

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 29 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390330

研究課題名(和文) 光る腸管神経の再生・新生機構の解明と制御

研究課題名(英文) Clarification and control on mechanism of neurogenesis of fluorescent enteric neurons.

研究代表者

高木 都 (Takaki, Miyako)

奈良県立医科大学・医学部・特任教授

研究者番号：00033358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経の光るマウス腸管切離吻合モデルで、クエン酸モサプリド(MOS)により5-HT4受容体を活性化して再生・新生が促進された壁内神経を2光子励起顕微鏡によるin vivoイメージングにより生きたまま形態学的に評価できた。加えて、胎児中枢神経由来の神経幹細胞移植を行い、移植細胞(赤色蛍光)がホスト細胞(黄緑色蛍光)と同様に腸管切離吻合部に移動して神経細胞に分化するのを同様に評価できた。ついで活動の強さに応じて光るトランスジェニックマウスの正常腸管(薄いので共焦点顕微鏡下で観察可能)の壁内神経細胞のin vivoカルシウムイメージングに成功した。

研究成果の概要(英文)：The reconstruct of impaired enteric neural circuits at the thick granulation tissue at anastomosis in small intestine of H-line: Thy1 promoter GFP mouse was observed by two-photon microscopy (2PM) a week after drinking a 5-HT4-receptor agonist, mosapride citrate (MOS) 100 microm solution.

In Thy1-promoter YFP mouse after gut transection and anastomosis, the fetal brain-derived neural stem cells (NSC) with red fluorescent cell linker were transplanted from the tail vein. 5-HT4 receptor-mediated facilitation of neurogenesis was confirmed by clear three-dimensional in vivo imaging of newborn enteric neurons generated from enteric neural progenitors (host NSC; green fluorescence) and those from transplant NSC (red fluorescence). The facilitating effect of MOS and the distribution of new neurons were similar between the transplant and host NSC. Finally, though preliminary, we succeeded in in vivo Ca²⁺ imaging of myenteric neuronal activity in the normal ileum of GCaMP6 transgenic mouse.

研究分野：生理学

キーワード：セロトニン4受容体 スジェニックマウス 腸壁内神経 神経再生・新生 腸管切離吻合モデル 2光子顕微鏡 GCaMPトラン

1. 研究開始当初の背景

(1) 本申請者は、1980年代から排便機構における神経生理学的制御機構の解明を進めてきた(Pflügers Arch 388:45-52, 1980; 398:120-125, 1983; 403:164-169, 1985; AJP GI Physiol 283: G148-G156, 2002; 285: G389-395, 2003; 289:G351-360, 2005)。一方、消化器外科との連携のもと、下部直腸癌術後患者の術後排便障害をきたす要因は手術操作に伴う神経損傷であると考え、その原因を究明してきた。このような研究に対し一流雑誌の査読者から、「この実験系は世界で比類を見ないものである」という評価を受けている。

(2) 本研究の課題である腸管(直腸)切離吻合術後失われた排便機能の完全な早期回復を目指すには「吻合部を跨いだ口側と肛門側直腸の生理的な機能の連続性をいかに回復させるか」がキーポイントになる。直腸切離吻合モデルの研究は本申請者のグループが世界で初めてであり、このモデルを用いて「損傷された腸壁内神経系が8週間で再生すること」を明らかにしている(AJP GI Physiol. 294: G1084, 2008)。

(3) 一方、申請者は、数年に亘って、直腸切離吻合モデルにて5-HT₄受容体刺激薬が損傷した壁内神経の再生・新生を促進し、排便機能障害を速やかに回復させることを示している(クエン酸モサプリド用途特許出願中特願 2008-281131 のちに特許第 5089556 号 2012.9.21 登録; Neurogastroenterol. Motil. 22: 806-814, 2010)。

2. 研究の目的

(1) クエン酸モサプリド(MOS)の腸壁内神経系再生・新生促進作用を含む多領域にわたる神経の再生・新生作用やメカニズムの解明を基礎研究にて明らかにし、その制御の基盤となるエビデンスを得る事を目的とする。

手始めに、5-HT₄受容体刺激薬の特異性を調べるためにセロトニン取り込み阻害薬(フルボキサミン)(内因性のセロトニン増加を起こす)を作用させてその効果を検討する。

(2) 本研究の本来の目的は、まず神経が光るトランスジェニックマウス(以下 TG マウス)を使い、新しいテクノロジーである2光子励起顕微鏡による腸壁内神経の in vivo(生体内)イメージングに成功することである。

(3) この手法を用いて損傷腸壁内神経あるいは老齢モデルマウスの腸壁内神経の再生・新生過程を明らかにする。さらには神経幹細胞移植も行い、iPS細胞やES細胞移植の可能性も探る。

(4) 最終的には神経活動に応じて神経が光る TG マウスを用いた in vivo イメージングにて神経再生・新生過程を制御・促進する因子(低分子化合物: 5-HT₄受容体刺激薬 MOS)を確定し、腸壁内神経の再生が消化管機能・排便機能の改善効果をもたらすことを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 自然科学研究機構生理学研究所生体

恒常機能発達機構研究部門鍋倉淳一教授らの協力を得て、壁内神経系の形態的・生理的機能を評価する2光子励起顕微鏡(2PM)システムによる in vivo でのイメージングを進める。すなわち、神経が光る Thy1-プロモーター-GFP TG マウスを使って、腸管切離吻合モデルを作成して神経を損傷後、その再生・新生過程を形態的に明らかにする。加えて、老齢 TG マウスの腸壁内神経組織をイメージングし、加齢変化を明らかにする。

(2) マウスの腸管切離吻合手術はマイクロサージェリーで施行する。麻酔下にて皮膚切開後、引き出した腸管を神経組織、血管は全て温存したまま全周にわたり切離、吻合を施し閉創する。粘膜層の外反が強く生じることが予測されることから、粘膜層の内反をもたらす Gambee 縫合を適宜用いることが必要である。まず、奈良県立医科大学内の動物実験施設内にて、正常な回復過程を明らかにするため、手術施行後の飼育期間を1週、2週、4週群に分け、飼育後採取した組織を従来の免疫染色処理後観察することで術後の飼育期間を決定する。

(3) 飼育期間決定後、自然科学研究機構生理学研究所の鍋倉研究室より C57BL/6 H-line Thy1-プロモーター-GFP TG マウス(神経が緑色に光る)の供与を受け、切離吻合モデルマウス腸管の2PMによる in vivo イメージングを行い、腸壁内神経の再生・新生過程を時系列的に追跡する。特に吻合部の神経新生は従来の固定した組織標本ではその三次元構造が全く予測できないので、重点的に調べる。Vehicle 投与群、MOS 投与群と5-HT₄受容体遮断薬 + MOS 投与群で結果を比較する。老齢 H-line マウスが入手できれば腸壁内神経系損傷後の腸壁内神経系の再生・新生過程の加齢による変化を in vivo イメージングでとらえる。

(4) さらに、C57BL/6 H-line Thy1-プロモーター-YFP TG マウス(神経が黄緑色に光る)の供与を受け、腸管の切離吻合術後に C57BL/6 マウス胎児の海馬と脳室下帯域の神経幹細胞を PKH26(赤色蛍光色素)でマークした後、尾静脈より移植を行う。2PM を使えば、950 nm の励起波長で移植した細胞(赤色蛍光)とホスト細胞(黄緑色蛍光)を同時に観察できる。切離吻合モデルマウス腸管の in vivo イメージングを、(3)と同様に、Vehicle 投与群、MOS 投与群と5-HT₄受容体遮断薬 + MOS 投与群で行い、腸壁内神経の再生・新生過程を時系列的に追跡し比較検討する。

(5) 再生・新生した神経細胞の生理機能研究のため、さらに進めて、埼玉大学中井教授から神経活動に応じて強く光る C57BL/6 Thy1-G6-2A-mCherry TG マウス(GCaMP6 マウス)の提供を受けて、まず、正常腸管の in vivo Ca²⁺イメージングでの生理実験法を確立する。910 nm の波長で励起をして正常腸管で遺伝子組換え型蛍光カルシウムプローブ(Genetically encoding calcium indicators; ECIs)

である GCaMP6 の反応を mCherry とのレシオメトリーで測定する。観察部位をチャンバーに確実に固定した後に、観察部位より口側または肛門側の腸管腔に生理食塩水や神経節刺激薬を注入する。これらの刺激により光る神経の蛍光強度が上昇する反応を捉える。正常腸管は厚みがないので、共焦点顕微鏡の時間スキャンで反応を検出できる。

腸管の切離吻合術後施行後、吻合部に形成された肉芽組織中に再生した神経軸索や、新生した神経細胞の探索は、2PM で今後行う予定である。

4. 研究成果

(1) 正常腸管神経の in vivo イメージング

連携研究者である自然科学研究機構生理学研究所鍋倉教授らの協力を得て、正常な壁内神経系の形態を 2 光子励起顕微鏡システムにより in vivo でイメージングする実験を実施した。鍋倉研究室では、生体内神経細胞の Ca^{2+} 動態イメージング技術や長時間連続イメージング技術が確立されてはいるが、まず、GFP を神経に発現させた H-line Thy-1 プロモーター-GFP TG マウスの腸壁内神経の in vivo イメージング観察を試みた。マウスは麻酔後正立顕微鏡のステージに横臥姿勢で固定して、小腸を血流は維持したまま引き出し栄養液を満たしたチャンバーに固定する。

H-line TG マウスの正常腸管の動きをピンでしっかりと止めることにより、小腸のアウエルバッハ神経節を、生存状態を維持したままの状態、強く光って見えることを確認した (図 1)

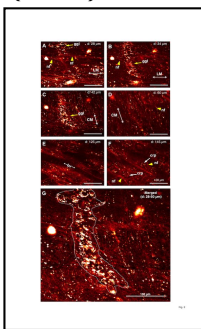


図 1 小腸の正常アウエルバッハ神経節の in vivo イメージング像

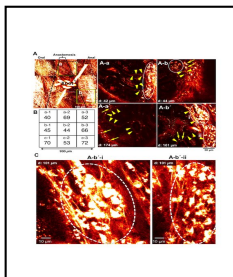
(2) 切離吻合部モデルでの損傷した壁内神経系から再生新生した神経細胞の in vivo イメージング

マウスの腸管切離吻合手術はマイクロサージェリーで施行した。麻酔下に皮膚切開後、引き出した腸管を神経組織、血管は全て温存したまま全周にわたり切離、吻合を施し閉創する。手術施行後の飼育期間を 1 週、2 週、4 週群に分け、飼育後採取した組織を従来の免疫染色処理後観察することで術後の飼育期間を 1 週、2 週、4 週に決定した。

自然科学研究機構生理学研究所の鍋倉教室より H-line GFP TG マウスの供与を受け、切離吻合モデルを作成し、術後、1 週、2 週、

4 週目で腸管の in vivo イメージングを行い、5-HT₄ 受容体刺激薬 (MOS) による腸壁内神経の再生・新生促進過程を時系列的に追跡した。特に吻合部の神経新生は従来の固定した組織標本ではその三次元構造が全く予測できないので、重点的に調べた。

MOS 投与 1-2 週間で吻合部に神経節様の構造物が認められた (図 2)。



これらの新生神経細胞群は吻合部全体にわたって偏りなくみられ、表面からの深さは MOS 投与 1 週目では浅く (100 μ m)、2 週目ではやや深い所 (140 μ m) にもみられた。

図 2 吻合部新生神経節様の構造物

MOS のこのような効果は 5-HT₄ 受容体遮断薬の同時投与により完全に消失したので、5-HT₄ 受容体を介する作用である事が確認できた。

また、プロモデオキシウリジン (BrdU) を MOS と同時投与する事によって、吻合部の新生神経細胞 (GFP 陽性、BrdU 陽性、ニューロフィラメント陽性、神経幹細胞マーカー DLX2 陰性) を確認することができた。

以上の結果から、2PM による切離吻合部モデルでの損傷した壁内神経系から再生新生した神経細胞の in vivo イメージングを三次元でとらえる事に成功した。

さらに、腸管の切離吻合術後に胎児の海馬と脳室下帯域の神経幹細胞を移植してから同様の研究を行ったが、移植された神経幹細胞はほぼホストの神経幹細胞と同様に振る舞い、分化した神経細胞の分布は同様であった。ただ、細胞数はホストの神経幹細胞から分化した神経細胞の 1 / 10 であった。

(3) 神経活動に応じて強く光る TG マウスの腸管神経の in vivo Ca^{2+} イメージング

まず埼玉大学中井教授が作成した中枢神経系で神経の光る GCaMP6 TG マウスを使って正常腸管で 2PM あるいは共焦点顕微鏡でいきのまま腸壁内神経の in vivo イメージング実験が可能かどうかを検討した。

様々なラインの GCaMP TG マウスを用いて、腸壁内神経細胞が光るラインを探した。その結果、C57BL/6・Thy1-G6-2A-mCherry がアウエルバッハ神経細胞は緑色の蛍光 (GFP 優勢) を示し、マイスナー神経細胞は赤色の蛍光 (mCherry 優勢) を示す事が認められた。この結果は、マイスナー神経細胞の非刺激時の細胞内 Ca^{2+} 濃度は低く、アウエルバッハ神経細胞の非刺激時の細胞内 Ca^{2+} 濃度は高いことを示していると思われる。

しかし、ネンブータル麻酔下では、腸管を伸展しても、神経節刺激薬 (DMPP) を尾静脈から注射しても蛍光強度が高まるという反応は得られなかった。

そこで、除脳モデル等で検討するつもりで

はあったが、まず吸入麻酔薬イソフルレン作用下で、同様の実験を試みた。ただし、DMPPは腸腔内に注入した。その結果、図3に示すようなGCaMP 蛍光の増強反応が得られた。

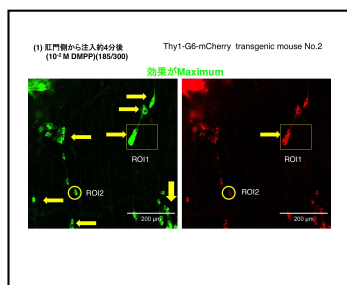


図3 腸壁内神経細胞の *in vivo* カルシウムイメージング

しかし、腸管の切離吻合術施行後、形成された吻合部肉芽組織に再生した神経軸索や、新生した神経細胞は、共焦点顕微鏡では全く見る事すらできないので2PMで今後行う予定である。

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 8 件)

Ohbuchi T, Takaki M, Misawa H, Suzuki H, Ueta Y. *In vitro* morphological bud formation in organ-like three-dimensional structure from mouse ES cells induced by FGF10 signaling. *Commun Integr Biol* 査読有 5(4) 1-4, 2012. doi:10.4161/cib.20093.

Kawahara I, Kuniyasu H, Matsuyoshi H, Goto K, Obata K, Misawa H, Fujii H, Takaki M. The comparison of effects of a selective 5-HT reuptake inhibitor versus a 5-HT₄ receptor agonist on *in vivo* neurogenesis at the rectal anastomosis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 査読有 302:G588-G597, 2012.

Goto K, Kato G, Kawahara I, Luo Y, Obata K, Misawa H, Ishikawa T, Kuniyasu H, Nabekura J, Takaki M. *In vivo* imaging of enteric neurogenesis in the deep tissue of mouse small intestine. *PLoS One* 査読有 2013;8(1):e54814.

doi: 10.1371/journal.pone.0054814.
Takaki M, Goto K, Kawahara I. [Review] 5-HT₄ receptor agonist-induced actions and enteric neurogenesis in the gut. *J Neurogastroenterol Motility* 査読有 20 (1), 17-30, 2014.

高木 都, 後藤 桂, 加藤 剛, 鍋倉淳一 再生・新生した腸管神経細胞機能の *in vivo* 可視化解析および神経再生新生機構の解析 生理学研究所年報 33 : 184-185, 2012.

高木 都, 後藤 桂, 加藤 剛, 石川達也, 鍋倉淳一 再生・新生した腸管神経細胞機能の *in vivo* 可視化解析および神経再生新生機構の解析 生理学研究所年報 34 : 204-205, 2013.

高木 都, 後藤 桂, 稲田浩之, 石川達也, 鍋倉淳一 : 再生・新生した腸管神経細胞機能の *in vivo* 可視化解析および神経新生機構の解析 生理学研究所年報 35 : 180-181, 2014.

Goto K, Kawahara I, Kuniyasu H, Takaki M. A protein tyrosine kinase receptor, c-RET signaling pathway contributes to the enteric neurogenesis induced by a 5-HT₄ receptor agonist at an anastomosis after transection of the gut in rodents. *J Physiol Sci*, 2015 (in press).

[学会発表](計 16 件)

Takaki M, Kuniyasu H, Kawahara I, Goto K, Matsuyoshi H. *In vivo* neural regeneration and neurogenesis promoted by 5-HT₄-receptor activation. Neurogastroenterology and Motility 2012 Joint International Meeting, September 6-8, 2012, in Bologna, Italy.

川原 勲, 國安弘基, 後藤 桂, 小畑孝二, 藤井久男, 高木 都 選択的セロトニン再取り込み阻害薬とセロトニン受容体作動薬が腸壁内神経損傷後の *in vivo* 神経再建に与える効果の比較 第5回 J-FD 研究会 2012年11月10日 東京.
後藤 桂, 加藤 剛, 川原 勲, 三澤裕美, 石川達也, 國安弘基, 鍋倉淳一, 高木 都 マウス小腸切離吻合術後の肉芽組織深部に新生した腸壁内神経系の *in vivo* イメージング法による解析 第40回自律神経生理研究会 2012年12月1日 東京.

Takaki M. Nervous control on physiological function of the distal gut defecation reflex mechanism in Irisawa H and Aya 's Award Symposium. The 90th annual meeting of the Physiological Society of Japan. (招待講演) 2013年3月28日 東京.

後藤 桂, 川原 勲, 鍋倉淳一, 國安弘基, 高木 都 マウス回腸切離吻合術後の肉芽組織深部における腸壁内神経系再生・新生促進作用の *in vivo* イメージング法による解析 第55回日本平滑筋学会総会 2013年8月7日 旭川.

高木 都 *in vivo* 平滑筋研究法の30年の進歩-モルモット排便反射の *in vivo* 解析法からヒトにおける生体機能イメージング法まで- 第55回日本平滑筋学会総会教育セミナー(招待講演) 2013年8月8日 旭川.

後藤 桂, 川原 勲, 鍋倉淳一, 國安弘基, 高木 都 クエン酸モサブリドによ

るマウス回腸切離吻合術後の肉芽組織深部における腸壁内神経系再生・新生促進作用 2光子励起顕微鏡を用いた in vivo イメージング法による解析 第6回 J-FD 研究会 2013年11月9日 東京.

高木 都 ランチョンセミナー「5-HT₄ 受容体刺激薬の新しい作用」第44回日本小児消化管機能研究会 2014年2月15日 大阪.

Goto K, Kato G, Kawahara I, Kuniyasu H, Nabekura J, Takaki M. Endogenously and exogenously newborn enteric neurons in the deep tissue of mouse small intestine underwent transection and anastomosis. 第91回日本生理学会大会 2014年3月18日 鹿児島.

後藤 桂, 川原 勲, 鍋倉淳一, 國安弘基, 高木 都 マウス回腸切離吻合術後の肉芽組織深部における 5-HT₄ 受容体活性化による移植神経幹細胞からの腸壁内神経系再生・新生促進作用 第56回日本平滑筋学会総会 2014年8月7日 横浜.

後藤 桂, 川原 勲, 羅 奕, 國安弘基, 高木 都 5-HT₄ 受容体活性化による損傷した腸壁内神経細胞の再生・新生作用促進効果の起こるメカニズム 第24回日本病態生理学会大会 2014年8月9日 北九州.

高木 都, 後藤 桂, 川原 勲, 鍋倉淳二, 國安弘基: スポンサーシンポジウム2「脳・神経-消化管の機能障害の基礎と臨床」: 損傷した消化管壁内神経の再生新生 第16回日本神経消化器病学会 2014年11月7日 東京.

高木 都, 後藤 桂, 川原 勲, 鍋倉淳一, 國安弘基 クエン酸モサプリドによるマウス回腸切離吻合術後の肉芽組織深部における移植した中枢神経由来神経幹細胞からの壁内神経系再生・新生促進作用 2光子励起顕微鏡を用いた in vivo イメージング法による解析 第7回 J-FD 研究会 2014年11月8日 東京.

高木 都, 後藤 桂, 川原 勲, 中井淳一 「Thy1-G6-2A-mCherry トランスジェニックマウスにおける腸壁内神経細胞の in vivo カルシウムイメージング」-共焦点レーザー顕微鏡下での予備的検討- 第42回 自律神経生理研究会 2014年12月6日 東京.

Goto K, Kawahara I, Kuniyasu H, Inada H, Nabekura J, Takaki M. 5-HT₄ receptor-mediated facilitation of neurogenesis of enteric neurons from transplanted brain-derived neural stem cells in the deep tissue of mouse small intestine underwent transection and anastomosis. 第92回日本生理学会大会 2015年3月22日 神戸.

高木 都 JPS シンポジウム 「ペプチド・アミンを介する脳・腸連関: 5-HT₄

受容体を介する移植した脳由来神経幹細胞からの腸壁内神経分化促進作用 第92回日本生理学会大会 2015年3月22日 神戸.

〔図書〕(計 1 件)

高木 都「プログレッシブ生命科学」編集 米田悦啓・岡村康司・金井好克・西田幸二 高木分担執筆 7-3 生体リズム 秒単位のリズム iii) 消化管の蠕動運動 pp.114-117, A5判 総頁312頁, 2014年9月10日 南山堂.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 腸壁内神経系再生促進剤
発明者: 高木 都・勝井錬太・國安弘基
権利者: 大日本住友製薬株式会社
種類: 用途特許
番号: 特許第 5089556 号
取得年月日: 平成 24 年 9 月 2 日
国内外の別: 国内

〔その他〕特別講義・セミナー

高木 都 産業医科大学大学院講義「再生医学と消化管(ES-gut など)」 2012年10月2日 16:20-17:50 産業医科大学.

高木 都 京都大学薬学研究科特論「消化管神経の再生・新生」 2013年1月26日 京都大学.

高木 都: 第8回愛媛大学先端医学ウィントースクール特別講演「素晴らしい研究生活を振りかえって?」ホテルアジュール汐の丸, 愛媛県今治市, 2015年2月28日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 都 (TAKAKI, Miyako)
奈良県立医科大学・医学部・特任教授
研究者番号: 00033358

(2) 研究分担者

國安弘基 (KUNIYASU, Hiroki)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00253055

(3) 連携研究者

鍋倉淳一 (NABEKURA, Junichi)
生理学研究所
研究者番号: 50237583

中井淳一 (Nakai, Junichi)
埼玉大学
研究者番号: 80237198