

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03550

研究課題名(和文) 腸管神経前駆細胞における網状細胞移動の分子機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of meshwork-like migration of enteric nervous system progenitors

研究代表者

榎本 秀樹 (Enomoto, Hideki)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：00360511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：網目構造を作る移動様式(網状細胞移動)は、さまざまな組織形成に認められ、網状細胞移動の破綻は先天的組織形成異常を導く。しかし網状細胞移動を制御する分子機構は明らかではない。我々が作製したRET9-Y1015Fマウスでは特定の細胞内シグナルが変調することにより腸管神経前駆細胞(ENCC)の網状細胞移動が破綻し、腸管神経系の欠損が誘導される。本研究このシステム用い網状細胞移動を制御するシグナルの同定を試みた。リン酸化プロテオミクス解析と遺伝子改変マウスを用いた解析で、PLCgammaのシグナル経路とRETのアイソフォーム特異的な細胞内シグナルが協調して網状細胞移動を制御している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網状細胞移動は血管、気管、腺など多様な器官の発生過程で認められる現象で、この分子機構が解明されれば器官発生の原理の理解に新たな扉を開くことが出来る。また、腸管神経前駆細胞の網状移動の障害は先天性の腸管神経系欠損であるヒルシュスプルング病の病態誘導機構の理解にもつながる。本研究では、PLCgammaのシグナルとRETのアイソフォーム特異的な機能が協調して網状細胞移動を誘導していることが示された。RETにはアイソフォームにより下流の細胞内シグナルに違いがあり、今後、この異なるシグナル経路を詳細に調べることで網状細胞移動を制御する分子を同定することが重要であり、現在解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed at understanding molecular mechanisms underlying the meshwork-like migration of neural progenitors of the enteric nervous system (ENS). We used RET9-Y1015 mice whose ENS progenitors display impaired meshwork-like migration. Because these ENS progenitors are defective in PLCgamma signaling downstream of RET tyrosine kinase, we sought to identify the signaling molecules/pathways by performing phospho-proteomics analyses of ENS progenitors. With this method, we have discovered that PLCgamma signaling cascade and RET isoform-specific cooperates to achieve meshwork-like migration.

研究分野：神経発生

キーワード：細胞移動 腸管神経系 RETチロシンキナーゼ ヒルシュスプルング病 細胞極性 細胞接着

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞移動は個体発生において最も根源的な素過程であり、そのメカニズムの理解・探求は器官発生の原理を解明する鍵となる。器官発生における細胞移動には、細胞同士が一定の接触・接着を保ちながら、あたかも一つの共同体として移動し、形態形成に寄与する集団的細胞移動の様式がある。特に細胞が索状に連なって移動し、網目構造を作る移動様式(網状細胞移動)は、脈管系や腺、気管、神経系などの組織形成に認められ、網状細胞移動の破綻は様々な先天的組織形成異常を導く。しかし網状細胞移動を制御する分子機構は明らかではない。

腸管神経系は、腸管神経前駆細胞(Enteric neural crest-derived cells; ENCC)が発生期腸管壁内を網状細胞移動して腸管全体を支配することにより、網目状に形成される。ENCCの移動には神経栄養因子GDNFとその受容体のRETチロシンキナーゼが必須であり、これらを欠損したマウスでは腸管神経系の全欠損を呈する。我々は最近、ヒトRET9アイソフォームをRet遺伝子座にノックインしたマウスにおいて、RETの細胞内ドメインにあるPLC結合チロシン残基(Y1015)をフェニルアラニンに置換した変異マウス(RET9-Y1015Fマウス)ENCCの網状細胞移動の障害により、腸管神経系の部分的欠損が誘導されることを見出した。RET9-Y1015Fマウスでは、ENCCの増殖・生存・分化は正常に保たれているものの、小腸および大腸においてENCCの網状構造が異常となり、ENCC全体の移動が遅延する。さらにタイムラプスイメージングの結果、先端部のENCCは長軸方向に移動せず、腸管の周方向に移動することが明らかになった。以上の結果から、RET9-Y1015FマウスのENCCでは細胞極性や細胞接着が異常となり、網状細胞移動が障害されていることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究はENCCをモデルに、網状細胞移動の分子機構を解明する事を目指した。我々が発見した、網状細胞移動の破綻を示すRET9-Y1015FマウスからENCCを単離し、コントロールENCCと共にGDNF刺激を行い、リン酸化プロテオミクス解析を行った。これによりコントロールマウスとRET-Y1015Fマウスとでリン酸化基質の変化を探索し、GDNF-pY1015-PLCシグナリングの下流にあると考えられる基質の同定を試みた。

3. 研究の方法

(1)ENCCの単離・ENCC細胞株の作成

胎児期腸管を摘出し、PBS内でピペッティングにより腸管組織からENCCを剥離させた。剥離したENCCを、未分化状態を維持できる培養メEDIUMで浮遊培養し、ENCCのneurosphereを作成した。neurosphereを分散培養し、Nmyc遺伝子およびPuromycin耐性遺伝子を持つレンチウイルスで感染させ、細胞を不死化させた。Puromycinで選択処理し、生存した細胞を長期培養してコロニーを形成させ、これらコロニー由来の細胞を混合し、ENCC細胞株を樹立した。

(2)生化学実験

ENCC細胞株を単層培養し、血清飢餓6時間後にGDNFで15分刺激し、細胞を溶解した。ウェスタンブロットによりRETのリン酸化およびRETの下流にあるMAPK・PI3Kのリン酸化を確認した後、同じライセートをリン酸化プロテオミクスに供した。リン酸化プロテオミクスは徳島大学先端酵素研究所・小迫英尊教授に委託した。

(3)Ret-Y1016Fマウスの作成

RET9-Y1015FマウスはY1015F変異を持つヒトRET9cDNAのノックインマウスであるため、マウスゲノムに直接Y1015F変異(マウスではY1016F)が挿入されたRet-Y1016Fマウスを作製した。マウスゲノムのY1016近辺でgRNAを設計し、Y1016F変異・PAM変異・制限酵素(BglI)切断サイトを持つ120塩基の一本鎖オリゴDNA(ssODN)及びCas9と共に、体外受精によって得られた野生型受精卵へエレクトロポレーションした(文献)。この受精卵を一晩培養し、翌日2細胞期胚を偽妊娠マウスに移植した。生まれたF0世代のマウスを野生型マウスと掛け合わせ、Ret-Y1016Fヘテロマウスを得た。

4. 研究成果

(1)野生型ENCC細胞株におけるリン酸化プロテオミクス

野生型マウス由来のENCCをGDNFで15分刺激し、刺激の有無でどのようなリン酸化基質が同定できるのかを解析した。これらENCCでは、GDNF刺激によりRET、MAPKおよびPI3Kがリン酸化されることをあらかじめ確認してある。その結果、GDNF刺激により有意なリン酸化が認められる分子として、MAPK構成因子やSrc、PLCなどが同定でき、ENCCにおいてリン酸化プロテオミクス解析が可能であることが判明した。

(2)RET-Y1015Fマウス由来ENCCの生化学的的特性の確認

網状細胞移動の制御分子を探索するため、RET9-Y1015Fマウスとコントロールマウス(野生型ヒトRET9cDNAのノックインマウス)からENCC細胞株を樹立した。RET-Y1015Fマウスにおける腸管神経系の網状細胞移動の異常は、変異RETを片アレルのみ持つマウスで認められるため(*Ret*^{RET9-Y1015F/-})、我々はコントロールマウスとして野生型ヒトRETcDNAを片アレルのみ持つマウス(*Ret*^{RET9/-})を用いた。さらにコントロールとして野生型マウス、Retヌル変異アレルのヘテロマウス(*Ret*^{+/-})も使用し、それぞれからENCC細胞株を樹立し、GDNF刺激を行ってその生

化学的特性を解析した。その結果野生型マウスおよび *Ret*^{+/-} マウスでは、GDNF 刺激により RET や MAPK、PI3K のリン酸化が認められたが、*Ret*^{RET9/-} マウスおよび *Ret*^{RET9-Y1015F/-} マウスでは、これらのリン酸化が検出できず、RET の発現も検出できなかった(図 1)。

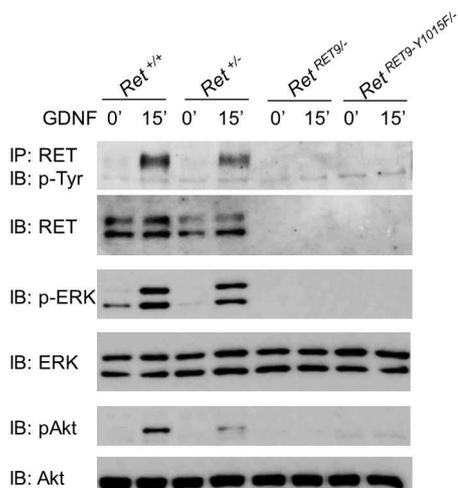


図 1 *RET9-Y1015F* マウス ENCC の生化学的特性。野生型マウスおよび *Ret*^{+/-} マウスでは、GDNF 刺激により RET や MAPK、PI3K のリン酸化が認められたが、*Ret*^{RET9/-} マウスおよび *Ret*^{RET9-Y1015F/-} マウスではこれらのリン酸化および RET の発現が認められなかった。

そこで我々は *RET9-Y1015F* アレルをホモに持つマウス (*Ret*^{RET9-Y1015F/RET9-Y1015F}) およびヒト野生型 RET をホモに持つコントロールマウス (*Ret*^{RET9/RET9}) から ENCC を単離し、各 ENCC クローンの RET の発現を見たが、野生型と同レベルの RET の発現が認められなかった(図 2)。また GDNF 処理による MAPK、PI3K のリン酸化も認められなかった(図 3)。このためヒト *RET* cDNA のノックインにより、RET の発現機構に何らかの異常が生じている可能性が示唆され、これらマウス由来の ENCC をリン酸化プロテオミクス解析に供しても、信頼性のある結果を得る事は難しいと判断した。

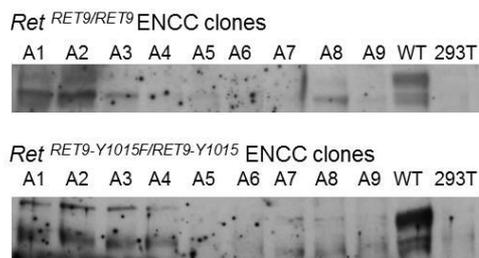


図 2 *RET9-Y1015F* ホモマウス ENCC クローンにおける RET の発現。

野生型マウス由来 ENCC では RET の発現が認められたが、*Ret*^{RET9/RET9} マウスおよび *Ret*^{RET9-Y1015F/RET9-Y1015F} マウス由来の ENCC クローンでは、RET の発現がほとんど認められなかった。ネガティブコントロールとして、293T 細胞ライセートを使用。

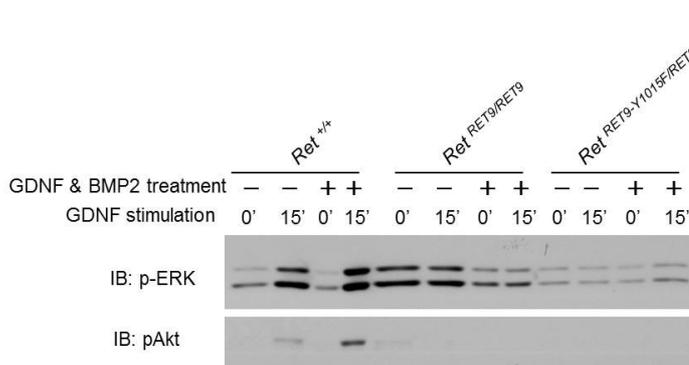


図 3 *RET9-Y1015F* ホモマウス ENCC における MAPK および PI3K のリン酸化。

野生型マウス由来 ENCC では、GDNF 刺激による MAPK および PI3K のリン酸化が認められたが、*Ret*^{RET9/RET9} マウスおよび *Ret*^{RET9-Y1015F/RET9-Y1015F} マウス由来の ENCC では、リン酸化が認められなかった。GDNF+BMP2 の前処理をしても、結果は同じであった。

(3) *Ret-Y1016F* マウスの作成・表現型解析

リン酸化プロテオミクス解析に適した新しい Y1015F マウス系統を樹立するため、我々は CRISPR/Cas9 および受精卵エレクトロポレーション法により、マウスゲノムに直接 Y1015F 変異 (マウスでは Y1016F) を挿入した。野生型マウスより精子・卵子を抽出して受精卵を取得し、これに gRNA、ssODN、Cas9 タンパク質をエレクトロポレーションし、一晚培養して、翌日 2 細胞期胚を偽妊娠マウスに移植した。gRNA は Y1016 近辺で探索し、ssODN は Y1016 を中心に、Y1016F 変異、PAM 変異、および制限酵素 (Bgl I) 切断サイトが入るよう 120 塩基で設計した。得られた F0 マウスと野生型マウスを掛け合わせ、F1 マウスの尾から DNA を抽出して PCR を行い、PCR 産

物が Bgl I で切断できた個体をヘテロ接合体と判断した。シーケンス解析により設計通りの変異が入っている個体を *Ret-Y1016F* マウスとして維持した(図 4)。

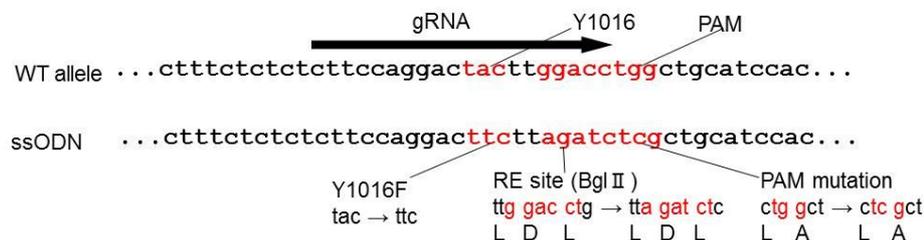


図 4 *Ret-Y1016F* マウス作成法。

gRNA を Y1016 近辺で探索し、ssODNDNA は Y1016 を中心に、Y1016F 変異、PAM 変異、および制限酵素 (Bgl I) 切断サイトが入るよう 120 塩基で設計した。PAM 変異、Bgl I サイトはサイレンス変異を設計した。

我々はまずヒト cDNA ノックイン型の *RET9-Y1015F* マウスと似た腸管神経欠損の表現型が認められるか調べるため、*Ret^{Y1016F/+}* マウスと、*Ret* 遺伝子座に tauLacZ (TLZ) を挿入したヌル変異マウスである *Ret^{TLZ/+}* マウスとを掛け合わせ、胎生 12.5 日目の *Ret^{TLZ/Y1016F}* マウスを摘出し、これを Xgal 染色した。その結果 *Ret^{TLZ/+}* マウスと同じように、*Ret^{TLZ/Y1016F}* マウスでは TLZ 陽性細胞が大腸へ正常に侵入していることが分かり、ENCC の移動が正常である可能性が示唆された(図 5)。

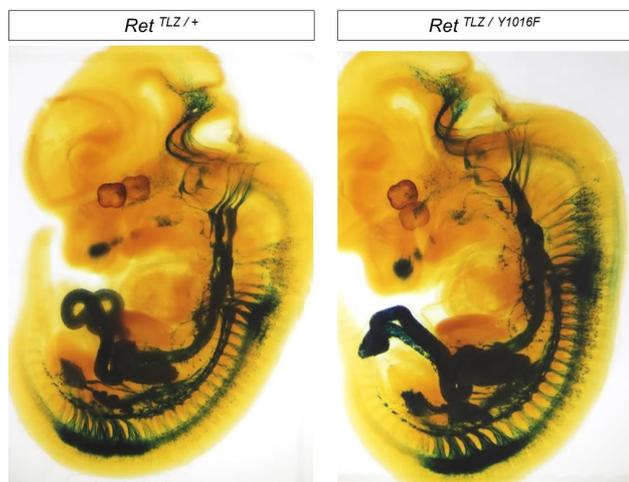


図 5 胎生 12.5 日目の *Ret-Y1016F* マウスの表現型。

Ret^{TLZ/+} マウスと同じように、*Ret^{TLZ/Y1016F}* マウスでは TLZ 陽性細胞が大腸へ正常に侵入していた。

そこで胎生 12.5 日目の *Ret^{Y1016F/Y1016F}* マウスを摘出し、腸管を神経細胞のマーカーである Phox2B および Tuj1 で免疫染色した。その結果 *Ret^{Y1016F/+}* マウスと同じように、*Ret^{Y1016F/Y1016F}* マウスの ENCC は大腸近位部まで ENCC が移動できていることが判明し、*Ret-Y1016F* マウスでは正常な腸管神経系が発生する可能性が示唆され、ヒト cDNA ノックイン型の *RET9-Y1015F* マウスの表現型が認められないことが判明した(図 6)。一方で腎臓に着目すると、*Ret^{Y1016F/Y1016F}* マウスでは尿管が複数形成される異常を認め(図 6)、これはヒト cDNA ノックイン型の *RET9-Y1015F* マウスでも認められており、以前の研究結果と一致した(文献)。このため Y1016F 変異は確かに腎臓の形成に関与する事が判明したが、腸管神経系に果たす役割は結論できず、今回樹立した *Ret-Y1016F* マウスの ENCC では、リン酸化プロテオミクス解析を行えない事が判明した。

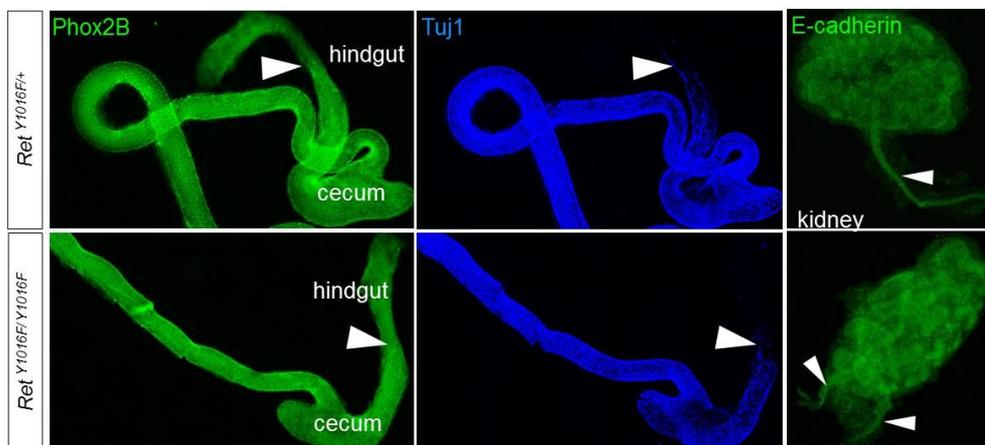


図6 胎生 12.5 日目の *Ret-Y1016F* マウスの腸管および腎臓。
Ret^{Y1016F/+} マウスおよび *Ret^{Y1016F/Y1016F}* マウスから腸管を摘出し、Phox2B と Tuj1 でホルマウント染色を行った。*Ret^{Y1016F/Y1016F}* マウスの ENCC は正常に大腸へ侵入できることが判明した。矢頭は ENCC の移動先進部を示す。
また腎臓も摘出し、E-Cadherin でホルマウント染色を行ったところ、*Ret^{Y1016F/+}* マウスでは尿管は 1 本なのに対し、*Ret^{Y1016F/Y1016F}* マウスでは複数の尿管が認められた(矢頭)。

(4)新規 *Ret-Y1016F* マウスの作成

我々はヒト cDNA ノックイン型の *RET9-Y1015F* マウスと類似した、新しい *Ret-Y1016F* 変異マウスを作成するため、*RET9* のみが発現されるマウスの作成を試みた。*Ret9* アイソフォームのスプライシングは、エクソン 3' 端のスプライドナー・GT がコドンとして読まれるか、読まれないかによって起こる。コドンとして読まれる場合は共通部から 9 アミノ酸 + 終始コドンが読まれ、*RET9* タンパク質として翻訳される。我々はこのスプライドナー・GT を、GC というサイレンス変異を挿入する事によって、*RET9* のみが発現されるマウス (*Ret9-only* マウス) が樹立出来ると考えた。このマウスに *Y1016F* 変異を挿入し、*Ret9-Y1016F* マウスを樹立する事で、ヒト cDNA ノックイン型の *RET9-Y1015F* マウスと似た ENCC の表現型が得られるのではないかと考えている。現在 *Ret9-only* マウスの作成を進めている。

引用文献

Hashimoto M, and Takemoto T. Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Sci Rep.* 2015 Jun 11;5:11315. doi: 10.1038/srep1131

Jain S, Encinas M, Johnson EM Jr, and Milbrandt J. Critical and distinct roles for key RET tyrosine docking sites in renal development. *Genes Dev.* 2006 Feb 1;20(3):321-33.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 1.Okamoto M, Yoshioka Y, Maeda K, Bito Y, Fukumoto T, Uesaka T, Enomoto H	4. 巻 [Epub ahead of print]
2. 論文標題 RET(C618F) mutation display C cell hyperplasia and hyperganglionosis of the enteric nervous system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genesis	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvg.23292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sotoyama Hidekazu, Iwakura Yuriko, Oda Kanako, Sasaoka Toshikuni, Takei Nobuyuki, Kakita Akiyoshi, Enomoto Hideki, Nawa Hiroyuki	4. 巻 654
2. 論文標題 Striatal hypodopamine phenotypes found in transgenic mice that overexpress glial cell line-derived neurotrophic factor	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 99 ~ 106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2017.06.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Vassilev Vassil, Platek Anna, Hiver Sylvain, Enomoto Hideki, Takeichi Masatoshi	4. 巻 43
2. 論文標題 Catenins Steer Cell Migration via Stabilization of Front-Rear Polarity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 463 ~ 479.e5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.devcel.2017.10.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 4件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Hideki Enomoto
2. 発表標題 Elevated levels of RET signaling coupled with decreased RET dose causes intestinal aganglionosis in mice
3. 学会等名 Development of the Enteric Nervous System:cells,signals,genes and therapy 5th International Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taichi Nakatani、Mitsuhiro Iwasaki、Yuko Bitoh、Kosaku Maeda、Tatsuya Takemoto、Hideki Enomoto
2. 発表標題 Exploration of gene function and genetic interactions in the pathogenesis of Hirschsprung disease by electroporation-mediated genome editing in mice
3. 学会等名 Development of the Enteric Nervous System:cells,signals,genes and therapy 5th International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎本 秀樹
2. 発表標題 シュワン細胞に内包された神経分化能とその可塑性
3. 学会等名 2018年度生理学研究所研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田 俊介、永島田 まゆみ、岩崎 光泰、榎本 秀樹
2. 発表標題 遺伝性神経芽腫に同定された変異型Phox2Bの機能解析
3. 学会等名 第6回神緑会ヤングインベスティゲーターアワード
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上坂 敏弘、榎本 秀樹
2. 発表標題 腸管神経系形成不全下におけるシュワン細胞系譜からのニューロン産生
3. 学会等名 第94回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤 圭祐、岡本 光正、上坂 敏弘、前田 貢作、榎本 秀樹
2. 発表標題 RET 活性化型変異 C618F は遺伝子量減少によりヒルシユスブルグ病を誘導する
3. 学会等名 第94回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤 圭祐、岡本 光正、上坂 敏弘、前田 貢作、榎本 秀樹
2. 発表標題 RET 活性化型変異 C618F は遺伝子量減少によりヒルシユスブルグ病を誘導する
3. 学会等名 CSMIリトリート「若手道場」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Yoshioka、Hideki Enomoto
2. 発表標題 Elucidation of the anatomy and function of the nodose-petrosal ganglia, a sensory gateway to organ communication
3. 学会等名 CSMIリトリート「若手道場」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎本 秀樹
2. 発表標題 腸管神経系の発生と病理
3. 学会等名 慶応義塾大学医学部セミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideki Enomoto
2. 発表標題 シュワン細胞前駆細胞由来神経形成の可塑性
3. 学会等名 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上坂 敏弘、榎本 秀樹
2. 発表標題 腸管神経系の先天的欠損領域におけるシュワン細胞系譜からのニューロン産生
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideki Enomoto, Toshihiro Uesaka
2. 発表標題 グリア細胞を基盤とする腸管神経系の発生と生理機能に迫る
3. 学会等名 第70回日本自律神経学会総会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideki Enomoto
2. 発表標題 Pathogenetic Mechanism of Hirschsprung Disease: What Does Mouse Genetics Teach Us?
3. 学会等名 The 2017 Annual Meeting of Indonesian Society of Human Genetics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 原田 俊介、永島田 まゆみ、岩崎 光泰、榎本 秀樹
2. 発表標題 遺伝性神経芽腫に同定された変異型Phox2Bの機能解析
3. 学会等名 2017年度世界をリードする次世代MD研究者・育成プロジェクト全国リトリート
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----