

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11521

研究課題名(和文) ヒルシュスブルグ病に対する腸管神経系の分化誘導による新しい再生治療法の開発

研究課題名(英文) Invention of new differentiation-inducing therapy of ENS development in Hirschsprung's disease

研究代表者

田中 奈々 (Tanaka, Nana)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50530656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：EDNRB欠損マウス(HDマウス)を用い、HDマウスの胎生13.5日の無神経節腸管におけるラミニンの発現がコントロールに比べ高いこと、HD腸管においては、コントロール腸管でみられたラミニンによる神経発達効果は認められなかったこと、ラミニンのレセプターである $\alpha 1$ インテグリンの発現は、腸管では2群間に差がなかったが、腸管神経堤由来細胞(ENCC)における $\alpha 1$ インテグリンの発現はHDマウスで有意に低下していたこと、を示した。これにより、EDNRB欠損マウスにおける無神経節腸管は、ENCCと腸管の微小環境との相互作用が妨げられ、正常の腸管神経発達が障害されることにより引き起こされることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この実験は、ヒルシュスブルグ病(H病)において、腸管培養中に付加する物質を変えることでその効果を試すことができるという、実験系としての将来性を秘めている。また今回ラミニン単独添加ではH病腸管において神経発達効果が得られなかったことから、レセプターの発現を調査しH病腸管で低下していることを明らかにした。今後はレセプターに着目することにより、今まで手術にしか根治し得ないとされてきたH病の治療に新たな風を吹き込むことが期待できる。実臨床では、便秘などの術後合併症がおこることがあるが、投薬による腸管神経伸長効果が実用化されれば、術後の補助療法としても、効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that laminin-1 does not have a positive effect on ENCC migration in HD mice, in contrast to the phenomenon seen in normal mice. Moreover, we showed that laminin-1 expression in the gut was increased in HD mice compared to controls. From these results, we hypothesized that excessive laminin is caused by an insufficiency or dysfunction of the receptors, that impairs interaction between ENCC and laminin, resulting in aganglionosis. To test this hypothesis, we examined the expression of $\alpha 1$ integrin, which is a receptor for laminin, in Ednr^b KO mouse. The expression of $\alpha 1$ integrin was not significantly different between KO and WT in the gut. However, the $\alpha 1$ -integrin expression in the isolated ENCC was significantly decreased in KO. Since integrin has a wide variety of ligands which have crucial roles in ENCCs migration, impairment of this interaction between integrin and its ligands may disturb normal ENS development, resulting in an aganglionic colon in this model.

研究分野：小児外科

キーワード：ヒルシュスブルグ病 腸管神経系 腸管神経堤細胞 細胞外マトリックス ラミニン インテグリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Hirschsprung 病 (以下 H 病) 5000 出生に 1 人の発生頻度で、肛門側腸管の壁内神経節細胞の先天性欠如により新生児期より腸閉塞症状きたす、最も代表的な小児外科疾患のひとつである。正常な腸管神経の発達には、腸管神経提由来細胞 (以下 ENCC) が正常に増殖・移動・分化することが不可欠であるが、H 病では胎生期に食道から肛門まで下降性に分布していく ENCC が途中で停止してしまうことより、停止部以降の腸管が無神経節腸管となり、正常な蠕動運動が妨げられ、腸閉塞症状をきたすと考えられている。現在のところ、その病因は明らかにされておらず、治療は外科手術のみとなる。病因解明に加え、手術をしても、排便機能障害が残存する例は少なくなく、新たな治療法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

H 病では ENCC の分化・増殖・移動に何らかの問題があるとされているが、ENCC そのものが原因か、それともそれを取り巻く環境因子によるものなのか、という問題は、未だ解決していない。しかし、近年、ENCC そのものではなく、腸管の細胞外マトリックスや細胞増殖因子といった、環境因子の変化が H 病の本質と示唆される報告がなされている。細胞外マトリックスの主要分子であるラミニンは、神経の発達に深くかかわっており、H 病との関連が示唆されている。申請者は、SOX10-VENUS Tg マウスの腸管培養を用いて腸管神経におけるラミニン - 1 の効果を検討し、ラミニン - 1 が、マウスの正常腸管において、口側から肛門側へ下降していく ENCC の発達を促進することを初めて明らかにした。胎生期に食道から下降性に分布していく ENCC が途中で停止することにより発症するとされる H 病腸管においても、ENCC の発達を促進しその停止位置を伸長することができるのだろうか？すなわち、H 病が薬で治る日が来るのか？この命題を明らかにする目的で本実験を計画した。

3. 研究の方法

- A) SOX10-VENUS マウスと、H 病モデルマウスを交配させることにより得られた、神経堤細胞のみが蛍光発色する H 病モデルマウスを作製する。
- B) H 病モデルマウスの腸管における、ラミニンの発現を調査する。
胎生 13.5 日の腸管 (中腸、近位後腸、遠位後腸) におけるラミニン - 1 の発現を免疫染色にて評価
- C) H 病胎仔の腸管培養を行い、培養液にラミニンを添加することで、H 病腸管におけるラミニンの腸管神経に対する効果について、蛍光ライブイメージング法にて評価する
- D) B) 及び C) から導かれた結果を基に、中腸、近位後腸、遠位後腸におけるラミニンのレセプターである 1 インテグリンの発現を RT-PCR にて調べた。また、E10.5 の ENCC を 2 日間細胞培養し、ENCC における 1 インテグリンの発現を調べる

4. 研究成果

(1) 神経堤細胞のみが蛍光発色する H 病モデルマウスの腸管におけるラミニンの発現
上記 A) で作製した H 病モデルマウスを用い胎生 13.5 日の腸管 (中腸、近位後腸、遠位後腸) におけるラミニン - 1 の発現を免疫染色にて比較すると、すべての部位において、

コントロールと比べ、HDマウスの無神経節腸管におけるラミニン-1の発現が高いことが示唆された。

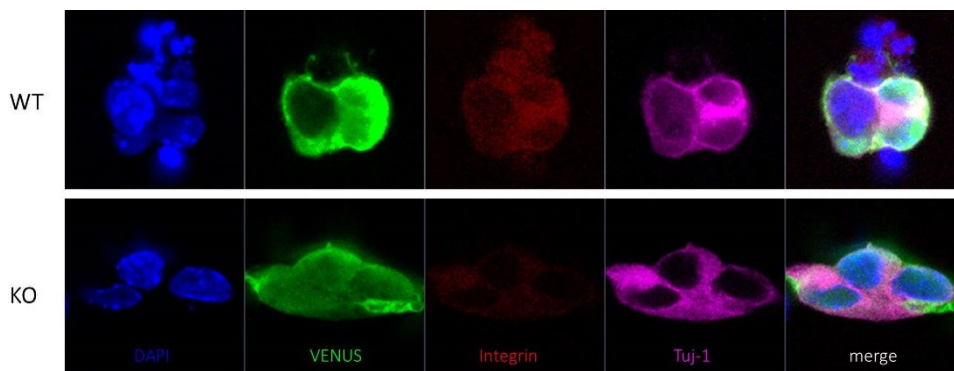
(2) H病腸管におけるラミニンの腸管神経に対する効果

申請者らは以前、正常腸管において、ラミニン添加により無添加の腸管より有意に腸管神経系の発達が促進されることをすでに示したが、HD腸管では、その結果とは異なり、ラミニン添加による、神経発達効果は認められなかった。

以上、HDマウスの無神経節腸管におけるラミニン-1の発現がすでに高く、またラミニン添加にて神経伸長効果が認められなかった結果から、HD腸管において、ラミニンのなんらかの利用障害がある可能性が示唆された。そこで我々はラミニンのレセプターである、 α 1インテグリンに着目した。

(3) HD腸管、及び遊離ENCCにおける α 1インテグリンの発現

腸管組織における α 1インテグリンの発現は、中腸、近位後腸、遠位後腸のいずれの部位においても、E13.5、E15.5ともに2群間に差がなかったが、ENCCにおける α 1インテグリンの発現はKOで有意に低下していた。(下図)



図：Venus及びTuj1陽性細胞、すなわちニューロンへ分化するENCCのインテグリンの発現がH病マウスで低下。

図

以上の結果より、EDNRB欠損マウス(HDマウス)において、HDマウスの胎生13.5日の無神経節腸管におけるラミニンの発現がコントロールに比べ高いこと HD腸管においては、コントロール腸管でみられたラミニンによる神経発達効果は認められなかったこと ラミニンのレセプターである α 1インテグリンの発現は、腸管では2群間に差がなかったが、神経堤由来細胞(ENCC)における α 1インテグリンの発現はHDマウスで有意に低下していたこと、が明らかとなった。これにより、EDNRB欠損マウスにおける無神経節腸管は、ENCCと腸管の微小環境との相互作用が妨げられ、正常の腸管神経発達が障害されることにより引き起こされることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Nakazawa-Tanaka N, Fujiwara N, Miyahara K, Nakada S, Arikawa-Hirasawa E, Akazawa C, Yamataka A	4. 巻 34
2. 論文標題 The effect of laminin-1 on enteric neural crest-derived cell migration in the Hirschsprung's disease mouse model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatr Surg Int	6. 最初と最後の頁 143-147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00383-017-4181-5	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 Fujiwara N, Nakazawa-Tanaka N, Miyahara K, Arikawa-Hirasawa E, Akazawa C, Yamataka A	4. 巻 34
2. 論文標題 Altered expression of laminin alpha1 in aganglionic colon of endothelin receptor-B null mouse model of Hirschsprung's disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatr Surg Int	6. 最初と最後の頁 137-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00383-017-4180-6	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 Fujiwara N, Miyahara K, Nakazawa-Tanaka N, Akazawa C, Yamataka A	4. 巻 53
2. 論文標題 Increased expression of Semaphorin 3A in the endothelin receptor-B null mouse model of Hirschsprung disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pediatr Surg	6. 最初と最後の頁 326-329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpedsurg.2017.11.034	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 Miyano G, Takeda M, Koga H, Okawada M, Nakazawa-Tanaka N, Ishii J, Doi T, Lane GJ, Okazaki T, Urao M, Yamataka A.	4. 巻 34
2. 論文標題 Hirschsprung's disease in the laparoscopic transanal pull-through era: implications of age at surgery and technical aspects	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pediatr Surg	6. 最初と最後の頁 183-188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00383-017-4187-z	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Nakazawa-Tanaka N, Miyahara K, Fujiwara N, Urao M, Yamataka A.
2. 発表標題 The altered expression of acetylated tubulin in enteric neurons in Hirschsprung disease mouse model
3. 学会等名 The 51th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons, Sapporo, Japan, (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakazawa-Tanaka N, Miyahara K, Fujiwara N, Urao M, Yamataka A.
2. 発表標題 The altered expression of acetylated tubulin in enteric neurons in Hirschsprung disease mouse model
3. 学会等名 Pediatric Colorectal Club Meeting, Tokyo Japan (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 奈々, 藤原 なほ, 宮原 克, 田端 克弘, 浦尾 正彦, 山高 篤行
2. 発表標題 当科における女性研究者支援制度を利用した基礎研究体制と臨床業務の両立
3. 学会等名 第55回日本小児外科学会学術集会、新潟
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中奈々 田端克弘 浦尾正彦
2. 発表標題 LPEC後に再発した小児De novo型鼠径ヘルニアの一例
3. 学会等名 PSJM2018第38回日本小児手術手技研究会 , 東京
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakazawa-Tanaka N, Fujiwara N, Miyahara K, Nakada S, Arikawa-Hirasawa E, Akazawa C, Yamataka A
2. 発表標題 The effect of laminin-1 on enteric neural crest-derived cell migration in the Hirschsprung's disease mouse model
3. 学会等名 30th International Symposium on Pediatric Surgical Research and Update on Newborn & Fetal Surgery (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中 奈々
2. 発表標題 シンポジウム『小児泌尿器科領域での男女共同参画を考える』
3. 学会等名 日本小児泌尿器科学総会・学術集会
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
研究分担者	浦尾 正彦 (Urao Masahiko) (00213504)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	
研究分担者	宮原 克 (Miyahara Katsumi) (00420844)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・技術員 (32620)	
研究分担者	藤原 なほ (Fujiwara Naho) (20589543)	順天堂大学・医学部・非常勤講師 (32620)	