

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07050

研究課題名(和文)末梢神経を介した腸管恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of the peripheral nervous system in gut homeostasis

研究代表者

石亀 晴道(Ishigame, Harumichi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：70729227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腸管神経系には多様性に富んだ神経が多数存在し、腸管恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられているが、まだその役割の一端が解明されたに過ぎず多くの不明な点が残されている。本研究では、遺伝学的手法を用いて神経栄養因子Tropomyosin receptor kinase(Trk)受容体ファミリーであるTrkA、TrkB、TrkCを発現する神経の形態学解析を行った結果、腸管内外の異なる神経節より腸管へ投射される神経繊維が異なるTrk受容体の発現様式により大別されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管の末梢神経系は、腸管外由来の末梢神経と腸管内に神経細胞体が存在する内在神経により構成され、複雑なネットワークを形成しているが、これらの由来の異なる神経を識別可能な有用なマーカーは同定されておらず、このことが腸管の末梢神経系の複雑な機能を理解する上での障害の一つになっている。本研究では、Trk受容体ファミリーの発現様式が特性の異なる神経のマーカーとなることを明らかにしたことから、今後、Trk受容体ファミリーを発現する神経と炎症性腸疾患等の病態との関連性や、これの神経の生体内における役割を解析することで、末梢神経を介した腸管の恒常性維持機構の解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The peripheral nervous system in the gut, which plays important roles for gut function and homeostasis, is a complex network of intrinsic enteric neurons and nerve fibers derived from ganglia outside the gut. The tropomyosin receptor kinase (Trk) family, TrkA, TrkB, and TrkC, are crucial for development, survival, and differentiation of different types of neurons through neurotrophin signaling. However, Trk family expression in the gut nerves with the diverse anatomical and functional features are yet to be clarified. In this study, we employed genetic reporter mice to visualize gut nerves that express the Trk family genes. Our genetic labeling approach revealed the distinct anatomical distribution of intrinsic and extrinsic nerves expressing the different Trk family receptors and may be useful for dissecting functional characteristics of diverse gut nerves.

研究分野：免疫学

キーワード：末梢神経 腸管神経

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸管の末梢神経系は、腸管外由来の末梢神経と腸管内に神経細胞体が存在する内在神経より構成され、複雑なネットワークを形成している。この腸管神経系には多様性に富んだ神経が多数存在し、腸管恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられているが、まだその役割の一端が解明されたに過ぎず多くの不明な点が残されている。また、内在神経由来の神経線維と腸管外由来の神経線維を識別できる有用なマーカーも同定されておらず、このことが腸管の末梢神経系の複雑な機能を理解する上での障害の一つになっている。

神経栄養因子の受容体である Tropyomyosin receptor kinase (Trk) ファミリーの TrkA、TrkB、TrkC を介したシグナル伝達は、神経系の発生に必須であり、その発現様式の違いは神経細胞の分化や機能に影響を与えていると考えられている。特に、皮膚の感覚神経においては、TrkA は侵害受容器に発現し、TrkB と TrkC は、触覚を担う 2 種類の異なった機械受容器にそれぞれ発現することが報告されている。一方、腸管においても Trk ファミリー発現神経が存在することが知られていたが、その詳細な組織内分布や生体内における役割に関しては、ほとんど報告がなかった。

2. 研究の目的

本研究は、異なる Trk 受容体を発現する神経の性質を解析し、腸管に投射する神経の多様性を解明することを目的とした。さらに、これらの神経を特異的に操作可能な実験系を確立し、生体内における役割を明らかにすることで、末梢神経を介した新たな腸管の恒常性維持機構を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) Trk ファミリー発現神経の形態学解析

Trk 受容体レポーターマウスは、TrkA-CreERT2 マウス(自家作製)、TrkB-CreERT2 マウス (JAX027214)、および、TrkC-CreERT2 マウス (JAX030291) と Cre 依存的に赤色蛍光タンパク質 (tdTomato) を発現する Ai14 マウス (JAX007914) を交配することにより作製した。これら Trk 受容体レポーターマウスより腸管を採取し、三次元免疫組織染色をすることにより、腸管組織に分布する神経の形態学的解析を行った。

(2) 末梢神経節の RNA シークエンス

神経マーカーである PGP9.5 の GFP レポーターマウス (JAX022476) を用いて、異なる神経節より神経を分離し、RNA シークエンスによる遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

レポーターマウスを用いて、tdTomato の発現を指標に Trk ファミリー遺伝子発現神経の腸管組織内分布について解析した。その結果、TrkA を発現する神経線維は筋層間神経叢や粘膜下神経叢で確認されたが、その神経細胞体は腸管内には存在せず、大部分は Tyrosine hydroxylase (TH) 陽性の腸管外来神経由来であると考えられた。TrkB 発現神経は、腸管では筋層間神経叢にその細胞体が分布しており、アセチルコリン合成酵素である Choline acetyltransferase (ChAT) 陽性であった。一方で、腸管での TrkC 発現神経は、筋層間神経叢と粘膜下神経叢との両方の内在神経に存在し、粘膜組織でも神経線維が高密度に分布していることが分かった。また、TrkC 発現神経も ChAT 陽性であり、その多くが Calcitonin gene related

peptide (CGRP)陽性であった。

次に、腸管外の神経節での Trk ファミリー遺伝子発現を tdTomato の発現を指標に解析した結果、TrkA 発現神経は腹腔交感神経節、TrkB 発現神経は求心性迷走神経節、また、TrkC 発現神経は脊髄後根神経節に多く分布していた。さらに、PGP9.5-GFP レポーターマウスより採取した神経節を用いた RNA シークエンス解析からも、形態学的解析と同様な Trk ファミリー遺伝子の発現様式を示す結果が得られた。このように、TrkA、TrkB、TrkC 遺伝子を発現する腸管神経は、それぞれ特徴的な組織内分布を示し、腸管内外の異なる神経節より腸管へ投射される神経繊維が Trk 受容体の発現様式により大別されることが明らかとなった(図 1)。

Trk ファミリー遺伝子発現神経の生体内における役割を解析するために、Trk 受容体レポーターマウスと Cre 依存的にジフテリア毒素を発現する (Rosa26-DTA) マウスとの交配による神経除去を試みた。しかしながら、本研究で用いた CreERT2 ラインと Rosa26-DTA ラインとの組み合わせは、ジフテリア毒素の発現を誘導する効率が非常に低いことが分かり、これら神経の生体内での役割を解析するには至らなかった。今後、Trk ファミリーの発現を腸管組織に分布する異なる神経のマーカとして用い、病態との関連性や生体内での役割を詳細に解析することで、末梢神経を介した腸管の恒常性維持機構の解明に繋がることが期待される。

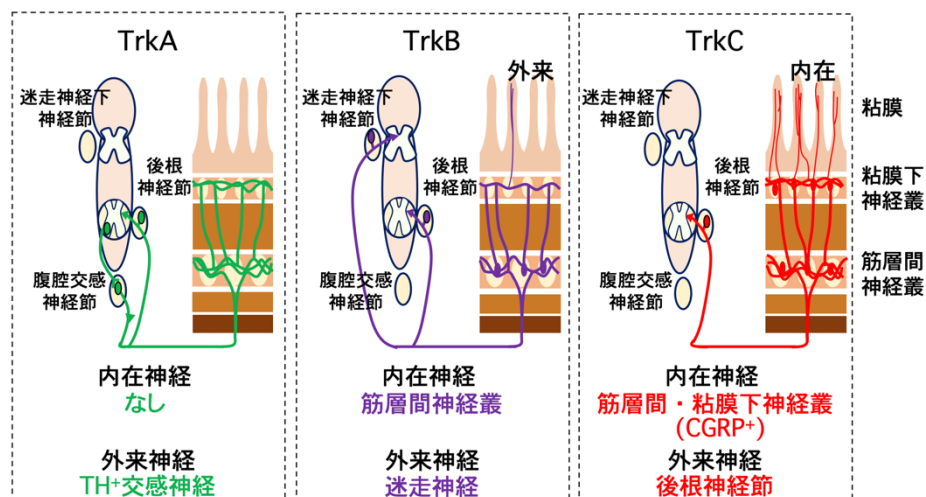


図1 腸管末梢神経系におけるTrkファミリー発現神経の分布

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石亀晴道, 青柳秀隆, 板澤萌子, 岡田峰陽
2. 発表標題 Trk受容体遺伝子発現レポーターを用いた腸管神経のイメージング解析
3. 学会等名 第21回日本神経消化器病学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------