

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15743

研究課題名（和文）腸神経堤由来細胞の細胞遊走をガイドする神経-周辺組織間コミュニケーションの探索

研究課題名（英文）Identification of the enteric neural crest-derived cell migration-regulated genes

研究代表者

河野 美幸 (KOHNO, Miyuki)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：10153496

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：腸管神経系（ENS）は、腸内神経堤細胞（ENCC）に由来するニューロンおよびグリアのネットワークであり、結腸の蠕動活性の調節に必須である。ENCCは胃腸管に沿って移動してENSを形成する。発生期におけるENCC運動の調節機構を解明するために、胚性期11.5日および15.5日にマウス腸の遺伝子発現を解析した。この結果、E11.5と比較しE15.5腸管内でコラーゲンVI（ColVI）の亢進およびフィブロネクチン（FN）の減少を確認した。さらに、ENCC-運動性アッセイにより、ColVIがFN誘発ENCC運動を減弱させ、接着斑関連分子の発現およびリン酸化を減少させることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The enteric nervous system (ENS) is a network of neurons and glia, which are derived from enteric neural crest cells (ENCCs), and is essential for regulating peristaltic activity of the colon. ENCCs migrate along the gastrointestinal tract to form the ENS. We analyzed differential gene expression between developing mouse intestine at embryonic days 11.5 and 15.5 in order to elucidate the mechanisms associated with variations in ENCC motility during this period. Our findings indicated significant differences in the expression of genes encoding extracellular matrix proteins during these developmental periods, as well as upregulated collagen VI (ColVI) and downregulated fibronectin (FN) in the E15.5 intestine. Furthermore, ENCC-motility assays in the presence of FN, ColVI, or a combination of the two revealed that ColVI attenuated FN-induced ENCC motility and reduced expression and phosphorylation of molecules associated with focal adhesion complexes.

研究分野：小児外科学

キーワード：腸管神経系

## 1. 研究開始当初の背景

腸管は運動や分泌・吸収の調節を行う Enteric neural system (ENS) と呼ばれる神経系を持つ。ENS は胎生期に神経堤由来細胞である enteric neural crest-derived cells (ENCCs) が腸管を口側から肛門側に遊走し、成熟することで形成される。この過程の異常は Hirschsprung 病 (HSCR) をはじめとする腸管神経節異常症の原因となる[1, 2]。HSCR の治療は、無神経節腸管の切除と肛門への吻合が根治術となる。しかし指定難病にもなっている全結腸型、小腸型の腸管神経節欠損の症例では死亡率が高く、腸管神経の移植療法の可能性が模索されているが移植効率が低く未だ成功していない[3]。近年マウス腸管神経の胎児腸管への移植実験から、胎生 14.5 日 (E14.5) 以降の腸管では腸管神経の移植効率が大きく減少することが報告された[4]。この報告は、E14.5 以前の腸管に移植効率を上げる因子もしくは、14.5 以降の腸管に移植を阻害する因子の発現を示唆していた。そこで我々は、E11.5 腸管と E15.5 腸管の比較遺伝子発現プロファイル解析を行うことで腸管神経の運動に影響を持つ分子の探索を行うことができるのではないかと考え本課題を提案した。そして、その解析から予想される分子が腸管神経の形成にどのように機能するか明らかにすることで、腸管神経移植の効率を上げる薬剤の開発につなげることを目指した。

## 2. 研究の目的

HSCR は、胎生期に ENS を形成する ENCCs の運動、増殖などに異常が生じて発症する。HSCR における神経節細胞欠損の過程はヒルシュスプルング病患者の遺伝子解析やモデルマウスを使った解剖学的解析により明らかになりつつあるが、その分子メカニズムに関してはほとんどわかっていない。本研究では、ENCCs の遊走に着目し、マウス胎仔の腸管形成における ENCCs 遊走を調節する分子を、ENCC 遊走能の高い時期の腸管 (E11.5) と遊走が抑制されている時期 (E15.5) の腸管の比較遺伝子発現解析から明らかにする。そして未知の ENCCs 遊走因子の同定を介して、HSCR における神経節欠損の分子メカニズムの解明につなげる。

## 3. 研究の方法

E11.5 と E15.5 マウスの腸管から全 RNA を抽出し、マイクロアレイ解析と定量 PCR に用いた。全 RNA を鋳型に GeneChip WT PLUS reagent kit (Affymetrix) を使いラベル化 cRNA を合成し、ラベル化 cRNA は、Clariom D array, mouse (Affymetrix) にハイブリダイズさせた。

ハイブリダイズさせた cRNA は GeneChip Fluidics Station 450 で洗浄後、GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix) でスキャンした。有意に変動した遺伝子群は、Signal Space Transformation-robust multiple-array average normalization method (SST-RMA) 法で標準化したアレイデータから E11.5 と E15.5 の比較遺伝子発現プロファイルを作製し、その変動比と One-way analysis of variance (ANOVA) の P 値から判定した ( $FC > 3, < -3, P < 0.05$ )。有意に変動した遺伝子群は、DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) [5] を使い、機能アノテーションクラスタリング解析を行うことで、どのような特性を持つ遺伝子群の発現変動が発生時の腸管内で起きているのか検証した。

ENCCs は E13.5 のマウス腸管から Nagashimada M らの方法を用い単離 [6]、neurosphere を形成させ維持培養した。ENCCs の細胞運動は Neurosphere をあらかじめ細胞外マトリクス (ECM) コートした培養皿に滴下し、12 時間後顕微鏡観察し、ENCCs の広がった面積を定量することで求めた。

ENCCs-ECM 相互作用による、細胞骨格、接着班への影響はトリプシン処理した Neurosphere を ECM 処理した培養皿に滴下し、90 分後の ENCCs のパキシリンとファロイジン を蛍光染色し、共焦点顕微鏡を使い観察した。

## 4. 研究成果

E11.5 と E15.5 腸管の比較マイクロアレイ解析の結果、3 倍以上発現変動が認められた遺伝子は、E11.5 で高発現の遺伝子が 351、E15.5 で高発現の遺伝子が 1004 であった。変動のあった遺伝子がどのような機能を持つのか機能アノテーションクラスタリング解析を行ったところ、糖タンパク質、分泌タンパク質、酸化還元酵素、細胞外マトリクス (ECM)、膜タンパク質の順で多くエンリッチされていた (表 1)。細胞外マトリクスは糖タンパク質と分泌タンパク質の特徴も併せ持つことから、それらのカテゴリに含まれる ECM のエンリッチメントスコアを計算したところ、両カテゴリにおいても有意に ECM がエンリッチされていることが判明したことから、発生期 ENCCs 運動の調節に ECM が大きく関与していることが示唆された。そこで ENCCs への関与が報告されている ECM の発現プロファイルを調べてみると、Col1a1、Col1a2 (I 型コラーゲン)、Lama4 (ラミニン  $\alpha 4$ )、and Col6a3、Col6a4、Col6a2、Col6a1 (VI 型コラーゲン: Col6) が E15.5 腸管で、Vcan (パーシカン)、Lama1 (ラミニン  $\alpha 1$ ) と Fn1 (フィブロネクチン: FN) が E11.5 腸管で高発現していることが分かった (表 2)。

表 1. マイクロアレイ結果の機能アノテーション  
エンリッチメント解析

Category	Term
Cluster 1	Enrichment Score: 26.5
<b>UP_KEYWORDS</b>	<b>glycoprotein</b>
UP_KEYWORDS	disulfide bond
UP_SEQ_FEATURE	glycosylation site:N-linked (GlcNAc...)
UP_KEYWORDS	signal
UP_SEQ_FEATURE	signal peptide
UP_SEQ_FEATURE	disulfide bond
Cluster 2	Enrichment Score: 20.9
<b>UP_KEYWORDS</b>	<b>secreted</b>
UP_SEQ_FEATURE	signal peptide
GOTERM_CC_DIRECT	extracellular region
GOTERM_CC_DIRECT	extracellular space
Cluster 3	Enrichment Score: 8.1
<b>UP_KEYWORDS</b>	<b>oxidoreductase</b>
GOTERM_MF_DIRECT	oxidoreductase activity
GOTERM_BP_DIRECT	oxidation-reduction process
Cluster 4	Enrichment Score: 7.6
<b>GOTERM_CC_DIRECT</b>	<b>proteinaceous extracellular matrix</b>
UP_KEYWORDS	extracellular matrix
GOTERM_CC_DIRECT	extracellular matrix
Cluster 5	Enrichment Score: 7.6
<b>GOTERM_CC_DIRECT</b>	<b>membrane</b>
UP_SEQ_FEATURE	transmembrane region
UP_SEQ_FEATURE	topological domain:Cytoplasmic
UP_SEQ_FEATURE	topological domain:Extracellular
UP_KEYWORDS	membrane
UP_KEYWORDS	transmembrane
UP_KEYWORDS	transmembrane helix

表 2. マウス腸管発生期に変動の大きかった  
細胞外マトリクス遺伝子

Gene Symbol	Fold Change (E11.5 vs. E11.5)	ANOVA p-value (E11.5 vs. E11.5)
<i>pem issive components</i>		
Vcan	-11.12	0.00006
Lama1	-4.05	0.00050
Fn1	-2.82	0.00054
Col1a1	2.34	0.00227
Col1a2	2.74	0.00649
Lama4	3.93	0.00003
Col6a3	6.15	0.00006
Col6a4	14.97	0.00004
Col6a2	20.83	0.00006
Col6a1	25.34	0.00006
<i>non-pem issive components</i>		
Tnc	-6.1	0.00023
Hapln1	-4.83	0.00083
Col18a1	-3.32	0.00617
Col9a1	-3.12	0.00024
Col12a1	2.84	0.00832
Bgn	2.91	0.00277
Dcn	5.73	0.00102
Col14a1	17.21	0.00002
Thbs2	25.99	0.00000

発生時、遺伝子発現変動がみられた ECM で神経堤細胞との相互作用が報告されている分子は、パーシカンを除き細胞運動の調節に重要な役割を持つインテグリンに相互作用する ECM であったことから、Col6、FN、ラミニンが ENCCs の運動に影響を与えるか調べた。その結果、Col6 は、FN 誘導性の ENCC 運動を阻害した(図 1)。そこで ENCCs の運動が抑制される E15.5 の腸管における Col6 と FN の局在を蛍光免疫染色で調べたところ、腸管神経周辺で Col6 の分布が優勢であった。Col6 の FN 誘導性 ENCC 運動の抑制がどのように調節されているか明らかにするため、ECM-細胞間の相互作用で活性化される細胞接着斑タンパク質について調べたところ、フィブロネクチンで誘導される p130<sup>Cas</sup> のリン酸化及びタンパク質発現がコラーゲン VI の存在下で抑制されていた。さらにアクチン細胞骨格と接着斑の構造を観察したところ、Col6 は FN によって惹起されるストレスファイバーの形成、細胞接着斑の形成も有意に抑制していることが明らかになった(図 2)。

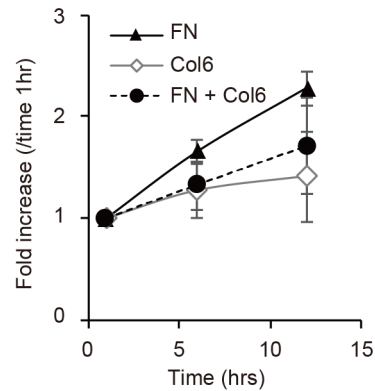


図 1. Neurosphere - ECM 接着解析

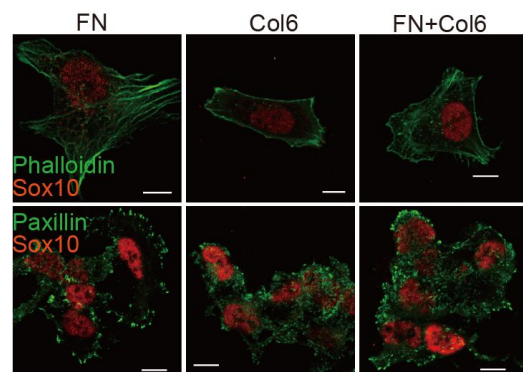


図 2. 各 ECM 上で接着-伸展した ENCCs のアクチン骨格、細胞接着斑構造の観察

本研究では、トランスクリプトーム解析で、マウスの腸管発生期に ECM タンパク質の発現が有意に変化することを実証した。またその中で Col6 が FN 誘導性の ENCC 運動を抑制すること、そのメカニズムとして、FN によって惹起される p130<sup>Cas</sup> タンパク質とその

リン酸化を Col6 が抑制すること、さらに FN-ENCCs の相互作用により誘導されるアクチンストレスファイバーの形成とパキシリンの細胞接着班への集積が Col6 の存在下では抑制されることを明らかにした。これらの結果は FN と Col6 のバランスが ENCC の運動を調節していることを示しており、FN 添加もしくは Col6 阻害による ENCC 運動の亢進が HSCR の新規治療戦略として有効であることを示唆する。本研究では、ENS に関連する ECM タンパク質をコードする遺伝子に焦点を当てたが、有意に変動した遺伝子群には ENS 形成および HSCR に関連する複数の遺伝子(例えば、*GDNF*、*GFRA2*、*EDNRB*、*EDN3*、*LICAM*、*SEMA3C*、*SEMA3D*、および *Zeb2*) が含まれていたことから、我々のデータは、ENS 形成や HSCR の病態に関連する遺伝子の抽出にも役立つことが期待される。

#### 参考文献

1. T.A. Heanue, V. Pachnis, Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies, *Nature reviews. Neuroscience*, 8 (2007) 466-479.
2. F. Obermayr, R. Hotta, H. Enomoto, H.M. Young, Development and developmental disorders of the enteric nervous system, *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 10 (2013) 43-57.
3. L.A. Stamp, Cell therapy for GI motility disorders: comparison of cell sources and proposed steps for treating Hirschsprung disease, *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 312 (2017) G348-G354.
4. R. Hotta, R.B. Anderson, K. Kobayashi, D.F. Newgreen, H.M. Young, Effects of tissue age, presence of neurones and endothelin-3 on the ability of enteric neurone precursors to colonize recipient gut: implications for cell-based therapies, *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 22 (2010) 331-e386.
5. W. Huang da, B.T. Sherman, R.A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, *Nature protocols*, 4 (2009) 44-57.
6. M. Nagashimada, H. Ohta, C. Li, K. Nakao, T. Uesaka, J.F. Brunet, J. Amiel, D. Trochet, T. Wakayama, H. Enomoto, Autonomic neurocristopathy-associated mutations in PHOX2B dysregulate Sox10 expression, *The Journal of clinical investigation*, 122 (2012) 3145-3158.

#### 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)

(1) Nishida S, Yoshizaki H, Yasui Y, Kuwahara T, Kiyokawa E, Kohno M. Collagen VI suppresses fibronectin-induced enteric neural crest cell migration by downregulation of focal adhesion proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 1;495(1):1461-1467. (査読あり)

(2) Yasui Y, Nishida S, Shironomae T, Satomi M, Kuwahara T, Kohno M. Surgical approach for fecal incontinence with a patulous anus after transanal pull-through for Hirschsprung disease. *J Pediatr Surg*. 2017 Jun;52(6):1070-1075. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) 吉崎尚良 西田翔一 安井良僚 桑原強 清川悦子 河野美幸, VI 型コラーゲンの腸管神経堤由来細胞移動に及ぼす影響, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会・第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会, 2017 年

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

河野 美幸 (KOHNO, Miyuki)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10153496

(2)研究分担者

(3)連携研究者

吉崎 尚良 (YOSHIZAKI, Hisayoshi)  
金沢医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00443490

安井 良僚 (YASUI, Yoshitomo)  
金沢医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10595325

西田 翔一 (NISHIDA, Shoichi)  
金沢医科大学・医学部・研究医  
研究者番号：50747251