

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17008

研究課題名(和文) 腸管神経堤由来細胞遊走に対する細胞外マトリックスの役割

研究課題名(英文) Widespread injury of intestinal serosa with type I collagenase promote colonization of transplanted enteric neural stem cells

研究代表者

安井 良僚 (YASUI, Yoshitomo)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：10595325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒルシュスプリング病は腹部膨満を引き起こし、生存には無神経節腸の外科的切除が必要となる。しかし、手術後の副作用として、腸炎と便失禁が報告されており、腸の神経前駆細胞の移植による、新しい治療戦略が望まれている。本研究では、マウスの切除結腸を用い、*ex vivo*腸管神経移植実験を行い、I型コラゲナーゼによる結腸漿膜のコラーゲンの除去により、移植された腸内神経堤由来細胞のコロニー形成が促進されることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
我々の研究結果は、I型コラゲナーゼを処理したレシピエントの大腸が、未治療の大腸よりも腸管神経系をより迅速に展開したことを示した。ドナーの神経幹細胞を受容可能な結腸にするこれらの発見は、細胞療法の現在の戦略を前進させることに役立つ。

研究成果の概要(英文)：Hirschsprung's disease (HSCR) causes abdominal distension and survival requires surgical excision of aganglionic bowel. However, after surgery, enterocolitis and fecal incontinence commonly occurs. Therefore, New strategies are needed to enhance bowel colonization by enteric neuron precursors and to reduce HSCR occurrence. In this study we demonstrated that injury of serosa with type I collagenase promote colonization of transplanted enteric neural crest derived Cells.

研究分野：小児外科学

キーワード：細胞外マトリクス 腸管神経細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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。これらの疾患に対し、現在のところ病変部を外科的に切除することが唯一の治療法であるが、これまでに確立された根治術では術後合併症として再手術を要する便失禁など排便機能障害を生じうる。また、HSCR のなかでも病変部腸管が長区域にわたる extensive aganglionosis や、同じく病変が長区域に及ぶ HSCR 類縁疾患では病変部の全切除は不可能で、経腸的な栄養のみで成長することは困難となり、治療に難渋する。また我々は HSCR 類縁疾患の一つである Hypoganglionosis の症例で、出生後早期よりほぼ全腸管の機能不全を呈し、年齢とともに少しずつ腸管運動が改善したものの経静脈栄養が不可欠である症例を経験し報告した(1)。これらの問題を解決するためには、腸管神経節異常症に対し、病変部を切除し正常腸管を肛門管に吻合する、というこれまでの外科治療に代わり、病変部腸管に欠如した機能を後天的に賦与する、という新しい治療法の確立が必要となる。

2. 研究の目的

現在、手術療法に代わる新しい治療法として、無神経節腸管に後天的に ENS を構築させる細胞補充療法の研究が進められており(2)、ヒトの胚性幹細胞(ES細胞)を ENCCs に分化させ、HSCR モデルマウスに移植する研究からその可能性が大きく開かれた(3)が、これまでの報告では効果は極めて限局的である。細胞補充療法の研究は、マウス胎仔腸管そのものを用いて、または分離した ENCCs を腸管に移植することで試みられてきた。これらの報告では、胎生 13.5 日(以下 E13.5 と表記)までの腸管では移植された ENCCs は腸管上を遊走、成熟し、神経ネットワークを形成するのに対し、E14.5 以降の腸管では移植した ENCCs が腸管上をほとんど遊走しないことが報告された(4,5)。これらの報告は、E13.5-E14.5 を境として出現する ENCCs 遊走抑制機構の存在と、その細胞遊走抑制機構が、細胞補充療法の妨げとなっていることを示唆する。我々は、この E13.5-E14.5 に出現する ENCCs 遊走の抑制機構を明らかにし、阻害することで、E14.5 以降、ひいては出生後の腸管上における、移植した ENCCs の遊走・定着を促進させることにつながるのではないかと考え本課題を着想した。

3. 研究の方法

定量 PCR

全 RNA は、RNA 精製キット (RNeasy ミニキット; キアゲン) を使用して、マウス胚腸から調製された。500 ng の全 RNA を、逆転写酵素 (ReverTraAce; 東洋紡) で逆転写した。リアルタイム PCR は、ABI Step-One-Plus Real-Time システムで実施し、StepOne ソフトウェア v2.3 (Thermo Fisher Scientific) を使って解析した。

リアルタイム PCR プライマーは、Primer3Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) を使用して設計した。mRNA レベルは、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) mRNA レベルによって正規化した。

ニューロスフェアの作製

ENCCs は E13.5 の Ednrb-hKikGR マウス(6)腸管から Nagashimada M らの方法を用い単離(7)、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。

ニューロスフェア伸展アッセイ

培養皿を 0.25 mg/ml フィブロネクチン (WAKO Inc.) またはコラーゲン I (Corning Inc.) またはフィブロネクチンとコラーゲン VI の両方で 37°C で 1 時間プレコートした。プレコートされた培養皿は、PBS を含む 0.5 mg/mL のウシ血清アルブミン (BSA) でブロックした後、PBS で洗浄した。ニューロスフェアを ECM プレコート培養皿に入れ、CO₂ インキュベーターで 36 時間した後、顕微鏡で観察した。ECM によって誘発されたニューロスフェアの広伸展は、MetaMorph ソフトウェアを使用して定量した。

ex vivo 移植

P21~28 の C57BL/6J マウスから切り出した結腸は、PBS で洗浄した後、10 mg/mL I 型コラーゲン (Gibco) で 10 分間処理した。コラーゲン処理した結腸は PBS で洗浄後、腸間膜の境界に沿って切開し、シリコンシートに固定したのち、Ednrb-hKikGR マウスに由来するニューロスフェアを移植した。移植した結腸は、10% FBS を含む DMEM で 7 日間培養し、蛍光顕微鏡観

察を行った。

4. 研究成果

コラーゲンの腸管神経前駆細胞遊走に与える影響

いくつかの研究で、一部の ECM (ラミニン、フィブロネクチン、一部のコラーゲンなど) が ENCC の移動に重要な役割を果たすことが報告されている。特に、フィブロネクチンは神経堤細胞の移動と接着に重要な役割を持つ(8,9)。しかし、I 型コラーゲンはフィブロネクチンほど神経堤細胞の遊走を促進しないことが報告された。また我々は、タイプ VI コラーゲンが発生後期から腸管で発現量が増加し、フィブロネクチン依存性 ENCC 遊走を阻害することを報告した(10)。そこで他のコラーゲンについて腸管発生における発現変化、および ENCC 遊走に与える影響を調べた。この結果、I 型コラーゲンの発現プロファイルが VI 型コラーゲンと類似していたことを発見した(図 1A)。そこで、ENCC 遊走に対する I 型コラーゲン調節の効果を示すために、コラーゲン塗布培養皿上におけるニューロン前駆細胞の凝集体(ニューロスフェア)の伸展能を調べた。ニューロスフェアは E13.5 マウス腸から単離培養した。I 型コラーゲンまたは VI 型コラーゲン塗布培養皿上のニューロスフェアからの ENCC の拡散は、フィブロネクチンおよびラミニン塗布培養皿上と比べて、有意に抑制されていた(図 1B)。次に、I 型コラーゲンの局在を観察した。腸内のタイプ I コラーゲンタンパク質の発現を調べるために、抗 I 型コラーゲン抗体による蛍光免疫染色を行った。その結果、I 型コラーゲンの局在は、漿膜、および平滑筋層で観察された(図 1C)。これらの結果から、I 型コラーゲンと VI 型コラーゲンが豊富な漿膜を排除することで、腸管への ENCC 移植の効率が高まることが期待された。

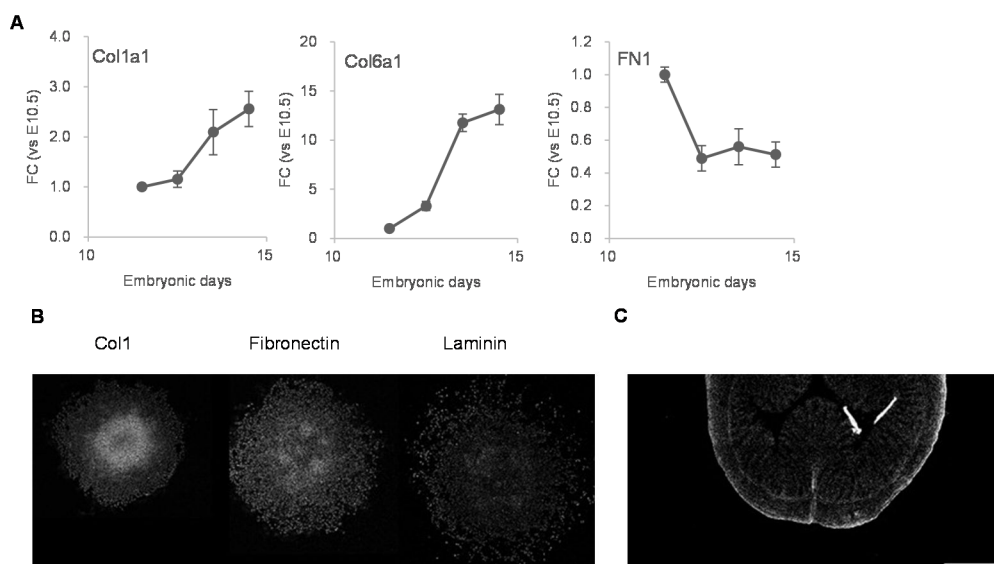


図1 コラーゲンの腸管神経前駆細胞遊走に与える影響

胎生10.5日から14.5日の腸管からRNAを抽出し、各ECMの発現を定量PCRで確認した(A)、1型コラーゲン、6型コラーゲン、フィブロネクチンコート培養皿にニューロスフェアを滴下48時間培養後のSOX10イメージング(B)、8週齢マウス結腸の1型コラーゲンの局在(C)

I 型コラーゲナーゼ処理腸へのニューロスフェアの *ex vivo* 移植

上記の結果に基づいて、I 型コラーゲンと VI 型コラーゲンが豊富な漿膜を排除すると、腸管への ENCC 移植の効率が高まると仮定し、移植腸管の漿膜およびコラーゲンの除去を試みた。トリプシンやディスパーゼと比較して、タイプ I コラーゲナーゼが漿膜の除去に最も効果的であったので、コラーゲンを分解して漿膜を除去するのに、タイプ I コラーゲナーゼを使用した。ニューロスフェアは、ラミニンを主成分とするマトリゲルに包み、シリコンシート上に固定した I 型コラーゲナーゼ処理結腸に移植した(図 2A)。その結果 I 型コラーゲナーゼで処理した腸に移植したニューロスフェアに由来するニューロンおよび神経幹細胞は、PBS 処理した腸に比べて 27% 広がり、神経突起の伸長が亢進していることが分かった(図 2B)。ドナーの神経幹細胞を受容可能な結腸にするこれらの発見は、細胞療法の現在の戦略を洗練するのに役立つことが期待される。

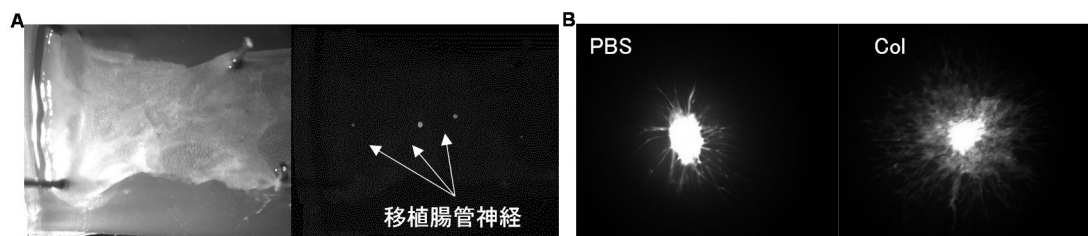


図2 *ex vivo* 腸管神経移植実験
 マウス腸管をシリコンシートにピン止め(A左)、KIKGR発現ニューロスフィアを滴下(A右)、3日培養後、蛍光顕微鏡観察(B)、Colはコラゲナーゼ処理を示す

参考文献

1. Y. Yasui *et al.*, Cartilage-hair hypoplasia associated with isolated hypoganglionosis: A case report. *Congenital anomalies* **57**, 32-34 (2017).
2. A. J. Burns, N. Thapar, Neural stem cell therapies for enteric nervous system disorders. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **11**, 317-328 (2014).
3. F. Fattahi *et al.*, Deriving human ENS lineages for cell therapy and drug discovery in Hirschsprung disease. *Nature* **531**, 105-109 (2016).
4. N. R. Druckenbrod, M. L. Epstein, Age-dependent changes in the gut environment restrict the invasion of the hindgut by enteric neural progenitors. *Development* **136**, 3195-3203 (2009).
5. 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**, 331-e386 (2010).
6. C. Nishiyama *et al.*, Trans-mesenteric neural crest cells are the principal source of the colonic enteric nervous system. *Nature neuroscience* **15**, 1211-1218 (2012).
7. M. Nagashimada *et al.*, Autonomic neurocristopathy-associated mutations in PHOX2B dysregulate Sox10 expression. *The Journal of clinical investigation* **122**, 3145-3158 (2012).
8. D. F. Newgreen, I. L. Gibbins, J. Sauter, B. Wallenfels, R. Wutz, Ultrastructural and tissue-culture studies on the role of fibronectin, collagen and glycosaminoglycans in the migration of neural crest cells in the fowl embryo. *Cell Tissue Res* **221**, 521-549 (1982).
9. R. A. Rovasio, A. Delouvee, K. M. Yamada, R. Timpl, J. P. Thiery, Neural crest cell migration: requirements for exogenous fibronectin and high cell density. *The Journal of cell biology* **96**, 462-473 (1983).
10. S. Nishida *et al.*, Collagen VI suppresses fibronectin-induced enteric neural crest cell migration by downregulation of focal adhesion proteins. *Biochemical and biophysical research communications* **495**, 1461-1467 (2018).

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 Nishida S, Yoshizaki H, Yasui Y, Kuwahara T, Kiyokawa E, Kohno M	4. 巻 485 (1)
2. 論文標題 Collagen VI suppress fibronectin-induced enteric neural crest cell migration to downregulate of focal adhesion proteins.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1461-1467
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.11.184	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 Yasui Y, Kohno M, Nishida S, Shironomae T, Satomi M, Kuwahara T, Takahashi S, Niida Y.	4. 巻 57
2. 論文標題 Cartilage-hair hypoplasia associated with isolated hypoganglionosis: A case report	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 32-34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cga.12175	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 Yasui Y, Nishida S, Shironomae T, Satomi M, Kuwahara T, Kohno M.	4. 巻 52
2. 論文標題 Surgical approach for fecal incontinence with a patulous anus after transanal pull-through for Hirschsprung disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Surgery	6. 最初と最後の頁 1070-1075
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpedsurg.2017.02.004	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 0件）

1. 発表者名 吉崎尚良, 西田翔一, 安井良僚, 桑原強, 清川悦子, 河野美幸
2. 発表標題 VI型コラーゲンはフィブロネクチン誘導性の腸管神経細胞遊走を阻害する
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉崎尚良, 西田翔一, 安井良僚, 桑原強, 清川悦子, 河野美幸
2. 発表標題 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
3. 学会等名 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
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安井良僚, 木戸美織, 中村清邦, 桑原強, 河野美幸
2. 発表標題 当教室のHirschsprung病根治術に対する考え方
3. 学会等名 第31回内視鏡外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安井良僚, 吉崎尚良
2. 発表標題 腸神経細胞幹細胞の移植促進因子の探索
3. 学会等名 平成30年度先端モデル動物支援 若手支援技術講習会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安井良僚, 岡島英明
2. 発表標題 臨床に役立つ消化器の発生と発育
3. 学会等名 第45回日本小児栄養消化器肝臓学会 教育講演
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安井良僚, 木戸美織, 中村清邦, 桑原強, 河野美幸
2. 発表標題 Rectosigmoid typeのHirschsprung病根治術における腹腔鏡の有用性
3. 学会等名 第54回小児外科学会総会
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