヒルシュスプルング病においても肛門の感覚系は正常と同様に保たれており、肛門管内はサブスタンス P と CGRP の発現が直腸より強く発現している事を明らかにした。肛門直腸移行部における神経の解剖学的位置を評価した報告は極めて少なく、その腸管神経系・感覚神経の詳細な分布はヒルシュスプルング病根治術の際の有用な情報であると考えている。

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 5 件)

1. Fujiwara N, Miyahara K, Nakazawa-Tanaka N, Akazawa C, Yamataka A. Increased expression of Semaphorin 3A in the endothelin receptor-B null mouse model of Hirschsprung disease. J Pediatr Surg. 2018 Feb;53(2):326-329. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2017.11.034. (査読あり)
2. Takeda M, Miyahara K, Akazawa C, Lane GJ, Yamataka A. Sensory innervation of the anal canal and anorectal line in Hirschsprung's disease: histological evidence from mouse models. Pediatr Surg Int. 2017 Aug;33(8):883-886. doi:10.1007/s00383-017-4112-5. (査読あり)
3. Takeda M, Miyahara K, Okawada M, Akazawa C, Lane GJ, Yamataka A. Semaphorin 3A expression following intestinal ischemia/reperfusion injury in Sox10-Venus mice. Pediatr Surg Int. 2017 Mar;33(3):383-388. doi: 10.1007/s00383-016-4039-2. (査読あり)
4. Nakazawa-Tanaka N, Fujiwara N, Miyahara K, Nakada S, Arikawa-Hirasawa E, Akazawa C, Urao M, Yamataka A. The effect of laminin-1 on enteric neural crest-derived cell migration in the Hirschsprung's disease mouse model. Pediatr Surg Int. 2018 Feb;34(2):143-147. doi: 10.1007/s00383-017-4181-5. (査読あり)
5. Fujiwara N, Nakazawa-Tanaka N, Miyahara K, Arikawa-Hirasawa E,

Akazawa C, Yamataka A. Altered expression of laminin alpha1 in aganglionic colon of endothelin receptor-B null mouse model of Hirschsprung's disease. Pediatr Surg Int. 2018 Feb;34(2):137-141. doi: 10.1007/s00383-017-4180-6. (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Fujiwara N, Miyahara K, Nakazawa N, G.J. Lane, Akazawa C, Yamataka A. Increased expression of Semaphorin 3A in the Endothelin- B null mouse model of Hirschsprung 's disease. The 28th International Symposium on Paediatric Surgical Research, 2015
2. Takeda M, Miyahara K, Okawada M, Akazawa C, Lane GJ, Yamataka A. Semaphorin 3A expression following intestinal ischemia/reperfusion injury in Sox10-Venus mice. The 29th International Symposium on Paediatric Surgical Research, 2016
3. 宮原 克, 田中奈々, 藤原なほ, 栗原秀剛, 山高篤行 ヒルシュスプルング病モデルマウス腸管神経細胞におけるアセチル化チュープリンの発現異常 第 107 回日本病理学会総会、2018

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮原 克 (MIYAHARA, Katsumi)
順天堂大学・医学研究科・技術員
研究者番号：00420844

(2)研究分担者

山高 篤行 (YAMATAKA, Atsuyuki)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：40200703

田中 奈々 (TANAKA, Nana)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：50530656

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

高橋 美麗 (TAKAHASHI, Mirei)