

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17576

研究課題名(和文)腸管神経系異常疾患の病態における腸管免疫系の関与

研究課題名(英文) Involvement of the Enteric Immune System in the Pathogenesis of Enteric Nervous System Abnormalities.

研究代表者

文田 貴志 (Fumita, Takashi)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60866995

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)：腸管神経と腸管免疫に着目し腸管神経増多を認めるNcx KOマウスの解析を行った。野生型と比較し遠位小腸粘膜固有層で好酸球が有意に増加しており、関連するサイトカインについて組織を用いてRT-qPCRを施行するとIL5/neuromedinU(nmU)の有意な上昇を認めた。組織学的検討でもnmUの発現増強を認め、ILC2も増加していたことから腸管神経がnmUを介してILC2を動員し、そこからIL5が増加し好酸球が増加するという機序がNcxKOマウスで働いている可能性が示された。また、好酸球欠損Ncx KOマウスは腸炎感受性の亢進を認めたことから好酸球が腸管保護的に働いていることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管神経異常を認める疾患は腸炎が重篤となる傾向にある。しかし自然状態で腸炎を発症している訳ではないため、そこに何かしらの免疫学的代償機構が働いていると仮説を立て研究を行った。腸管神経増多を呈し腸管運動異常をきたすNcx遺伝子をノックアウトしたマウスは腸炎の感受性亢進を認めているおり、そのマウスを用いて研究を行うと小腸粘膜固有層で好酸球が増加しており、その好酸球を欠損させると腸炎の感受性がさらに亢進したことから好酸球が腸管保護的に働いている可能性を発見した。

研究成果の概要(英文)：I focused on the interaction between enteric nerves and enteric immunity. So, I analyzed the small intestine of Ncx KO mice with enteric hyperinnervation. Eosinophils were significantly increased in the distal small intestinal lamina propria compared to wild-type mice. RT-qPCR of eosinophil-associated cytokines showed a significant increase in IL5 and neuromedinU (nmU). Histological examination also showed increased expression of nmU, and type2 innate lymphoid cell (ILC2) was also increased, suggesting that enteric nerves mobilize ILC2 via nmU, from which IL5 increases, leading to an increase in eosinophils. This suggests that enteric nerves mobilize ILC2 via neuromedin U, from which IL5 is increased and eosinophils are increased in NcxKO mice. Eosinophils may also play an intestinal protective role, as eosinophil-deficient NcxKO mice showed an increased susceptibility to enterocolitis.

研究分野：腸管神経

キーワード：腸管神経 腸管免疫 好酸球 ILC2 neuromedinU GATA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児外科領域で扱う疾患である Hirschsprung 病や Hirschsprung 病類縁疾患は、便秘や腸管拡張を呈する腸管神経異常疾患で、腸炎が重症化することが知られている。神経異常腸管の切除術が治療であるが、術後腸炎の重症化が報告されており、その原因は不明であるものの腸管神経と腸管免疫の関連も示唆される。Ncx は神経堤細胞に発現する転写因子でありその遺伝子をノックアウトした(Ncx KO)マウスは神経細胞死の障害により腸管神経細胞の増多を認め、Hirschsprung 病類縁疾患の一型である腸管神経形成異常症(Intestinal Neuronal Dysplasia : IND)のモデルマウスと位置付けられている。Ncx KO マウスではデキストリン硫酸ナトリウム(DSS)誘導腸炎の感受性が野生型(Wild Type : WT)と比較して亢進しており、組織学的所見でも炎症所見の増悪が認められた。その機序については腸管神経が産生する過剰な一酸化窒素(NO)による上皮細胞障害(E-cadherin 減少)及び NO 殺菌抵抗性(NorV+)を有する高病原性腸内細菌の増加(dysbiosis)によるものであることを明らかにし、腸管神経が腸管のバリア機構や腸内細菌叢に影響を及ぼしていることを見出した。

2. 研究の目的

腸管神経増多を認める Ncx KO マウスは野生型と比較し腸炎感受性の亢進を認めるが、自然経過で腸炎を発症しないことから何らかの免疫学的な代償機構(腸管恒常性維持機構)が腸炎発症抑制に働いていると仮説を立て、腸管神経と腸管免疫の相互作用を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)小腸の組織学的解析(HE 染色、Chromotrope2R 染色)

10 週齢前後のマウス小腸からパラフィン標本を作成し、脱パラフィン後に HE 染色と Chromotrope2R 染色を施行し絨毛長、陰窩長、絨毛の性状、好酸球数について検討した。

(2)小腸粘膜固有層から抽出した細胞の FACS 解析

10 週齢前後のマウス小腸を切開し、EDTA や DNase I 等を含んだ PBS で洗浄し単細胞を得た後に濃度勾配法を用いてリンパ球を分離した。得られた細胞塊を染色し FACS 解析を行った。T 細胞、B 細胞、好酸球について検討した。

(3)小腸組織における遺伝子発現解析

上記マウスから小腸組織を全層で採取し、RNA を抽出した後に cDNA を作製し RT-qPCR にて関連するサイトカインについて解析を行った。

(4)FACS sorting により分離した細胞の遺伝子発現解析

FACS sorting で、ILC2(innate lymphoid cell type2)、T 細胞集団から RNA を抽出し RT-qPCR で遺伝子発現解析を行った。

(5)小腸の蛍光免疫組織学的解析

パラフィン標本から脱パラフィン、抗原賦活化、細胞透過処理、ブロッキングを行った上で一次、二次抗体で染色し蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

(6)好酸球欠損 Ncx KO(DKO)マウスの DSS 誘導腸炎

CRISPR/Cas9 システムを利用して X 染色体 double GATA 領域を欠失させたマウスを作製・継代した。DKO マウスと Ncx KO マウスを 2.5%DSS を 7 日間自由飲水させたのちに水に切り替え 7 日間観察した。生存率と体重減少率について検討した。

4. 研究成果

(1)小腸の組織学的解析(HE 染色、Chromotrope2R 染色)

HE 染色では遠位小腸において Ncx KO マウスは WT と比較し絨毛長陰窩長比が有意に小さく(p=0.012)、陰窩の拡張傾向が認められていた。絨毛の性状に明らかな異常は認められなかった。また Chromotrope2R 染色では Ncx KO マウスで粘膜固有層における好酸球数の増加を認めて

いた。

(2)小腸から抽出した細胞の FACS 解析
パイエル板の細胞組成に関しては WT、
Ncx KO 間で明らかな差を認めなかつた。
小腸粘膜固有層における B 細胞、T 細胞の割合においても明らかな差を認めなかつた一方で、遠位小腸粘膜固有層における好酸球割合は Ncx KO マウスにおいて有意な上昇を認めていた。
($p < 0.05$)(図 1)

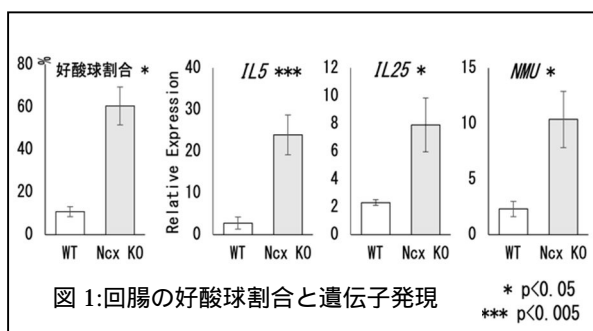


図 1:回腸の好酸球割合と遺伝子発現

* $p < 0.05$
*** $p < 0.005$

(3)小腸組織における遺伝子発現解析

FACS 解析で得られた結果をもとに好酸球の増加に関連するサイトカインを中心に RT-qPCR にて遺伝子発現解析を行ったところ、*IL5* ($p < 0.005$)、*CCL8* ($p < 0.05$)、*neuromedinU* ($p < 0.05$)の有意な発現上昇が Ncx KO マウス遠位小腸で認められた。(図 1)

(4)FACS sorting により分離した細胞の遺伝子発現解析

IL5 発現の増加を認めていたことから、その発現細胞を同定することを目的に FACS sorting で得られた細胞集団から RNA を抽出し遺伝子発現解析を行ったところ、ILC2 (innate lymphoid cell type2)の細胞集団において IL5 発現が増加していた。また、T 細胞集団では WT と Ncx KO 間で明らかな差を認めなかつた。

(5)小腸の蛍光免疫組織学的解析

ILC2 は神経放出されるペプチドである neuromedinU で活性化するという既報から neuromedinU 発現を蛍光免疫組織染色で評価したところ、筋層間腸管叢と粘膜層の TUB3 陽性神経細胞で neuromedinU の発現が確認され、さらに Ncx KO マウスで neuromedinU の蛍光発現が高くなっていた。

(6)好酸球欠損 Ncx KO(DKO)マウスの DSS 誘導腸炎

CRISPR/Cas9 システムを利用して X 染色体 double GATA 領域を欠失させることで DKO マウスの作製に成功した。DKO マウスにおいては FACS 解析で腸管好酸球、末梢血好酸球の著減、自然飼育での死亡率に差がないことを確認している。Ncx KO マウスと DKO マウスで DSS 誘導腸炎を起こし生存率を比較したところ、DKO マウスで有意に生存率が低下した。 $(p < 0.05)$ また、経過中の体重減少も有意に大きかった。このことから Ncx KO マウスでは腸管好酸球が腸管保護的に働いている可能性が示唆された

以上の結果から、腸管神経から放出される neuromedinU が ILC2 を活性化することで IL5 が放出され好酸球が小腸に動員されるという反応が Ncx KO マウスで生じている可能性が示された。また、増加している好酸球は腸管保護的に働いている可能性を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 文田貴志、藤村理紗、坂本明美、幡野雅彦
2. 発表標題 Crosstalk between enteric neurons and immune cells in the maintenance of intestinal homeostasis
3. 学会等名 第50回日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本昌大、文田貴志、藤村理紗、坂本明美、幡野雅彦
2. 発表標題 Ncx(-/-)マウスにおける腸管好酸球機能解析 好酸球欠損マウスの作製と検証
3. 学会等名 令和3年度東日本研究医養成コンソーシアム 第 11 回夏のリトリート
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------