

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19321

研究課題名(和文)c-Kit変異マウスを用いた損傷腸管神経再生メカニズムの解析

研究課題名(英文)Analysis of neurogenesis in the enteric nervous system with c-Kit mutant mice

研究代表者

玉田 宏美(Tamada, Hiromi)

名古屋大学・医学系研究科・学振特別研究員(PD)

研究者番号：60712817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、塩化ベンザルコニウムによる腸管神経損傷後、新生神経細胞の出現が野生型マウスと比較してc-Kit変異マウスにおいて顕著に観察されることを明らかにした。この新生神経細胞は、通常神経節細胞が存在しない縦走筋層または漿膜下に存在する異所性の新生神経細胞である。また損傷後3週で既に腸管神経系に含まれる各神経サブタイプに分化しており、微細構造上も通常の神経節と同等の神経節を構成していた。さらに、c-Kit inhibitorの野生型マウスへの投与で、この異所性新生神経細胞の出現が有意に上昇したことから、c-Kitシグナリングが腸管神経細胞の損傷後の再生を抑制的に制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was focused on that neurogenesis in the enteric nervous system was observed extremely in c-Kit mutant mice, compared to wildtype mice. After the ablation of myenteric plexus layer with benzalkonium chloride, the new neurons were appeared in the longitudinal muscle layer or the subserosal layer, where normally enteric neurons were not distributed. In addition, they were already differentiated into several neuronal subtypes and formed normal enteric ganglion 3 weeks after the ablation with benzalkonium chloride. The neurogenesis was also enhanced in wildtype mice with administration of imatinib, a c-Kit inhibitor, compared to wildtype mice without administration. From these results, it seems that c-Kit signaling regulates the neurogenesis inhibitory in adult gut.

研究分野：機能組織学

キーワード：腸管神経系 神経再生 c-Kit

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 腸管神経系 (enteric nervous system: ENS) は、外界からの侵襲など、比較的傷害を受けやすい環境にある神経系であるにも関わらず、中枢神経系や末梢神経系と比べ、神経再生メカニズムについてはほとんどわかっていない。成体の腸管には神経前駆細胞が残存し、それらは *in vitro* において神経細胞へと分化することが知られているが<sup>1)</sup>、*in vivo* で神経再生現象が観察されることは極めて稀であり、ENS の神経再生を再現することは困難であるとされている。

(2) 申請者は、c-Kit 変異マウスである *W/W<sup>v</sup>* マウスを用いた予備実験において、腸管神経損傷後、新生神経細胞が観察されることを *in vivo* で見出した。このことから、野生型の *in vivo* では、抑制性の因子が働いているが、c-Kit の変異が生じることで神経再生を可能にすると予想された。そこで、本研究では、c-Kit 変異マウスを用い、腸管神経損傷後の神経再生メカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

### (1) 新生神経細胞の細胞特性の解析

損傷後に出現した新生神経細胞の前駆細胞は何であったのか、そして、その前駆細胞はどこに位置していたもので、どのように遊走してきたのかを明らかにすることを目的とした。特に前駆細胞の候補として、内在性に腸管内に存在するグリア細胞や、腸間膜を介して腸管外から侵入していく細胞などを検討しており、新生神経細胞の発現タンパクや微細構造を解析することで理解できると考えられた。

### (2) c-Kit の欠損と ENS の再生メカニズムの関連についての解析

*W/W<sup>v</sup>* マウス (c-Kit 欠損マウス) で特異的に見られる神経再生のメカニズムに、c-Kit 変異のどの要因が関与しているのかを明らかにすることを目的とした。*W/W<sup>v</sup>* マウスは、c-Kit レセプター発現細胞であるカハールの介在細胞 (ICC) をはじめ、マスト細胞や造血幹細胞にも障害が見られる。本研究で見られた神経再生を可能にするものがこれらの細胞の欠損によるものなのか、免疫系など、c-Kit 変異に伴う他の要因によるものなのかに注目した。

## 3. 研究の方法

(1) 野生型マウスおよび *W/W<sup>v</sup>* マウス (c-Kit 欠損マウス) 回腸を用いた。腸管神経損傷モデルとして、0.03% 塩化ベンザルコニウム (BAC) を消化管壁外から 30 分間巻きつけ

ることにより、筋層間神経叢 (Myenteric plexus) を損傷させた (図 1 a, b)。損傷後、1 週間、2 週間、3 週間とタイムコースを追い、損傷部位を解析した。

(2) 新生神経細胞の同定に NADPH ジアフォラーゼ活性を用い、腸管の状態のまま新生神経細胞を可視化し、その発現の有無、細胞数の解析を行った。

(3) 免疫組織化学的手法を用い、新生神経細胞の細胞特性、サブタイプへの分化を検討した。また、透過型電子顕微鏡を用い微細構造を解析した。

(4) BAC 処理後に、c-Kit inhibitor であり、gastrointestinal stromal tumor (GIST) の治療薬である imatinib を投与することで、人為的に c-Kit activity を阻害した野生型マウスを作製した。このマウスと非投与野生型マウスを用い、新生神経細胞の出現について比較し、c-Kit activity の関与を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 野生型マウスおよび *W/W<sup>v</sup>* マウスに対して BAC 処理を行い、タイムコースを追ってサンプルを摘出後、NADPH ジアフォラーゼ活性を用いて損傷部位の神経要素を解析した。BAC 処理後 1 週間で、野生型、*W/W<sup>v</sup>* マウスいずれにおいても、損傷部位へのおびただしい数の神経線維の伸長が見られた (図 1 c, d)。これらの神経線維は縦走筋層に並行して走行していた。処理後 2 週間以降に新生神経細胞が出現し始めるが、野生型マウスではほとんど観察されないものの、*W/W<sup>v</sup>* マウスでは多くの新生神経細胞が見られることがわかった。損傷後 3 週間の時点で、野生型マウスと *W/W<sup>v</sup>* マウスとの新生神経細胞の一個体あたりの細胞数は有意に差があること

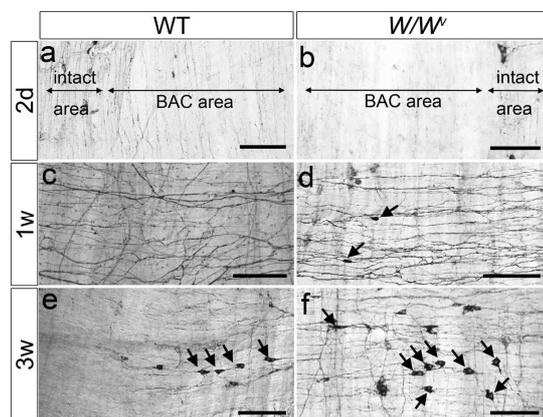


図1 BAC 損傷後の野生型および *W/W<sup>v</sup>* マウスの NADPH ジアフォラーゼ活性により標識した異所性新生神経細胞。Scale Bar 200  $\mu\text{m}$  (Tamada & Kiyama 2016 より引用)

がわかった(図 1 e, f) (野生型マウス  $10.6 \pm 3.9$  cells / animal,  $n=7$  vs.  $W/W^v$   $59.2 \pm 17.6$  cells / animal,  $n=6$ ) ( $p<0.05$ , Mann-Whitney U test)。

(2) BAC 処理後の新生神経細胞は、通常腸管神経節細胞に存在しない縦走筋層あるいは漿膜下に分布しており、異所性の細胞として観察された (図 2)。

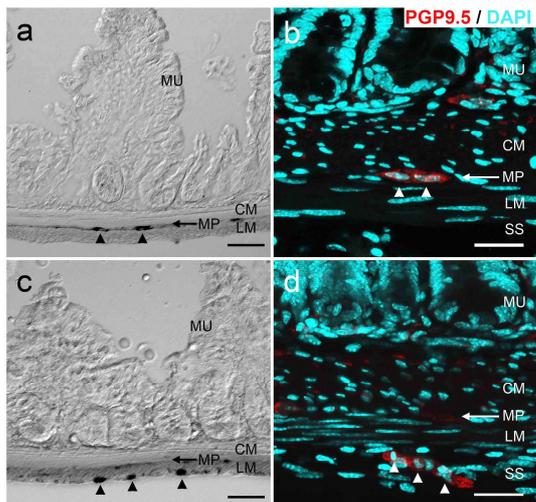


図 2 NADPH ジアフォラーゼ活性および免疫染色を施した切片像。(a, b) 正常像。神経節細胞は筋層間神経叢 (MP) に分布し、それより外側には分布しない。(c, d) BAC 処理後に出現する新生神経細胞の分布 (矢頭)。MP より外側に位置している。Scale Bar 100  $\mu$ m (a,c), 30  $\mu$ m (b, d) (Tamada & Kiyama 2016 より引用)

(3) 内在性抑制運動ニューロンを標識する NADPH ジアフォラーゼ活性や一般的な神経

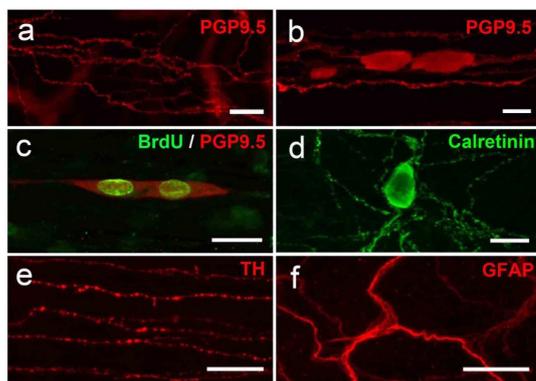


図 3 (a-e) 各神経サブタイプのマーカーで標識された異所性新生神経細胞。(c) BrdU+から、損傷後に分裂した細胞であることも示されている。(f)周辺には GFAP+のグリア細胞も示された Scale Bar 50  $\mu$ m (a, b, c, e) 20  $\mu$ m (d) (Tamada & Kiyama 2016 より引用)

マーカーである PGP9.5 で標識されるだけでなく、内在性の興奮性運動ニューロンへの分化、外来性の神経線維の侵入など、この部位に通常分布する神経サブタイプへと、損傷後 3 週間の段階で既に分化していることが免疫組織化学的手法から明らかになった (図 3 a-f)。

また、神経損傷後 BrdU を自由飲水で与えたマウスでは、これらの異所性神経細胞が BrdU ポジティブであることから、確かに損傷後に分裂した細胞であることが示された (図 3 c)。

異所性新生神経細胞周囲には、GFAP で標識されるグリア細胞の存在も示された (図 3 f)。

(4) 新生神経細胞を NADPH ジアフォラーゼで標識後、透過型電子顕微鏡で観察した。その結果、腸管神経節の構成要素である神経節細胞、グリア細胞、シナプス小胞を含む神経束、基底膜の存在が確認でき、この段階ではほぼ正常な微細構造を呈する腸管神経節を構成していることも明らかにした (図 4)。

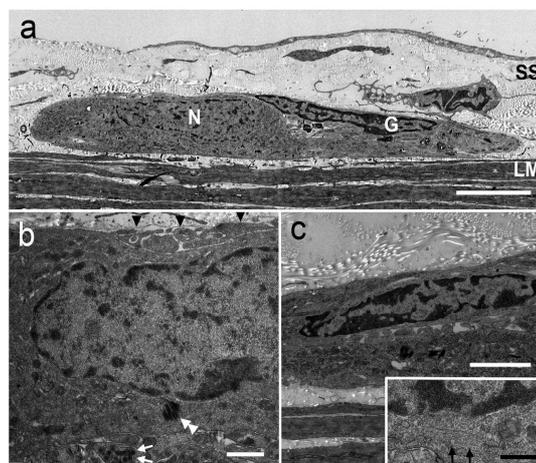


図 4 新生神経細胞の透過型電子顕微鏡像。

(a) 通常の微細構造を呈する神経節が漿膜下に形成されている N: 神経節細胞 G: グリア細胞 SS: 漿膜下 LM: 縦走筋層 (b) 新生神経細胞の拡大図 神経節を取り囲む基底膜の存在 (矢頭) や周囲にシナプス小胞を含む神経束の存在 (矢印) が示されている。二重矢頭: NADPH ジアフォラーゼで標識された細胞であることを示す。

(c) グリア細胞の拡大図 (挿入図) GFAP で標識されるフィラメント構造も見られる。

Scale Bar 2  $\mu$ m; inset, 500 nm (Tamada & Kiyama 2016 より引用)

(5) BAC 処理後に Imatinib を野生型マウスに経口投与し、c-Kit inhibitory の環境を人為的に作製した。野生型マウスと  $W/W^v$  マウス間の比較と同様に NADPH ジアフォラーゼ活性で標識される異所性新生神経細胞の数を比較した。その結果、BAC 処理後 3 週間の段階で、Imatinib 投与群の野生型マウスにおいて、非投与群の野生型マウスと比較して、異所性新生神経細胞の発現数が優位に上昇することを示した(図 5)(Imatinib 非投与群  $10.6 \pm 3.9$  cells / animal,  $n=7$  vs Imatinib 投与群  $103.4 \pm 36.1$  cells / animal,  $n=8$ )( $p < 0.01$ , Mann-Whitney U test)。

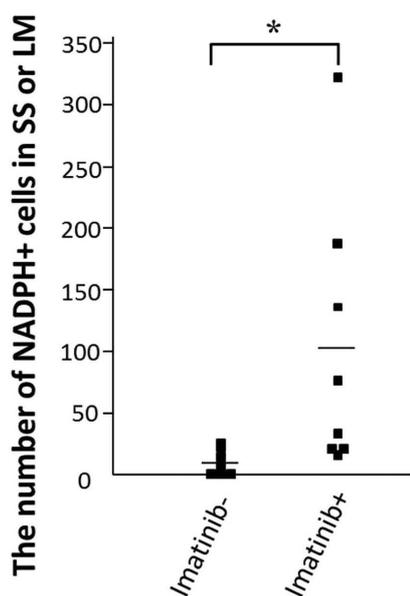


図 5 BAC 処理後に新生される異所性神経細胞数の imatinib 非投与群(Imatinib -) と投与群(Imatinib +)間の比較 (Tamada & Kiyama 2016 より引用)

(6)以上の結果より、*in vivo* での腸管では、損傷後の神経損傷過程において、c-Kit signaling が神経再生を抑制的に制御している可能性が示唆された。

#### 引用文献

Tamada H, Kiyama H (2016) Sci Rep  
1) Kruger GM et al (2002) Neuron  
35:657-69

#### 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 2 件)

Tamada H, Kiyama H, Suppression of c-Kit signaling induces adult neurogenesis in the mouse intestine after myenteric

plexus ablation with benzalkonium chloride. Sci Rep, 査読有, 2016  
DOI:10.1038/srep32100

Watanabe S, Ilieva H, Tamada H, Nomura H, Komine O, Endo F, Jin S, Mancias P, Kiyama H, Yamanaka K, Mitochondria-associated membrane collapse in a common pathomechanism in SIGMAR1- and SOD1-linked ALS. EMBO Molecular Medicine, 査読有, 2016, 1421-1437  
DOI:10.15252/emmm.201606403

[学会発表](計 5 件)

玉田宏美、木山博資、Existence of c-Kit negative cells with ultrastructural features of interstitial cells of Cajal in the subserosal layer of  $W/W^v$  mutant mouse colon. 第 58 回日本平滑筋学会総会、2016 年 8 月 17 日-19 日、東北医科薬科大学(宮城県仙台市)

玉田宏美、木山博資、塩化ベンザルコニウム処理後の c-kit 欠損マウスにおける腸管神経再生、第 93 回日本生理学会総会、2016 年 3 月 22 日-24 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

玉田宏美、神経サブタイプの探索と消化管再生メカニズムとの関連に注目した ICC 研究の展開、日本平滑筋学会若手の会研究発表会、2016 年 1 月 9 日、サンライフホテル(福岡県福岡市)

玉田宏美、木山博資、塩化ベンザルコニウム処理により新生する異所性神経細胞の形態学的解析、第 68 回日本自律神経学会総会、2015 年 10 月 29 日-30 日、ウインク愛知(愛知県名古屋市)

玉田宏美、木山博資、塩化ベンザルコニウム処理後に ICC ミュータント動物で顕著に発現する異所性神経細胞の形態学的特性、第 57 回日本平滑筋学会総会、2015 年 8 月 25 日-27 日、山口大学(山口県宇部市)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

玉田 宏美(TAMADA, Hiromi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・学振特別研究員(PD)  
研究者番号: 60712817