

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19527

研究課題名(和文) 臓器一次知覚ニューロンの臓器別カタログ化

研究課題名(英文) Organ-dependent categorization of visceral primary sensory neurons

研究代表者

榎本 秀樹 (Enomoto, Hideki)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：00360511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、臓器一次知覚ニューロンの集合体である舌咽・迷走神経の下神経節(nodose-petrosal ganglia: 以下NPGと略す)のニューロンの中から、腸管の情報を収集するニューロン群を同定し、各ニューロン群の機能を明らかにすることを目的に実験を行った。腸管は体内で最も多くの細菌叢が存在することに着目し、無菌マウスとSPFマウスのNPGを採取し遺伝子発現解析を行った。その結果、腸内細菌依存性に発現変動を示す遺伝子群とそれを発現するニューロンサブタイプを同定した。現在、このニューロン群および遺伝子の機能解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では臓器一次知覚ニューロンの集合体であるNPGを解析し、腸内細菌叢依存性に発現レベルを変動する遺伝子群とニューロンサブタイプを同定した。腸と脳は神経で繋がり情報伝達していること(脳腸連関)が示されてきたが、どのようなニューロン群がどのような情報を伝達しているのかは未解明である。本研究で同定された遺伝子群やニューロンサブタイプは、この命題を解明するための基盤情報となる。さらに解析を進めることにより、脳腸連関を分子・細胞レベルで理解することが可能となる。また過敏性大腸症候群などの疾患の病態誘導機構解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed at understanding the anatomy and function of neurons that sense gut luminal environment in the nodose-petrosal ganglia (NPG), which consist of primary sensory neurons in the visceral neural circuit. Based on the assumption that such neurons should respond to microbitota, which is rich in the gut luminal environment, we have performed RNAseq analyses of the NPG of germ-free and SPF mice and compared their gene expression profiles. We have identified a number of genes whose expression levels change in a microbiota-dependent manner, and neuronal subtypes that express those genes. We are currently investigating the function of those genes and neuronal subtypes.

研究分野：神経発生

キーワード：臓器神経回路 臓器感覚 迷走神経 感覚ニューロン 腸内細菌叢 脳腸連関

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々の脳は、外界からの刺激を受け取る(外部感覚: exteroception)と同時にそれに応じて惹起される体内器官からのシグナル(内部感覚: interoception)を受容し、両者の統合により「体の感覚」が形成されている。その中でも内部感覚の主体をなすのは臓性知覚(viscerosensation)と呼ばれる臓器からの神経性のシグナルである。臓性知覚は我々の意識に上らない、不明瞭な感覚としてとらえられているが、実際にはこの臓性知覚が生体のホメオスタシス維持の基盤とされる臓器連関において非常に重要な役割を果たしているという知見が近年数多く見られている。しかし、各臓器からの情報を収集し、中枢神経系に伝達する一次知覚ニューロンの臓器別特性についてはほとんど明らかにされておらず、臓性知覚を担う求心性の神経シグナルの実態に関しては未解明である。

この臓性知覚の実態解明に向けて、本研究は各臓器と中枢神経系までの神経経路においての中継点ともいえる、舌咽・迷走神経の下神経節(nodose-petrosal ganglia: 以下NPGと略す)に着目した。臓性知覚のゲートウェイとしての役割をもつNPGには約2000個のニューロンが存在すると言われている。近年のエビデンスではNPGニューロンのごく一部の集団を刺激することで肺の呼吸様式、あるいは消化管の拡張・収縮を惹起させることが証明されている。(Cell 2015, Cell 2016)しかし、このようなそれぞれのニューロンにおける臓器別特性に関しては大部分が未解明の状態である。そこで我々はNPGニューロンを神経線維の投射する臓器別に分類し、各ニューロン群の遺伝子発現特性とその機能を明らかにすることを目的とした。各臓器から伝達される神経シグナルがどの一次知覚ニューロンにより受容されるのかということが明確になれば中枢神経のどの二次ニューロンに伝達され、機能するのかといった二次ニューロンの特性解明という段階的な解析に進展する。臓器別神経回路が明らかになってくる。さらには各臓器の活動が他臓器の活動に神経シグナルを介してどのような影響を及ぼすのかという臓器連関の根幹とも言える命題も明確になり、神経特異型臓器連関マップ形成が可能になる。

つまりこの目的達成の意義は非常に大きく、生体ホメオスタシスの基盤である臓器連関に必要不可欠とされる、臓性知覚の神経シグナルの実態解明という分野において飛躍的な進歩を示すことができるといえる。

2. 研究の目的

(1) NPGニューロンの各臓器への神経投射パターンの解明

NPGニューロンのみを蛍光標識できるような生体システムをマウスの遺伝子改変により構築する。平行して蛍光タンパク質をもつアデノ随伴ウイルス(adeno associated virus: 以下AAVと略す)を用いてNPGに直接 injection し感染させることにより、NPGニューロンから末梢臓器までの神経投射経路を可視化する。さらにはNPGに発現する遺伝子においてその遺伝子特異的なCreドライバーをもつマウスにCre依存性のAAVを感染させることにより遺伝子特異的な臓器投射経路の解明が可能になる。

この解析には個々のニューロンがマクロレベルではどの臓器にどのような形で投射しているか、ミクロレベルでは臓器のどのような組織・細胞にコンタクトしているかといった、NPGのニューロンサブタイプにおける臓器別神経回路の仕組みとその特性の実態解明に関して大きな意義をもつといえる。

(2) 各臓器の活動・状態変化に応答するNPGニューロン群の同定と臓器特異的機能解析

生体内のホメオスタシスの維持に臓性知覚は深く関与しているが、そのホメオスタシスに「ひずみ」を生じさせるような臓器内の環境変化は臓性知覚の役割を担う一次知覚ニューロンを刺激し、NPGの一部のニューロンサブタイプに何らかの遺伝子発現変化が生じると考えられる。各臓器刺

激で特異的に興奮するNPG ニューロン群を組織および遺伝子発現解析により同定する。この解析を進めることにより臓器特異的ニューロンサブタイプのカテゴリ化が構築される。最終的には臓器特異的NPGニューロンを人為的に興奮させることにより、臓器の生理学的・組織学的変化を含む生体内効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) NPG ニューロンのみを蛍光標識できる生体システムの作製

Phox2b は NPG を含む中枢神経の一部で発現する転写因子である。Foxg1 は placode 由来のニューロンに発現する転写因子として知られており NPG は placode 由来のニューロンの集合体である。つまり NPG では Phox2b と Foxg1 の両方が発現している。これら転写因子の共発現と cre-loxP, flpe-frt の 2 つの遺伝子組み換えシステムを用いることにより NPG ニューロンのみを蛍光標識できる。

具体的には Phox2bCre マウスと Ai65D (Rosa-CAG-frt-STOP-lox-STOP-tdTomato) マウスを交配させる。これにより生まれた子孫と Foxg1-flpe マウスを交配させることにより Phox2b, Foxg1 を共に発現する NPG のみを tdTomato でラベリングすることが可能になり、NPG から末梢臓器までの投射経路を可視化することができる。

(2) AAV を用いた NPG ニューロンの蛍光標識

生後 3 週齢のマウスに麻酔をかけた後で頸部を切開し、NPG を同定する。そこに蛍光タンパク質をもつ AAV を直接インジェクションし感染させる。1 か月後にマウスを解剖し、NPG ニューロンの蛍光標識を確認する。さらに同様の手順で Cre 依存性の AAV、特定の遺伝子レポーターをもつ Cre マウスを用いて特定の遺伝子発現を示すニューロンサブタイプの臓器投射経路を可視化することができる。

(3) 臓器特異的 NPG ニューロンの同定とその機能解析

各臓器の環境変化に応答する NPG ニューロンを同定する方法として SPF マウスと無菌マウスにおける NPG ニューロンの遺伝子発現変化を解析する。無菌マウスは腸内細菌叢をはじめとする生体内の微小細菌叢を有さないマウスである。例えば腸内細菌叢は食べ物の消化・吸収、免疫機能などに密接に関連していることが知られており、腸内環境の保持には欠かせないファクターとなっている。この微小細菌叢の変化は 1 次知覚ニューロンの集合体である NPG ニューロンの遺伝子発現に影響を及ぼすと考えられる。

この場合に用いる SPF マウスは離乳をしたことにより十分な微小細菌叢を獲得していると考えられる 3 週齢の雌マウスを用いる。

具体的には SPF マウスと無菌マウスからそれぞれ NPG を摘出し単離したのちに RNA を抽出し、RNA sequence により遺伝子発現プロファイリングを行う。一方で SPF マウスと無菌マウスに腸内細菌叢を植菌させたマウスからも同様に RNA sequence を行う。この 2 群の比較により有意に発現変化を認める遺伝子を同定する。これら遺伝子を発現するニューロンサブタイプは腸内環境を含む生体のホメオスタシス維持に重要な役割をもつことが示唆される。

さらにはこれらの遺伝子発現調節領域の下流に Chr2 cDNA を発現するトランスジェニックマウスを作成し、光刺激による人為的興奮を与えることにより各臓器の生理学的変化を解析する。

4. 研究成果

(1) NPG ニューロンのみを蛍光標識できる生体システムの作製

上述したように Phox2bCre マウスと Ai65D (Rosa-CAG-frt-STOP-lox-STOP-tdTomato) マウスを

交配させたのち、これにより生まれた子孫と Foxg1-flpe マウスを交配させた。生まれた新生児マウスに対してジェノタイピングを行い、Phox2b、Foxg1、tdTomato すべて陽性のマウスを解剖し、蛍光標識の確認を行ったが、NPG ニューロンの蛍光標識は認めなかった。原因としては flpe-frt の遺伝子組み換え効率が低いこと、Foxg1 の NPG における発現が弱いことなどが挙げられる。

そこで現在、Slc17a6 と呼ばれる遺伝子が NPG ニューロン全体に高発現しているというエビデンスに着目し、Foxg1-flpe マウスの代替として Slc17a6-flpo マウスを用いることにし、このマウスと Phox2bCre: Ai65D マウスを交配させることにより NPG ニューロンの蛍光標識を試みている。

(2) AAV を用いた NPG ニューロンの蛍光標識

まず3週齢の野生型マウスに AAV CAG tdTomato をインジェクションし、1か月後に解剖し組織解析を行った。Nodose をはじめとして肺、心臓、膵臓、肝臓、脾臓、門脈、胃、十二指腸、小腸、大腸に tdTomato で蛍光標識された求心性の神経線維を確認した。(図1)それぞれの切片での観察では神経終末まで神経線維を可視化できた。例えば肺では気道上皮や肺胞周囲、膵臓では血管周囲からランゲルハンス島、小腸では絨毛、陰窩、筋層などにそれぞれ NPG 由来の求心性神経線維が投射していることを確認した。

また胃においてはこの切片と 5-HT、小腸においてはこの切片と CCK の蛍光免疫組織化学染色を行うことにより、求心性の迷走神経線維が 5-HT や CCK を発現する消化管内分泌細胞と密接にコンタクトしている所見を得た。この結果は消化管内分泌細胞が求心性神経線維に何らかの情報を伝達していることを示す重要な所見である。(図2)

さらに我々は同様の手法を用いて Phox2bCre マウスの NPG に AAV flex tdTomato をインジェクションし、組織解析を行った。前述した結果とほぼ同様に NPG 由来の神経線維の可視化を実証できたが、遺伝子特異的 Cre マウスへの Cre 依存性 AAV の感染実験の成功により今後、特定の遺伝子をもつ NPG ニューロンの臓器投射経路の解析は極めて容易になり、これは臓器特異的 NPG ニューロンサブタイプの同定の解明に大きな役割を果たすと考える。

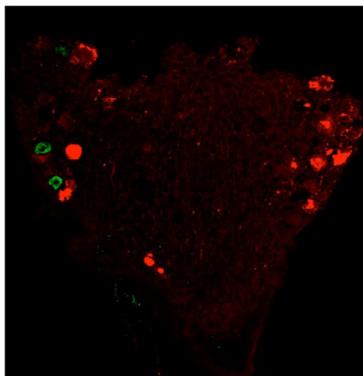


図1: Phox2bCre NPG

AAV flex tdTomato/AAV CAG eGFP

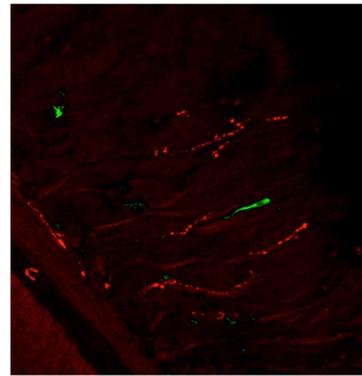


図2: Phox2bCre Stomach

AAV flex tdTomato/5-HT

(3) 臓器特異的 NPG ニューロンの同定とその機能解析

3週齢の SPF 雌マウス、無菌 (Germ free: 以下 GF と略す) 雌マウス、さらに GF マウスに SPF マウスの糞便を植菌させた雌マウス (以下 CONV-D マウスと略す) の3種類を準備し、それぞれのマウスから NPG を摘出、単離し RNA 抽出を行った。その後、SPF/GF 群、SPF/CONV-D 群において RNA sequence を行った。この解析において腸内細菌を有する SPF マウスや CONV-D マウスで

発現量が増加している遺伝子を microbiota(+), 腸内細菌を有さない GF マウスで発現量が減少している遺伝子を microbiota(-)と設定した。

log₂FoldChange 0.4 以上、かつ False Discovery Rate 0.001 以下をカットオフ値としたところ、SPF/GF 群では microbiota(+)758、microbiota(-)273、SPF/CONV-D 群で

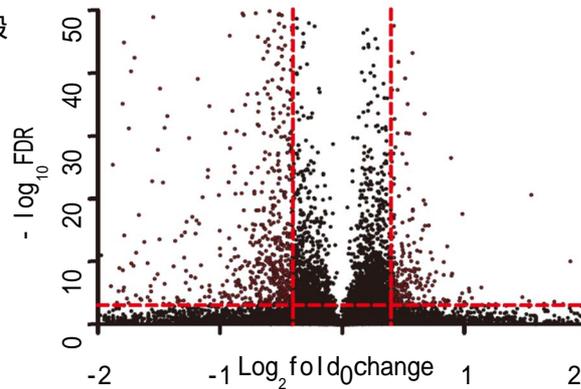
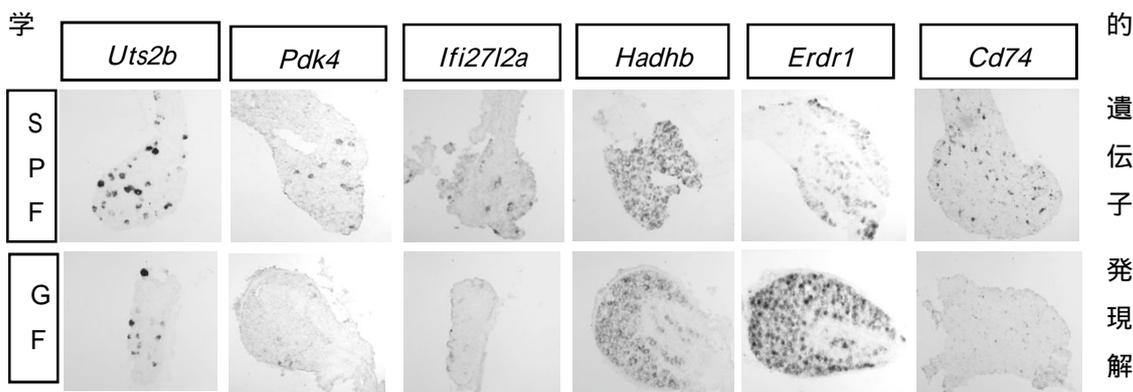


図 3 : Volcano Plot (SPFvsGF)

は microbiota(+)607、microbiota(-)251 の遺伝子が残った。(図 1) このうち両群に共通する遺伝子は microbiota(+)59、microbiota(-)17 であった。

その後、SPF、GF マウスの NPG の cDNA を用いてそれぞれの遺伝子に対して quantitative PCR による遺伝子定量解析を行った。2 者間で 1.5 倍以上の定量差を有意とみなし、最終的に 33 の遺伝子 (microbiota(+)22、microbiota(-)11) が腸内細菌を含む微小細菌叢の変化に応答する遺伝子の候補として選別された。続いてこれら 33 の遺伝子に関して SPF マウスの NPG と GF の NPG を用いて In situ Hybridization による組織

図 4 : In situ hybridization



学的遺伝子発現解析を行った。その結果、microbiota(+)では 5 つ (*Uts2b*, *Hadhb*, *Ifi2712a*, *Pdk4*, *CD74*)、microbiota(-)では 1 つ (*Erdr1*) の遺伝子が NPG 組織において有意な発現量の変化を認めた。*Uts2b*, *Hadhb*, *Ifi2712a*, *Pdk4*, *Erdr1* は NPG ニューロンで遺伝子発現を認めたのに対し、*CD74* は NPG ニューロン以外の領域に遺伝子発現を認めた。(図 2) RNA sequence、quantitative PCR、In situ hybridization の結果より微小細菌の変化に応答する、言い換えれば臓器環境変化に応答する遺伝子を同定することができた。今後は同定された遺伝子を発現するニューロンサブタイプの臓器別特性の解明を行う予定である。具体的には前述した AAV による投射経路解析、ニューロンサブタイプ特異的な光刺激による生理学的な臓器応答評価を行う予定である。一方で新生児の Ai9 マウスに AAV retro Cre 溶液を経口的に投与し、1 週間後に解析を行ったところ、NPG の一部のニューロンで蛍光シグナルが確認できた。これは AAV が一部の消化管粘膜上皮に感染し、その領域に NPG 由来の迷走神経線維が投射していることを示す重要な所見である。この発見を応用し、今後は同様の手法で蛍光シグナルを認めたニューロンポピュレーションと、前述の In situ hybridization にて有意な発現量の変化を認めた遺伝子を発現するニューロンポピュレーションが合致するかどうかを Fluorescence in situ hybridization にて検証する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okamoto M, Yoshioka Y, Maeda K, Bito Y, Fukumoto T, Uesaka T, Enomoto H	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Mice conditionally expressing RET(C618F) mutation display C cell hyperplasia and hyperganglionosis of the enteric nervous system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genesis	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvg.23292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Espinosa-Medina Isabel, Jevans Ben, Boismoreau Franck, Chettouh Zoubida, Enomoto Hideki, Müller Thomas, Birchmeier Carmen, Burns Alan J., Brunet Jean-François	4. 巻 114
2. 論文標題 Dual origin of enteric neurons in vagal Schwann cell precursors and the sympathetic neural crest	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 11980 ~ 11985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1710308114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Vassilev Vassil, Platek Anna, Hiver Sylvain, Enomoto Hideki, Takeichi Masatoshi	4. 巻 43
2. 論文標題 Catenins Steer Cell Migration via Stabilization of Front-Rear Polarity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 463 ~ 479.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2017.10.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sotoyama Hidekazu, Iwakura Yuriko, Oda Kanako, Sasaoka Toshikuni, Takei Nobuyuki, Kakita Akiyoshi, Enomoto Hideki, Nawa Hiroyuki	4. 巻 654
2. 論文標題 Striatal hypodopamine phenotypes found in transgenic mice that overexpress glial cell line-derived neurotrophic factor	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 99 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2017.06.005	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hideki Enomoto
2. 発表標題 Elevated levels of RET signaling coupled with decreased RET dose causes intestinal aganglionosis in mice
3. 学会等名 Development of the Enteric Nervous System:cells,signals,genes and therapy 5th International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taichi Nakatani、Mitsuhiro Iwasaki、Yuko Bitoh、Kosaku Maeda、Tatsuya Takemoto、Hideki Enomoto
2. 発表標題 Exploration of gene function and genetic interactions in the pathogenesis of Hirschsprung disease by electroporation-mediated genome editing in mice
3. 学会等名 Development of the Enteric Nervous System:cells,signals,genes and therapy 5th International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎本 秀樹
2. 発表標題 シュワン細胞に内包された神経分化能とその可塑性
3. 学会等名 2018年度生理学研究所研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田 俊介、永島田 まゆみ、岩崎 光泰、榎本 秀樹
2. 発表標題 遺伝性神経芽腫に同定された変異型Phox2Bの機能解析
3. 学会等名 第6回神緑会ヤングインベスティゲーターアワード
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上坂 敏弘、榎本 秀樹
2. 発表標題 腸管神経系形成不全下におけるシュワン細胞系譜からのニューロン産生
3. 学会等名 第94回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤 圭祐、岡本 光正、上坂 敏弘、前田 貢作、榎本 秀樹
2. 発表標題 RET 活性化型変異 C618F は遺伝子量減少によりヒルシュスプルング病を誘導する
3. 学会等名 第94回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤 圭祐、岡本 光正、上坂 敏弘、前田 貢作、榎本 秀樹
2. 発表標題 RET 活性化型変異 C618F は遺伝子量減少によりヒルシュスプルング病を誘導する
3. 学会等名 CSMIリトリート「若手道場」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Yoshioka, Hideki Enomoto
2. 発表標題 Elucidation of the anatomy and function of the nodose-petrosal ganglia, a sensory gateway to organ communication
3. 学会等名 CSMIリトリート「若手道場」
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----