

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09098

研究課題名（和文）ヒルシュスブルング病類縁疾患の新規治療法を目指した遺伝子変異の同定とその機能解析

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of genetic mutations for novel therapies for allied disorders of Hirschsprung's disease

研究代表者

河野 淳（Kono, Jun）

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：90758418

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒルシュスブルング病類縁疾患は時として致死的な合併症を引き起こす難治性の機能的腸管不全疾患である。本研究ではヒルシュスブルング病類縁疾患のモデルマウスであるJF1/Msfにおいて、腸管神経節の減少、自律運動の低下、アセチルコリンに対する収縮力の低下を明らかにした。また電位依存性Naチャンネル阻害剤であるテトロドトキシンの投与により周期的な収縮が出現することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒルシュスブルング病類縁疾患において、根治治療といえるものは小腸移植しかないが、その合併症の発生頻度は高く、また術後も長期にわたる免疫抑制剤の使用を行う必要がある。そのような状況下において本研究において腸管蠕動の改善につながる可能性のある知見が得られた。今後、新規治療法の研究へとつながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Allied disorders of Hirschsprung's disease are functional intestinal failure diseases that sometimes cause fatal complications. This study found decreased enteric ganglion, decreased autonomic motility, and decreased contractility to acetylcholine in JF1/Msf, a mouse model of Hirschsprung's disease analog. It also found that administration of tetrodotoxin, a voltage-dependent Na channel inhibitor, caused the appearance of cyclic contractions.

研究分野：小児外科学

キーワード：ヒルシュスブルング病類縁疾患 腸管不全 電気生理学

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類縁疾患は腸管蠕動不全を来す複数の疾患の総称であるが、このうち、腸管神経節細胞僅少症 (hypoganglionosis; hypo) 巨大膀胱探勝結腸腸管蠕動不全症 (megacystis microcolon intestinal hypoperistalsis syndrome; MMIHS) 慢性特発性犠牲腸閉塞症 (chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction; CIIP) は著しい腸管蠕動不全を認め、腸からの栄養吸収が困難で機能的腸閉塞に伴う重症腸炎を繰り返す。そのため姑息的手術を繰り返し終生に渡り静脈栄養に依存せざるを得ず、その合併症は時に致命的である。現在のところ、根治治療といえるものは小腸移植しかないが、その合併症の発生頻度は高く、また術後も長期にわたる免疫抑制剤の使用を行う必要がある。

また、これらの疾患の発症メカニズムは未だ不明である。MMIHS や CIIP については *ACTG2*, *MYH11*, *LMOD1*, *MYLK*, *MYL9* などの遺伝子の変異の関与が疑われているが、遺伝子変異による疾患発症の機序は解明されていない。hypo については可能性のある遺伝子変異の同定すらなされていない。

2. 研究の目的

我々は家族性 CIIP の一家系の診療にあたっている。その遺伝形式は常染色体優性遺伝が疑われ、CIIP や MMIHS で現在同定されている変異遺伝子の中で常染色体優性遺伝の形式をとるものは *ACTG2* のみであることから、同家系においては *ACTG2* の変異が疑われる。本研究においては、*ACTG2* 遺伝子変異の同定とその変異遺伝子を平滑筋細胞に導入することによる細胞機能の解析を行うことで、*ACTG2* 変異による CIIP, MMIHS 発症の機序を解明する。

また、hypo について原因となりうる遺伝子変異の有無を検索する。

3. 研究の方法

上記の家族性 CIIP 家系より血液を採取し、*ACTG2* のターゲットシーケンスを行い、その変異を同定し、ヒト骨肉腫細胞株である U2OS あるいはヒト膀胱平滑筋細胞に上記変異遺伝子と GFP をトランスフェクションすることを計画していた。

しかし、新型コロナウイルスによる研究環境の制限、および研究室の移転・再整備などにより細胞実験を行うことが不可能となった。

また、hypo の遺伝子異常について、我々はすでに hypo 患児 3 名の全エクソーム検索を外部企業に委託して行っており、その raw data を用いて変異遺伝子の有無の検索を予定していたが、これも企業側に問題により raw data を入手することが困難となった。

そこで、ヒルシュスプルング病類縁疾患のモデルマウスである JF1/Msf の腸管の機能的解析を行うことでヒルシュスプルング病類縁疾患の病態解析及び新規治療につながると考えた。

1) ヒルシュスプルング病類縁疾患モデルマウスとして JF1/Msf を選定し、コントロール群として C57BL/6J を選定した。両マウスの結腸を摘出し、組織学的に神経節細胞を評価する。

2) JF1/Msf と C57BL/6J の結腸を摘出し、1.5 cm に切断し実験に用いた。Krebs 液に腸管を保存しながら、tissue organ bath システムを用いその蠕動を観察した。Krebs 液の組成は 120.0 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 2.0 mM MgCl₂, 0.16 g/L Na₂H₂P₄O₇, 0.37 g/L CaCl₂ · 2H₂O, 2.0 g/L glucose, and 2.1 g/L NaHCO₃ とした。

蠕動の評価について、tissue organ bath システム設置後 1 時間後から 10 分間の自律蠕動を評価した。Area under the curve (AUC) は 10 分間の収縮波形と最小値の間の面積とした。

3) Tissue organ bath システムを用い、電気刺激と acetylcholine (ACh) による薬剤刺激で行い反応の収縮を評価した。電気刺激は 100Hz, 50V で行い、3 回の刺激の平均値を比較した。ACh の濃度は 1 μmol/L とした。

4. 研究成果

1) Jf1/Ms では結腸の筋層間神経節の減少、縮小を認めた。(図 1)

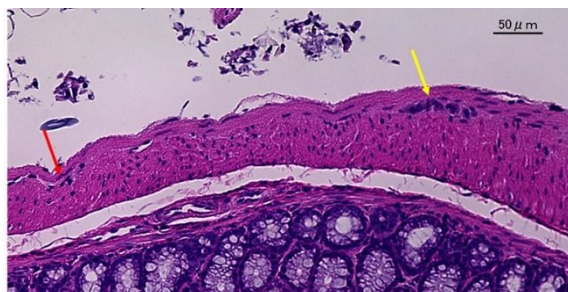


図1. 黄色矢印：神経節細胞、赤色矢印：正常より小さい神経節細胞

2) 自立運動において統計学的有意差はないものの

JF1/Msf は AUC が小さい傾向がみられた。(図 2、p=0.111)

(JF1/Msf n=6, C57BL/6J n=6)

JF1/Msf は C57BL/6J に比較し腸管の自律運動が弱いと考えられた。

3) 電気刺激においては両群間で明らかな差は認めなかった。(図3, $p=0.419$)
 (JF1/Msf $n=17$, C57BL/6J $n=8$)
 Ach 刺激においては JF1/Msf において統計学的な有意差をもって収縮が弱かった。
 (図4, $p=0.001$)
 (JF1/Msf $n=17$, C57BL/6J $n=10$)

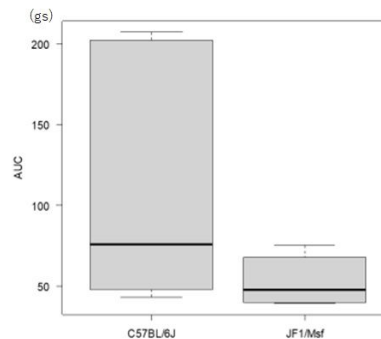


図2. 自立運動のAUC

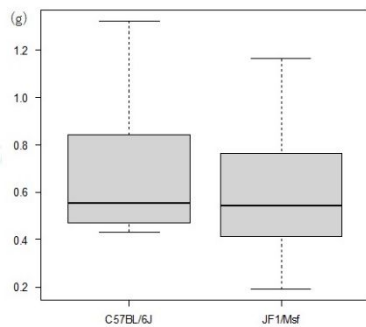


図3. 電気刺激による収縮

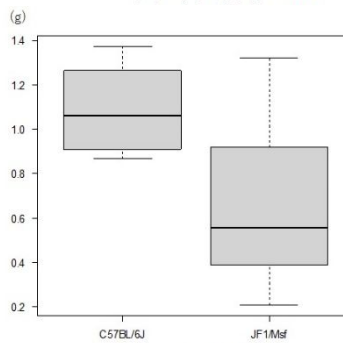


図4. Achによる収縮

以上より JF1/Msf においては Ach 受容体から平滑筋収縮に至るプロセスに異常がある可能性が示唆された。

また、実験の過程において、JF1/Msf に電位依存性 Na チャネル阻害剤である tetrodotoxin の投与を行ったところ図5に示すような周期的な収縮の増加を認めた。

今後はこの tetrodotoxin による収縮機能を解明することで新規治療法開発への可能性が示唆された。

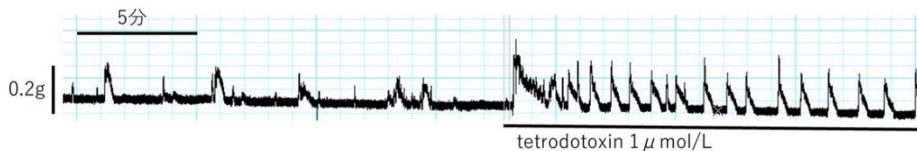


図5. JF1/Msfにおけるtetrodotoxinによる収縮の増加

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	桐野 浩輔 (Kirino Kousuke) (00621707)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	田口 智章 (Taguchi Tomoaki) (20197247)	福岡医療短期大学・歯科衛生学科・学長 (47131)	
研究分担者	吉丸 耕一郎 (Yoshimaru Koichiro) (60711190)	九州大学・医学研究院・講師 (17102)	

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