

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390122

研究課題名（和文） GDNF シグナル不全に誘導される新規神経細胞死の分子機構

研究課題名（英文） Molecular Mechanisms underlying a novel form of cell death induced by impaired GDNF signaling

研究代表者

榎本秀樹（ENOMOTO HIDEKI）

独立行政法人理化学研究所・神経分化・再生研究チーム・チームリーダー

研究者番号：00360511

研究成果の概要（和文）：GDNF シグナル不全に誘導される腸管神経細胞死（CIDEN と略）は、アポトーシスと類似した経路で活性化されるが、腸管神経における Apaf-1 の内因性の機能欠損によりカスパーゼ活性化に至らない可能性が示唆された。また、CIDEN を抑制する遺伝子操作を加えたマウスにおいて腸管神経細胞数の増加は認められず、CIDEN は生理的条件下には存在しない細胞死と考えられた。一方、ヒルシュスプルング病モデルマウスで CIDEN を抑制すると発症を回避でき、CIDEN は病態形成に中核的に関与していることが示された。

研究成果の概要（英文）：Investigation of molecular mechanism underlying caspase-independent cell death of enteric neurons triggered by GDNF deprivation (CIDEN) revealed an intrinsic absence of Apaf-1 function in enteric neurons, which appears to account for the lack in morphological hallmark of apoptosis in CIDEN. Genetic manipulation to block CIDEN in vivo did not cause an increased numbers of enteric neurons, suggesting that CIDEN does not occur in the physiological condition. Blocking CIDEN, however, rescued the intestinal aganglionosis in a mouse model for Hirschsprung disease (HSCR, congenital absence of the enteric ganglia), suggesting that CIDEN is central to the pathogenesis of HSCR.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 7,600,000 | 2,280,000 | 9,880,000 |
| 2010年度 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |
| 2011年度 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,600,000 | 4,380,000 | 18,980,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：細胞死、GDNF、腸管神経、カスパーゼ、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

条件的ノックアウトマウスを用いた先行研究により、発生後期に GDNF シグナルを欠いた大腸神経細胞が、カスパーゼ非依存性で新規な形態の細胞死を起こして消失し、ヒルシュスプルング病（HSCR：腸管神経系の先

天性欠損）様の病態を形成することを見出していた。この神経細胞死の生理的意義、分子機構、HSCR を初めとする様々な病態形成への関与を明らかにすることは極めて重要であると考えられた。

2. 研究の目的

GDNF シグナル不全に誘導される腸管神経細胞死の、1. 分子機構を解明する 2. 生理的意義を解明する 3. 病態との関連を解明する。

3. 研究の方法

1. 既に確立していた腸管神経細胞の培養系を用い、薬理学的手法、分子生物学的手法、生化学的手法を組み合わせて細胞死の経路を探索する。2. 腸管神経細胞死を特異的に抑制する遺伝学的操作を行い、マウス腸管神経系の形成を解析する。3. 腸管神経系形成の過程をタイムラプス解析し、大腸神経系の形成に寄与する細胞群を同定し、ヒルシュスプルング病との関連を探索する。

4. 研究成果

1. GDNF 存在下で初代培養した胎児大腸神経細胞の大半は、GDNF 除去後 24 時間以内にカスパーゼ非依存性の細胞死を起こす。このシステムを用いてカスパーゼ非依存性細胞死の経路探索を試みた。

GDNF に依存した細胞生存における種々のシグナル経路阻害剤の効果を検討した。その結果、MEK 阻害剤では細胞死に変化がなかったが PI3K の阻害剤により細胞死が促進された。一方、JNK の阻害により細胞死が有意に抑制されることを見出した。

一方、腸管神経細胞では GDNF 除去後、cytochrome c の明らかな放出を認めなかった。腸管神経細胞死の形態はアポトーシスに見られるようなクロマチン凝集を欠くため、カスパーゼ活性化経路 (Apaf1, caspase3, 7, 9) が欠落している可能性が示唆されていた。Apaf-1 の発現を調べたところ、腸管神経系における発現レベルが非常に低く、細胞死の過程での上昇も認めないことが明らかとなった。腸管神経では内在的に Apaf-1 の機能が欠落している可能性が示唆された。

また、カスパーゼ 6 の阻害剤による細胞死抑制の可能性を解析したが、明らかな抑制効果は認められなかった。

以上の結果は、腸管細胞死を誘導する上流シグナルは、交感神経細胞をはじめとする多くの神経細胞のアポトーシスの誘導経路と非常に類似するが、Apaf-1 の欠如により下流のカスパーゼ活性化が起こらずアポトーシスに特徴的な死の形態をとらないと予測された。カスパーゼ非依存性の腸管細胞死の経路に関しては同定には至っていない。现阶段の培養システムでは大規模な生化学的解析をするために十分な細胞数を確保することが困難であり、今後、システムに改良を加える必要があることも示された。

2. 先行研究により、GDNF 存在下で培養された腸管神経細胞は、GDNF 除去により Bax 非依存性、カスパーゼ非依存性の細胞死を起こし、この細胞死は Bcl-xL の過剰発現により抑制されることが明らかとなっていた。この知見をもとに、gene targeting により腸管神経系で Bcl-xL を高く発現する Ret-Bcl-xL マウスを作製した。その結果以下の知見を得た。

(1) Ret-Bcl-xL マウスでは、Ret 不活化による腸管神経細胞死が抑制され、約半数の個体で見かけ上正常の腸管神経系が形成された。Bcl-xL の発現上昇が生体内で腸管神経細胞死を抑制できることが明らかとなった。

(2) Ret-Bcl-xL アレルにより rescue された Ret 不活化神経系では、腸管内の便滞留と NOS 陽性細胞の減少が認められ、Ret の発現が腸管神経系の機能と特定の神経サブタイプの分化に必要である可能性が示された。

(3) Ret-Bcl-xL アレルを持つマウスでは腸管神経細胞の数に変化は認められなかった。すなわち、発生中の腸管神経系では生理的細胞死が起きていない可能性が示唆された。

(4) Ret-Bcl-xL アレルはヒルシュスプルング病モデルマウスにおける無神経節腸管の発生をほぼ完全に抑制した。腸管神経系の機能と神経分化にも異常は認められなかった。この結果は、ヒルシュスプルング病の発症において細胞死が中心的な役割を果たしていることを示唆し、細胞死抑制による発症予防というヒルシュスプルング病の新たな治療戦略の可能性を提示した。

3. RET 発現量を減少させたマウスではカスパーゼ非依存性の腸管神経細胞死によりヒルシュスプルング病様の病態が生じる。このマウスにおいて細胞死を起こす細胞集団を特定するために、発生中の腸管神経前駆細胞において光変換蛍光タンパクである KikumeGR を発現するトランスジェニックマウスを作成し、このマウスの腸管の器官培養系を用いて腸管神経系の形成過程をタイムラプス観察した。

その結果、発生過程で小腸から大腸が血管を挟んで一過性に平行に並ぶ時期に、小腸壁から離れ、血管を足場に大腸へ「近道移動する」腸管神経前駆細胞集団があることを発見した (以下、この細胞集団を trans-mesenteric enteric neural crest-derived cell: ENCCs と呼ぶ)。tmENCCs を光変換により非侵襲的にラベルしその運命を追跡した結果、tmENCC が大腸神経系の大部分を形成することを見出した。この結果は、大腸神経系が腸管壁内を吻側から尾側に一方向に移動する細胞集団の先頭部分から形成されるとする従来の概念を覆す発見であった。

ヒルシュスプルング病の 8 割以上では大腸末端で神経節欠如が起こるため、疾患発症に

tmENCCsの異常の関与が強く示唆された。先行研究で作成していたヒルシュスブルング病モデルマウスの発生過程を解析したところ、tmENCCsの移動開始のタイミングが遅れ大腸壁に侵入出来る tmENCC 細胞数が減少していることが明らかとなった。一方、従来知られていた腸管壁内を吻尾方向に移動する経路で大腸に侵入する細胞群（以下、circumflex ENCCs）の移動には大きな変化は認められなかった。この結果は、モデルマウスの大腸神経過程では、cfENCCsがtmENCCsの減少を補償している可能性を示唆していた。すなわち、ヒルシュスブルング病ではcfENCCsがカスパーゼ非依存性細胞死を起こすことが示唆された

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）

〔雑誌論文〕（計 6 件）

- ① Patel A, Harker N, Moreira-Santos L, Ferreira M, Alden K, Foster K, Garefalaki A, Pachnis P, Andrews P, Enomoto H, Milbrandt J, Pachnis V, Coles MC, Kioussis D, Veiga-Fernandes H. Differential RET signaling reponses orchestrate lymphoid and nervous enteric system development. *Science Signaling* in press, 2012 査読あり
- ② Uesaka T, Enomoto H. Neural precursor death is central to the pathogenesis of intestinal aganglionosis in Ret hypomorphic mice. *Journal of Neuroscience*, 30, 5211-5218, 2010. 査読あり
- ③ Golden JP, Hoshi M, Nassar MA, Enomoto H, Wood JN, Milbrandt J, Gereau RW 4th, Johnson EM Jr, Jain S. RET signaling is required for survival and normal function of nonpeptidergic nociceptors. *Journal of Neuroscience*, 30, 3983-3994, 2010. 査読あり
- ④ Luo W, Enomoto H, Rice FL, Milbrandt J, Ginty DD. Molecular identification of rapidly adapting mechanoreceptors and their developmental dependence on Ret signaling. *Neuron*, 64, 841-856, 2009. 査読あり
- ⑤ Canty AJ, Dietze J, Harvey M, Enomoto H, Milbrandt J, Ibáñez CF. Regionalized loss of parvalbumin interneurons in the cerebral cortex of mice with deficits in GFR α 1 signaling. *Journal of Neuroscience*, 29, 10695-10705, 2009. 査読あり

- ⑥ Chi X, Michos O, Shakya R, Riccio P, Enomoto H, Licht JD, Asai N, Takahashi M, Ohgami N, Kato M, Mendelsohn C, Costantini F. Ret-Dependent Cell Rearrangements in the Wolffian Duct Epithelium Initiate Ureteric Bud Morphogenesis. *Developmental Cell*, 17,199-209, 2009. 査読あり

〔学会発表〕（計 15 件）

- ① Enomoto H: Non-polyalanine repeat expansion mutations of the *PHOX2B* gene dysregulate Sox10 expression and cause neurocristopathy in the autonomic nervous system in mice, 3rd International Symposium on Development of the Enteric Nervous System: Cells, Signals and Genes, Hong Kong, China, 2012年3月26日
- ② Enomoto H: Migration and cell death of neural crest derived-cells in the gut, KSBNS-MCCS-Asia Conference, Seoul, Korea, 2011年9月19日
- ③ 上坂 敏弘, 榎本 秀樹: 神経栄養因子GDNF は神経堤由来細胞による腸管神経系の二つの神経叢の形成に必須である, 第34回日本神経科学大会, 横浜, 2011年9月16日
- ④ 榎本 秀樹: Neurovascular congruency is required for the development of the enteric nervous system, KEY Forum in Developmental Biology and Regenerative Medicine, 熊本, 2011年9月8日
- ⑤ Enomoto H: Identification of trans-mesenteric neural crest cells as the major source for the colonic enteric nervous system, 16th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Tokyo, Japan, 2010年12月1日
- ⑥ 榎本 秀樹: 腸管神経系の発生と病理. 新潟大学脳研究所セミナー, 新潟, 2010年11月29日
- ⑦ 榎本 秀樹: Phox2b遺伝子変異による症候群性神経堤症の発症メカニズム, 第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学学会大会・第20回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2010), 神戸, 2010年9月4日
- ⑧ Enomoto H, Nagashimada M, Ohta H, Wakayama T and Nakao K: Neurocristopathy-associated Phox2b mutations cause Sox10 dysregulation and affects self-renewal, proliferation and differentiation of autonomic neural progenitors, Advances in

- Neuroblastoma Research (ANR),
Stockholm, Sweden, 2010年6月23日
- ⑨ 榎本 秀樹：神経堤細胞の発生と病理。第13回京都府立医科大学研究開発センター学術講演会，京都，2009年12月18日
- ⑩ 榎本 秀樹：ヒルシユスプルング病とRET遺伝子変異，第62回日本自律神経学会総会，和歌山，2009年11月5日
- ⑪ 榎本 秀樹，西山 千尋，眞部 孝幸，Young H，Newgreen Don：腸管神経堤細胞の移動様式，第32回日本神経科学大会，名古屋，2009年9月16日
- ⑫ 上坂 敏弘，榎本 秀樹：Bcl-xLによるヒルシユスプルング病モデルマウスの発症抑制，第32回日本神経科学大会，名古屋，2009年9月16日
- ⑬ Enomoto H: Signals and cell behaviors in the development and pathology of the enteric nervous system, 2009 Gordon Research Conferences on Neurotrophic Factors, Newport, USA, 2009年6月24日
- ⑭ 榎本 秀樹，西山 千尋，Newgreen D，Young H:腸管における腸管神経堤細胞の移動分布様式，日本発生生物学会第42回大会，新潟，2009年5月31日
- ⑮ Enomoto H: Signals and cell behaviors in the development and pathology of the enteric nervous system, Bilateral workshop on developmental biology, Beijing, China, 2009年5月7日

[図書] (計 1 件)

- ① Heather M. Young, Donald F. Newgreen, Hideki Enomoto, ACADEMIC PRESS, Physiology of the gastrointestinal tract, Fifth Edition, Section II Neurogastroenterology, Development of the nervous system 2012 p475-488

[その他]

ホームページ等

<http://www.cdb.riken.jp/ndr/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 秀樹 (HIDEKI ENOMOTO)

独立行政法人理化学研究所 神経分化・再生研究チーム

研究者番号：00360511

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし