

平成 2 1 年 3 月 3 1 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2006 ~ 2008
 課題番号：18791316
 研究課題名(和文)胎仔小腸分離細胞の再構築過程における腸管壁内神経細胞遊走のメカニズム
 研究課題名(英文)Neuronal Migration in Reorganized Small Intestine
 研究代表者 米川 浩伸(YONEKAWA HIRONOBU)
 埼玉医科大学・医学部・講師
 研究者番号：00296279

研究成果の概要：

胎児マウス小腸を切離し細胞単位に分離後細胞を集め再び培養を行い 5 日目で上皮細胞の migration を認め約 1 週間で直径が 5mm 大の表面に微絨毛を認める腸管類似の組織様構造に再構築される。この再構築された細胞塊の粘膜様組織下には神経・神経線維・神経筋接合部などが確認される。この再構築過程での神経細胞遊走を観察する目的で培養 1 日目から 7 日目までの細胞塊に対して経日的に免疫組織学的・形態学的検討を行った。胎児マウス小腸を切離し細胞単位に分離後細胞を集め再び培養を行い 5 日目で 1 層の上皮様構造を認めるようになり約 1 週間で直径が 5mm 大の表面に微絨毛を認める腸管類似の組織様構造に再構築された。acetylcholinesterase 染色、S-100 蛋白染色、Myelin basic protein (D-18):SC-13912 の免疫染色にて神経細胞は培養 1 日目から 7 日目まで小腸類似の期間構造を有する細胞塊の粘膜様組織下に認められたが経日的変化は認められなかった。また電子顕微鏡による形態学的な評価では培養 5 日目・6 日目では小腸類似の期間構造を有する細胞塊の粘膜様組織下には神経細胞は同定出来なかったが培養 7 日目で細胞塊の粘膜様組織下に神経細胞・神経線維と神経筋接合部を確認した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	500,000	0	500,000
2007年度	500,000	0	500,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,500,000	150,000	1,650,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：先天性消化器疾患学、胎仔マウス小腸、再構築細胞塊、腸管壁内神経、細胞遊走

1. 研究開始当初の背景

Hirschsprung 病は肛門から口側にかけて腫々の長さでみられる腸管壁内神経細胞の先天的欠如に基づき、生直後より頑固な便秘、嘔吐、腹部膨満を来す先天性の機能的腸閉塞症である。

しかしこの腸管壁内神経細胞の先天的欠如の原因は解明されていない。消化管の壁内神経は胎生 6 週頃迷走神経に伴われて中枢側より食道に達し胎生 12 週まで直腸下端に達する。(cranio-caudal migration theory、岡本、1961)(neurofilament をマーカーとした免疫組織学検討、広部、1990)

そのためこの migration の過程の障害がこの疾患の病因である可能性が高く腸管壁内の神経細胞の migration のメカニズムがこの疾患の発生・病体の解明につながる。腸管壁内神経細胞の移動は発生時など限られた条件下でのみ認められる。また細胞の移動には周囲の細胞外基質と神経細胞との関係が

重要である。これらの条件を満たしながら発生段階での腸管壁内の神経細胞の移動を観察するには生体内での胎児の腸管内の神経細胞の移動を経時的に観察することが望ましいが実際には不可能である。この発生時の腸管壁内神経細胞の migration モデルとして再構築細胞塊を用いることで今まで困難であった神経細胞の migration を再現し遊走時の神経細胞と細胞外基質との関係をリアルタイムで観察出来る。今回の研究では申請者の再構築細胞塊を培養し経時的に以下のモノクローナル抗体を用いて神経細胞の migration を観察する。

2. 研究の目的

細胞の遊走は免疫系の細胞、癌細胞、創傷治癒時、発生時など限られた条件下で認められる。また細胞の移動には 1) 細胞外走化性因子の濃度差を感知し細胞が極性化。2) 高濃度側での細胞内シグナルの増強 3)

Leading edged(移動の先端)のアクチンの重合細胞内骨格の変化による細胞膜の進展 4) 核や細胞内オルガネラなどの進行方向への移動 5 MMP などのプロテアーゼによる細胞外基質の分解と先端細胞膜と細胞外基質との解離、など周囲の細胞外基質と移動する細胞との関係が重要である。従って神経細胞の migration においても細胞外基質と神経細胞とを切り離すことは出来ない。1) ~ 5) の条件を満たしながら発生段階での腸管壁内の神経細胞の移動を観察し腸管壁内神経細胞の移動のメカニズムを解明する。今回の研究目的は胎児マウス小腸を細胞単位に分離し分離された神経細胞を含む雑多な細胞が培養により再構築される過程で神経細胞が遊走するメカニズムの解明にある。そのため今回はこの細胞単位に分離された細胞塊の再構築過程における神経細胞を免疫組織学と形態学的評価を行った。

3. 研究の方法

(1) 培養下再構築小腸細胞塊の作成

胎齢 15.5 日の ICR マウスから小腸(十二指腸・空腸・回腸)を摘出し細切後に 0.1%collagenase/dispase で消化を行い個々

の細胞単位に分離、細胞浮遊液を作る。細胞浮遊液は 800 回/10 min で遠心分離後、上澄を捨て高濃度細胞浮遊液を作る。steinless 網に membrane filter を乗せこの上に 15 μ l の高濃度細胞浮遊液を直径 5~6 mm にスポットする。培養器で培養 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂/95%空気の条件で約一週間培養。培養液は 2 日おきに取り換えた。培養液は Ham F-12 液 (Bioproducts, Maryland) に 20%ウシ胎児血、50units/ml ペニシリン、50mg/ml ストレプトマイシン、50 mg/ml アスコルビン酸、10 μ l/ml non-essential amino acids (NEAA), 2mg/ml グルコースを含む。約 2ml の培養液 (HAM F12+FBS) を加えて培養を行う。培養液は 2 日おきに取り換え、約 1 週間の培養で小腸類似の器官様構造を有する細胞塊が再構築する。今回は培養 1 日目より経日的に細胞塊を固定して以下の免疫組織学的検討を行った。

ヘマトキシレン・エオジン染色及び

Karnovsky-Root 法

による acetylcholinesterase 染色

S-100 蛋白染色

Myelin basic protein (D-18):SC-13912

免疫染色

前固定、後固定した後、エタノールで脱水しエポキシ樹脂に包埋した。超薄切片はウラン / 鉛染色を施し透過型電子顕微鏡 (H-7000Hitachi) で観察。

4 . 研究成果

(1)ヘマトキシレン・エオジン染色結果：胎児マウス小腸を切離し細胞単位に分離後細胞を集め再び培養を行い5日目で1層の上皮様構造を認めるようになり約1週間で直径が5mm 大の表面に微絨毛を認める腸管類似の組織様構造に再構築された。再構築細胞塊の粘膜様組織下には血管、筋肉、神経などの雑多な細胞が秩序なく塊を形成していた

(2)Karnovsky-Root 法による acetylcholinesterase 染色および S-100 蛋白染色結果
acetylcholinesterase 染色、S-100 蛋白染色
培養1日目から7日目まで再構築された細胞塊の粘膜様組織下には神経線維が秩序なく染色され培養1日目から7日目まで変化は認められなかった。

(3)Myelin basic protein (D-18):SC-13912 の免疫染色結果
培養1日目~7日目まで粘膜下の雑多な細胞内

に秩序なく染色された神経細胞を認めたが経日的な変化は認められなかった

(4)電子顕微鏡による形態学的検討結果

培養前の細胞は球形で細胞同士は分かており形態学的に神経細胞は同定出来なかった。

培養5日目・6日目では小腸類似の期間構造を有する細胞塊の粘膜様組織下には神経細胞は同定出来なかった。培養7日目で細胞塊の粘膜様組織下に神経細胞・神経線維と神経筋接合部を確認した。

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)

〔その他〕ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

米川 浩伸 (YONEKAWA HIRONOBU)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：00296279

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし