

令和元年5月30日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08466

研究課題名(和文) RETチロシンキナーゼの活性化レベル変動と神経系形成異常の相関についての検証

研究課題名(英文) RET signaling levels control development of the enteric nervous system

研究代表者

上坂 敏弘 (Uesaka, Toshihiro)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90304451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経栄養因子GDNFの受容体であるRETチロシンキナーゼは機能消失型、機能獲得型の点変異が腸管神経系の形成不全を呈する疾患と関連することが示唆されてきた。RETの機能低下による腸管ニューロン前駆細胞の移動や維持の不良による腸管神経系の欠損とは異なり、今回、RETの恒常的活性化により、活性化レベルが少し高まった状態だと神経分化が亢進され、結果として細胞移動が中断され、腸管神経系の形成不全が生じることがわかった。さらにRETの活性化レベルが高まると神経前駆細胞の増殖が高められ、腸管神経系の過形成が生じることにもわかった。本研究によりRETの活性化レベルの絶妙な制御の重要性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管神経系の形成は、マウスやヒトにおいて胎児期中期から始まり、生後離乳期あたりまで続く。この長い発生過程において神経栄養因子GDNF-RETシグナルが様々な細胞イベントを制御している。RETの活性化レベルが比較的強く保たれている状態で、前駆細胞の未分化性が維持され、細胞移動が行われるが、活性化レベルが通常より高まると、ニューロンへの分化が促進されることが、本研究の変異マウスにより、裏付けられた。一つの分泌性調節因子によるRETの活性化レベルの絶妙な変化が発生過程の制御にいかにも重要であることが示され、発生機序だけでなく、破綻による発生異常の機序の理解につながる成果である。

研究成果の概要(英文)：Constitutive activation of RET in medullary thyroid carcinoma (MTC) occurs mainly through the substitution of a single amino acid in the cysteine-rich domain. We generated a new mouse model for MEN2A harboring RET(C618F) mutation. Mice expressing RET(C618F) exhibit mild C cell hyperplasia and increased numbers of enteric neurons, indicating that RET(C618F) confers gain-of-function phenotypes. In contrast, decreased amount of RET(C618F) with its high activity confers susceptibility to intestinal aganglionosis. In reduced RET(C618F) embryos, induction of premature neuronal differentiation causes impaired neural precursor migration. These findings suggest that proliferation, migration, and neuronal differentiation are exquisitely regulated by both the activation levels and total amount of RET.

研究分野：発生生物学

キーワード：受容体チロシンキナーゼ 腸管神経前駆細胞 疾患モデルマウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

神経栄養因子 GDNF の受容体である RET チロシンキナーゼの点変異は多発性内分泌腫瘍症やヒルシュスプルング病と関連していることが明らかになっていた。これまで、点変異による RET の機能消失が、腸管神経節の形成不全につながり、ヒルシュスプルング病の発症原因と考えられ、一方、機能獲得型の変異により RET の活性化レベルが高まることで、がん化につながると考えられてきたが、機能獲得型の変異がヒルシュスプルング病患者からも報告された。それが RET のシステインリッチドメインの Cys 残基の置換である。これまでに報告されている RET の恒常的活性化を伴うシステインリッチドメインの点変異マウスでは、活性化（ダイマー形成）により細胞質内に留まり、細胞膜表面に出ないため、GDNF 応答性が失われているため、結果として RET 欠損の表現型と同様に発生不全であった。そこで、GDNF 応答性を維持した状態で、活性化レベルが上昇している変異があれば、RET の活性化レベルが高い状態で生じる発生異常についてより詳細に解析できるのではと考えた。

2. 研究の目的

これまでに、RET の発現レベルの低下、不活性化が発生過程に及ぼす影響について明らかにしてきたが、では、活性化レベルが亢進した場合、発生過程がどのように破綻するのかについて、マウス生体レベルでの解明を目指した。具体的には、RET(C618F)変異遺伝子2コピーもしくは1コピーを有するマウスの胚発生過程を解剖学的、組織化学的に解析し、RET の機能獲得および消失による発症過程の詳細を明らかにする。

3. 研究の方法

- 1) RET(C618F) のホモ変異体マウスの解析： 甲状腺における RET 陽性細胞の数や腸管ニューロンの数について定量的な解析を行った。腸管ニューロンについては、ニューロンマーカーによって標識された細胞を数えるだけでなく、EdU 取り込み解析を行い、細胞増殖能について検証した。また甲状腺、腸管神経系以外にも RET シグナルが寄与している腎臓の発生などに異常がないか検証した。
- 2) RET(C618F) のヘテロ変異体マウスの解析： ホモ変異体マウスと同様にヘテロ変異体マウスにおいても異常があるかどうか検証した。特にホモ変異体マウスは生後すぐに死んでしまうので、ヘテロ変異体マウスを使って甲状腺での腫瘍形成などの検証を行った。甲状腺においては、カルシトニン遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、C 細胞におけるカルシトニン発現レベルについても検証した。
- 3) *Ret^{51(C618F)}-* マウスの解析： RET(C618F) ホモ変異体マウスは生後すぐ死んでしまうので、つぎに RET(C618F) を一コピーのみ有するマウスを作製し、RET(C618F) 変異体の発現レベルを半分に抑えるとどうなるか検証した。その結果、生後しばらく生きるが、腸管神経系の形成不全が生じることがわかった。そこで、従来知られている RET シグナル不足による細胞移動や生存維持の低下によるのではなく、RET の比較的わずかな活性化レベルの亢進によって、なぜ形成不全が生じるのか検証した。具体的には、発生過程における種々の分化マーカーによる組織科学的解析による細胞特性についての検証、タイムラプス解析による前駆細胞の挙動について比較検討した。
- 4) スキップ型ヒルシュスプルング病の発症機序の解析： *Ret^{51(C618F)}-* マウスは、小腸遠位部から神経節がけっそんしているが、一部のマウスで、大腸の神経節が欠損した領域において、(スキップ型、島様の) 神経節の形成が認められた。この孤立した神経節の形成を示すマウスモデルの報告はなく、ヒルシュスプルング病患者で報告されているのスキップ型の神経節野線不全の発症機序は全くわかっていなかった。我々はこのマウスモデルを用いて、近年我々が見出した外来神経線維由来のシュワン細胞系譜からのニューロン産生が寄与しているのではないかと考え、*Dhh::Cre* ドライバーと mCherry 蛍光タンパク質レポーターラインを組み合わせ、シュワン細胞系譜のニューロンを標識して、関与を検証した。

4. 研究成果

- 1) GDNF 応答性を有し、かつ恒常的活性化が認められる RET (C618F) 点変異： 正常の RET は GDNF 刺激がないと自己リン酸化をおこさず、GDNF に応答して活性化（リン酸化）する。一方報告されている点変異 RET(C620R)は GDNF なしでも活性化を示し、一方で、GDNF 刺激によるそれ以上の活性化はみとめられない。それに対し、RET(C618F) は恒常的活性化による活性レベルの上昇が認められ、かつ GDNF 刺激により活性化が高められることを確認した。そこでこの RET (C618F) 変異体を RET 遺伝子座にノックインしたマウスを作製した。
- 2) RET (C618F) ホモ変異マウスは RET 欠損マウスと異なり、腸管神経系および腎臓

の形成は見かけ上正常と変わらず形成されたが、生後すぐ致死となった。詳しく調べると、腸管ニューロンの過形成がみとめられ、発生過程において前駆細胞の増殖が高められていることが明らかになった (図1)。しかしながら消化管の過度の閉塞などは認められず、直接の死因についてはまだ不明である。

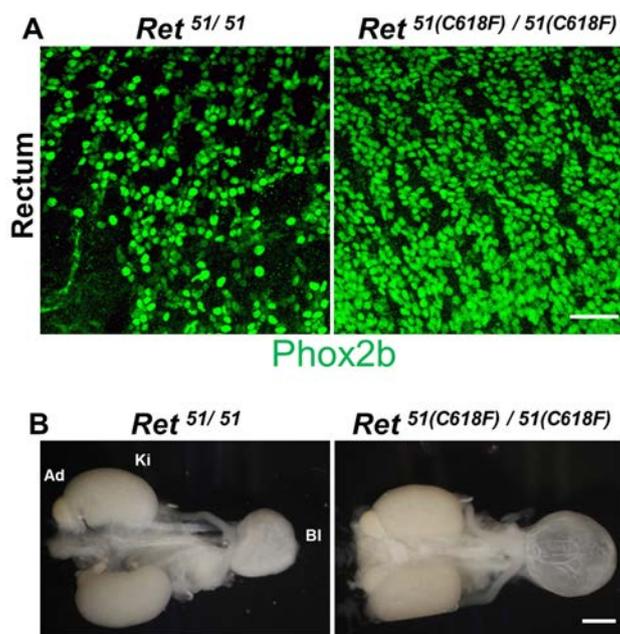


図1. RET (C618F) ホモ変異マウスの腸管神経系と腎臓の発生. コントロール (RET51) と RET (C618F) ホモ変異マウスの出産直後における直腸における腸管ニューロンの核 (Phox2b 抗体染色, A)と腎臓 (B). Ad: 副腎、Ki: 腎臓、Bl: 膀胱. スケールバー, A: 50 μ m, B: 1000 μ m.

出典 : Genesis 2019.

DOI:(10.1002/dvg.23292)

3) RET (C618F) ヘテロ変異マウスは、致死性は認められず、繁殖も可能であった。腸管ニューロンの数を定量すると、大腸において統計学的有意差があるニューロンの増加が認められた。また甲状腺において、加齢に伴い C 細胞の有意な増大が認められた (図2)。これらのことから、RET(C618F)変異体は機能獲得型の表現型を獲得することが示めされ、腸管神経系や甲状腺 C 細胞の過形成について解析するモデルマウスとして利用できるのではと期待される。

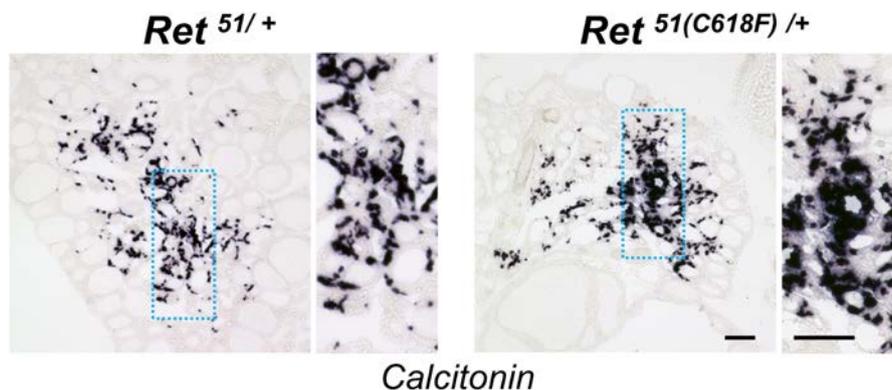


図2. 甲状腺 C 細胞の増大. コントロール (RET51) と RET (C618F) ヘテロ変異マウスの甲状腺切片のカルシトニン遺伝子に対する in situ ハイブリダイゼーション. スケールバー, 100 μ m.

出典 : Genesis 2019. DOI:(10.1002/dvg.23292)

4) RET(C618F)を一コピーだけ有する *Ret*^{51(C618F)/-} マウスは、大部分のマウスが小腸遠位部以降において腸管神経節が形成されないことがわかった。一方で、腎臓は正常に形成されており、生後すぐの致死性はなかった。腸管神経系の発生過程について観察すると、腸管神経前駆細胞の移動が中腸の遠位部にさしかかるあたりにおいて滞ることがわかった。移動している細胞集団の先端部において細胞の特性を組織科学的に解析した結果、通常では、先端部には未分化の前駆細胞の細胞集団が認められるが、*Ret*^{51(C618F)/-} マウスでは、すでに、ニューロンに分化し始めた細胞が出現し始めていることを明らかにした。また RET シグナルの下流にある ERK の活性化レベルをみると、通常先端部の細胞では低く保たれているが、*Ret*^{51(C618F)/-} マウスでは、ERK が活性化されている細胞が多く認められた。ERK の活性化はニューロンに分化し始めた細胞に顕著に認められることから、

Ret^{51(C618F)}/- マウスでは、前駆細胞の RET 活性化レベルが高まることによってニューロンへの分化が亢進し、結果として未分化な細胞の細胞移動が滞っていると考えられる。

5) *Ret^{51(C618F)}/-* マウスでは、RET の活性化レベルの低下ではなく、活性化レベルの増大によって前駆細胞の移動が滞っていると考えられるので、それを確かめるために、RET の活性化に寄与するリガンドである神経栄養因子 GDNF の発現を半分に下げたマウスにおいて、つまり GDNF による RET の活性化が少し抑えられた *Ret^{51(C618F)}/-* マウスにおいて腸管神経前駆細胞の移動を観察すると、移動不良が少し改善された。このことから、RET 活性化の亢進が前駆細胞の移動不全の原因であることが強く示唆された。

6) *Ret^{51(C618F)}/-* マウスは、希に大腸の無神経節領域に孤立した神経叢を形成する場合があった。ヒトにおいては、このような孤立した神経叢を形成しているヒルシュスプルング病患者が知られていたが、これまで、マウス変異モデルでは、このような表現型を示すものはなかった。*Ret^{51(C618F)}/-* マウスがはじめてであり、この疾患モデルマウスを用いて孤立した神経叢が、形成される機序の解析を進めている。我々が近年見出した外来神経線維に付随するシュワン細胞系譜からのニューロン産生が寄与しているのではないかと仮定し、検証を開始したところ、孤立した神経叢を構成する大部分のニューロンがシュワン細胞系譜であったことが明らかになってきており、現在さらに解析を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Okamoto, M., Yoshioka, Y., Maeda, K., Bito, Y., Fukumoto, T., **Uesaka, T.**, Enomoto, H. (2019) Mice conditionally expressing RET(C618F) mutation display C cell hyperplasia and hyperganglionosis of the enteric nervous system. *Genesis* 57: e23292. doi: 10.1002/dvg.23292. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① **Uesaka, T.**, Enomoto H. Enteric neurogenesis from Schwann cell lineage in mouse models of Hirschsprung disease. 第 40 回 日本神経科学大会 千葉 2017
- ② **Uesaka, T.**, Enomoto, H. Formation of enteric nervous system from Schwann cell precursors in mouse models of Hirschsprung disease. International Symposium “Development of the enteric nervous system: cells, signals, genes, and therapy. Boston, MA, USA, April 2018.
- ③ **上坂敏弘** 腸管神経系の形成不全後のシュワン細胞系譜からの腸管ニューロン産生 第 124 回日本解剖学会総会 新潟 2019

[図書] (計 1 件)

- ① Young, H.M., Stamp, L.A., **Uesaka, T.**, Hao, M.M., Newgreen, D.F., Enomoto, H. Development of the enteric nervous system. In: Said, H., ed. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Volume 1. 6th ed. New York Academic Press, 2018:273-288.

[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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(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。