

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 9 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790769

研究課題名（和文） 炎症性腸疾患における腸管神経の関わりについて

研究課題名（英文） Analysis of relation between entero colitis with enteric neuron

研究代表者

藤村 理紗 (FUJIMURA LISA)

千葉大学・バイオメディカル研究センター・助教

研究者番号：30376363

研究成果の概要（和文）：腸管神経が過剰である Ncx-KO マウスを用いた DSS 誘導腸炎モデルを用いた当研究から、腸管神経由来一酸化窒素は、腸管上皮の e-cadherin を発現制御することにより上皮透過性をコントロールすること、また、腸内フローラの恒常性維持において重要な役割を持つことを示唆した。以上から、腸管神経は腸管において、その恒常性の維持と炎症性腸疾患において何らかのかかわりを持つことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Using the hyper innervated Ncx-KO mice, the nitric oxide from enteric neuron controls the expression of e-cadherin of enteric endothelial cells and intestinal permeability and has an important roles in maintain the homeostasis of intestinal flora. This study indicated that the enteric neuron has roles in maintenance of enteric homeostasis and in enteric colitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：下部消化管学(小腸、大腸)

1. 研究開始当初の背景

腸管における恒常性の制御システムには、腸管神経系、腸管免疫系および腸管内分泌系の3者がバランスを持って相互作用することにより保たれていると考えられる。腸管には、体全体の神経細胞の半数が存在する。この腸管神経の発生異常や機能異常は、腸管運動の低下ばかりでなく腸管免疫力の低下をひきおこし、腸炎の発症などから腸管機能低下の悪循環をもたらす。腸管神経系の発生分化異常と腸管免疫系異常には密接な関係があると考えられているが、不明な点が多く、研究報告も少ない。申請者は、腸管神経の発生分化異常を示す遺伝子改変マウスを用いて、腸管における神経系および免疫系のクロストークに

ついて分子レベルでの解明をめざしている。

神経堤細胞に特異的に発現しているホメオボックス遺伝子であるNcx(Hatano et al, Anat. Embryol., 1997)は、申請者の所属するグループで単離され、そのノックアウト(KO)マウスの解析から、アポトーシスの異常による腸管神経の過剰分化により一部のマウスでは巨大結腸症を発症する(C57BL/6系統では約90%、C57BL/6×DBA2では約42%)(Hatano et al, J. Clin. Invest., 1997)。Ncx-KOマウスは、3週齢より正常マウスで見られる腸管神経細胞のアポトーシスが起これないことにより腸管神経節数が増加し、成体では、胃から直腸までの腸管全領域で腸管神経節数が増加している。申請者は、巨大結腸症を発症しない8週齢Ncx-KOマウスにおい

て、腸管炎症の自然発症を認めている。本研究では、腸管における神経系および免疫系のクロストークについての解明を目指して、Ncx-KOマウスにおける腸管免疫機能について解析をはじめており、すでに以下のことを明らかにしている。

- (1) 8週齢のNcx-KOマウスについて、盲腸および大腸において血便を認めた。組織学的解析により、Ncx-KOマウス大腸では局所的にびらんのような病変、炎症痕を認めた。
- (2) Ncx-KOマウスにおけるパイエル板と腸管膜リンパ節のリンパ球数が、8週齢において野生型マウスの約2-3倍に増加していた。
- (3) 8週齢Ncx-KOマウスのリンパ系臓器(脾臓、胸腺)について細胞数やサブセットを解析した結果、野生型と変わらなかった。
- (4) 8週齢のNcx-KOマウスより摘出したパイエル板リンパ球は野生型マウスと比較してアポトーシスを起こしやすいことを見出した。
- (5) 8週齢のNcx-KOマウスにおいて、糞便中IgA抗体の量が、野生型マウスの2/3-1/2に低下していたが、血清中IgG1量が約1.3-2倍高かった。
- (6) 6週齢のNcx-KOマウスに、2.5%デキストラン硫酸塩(dextran sulfate sodium : DSS)を7日間自由飲水させ、腸管炎症モデルを作製したところ、野生型マウスと比べ、非常に高い感受性を示した。
- (7) 2.5%DSS飲水によりみられたNcx-KOマウスにおける高い感受性は、1%DSS飲水でもみられた。
- (8) 2.5% DSS腸炎モデルにおいて、Ncx-KOマウスでみられた体重減少と生存曲線は、野生型マウスに10% DSSを飲水した場合とほぼ同じであったが、血便はNcx-KOマウスにおいて野生型よりも早期に高い頻度でみられた。
- (8) 腸管上皮の透過性を調べるために、FITC-dextranを経口摂取させ腸管上皮からの血清中に浸透したFITC-dextranの量を調べたところ、一部の8週齢のマウスでは野生型と比べ、約3倍亢進していた。

以上の結果から、Ncx-KOマウスは腸管炎症を起こしやすい(自然発症、DSS腸炎モデル高感受性)ということが明らかとなった。近年、腸管神経の免疫系への関与が示唆されており、Ncx-KOマウスにおける腸管神経異常との関連が予想され、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

クローン病や潰瘍性大腸炎などの難治性

炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease: IBD)は、わが国で患者数が毎年増加している。病因はいまだ明らかでないが、自然免疫系にかかわる分子の異常、獲得免疫系の異常、腸管粘膜上皮の異常などの報告がある。一方、腸管における恒常性制御には、神経系、免疫系および内分泌系がバランスをとり相互作用することで保たれていると考えられている。しかし、腸管神経系による、腸管機能への影響や炎症性腸疾患発症への関与についての報告はあまりない。本研究では、腸管神経系に異常をきたすマウスを用いて、腸管神経異常が腸管機能や腸管免疫に与える影響を明らかにし、IBDの病因とその治療法の開発について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Ncx-KOマウスにおけるDSS腸炎モデルの詳細な病態の解析

Ncx-KOマウスにおけるDSS腸炎モデルの病態について、野生型との比較を行う。Ncx-KOマウスでは、DSS飲水後1、2日後より血便がみられることから、腸管上皮の透過性が亢進し、早期に細菌感染を起していると考えられる。この時の腸管粘膜への浸潤細胞について、量的、質的な観点から野生型マウスと比較検討する。方法は、腸管粘膜下層に浸潤したマクロファージ、顆粒球、T細胞について、免疫組織学的に調べる。また腸管組織における炎症性サイトカインの発現について調べる。

(2) Ncx-KOマウスの腸管粘膜機能の解析

腸炎の原因のひとつとして、腸管粘膜透過性の亢進または粘膜バリア機能低下が、細菌感染を容易とするという報告がある。申請者は、8週齢のNcx-KOマウスにおいて、腸管上皮透過性が亢進していることを見出している。そこで、腸管上皮透過性亢進の原因として考えられる上皮細胞間タイトジャンクションのバリア機能を調べるために、tight junction タンパクの発現について免疫組織学およびウェスタンブロット法により検討する。また、バリア機能に重要なGoblet細胞(ムチン層などの腸管粘液分泌)やPaneth細胞(ディフェンシンやリゾチームなど抗菌物質を分泌)の機能について、免疫組織学的に調べる。

(3) Ncx-KOマウス腸管における腸内フローラの解析

Ncx-KOマウスと野生型マウスを生後2週後までに同居を開始し、成体での腸内フローラ

の構成について検討を行う。方法は、糞便を無菌的に回収し、MacConkey 培地を用いた好気条件下による大腸菌科などの通性嫌気性菌の培養と、GAM 培地を用いた嫌気条件下による偏性嫌気性菌の培養による糞便中の菌数の測定を行う。

4. 研究成果

腸管では、免疫系、内分泌系、神経系が相互作用により恒常性を維持しているが、神経系の役割については不明である。当研究では、腸管における神経系の役割の解明を目的とし、その一部が明らかとなった。

(1) 腸管神経由来 NO による腸管上皮タイトジャンクションタンパク e-cadherin 制御機構の解明

腸管神経が過剰である Ncx-KO マウスは、DSS 誘導腸炎モデルにおいて非常に高い感受性を示した。Ncx-KO マウスでは、高い死亡率と激しい体重減少、腸管組織における炎症性サイトカインの高産生、激しい細胞浸潤(T細胞、マクロファージ、顆粒球)などがみられた。(図 1、2)。また、DSS 投与後高い確率で血便を呈したことから、腸管バリアが破たんしているのではないかと考えられた。しかし腸管バリアを形成する粘液層(ムチン)について調べたが、MUC2 や MUC3 などのムチン遺伝子の発現や細胞修復に関与する TFF3 遺伝子の発現には異常を認めず、また、PAS 染色によるムチンの染色においても異常を認めなかった。一方で、FITC-dextran 法により腸管上皮の透過性を調べたところ、Ncx-KO マウスでは野生型と比べ約 3 倍亢進していた。さらに、Ncx-KO マウスの腸管上皮細胞では、tight junction 関連タンパクである e-cadherin 発現が顕著に減少していることがわかった。Ncx-KO マウスは一酸化窒素(NO)産生腸管神経細胞が増加していることより、NO 合成酵素(NOS)阻害剤である L-NAME を投与したところ、腸管上皮の透過性亢進および e-cadherin の発現は野生型と同レベルまで改善された。

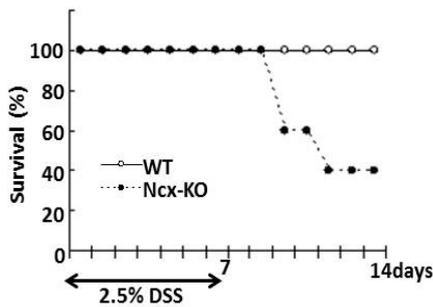
DSS 腸炎モデルにおいて、Kanamycin を同時に投与したところ、Ncx-KO マウスでは顕著に改善した(図 3)。このことは腸管神経過剰である Ncx-KO マウスでは、e-cadherin 発現低下による腸管上皮細胞の脆弱化から、腸内細菌浸襲による腸炎を起こしていることが示唆された。

(2) 腸管神経由来 NO による腸内フローラのバランス制御機構の解明

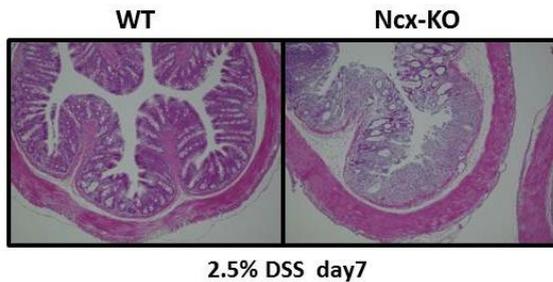
Ncx-KO マウスは、L-NAME 投与下においては、腸管上皮の透過性の改善と e-cadherin の発現増強がみられたにも関わらず、DSS 誘導腸炎モデルにおいては L-NAME 投与群ではさらに悪化した。また nNOS 特異的な阻害剤 L-NPA 投与下においても同様に悪化した。一方で、iNOS 特異的な阻害剤 1400w 投与下では、野生型と比較して差を認めなかった。このことは腸管神経より産生される NO が保護的な役割を持つことを示唆した。マクロファージなどから産生される一酸化窒素は、殺菌作用を持つことが知られているため、腸管神経由来一酸化窒素も、殺菌作用や、腸内環境を維持する役割を持つことが考えられた。そこで L-NPA 投与下 DSS 誘導腸炎モデルにおいて、抗生物質 Kanamycin の投与を行ったところ、Ncx-KO マウスでは改善した。このことから、腸管神経が腸内フローラのバランスを制御しているのではないかと考えられた。また、腸内フローラについて、培養法により検討を行った。糞便を回収し、好気および嫌気条件下で培養を行ったところ、Ncx-KO マウスでは、好気条件下で生育する菌が、野生型と比べ 10~100 倍増えていた。また、RealtimePCR 法により細菌の DNA について調べたところ、腸内細菌科の菌数が増加していた。一方で嫌気条件下にて生育する菌数は、Ncx-KO マウスでは野生型と比較して違いを認めなかったが、DNA レベルにおいてはビフィズス菌属の菌数が野生型と比べ半減していた。以上より、Ncx-KO マウスでは腸内フローラのバランス異常を呈することが示唆された。

以上の結果より、腸管神経は腸管において、その恒常性の維持と炎症性腸疾患において何らかのかかわりを持つことが明らかとなった。当研究の研究成果は、腸管における神経の役割を解明することは、ヒトの炎症性腸疾患における病態のコントロールおよび治療において将来的に有用である可能性を示した。

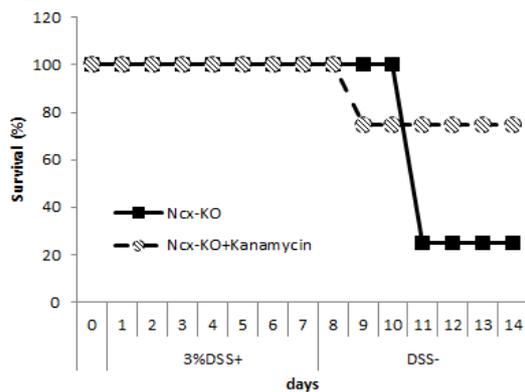
(図 1)



(図 2)



(図 3)



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Fujimura L, Hatano M, Miyado K, Toshimori K. Integration of the mouse sperm fertilization-related protein equatorin into the acrosome during spermatogenesis as revealed by super-resolution and immunoelectron microscopy. *Cell Tissue Res.* 2013 Apr 6. 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23564009>

2. Kinoshita T, Nohata N, Watanabe-Takano H, Yoshino H, Hidaka H, Fujimura L, Fuse M, Yamasaki T, Enokida H, Nakagawa M, Hanazawa T, Okamoto Y, Seki N.

Actin-related protein 2/3 complex subunit 5 (ARPC5) contributes to cell migration and invasion and is directly regulated by tumor-suppressive microRNA-133a in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2012 Jun;40(6):1770-8. 査読有 doi: 10.3892/ijo.2012.1390. Epub 2012 Feb 29.

3. Kinoshita T, Nohata N, Fuse M, Hanazawa T, Kikkawa N, Fujimura L, Watanabe-Takano H, Yamada Y, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N. Tumor suppressive microRNA-133a regulates novel targets: moesin contributes to cancer cell proliferation and invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Feb 10;418(2):378-83. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2012.01.030.

4. Fujimura L, Hatano M. Role of Prickle1 and Prickle2 in neurite outgrowth in murine neuroblastoma cells. *Methods Mol Biol.* 2012;839:173-85. 査読有 doi: 10.1007/978-1-61779-510-7_14.

5. Kinoshita T, Nohata N, Yoshino H, Hanazawa T, Kikkawa N, Fujimura L, Chiyomaru T, Kawakami K, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N. Tumor suppressive microRNA-375 regulates lactate dehydrogenase B in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2012 Jan;40(1):185-93. 査読有 doi: 10.3892/ijo.2011.1196.

6. Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Mutallip M, Sakurai D, Fujimura L, Kawakami K, Chiyomaru T, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N. Tumor suppressive microRNA-375 regulates oncogene AEG-1/MTDH in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *J Hum Genet.* 2011 Aug;56(8):595-601. 査読有 doi: 10.1038/jhg.2011.66.

[学会発表] (計 8 件)

1. 第 35 回日本分子生物学会 2012 年 12 月 11 日福岡 Teratake Y, Hasegawa Y, Fujimura L, Takano H, Tokuhisa T, Hatano M Nczf disruption results in early

embryonic lethality by deregulating p27 expression

2. 第41回日本免疫学会 2012年12月7日 神戸 Fujimura L, Sakamoto A, Arima M, Tokuhisa T, Hatano M Nitric oxide derived from enteric neurons regulates intestinal barrier function

3. 第41回日本免疫学会 2012年12月5日 神戸 Arima M, Taniguchi T, Fujimura L, Sakamoto A, Hatano M, Tokuhisa T Role of IL-33 in a suppressive function of Bcl6 for IL-4 production by memory Th2 cells.

4. 第41回日本免疫学会 2012年12月5日 神戸 Yamamoto T, Taniguchi T, Inamine A, Fujimura L, Sakamoto A, Hatano M, Tokuhisa T, Arima M Phf11 promotes IgE class switch recombination in activated B cells.

5. 第34回日本分子生物学会 2011年12月16日 横浜 寺竹洋一、長谷川勇太、藤村理紗、高野晴子、徳久剛史、幡野雅彦 *Nczf* disruption results in early embryonic lethality by deregulating p27 expression.

6. 第40回日本免疫学会 2011年11月28日 幕張 Kohashi Y, Inamine A, Inage S, Takano H, Fujimura L, Sakaoto A, Hatano M, Tokuhisa T, Arima M 樹状細胞によるTh2誘導サイトカイン産生に対する Bcl6 の抑制作用

7. 第40回日本免疫学会 2011年11月28日 幕張 藤村理紗、坂本明美、有馬雅史、徳久剛史、幡野雅彦 *Ncx* 欠損は腸管上皮バリアの異常により腸炎を発症する

8. 第40回日本免疫学会 2011年11月28日 幕張 Hanazumi N, Inamine A, Kohashi Y, Takano H, Fujimura L, Sakaoto A, Hatano M, Tokuhisa T, Arima M 好塩基球のTh2サイトカイン遺伝子発現制御におけるGATA2の役割

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉大学・バイオメディカル研究センター・助教

藤村 理紗 (FUJIMURA LISA)

研究者番号 : 30376363

(2) 研究分担者

()
研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()
研究者番号 :