

令和元年6月24日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06998

研究課題名(和文) 単純な脊椎動物の腸神経系機能の可視化と光遺伝学による腸運動の制御

研究課題名(英文) Imaging of the function of enteric neurons in a simple vertebrate and manipulation of gut movement by using optogenetics

研究代表者

八田 公平 (Hatta, Kohei)

兵庫県立大学・生命理学研究科・教授

研究者番号：40183909

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)：脊椎動物の腸は独自の神経系をもち、第2の脳とよばれている。私達は、体が透明で腸を外部から見る事ができるゼブラフィッシュ幼生を用いて、腸の発生・再生・機能を非侵襲的に調べる実験系を確立した。

腸神経細胞を多色ラベルし、腸の上における一個一個の遊走神経堤細胞の移動・分裂・神経分化の追跡に成功した。腸神経細胞・ペースメーカー細胞(ICC)・平滑筋細胞・粘膜細胞・EC細胞などのCa<sup>2+</sup>イメージングを行ない、腸の運動との関係を明らかにした。

また、これらの細胞にチャンネルロドプシン2を発現させ、腸の細胞1～数個を光で興奮させるだけで、様々な腸の運動をひきおこしたり停止したりできることをはじめて示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

透明なゼブラフィッシュの幼生を用いて、生きた個体内で腸神経系の発生・機能・再生をライブイメージングによって調べることができる実験系を確立した。また、光遺伝学的手法によって、光で腸の動きを体内で制御することに成功した。これらの成果は、腸の発生と機能をひとつひとつの細胞レベルで解析し、ヒルシウスブルング病や過敏性腸症候群(IBS)など、さまざまな腸の疾病の原因や治療法を明らかにするための基礎を提供する。

研究成果の概要(英文)：The gut of vertebrate has enteric nervous system (ENS) which is also called the second brain. We developed an experimental system to study development, function and regeneration of ENS in vivo with zebrafish larva.

By labeling ENS in multi-colors, we revealed migration, cell division and neurogenesis from the vagal neural crest in vivo. We performed Ca<sup>2+</sup> imaging of enteric neurons, smooth muscles, mucosa, EC cells as well as pace-make cells, and revealed the relationship between the activity of each cell and the gut movement.

We also showed that photo-activation of one to a few cells in the gut expressing ChR2 could activate or arrest various gut movement, for the first time in the vertebrate.

研究分野：神経生物学 発生生物学

キーワード：光遺伝学 腸神経系 カルシウムイメージング 咽頭歯 平滑筋 蠕動運動 ゼブラフィッシュ 摂食行動

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 脊椎動物の腸は独自の反射回路を備えた神経系をもち、体から切り離しても運動し、食塊を後方へ移送することができるため、第2の脳とよばれている。しかし、どの細胞が、どのように活動し、蠕動運動などを引き起こしているのか、また、これらの細胞がどのように分化・発生するのかを、生きた個体内で調べることは難しかった。

### 2. 研究の目的

- (1) 腸の発生・再生および、機能を非侵襲的に調べる実験系を、体が透明で腸の動きや細胞を個体内で外から観察できるゼブラフィッシュ幼生を用いて確立する。
- (2) 腸の神経系、平滑筋、ペースメーカー細胞 (ICC)、EC細胞、内胚葉などの活動と、腸の運動との関係について  $Ca^{2+}$  イメージングによって調べる。
- (3) 光遺伝学を腸に応用し、体外から光によって腸の動きを制御し、各細胞の機能・役割を明らかにする。
- (4) 魚類における咽頭顎の動きの多様性と進化を調べる。

### 3. 研究の方法

- (1) GCaMP3 を腸の様々な細胞種で発現させ、共焦点顕微鏡による  $Ca^{2+}$  イメージングを行う。
- (2) ChR2 を腸の様々な細胞種で発現させ、体外から光によって刺激することによって、腸の運動の変化を調べる。
- (3) 迷走神経堤領域に熱ショックを与え、CRE による組換えをおこすことによって腸神経細胞を多色ラベルし、腸の上における一個一個の神経堤細胞の移動、分裂、神経分化をライブイメージングにより追跡する。
- (4) 赤外線レーザーにより腸神経系を破壊し、再生過程を追跡する。
- (5) 摂食中の魚類の放射光動画撮影をおこない咽頭顎の動きを観察する。

### 4. 研究成果

#### A. 発生・再生:

- (1) 脊椎動物の腸神経系の発生を可視化するために、コリンアセチルトランスフェラーゼ a (chata) 遺伝子の 1.5kb 上流領域と緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を導入したトランスジェニックゼブラフィッシュ Tg(chata:GGFF2) の解析を行った。受精後 60 時間から、腸において GFP 陽性細胞が発現が開始し、受精後 6 ~ 12 日幼生の腸では、GFP 陽性細胞の 92% が HuC/D を発現する神経細胞であることがわかった。受精後 1 月半の若い成魚では、66% の GFP 陽性細胞が ChAT 抗体陽性であった。ChAT 抗体が染まらない幼生の腸でも、すでに、GFP を発現している細胞を観察できることになる。私達は、タイムラプス生体イメージングを行い、腸神経分化の時間空間分布を観察した。GFP 陽性細胞は、受精後 60 時間 (gfp 遺伝子は 53 時間) では、腸の左右に 1 列に並んだ状態で観察された。多くの GFP 陽性細胞は動かず、新しい GFP 陽性細胞は、古い GFP 陽性細胞群の間を埋めるように付け加わることがわかった。GFP の発現は、72 時間までに腸の後端まで到達したが、その後、腸の背側、腹側にも GFP 陽性細胞が現れ、4 日目までには、腸全体に広がった。一部の GFP を発現し始めたばかりの細胞は、古い GFP 陽性細胞群の中を移動してから停止する様子が観察された。これらの細胞は、その挙動から、最終的な神経分化の場所を探している神経細胞前駆体の可能性がある。これらの結果は、Tg(chata:GGFF2) が腸神経系の分化を調べるために有用な系統であることを示している。
- (2) 遊走神経堤細胞が腸の中で分裂し、神経細胞に分化する様子を、さらに詳細に調べるために、CRE 組換えによって多色ラベルできるトランスジェニックを作製した。これと、Tg(HSP:creERt2) を組み合わせ、受精後 13-14 時間胚を遊走神経堤領域に熱ショックが起こるように 55 °C のお湯に 3 秒間つけることで、腸神経堤細胞を多色ラベルして追跡した。その結果、細胞分裂、移動、神経分化の様子をライブイメージングによって明らかにすることに成功し、i) 腸神経堤細胞が分裂する場所は腸全体に散らばっており、特定の場所に限定されていない、ii) 腸神経分化にともなう細胞系譜を作製し、娘細胞が両方とも HuC/D 陽性の神経細胞になる場合、両方とも Sox10 陽性 (未分化神経堤細胞あるいはグリア細胞) の場合、HuC/D 陽性細胞と Sox10 陽性細胞になる場合があることを明らかにした。
- (3) 一部の Sox10 陽性細胞体は HuC/D 陽性の神経細胞体と強く接触し、緊密な相互作用が示唆された。
- (4) ゼブラフィッシュ幼生の腸神経系を破壊すると 5 日で再生すること、また、再生過程を明らかにした。

#### B. 機能:

- (5) 腸神経細胞、ペースメーカー細胞 (ICC)、平滑筋細胞、粘膜細胞、内分泌細胞などの細胞の活動を、GCaMP3 を用いた  $Ca^{2+}$  イメージングによって、生きた個体の外部から観察することにはじめて成功した。これによって、さまざまな腸の運動と関連して活動する神経細胞やその他の細胞の同定に成功した。
- (6) 一方、これらの細胞にチャネルロドプシン 2 を発現させ、1 ~ 数個の細胞を光で興奮させると、様々な腸の運動をひきおこしたり、停止したりできることをはじめて示した。

以上の成果は、腸の発生・再生・機能を単一細胞レベルで明らかにし、腸の運動を体外から光制御するための基盤になると考えられる。

#### C. 進化：

(7) 複数種の魚類について放射光 X 線イメージング解析を行ない、咽頭顎の動きがいくつかのパターンに分類できること、一方、予想外の動きを示すものも存在することがわかった。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Mai Kuwata, Masataka Nikaido, Kohei Hatta

Local heat-shock mediated multi-color labeling visualizing behaviors of enteric neural crest cells associated with division and neurogenesis in zebrafish gut  
Developmental Dynamics 248:437-448 (2019)

Masataka Nikaido, Saki Izumi, Honoka Ohnuki, Yuki Takigawa, Kyo Yamasu, Kohei Hatta  
Early development of the enteric nervous system visualized by using a new transgenic zebrafish line harboring a regulatory region for choline acetyltransferase a ( chata ) gene  
Gene Expression Patterns 28: 12 ~ 21 (2018)

〔学会発表〕(計 23 件)

○八田公平 放射光イメージングの動物学への応用：魚が隠し持つ第 2・第 3 の顎の謎を SPring-8 で解き明かす (招待講演) 第 90 回日本動物学会 大阪 2019 年

○高御堂大慈、西田さやか、兒島 卓也、二階堂 昌孝、川上浩一、岡本 晋一、八田 公平  
ゼブラフィッシュ幼生の腸組織のカルシウムイメージングと光遺伝学的解析 (ポスター) 第 42 回日本神経科学大会 新潟 2019 年

Daiji Takamido, Sayaka Nishida, Takuya Kojima, Masataka Nikaido, Shin-ichi Okamoto, Koichi Kawakami, ○Kohei Hatta

Ca<sup>2+</sup> imaging and optogenetic analysis of tissues in the zebrafish gut (口頭)(国際学会)  
14<sup>th</sup> International Zebrafish Conference (Suzhou, China) 2019 年

Maria Ohno, Natsumi Horiuchi, Koichi Kawakami, ○Masataka Nikaido, Kohei Hatta

ゼブラフィッシュを用いた腸神経細胞除去後の再生機構の解明 (口頭)  
第 52 回日本発生生物学学会 2019 年

Daiji Takamido, Sayaka Nishida, Takuya Kojima, Masataka Nikaido, Shin-ichi Okamoto, ○Kohei Hatta

Imaging and optogenetic analysis of the second brain to control gut motility in zebrafish larvae (ポスター) (国際学会) 2018 年

CSH Asia meeting on Latest Advances in Development & Function of Neuronal Circuits (Awaji, Japan)

Daiji Takamido, Sayaka Nishida, Takuya Kojima, Masataka Nikaido, ○Kohei Hatta

Identification of neuronal and non-neuronal cells associated with either peristalsis or slow waves in the zebrafish intestine (口頭) (国際学会)

13<sup>th</sup> International Zebrafish Conference (Madison, USA) 2018 年

○大野 真理愛、堀内 奈津美、川上浩一、二階堂 昌孝、八田 公平

ゼブラフィッシュを用いた腸神経系傷害後の再生機構の解明 (ポスター)  
第 41 回日本分子生物学学会 横浜 2018 年

大野 真理愛、堀内 奈津美、川上浩一、二階堂 昌孝、八田 公平

ゼブラフィッシュを用いた腸神経系傷害後の再生機構の解明 (ポスター) 第 41 回日本神経科学大会 神戸 2018 年

八田 公平、兒島 卓也、高御堂 大慈、西田 さやか、二階堂 昌孝、岡本 晋一

ゼブラフィッシュ幼生の単純な腸における徐波と蠕動運動に関連して活動する細胞群の光遺伝学による機能解析 (口頭) 第 41 回日本神経科学大会 神戸 2018 年

高御堂 大慈、西田 さやか、兒島 卓也、二階堂 昌孝、岡本 晋一、八田 公平

ゼブラフィッシュ幼生の腸における蠕動運動と徐波に関連して活動する神経および非神経細胞群の同定 (口頭) 第41回日本神経科学大会 神戸 2018年

Shin-ichi Okamoto & Kohei Hatta

Ca<sup>2+</sup>-imaging and photo-manipulation of the simple gut of zebrafish larvae *in vivo* (ポスター) (国際学会)

10<sup>th</sup> European Zebrafish Meeting, Budapest, Hungary 2017年

Taiki Komori, Saki Shiomoto, Shota Nomura, Kenta Kuwabara, Tomohiro Inoue, Takanori Ikenaga, Kentaro Uesugi, Masato Hoshino, Masataka Nikaido, Mai Kuwata, Maria Ohno, Mio Aoki, Takuya Kojima, Daiji Takamido, Sayaka Nishida, Mie Honda, and Kohei Hatta

Synchrotron mCT and live-imaging analysis of pharyngeal jaws of ancient fish, arowana, gar, polypterus and lungfish, in feeding. (口頭) (国際学会)

The Joint Symposium between The 2nd Brain Research Institute Monash

Sunway-University of Toyama International Symposium 富山 2017年

岡本 晋一、八田公平

ゼブラフィッシュ幼生の単純な腸の生体内カルシウムイメージングと光操作 (口頭)

第50回 日本発生生物学会 船堀、東京 2017年

八田公平、岡本 晋一

ゼブラフィッシュ幼生の単純な腸における蠕動運動の Ca<sup>2+</sup>イメージングおよび光遺伝学解析 (口頭)

第40回 日本神経科学大会 (Neuroscience 2017) 幕張、東京 2017年

二階堂昌孝、泉早紀、大貫穂乃佳、瀧川雄基、弥益恭、八田公平

コリンアセチルトランスフェラーゼ調節領域を使用した遺伝子導入魚による腸神経系の初期発生過程の可視 (口頭)

第40回 日本神経科学大会 (Neuroscience 2017) 幕張、東京 2017年

桑田舞、八田公平、二階堂昌孝

迷走神経堤の可視化による腸神経分化過程の細胞動態の解明 (ポスター)

第40回 日本神経科学大会 (Neuroscience 2017) 幕張、東京 2017年

大野 真理愛、堀内 奈津美、二階堂 昌孝、八田 公平

ゼブラフィッシュを用いた腸神経系傷害後の機能回復機構の解明 (ポスター)

生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017 第40回日本分子生物学会年会) 神戸 2017年

岡本 晋一、高御堂 大慈、西田 さやか、兒島 卓也、二階堂 昌孝、八田 公平

ゼブラフィッシュ幼生の単純な腸のカルシウムイメージングと光遺伝学解析 (ポスター)

生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017 第40回日本分子生物学会年会) 神戸 2017年

高御堂 大慈、西田 さやか、兒島 卓也、二階堂 昌孝、岡本 晋一、八田 公平

ゼブラフィッシュ幼生の腸の運動と関連して活動する細胞の同定 (ポスター)

生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017 第40回日本分子生物学会年会) 神戸 2017年

桑田舞、大野 真理愛、青木 澗、兒島卓也、古森大樹、高御堂大慈、西田さやか、本多美瑛、二階堂昌孝、中川将司、八田公平

2つの脳の作り方: ~いろいろな色の光と遺伝子による挑戦~ (ポスター)

知の交流シンポジウム 神戸 2017年

八田公平、古森大樹

身近にいるエイリアン? 魚がかくし持つ第2のあごのなぞを SPring-8 でときあかす (招待講演)

やさしいサイエンスセミナー 光都オプトピアジアター 赤穂郡 2017年

Kohei Hatta, Saki Shiomoto, Shota Nomura, Tomohiro Inoue, Kenta Kuwabara, Kentaro Uesugi, Ayumi Suzu, Kyohei Fujita, Tatsunori Harada, Takanori Ikenaga. Diverse structure of pharyngeal teeth in teleost (zebrafish, medaka, carp, snowflake moray) live-imaged by synchrotron X-ray cinematography. (口頭)

12<sup>th</sup> International Conference on Zebrafish Development and Genetics (The Allied Genetics2016) (Orland, UAS) 2016年

Saki Shiomoto, Shota Nomura, Kenta Kuwabara, Tomohiro Inoue, Yuka Takamiya, Tatsunori Harada, Kazutake Tashima, Kyohei Fujita, Tamami Yamamoto, Ayumi Suzu, Kentaro Uesugi, Takanori Ikenaga, O.Kohei Hatta.

Application of synchrotron microCT and X-ray cinematography to zoology.

(動物学への放射光 X 線 CT と X 線映画撮影の適用 ; 招待講演)

Joint events of the 22<sup>nd</sup> International Congress of Zoology and the 87<sup>th</sup> meeting of Zoological Society of Japan. 沖縄 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/bioinfo/index-j.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：二階堂昌孝

ローマ字氏名：(NIKAIDO, masataka)

所属研究機関名：兵庫県立大学

部局名：生命科学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁): 70344950

### (2)研究分担者

研究分担者氏名：中川将司

ローマ字氏名：(NAKAGAWA, masashi)

所属研究機関名：兵庫県立大学

部局名：生命科学研究科

職名：助教

研究者番号(8桁): 00212085

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。