

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08601

研究課題名(和文) 透明化組織イメージング法を用いたヒルシュスプルング病の新しい診断マーカーの探索

研究課題名(英文) Searching for new diagnostic markers for Hirschsprung disease using tissue clearing methods

研究代表者

宮原 克 (Miyahara, Katsumi)

順天堂大学・大学院医学研究科・技術員

研究者番号：00420844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：小児外科領域における最も代表的な機能的腸閉塞疾患であるヒルシュスプルング病のモデルであるエンドセリンレセプターB受容体欠失マウスにおいて、腸管組織内の血管構築の異常を見出し、血管構造の安定維持に関連する分子の発現が低いという結果を得た。今回の結果は、本疾患の原因遺伝子が神経堤細胞の発生とともに、血管構造の発生異常を引き起こす可能性が示唆された。本疾患の新しい病態の理解と確定診断のための一助となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒルシュスプルング病の確定診断の際に診断に難渋するケースにしばしば遭遇し、また根治には外科的治療が必要であり、その治療と診断のために新しい発生病態を解明することは重要である。今回の結果で可能性が示された原因遺伝子により神経系の発生の異常とともに血管の形成の異常が引き起こされる可能性は新しい発生病態の解明になるとともに、術後の合併症の原因ともなりえらると思っており、本疾患の新しい病態の理解と診断のための一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We revealed that the decrease of the molecule related of the stability and the development process of blood vessel formation in the gut of Hirschsprung disease model mice. It was suggested that the responsible gene of this disease may cause both abnormal development of vascular structure as well as abnormal development of enteric nervous system. This result may provide that the new understanding of pathogenesis and the new pathological diagnosis for Hirschsprung disease.

研究分野：小児外科病理学

キーワード：ヒルシュスプルング病 腸管神経系 組織透明化 蛍光イメージング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒルシュスプルング病の確定診断には外来神経線維の増生の有無が用いられているが、神経線維の増生が見られない症例もあり診断に難渋する場合がある。さらに精度が高く、有用な診断マーカーが必要と考えられているが、外来神経線維が増生する際の発生機構に着目した検討はされておらず、またこれまでの病理学的手法を用いた探索で観察するには技術的な限界が生じているのが現状である。

申請者らは、腸管神経系イメージングモデルマウス胎児を用いて透明化組織イメージング法を行い、ヒルシュスプルング病において増生する外来神経線維や無神経節細胞腸管の形成・発生メカニズム(関連分子)を可視化し、確定診断に用いることができる病理診断マーカーを見出すことを目的とした。

### 2. 研究の目的

本研究ではヒルシュスプルング病蛍光イメージングモデルマウスで最新の蛍光イメージング技術、特に現在脳神経科学分野で応用が進んでいる組織透明化法を用いて、未だ解明されていない発生メカニズム(関連分子)を可視化し、新しい発生機構とそれに関わる因子を探索するために以下の3つを目的とし、研究を進めた。

(1) ヒルシュスプルング病の発生メカニズム解析のための組織透明化による三次元イメージング法の確立

(2) 腸管神経系発生と血管形成機構の関連について

(3) ヒルシュスプルング病根治術後腸炎の原因探索

### 3. 研究の方法

(1) 腸管組織の摘出、処理、透明化処理と免疫染色について

生後7-14日のヒルシュスプルング病マウス(EDNRB KO)と同腹の野生型マウス腸管から消化管を摘出し、小腸と大腸組織それぞれの近接領域を3か所取り出した。1つめはRNA量測定のための保存液に、2つめは腸管を長軸方向に開きホルマリン(4%PFA)固定し、全層標本(ホールマウント標本)作製用組織とした。3つめの組織は凍結切片作成用として4%PFA固定後、凍結ブロックとして保存した。ホールマウント標本は通常の免疫染色に組織透明化を組み合わせた方法で行った。透明化法は組織の伸縮がなく、蛍光タンパクが退色しない、操作の簡便さに重点をおき、SeeDB法、Scale S法を採用し、共焦点レーザー顕微鏡で目的部位を63倍のグリセリン対物レンズを用いて厚さ100-150um程度で画像取得した。

(2) 腸管神経系発生と血管形成機構の関連について

定量PCR法を用いてRNA量を比較し、その際有意な差が見られた分子の発現について、これが血管新生に関連する発現であるかどうか凍結組織切片を用いた免疫染色と組織透明化処理を施した腸管を用いたホールマウント標本による組織発現変化を観察した。

(3) ヒルシュスプルング病根治術後腸炎の原因探索

腸管神経発生に関わる遺伝子が腸管に点在する免疫器官であるパイエル板の発生に関わることと、腸管からの異物取り込みに関与するM細胞が神経との関連により組織内の細胞密度が抑制されることが報告されている。そこで我々はEDNRB KOマウスにおける神経発生異常と腸管からの異物取り込みに関与するM細胞の関連を透明化ホールマウント標本での検討を行った。M細胞マーカーとしてGP2、Spi抗体を用い、神経マーカーとしてTUJ1抗体を用いた。

### 4. 研究成果

(1) 組織透明化三次元イメージング法の確立

ヒルシュスプルング病マウス(EDNRB KO)と同腹の野生型マウス腸管を採取し、通常の免疫染色後SeeDB法とScale S法で蛍光シグナルの検出と保存について検討すると、組織の伸縮や組織深度が浅い部位での蛍光シグナルの検出では差がなかったが、組織深度が深い部位でのシグナルの検出感度と蛍光シグナルの保持という点ではScale S法が我々の解析に適しており、以後ホールマウント標本での画像取得はScale S法で行った。(図1)

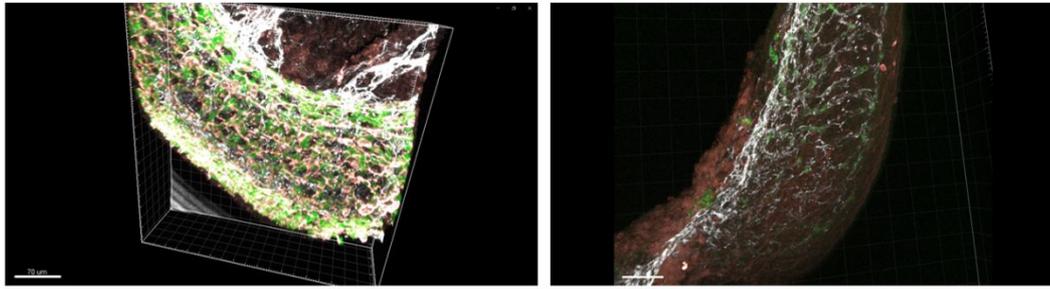


図1 透明化処理を施したマウス胎仔期の腸管ホールマウント組織における神経堤細胞（緑）神経細胞（赤）および血管（白）各種マーカーの3次元画像での分布  
左：小腸 右：大腸遠位部

### （2）腸管神経系発生と血管形成機構の関連について

個体発生や組織再生の過程において、血管系神経系の正しいネットワークの確立のために両者互いのシグナル互換性をもって作用する血管 - 神経ワイヤリングの概念に着想し、K0 マウス腸管内血管構築異常がみられるか、またその所見が神経堤細胞機能不全の分布と相関性を有するか、組織学的に検討した。血管内皮細胞マーカーCD31 抗体免疫染色による血管分布を観察すると、どの腸管領域でも野生型マウスの所見に比して K0 マウスにおいて血管内皮細胞の分布がより広範であり（図2）、また腸管組織由来 mRNA を用いた qPCR でも K0 腸管では血管形成と血管透過性に関連する接着因子群の発現が上昇を示した。しかし、神経堤細胞や分化した神経細胞およびグリア細胞の分布に関して K0 と野生型マウスの間で見られる違いは、これらの腸管壁内血管内皮細胞の分布や血管新生関連シグナルの違いとは相関性を示さなかった。

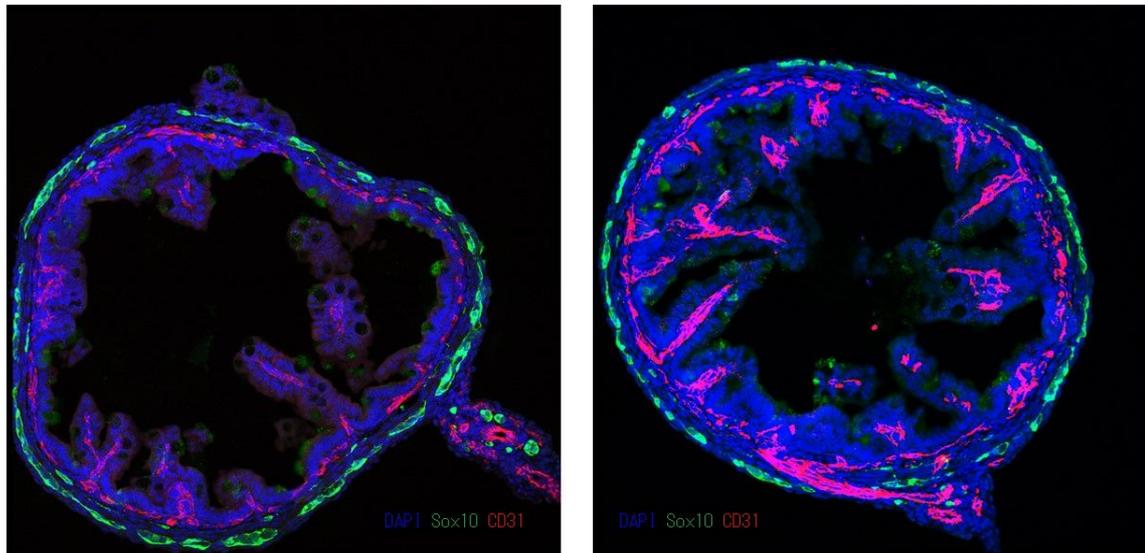


図2 EDNRB KO マウス腸管を用いた免疫染色における腸管壁内血管構築  
EDNRBKO マウスの腸管（小腸）では CD31 陽性（赤）の血管構築像が野生型に比して増生している。  
左：野生型 右：EDNRB KO

### （3）ヒルシュスプルング病根治術後腸炎の原因探索

腸管神経発生に関わる遺伝子が腸管に点在する免疫器官であるパイエル板の発生に関わることと、腸管からの異物取り込みに関与する M 細胞が神経との関連により組織内の細胞密度が抑制されることが報告されている。そこで我々は EDNRB KO マウスにおける神経発生異常と M 細胞との関連を、透明化ホールマウント標本をもちいた検討を開始した。M 細胞マーカーとして GP2、Spi 抗体を用い、神経マーカーとして TUJ1 抗体を用いている。これまでに有意な変化を見いだせてはいないが、今後モデルマウスの発生日齢による変化を追跡し、有意な変化を探索していく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sueyoshi Ryo, Miyahara Katsumi, Nakazawa-Tanaka Nana, Fujiwara Naho, Ochi Takanori, Yamataka Atsuyuki	4. 巻 36
2. 論文標題 DPP4 inhibitor reinforces cell junction proteins in mouse model of short bowel syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 49 ~ 55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-019-04571-5	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 Nakazawa-Tanaka Nana, Miyahara Katsumi, Fujiwara Naho, Ochi Takanori, Sueyoshi Ryo, Nojiri Shuko, Akazawa Chihiro, Urao Masahiko, Yamataka Atsuyuki	4. 巻 36
2. 論文標題 Decreased expression of $\alpha 1$ integrin in enteric neural crest cells of the endothelin receptor B null mouse model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 43 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-019-04578-y	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 Miyake Hiromu, Seo Shogo, Fujiwara Naho, Miyahara Katsumi, Lee Carol, Li Bo, Chen Yong, Yamataka Atsuyuki, Pierro Agostino	4. 巻 35
2. 論文標題 Endothelin receptor B affects the perfusion of newborn intestine: possible mechanism of necrotizing enterocolitis development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1339 ~ 1343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-019-04559-1	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 該当する
1. 著者名 Hidayat M, Mitsuishi Y, Takahashi F, Tajima K, Yae T, Miyahara K, Hayakawa D, Winardi W, Ihara H, Koinuma Y, Wirawan A, Nurwidya F, Kato M, Kobayashi I, Sasaki S, Takamochi K, Hayashi T, Suehara Y, Moriyama M, Moriyama H, Habu S, Takahashi K.	4. 巻 19
2. 論文標題 Role of FBXW7 in the quiescence of gefitinib-resistant lung cancer stem cells in EGFR-mutant non-small cell lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bosnian Journal of Basic Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 355 ~ 367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17305/bjbms.2019.4227	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 Takeda Masahiro, Miyahara Katsumi, Sueyoshi Ryo, Arakawa Atsushi, Lane Geoffrey J., Yamataka Atsuyuki	4. 巻 35
2. 論文標題 Innervation of the entire internal anal sphincter in a mouse model of Hirschsprung's disease: a first report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 209 ~ 214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-018-4397-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 -

1. 著者名 Kosaka Seitaro, Takeda Masahiro, Ochi Takatori, Miyahara Katsumi, Nakamura Eri, Tada Norihiro, Lane Geoffrey J., Yamataka Atsuyuki	4. 巻 35
2. 論文標題 Compromised vitality of spermatozoa after contact with colonic mucosa in mice: implications for fertility in colon vaginoplasty patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 71 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-018-4377-3	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 Naho, Miyahara Katsumi, Nakazawa-Tanaka Nana, Akazawa Chihiro, Yamataka Atsuyuki	4. 巻 38
2. 論文標題 In vitro investigation of the differentiation of enteric neural crest-derived cells following transplantation of aganglionic gut in a mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 755 ~ 759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-022-05105-2	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 Kaneke Ayaka, Naito Kiyohito, Nakamura Shinji, Miyahara Katsumi, Goto Kenji, Obata Hiroyuki, Nagura Nana, Sugiyama Yoichi, Kaneke Kazuo, Ishijima Muneaki	4. 巻 21
2. 論文標題 Influence of aging on the peripheral nerve repair process using an artificial nerve conduit	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2020.9599	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮原 克, 田中 奈々, 藤原 なほ, 栗原 秀剛, 山高 篤行
2. 発表標題 ヒルシユスプルング病モデルマウス腸管神経細胞におけるアセチル化チュープリンの発現異常
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018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	田中 奈々  (Tanaka Nana)  (50530656)	順天堂大学・医学部・准教授   (32620)	
研究分担者	藤原 なほ  (Fujiwara Naho)  (20589543)	順天堂大学・医学部・准教授   (32620)	
研究分担者	山高 篤行  (Yamatoka Atsuyuki)  (40200703)	順天堂大学・医学部・教授   (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------