

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792033

研究課題名(和文) 新しいヒルシュスプルング病モデルマウスを用いた基礎研究：神経堤細胞移植を目指して

研究課題名(英文) Searching for new treatment of Hirschsprung disease by using newly developed mice model

研究代表者

田中 奈々 (Tanaka, Nana)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：50530656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胎仔の腸管から神経堤細胞を外科的に除去した条件下において、外来神経線維の増生の有無を観察し、ヒルシュスプルング病の無神経節領域腸管と同様に外来神経線維が増生することを明らかにした。この結果、ヒルシュスプルング病における外来神経増生が二次的現象であることを示した。また、本疾患の新たな治療法の確立を目指して、SOX10-Venus マウスを用いた腸管神経系の発達を促進する要素を見出す検討を行った。腸管組織に細胞外マトリックスであるラミニンを添加することで、無添加の腸管より有意に腸管神経系の発達が促進されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Disruption of vagal enteric neural crest cells(NCC) migration appears to induce sacral NCC activation in the anorectum, which could have implications for the etiology of the thick nerve fibers seen in Hirschsprung disease(HD) anorectum, which could in fact be a secondary phenomenon. To establish new treatment for HD, we examined the effect of laminin-1 in NCC migration using SOX10-Venus mice gut. Our results suggest that laminin promotes NCC migration in mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児外科学

キーワード：ヒルシュスプルング病 神経堤細胞 マウスモデル 蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

ヒルシュスプルング病(H病)は、小児外科領域における最も代表的な機能性腸閉塞疾患の一つであり、出生児 5000 人に1人の頻度で発生し、腸管運動障害を呈するニューロクリストパチー(神経堤症)の一つとして知られている。重篤な症例の場合、通常の根治術では排便状態や栄養管理上、予後が不良の場合が多く、時として移植手術が必要となる場合もある。このように、H病の内科的治療は現在まで不可能であり、外科的治療を施しても排便機能障害が残存する症例も多く、患者の身体へ負担の少ない新しい治療法の確立が望まれている。

我々はこれまでにH病の病態を腸管神経系の正常発生について病理組織学的手法を用いた病態解析を行ってきたが、近年、正常な腸管神経の発生機序をライブイメージで観察する事も可能な、神経堤由来の細胞が緑色蛍光タンパクで標識されたマウス(SOX10-VENUS)を用いた基礎研究を開始し、その胎子における神経堤細胞の発現および培養腸管における腸管神経系の発生過程を無染色でライブイメージ撮影することに成功した。そこでこのSox10-VENUSマウスを用いて既知のH病モデルマウス(エンドセリンBレセプター欠失マウス: EDNRB^{-/-})を交配し、H病における神経堤細胞の動態も観察しうる新たなH病モデルマウスを作製することで、腸管神経への治療効果が直接蛍光顕微鏡下で観察できると考え、近年注目されている神経堤幹細胞を用いた新たな治療法を目指した基礎研究を計画した。

2. 研究の目的

腸管神経系が直接観察可能な、新たなH病モデルマウスを作製し、H病腸管神経堤細胞の胎生期における発生過程の異常とその病因について検討するとともに、neurosphere移植実験を行う事によりレシピエントであ

るモデルマウス腸管への神経堤細胞の動態を生きたままライブイメージで観察し、将来のin vivoにおける神経堤幹細胞を用いた移植治療研究を目指す事を目的とした。

3. 研究の方法

Sox10-VENUSマウス胎子の神経堤細胞を含む腸管領域を外科的に切除し、H病腸管と同様な無神経節腸管を作製、その後の外来神経線維の動態を観察した。さらにSOX10-Venusマウスの腸管より蛍光タンパクVenus陽性細胞のみをcell sortingにより分離した細胞を用いて神経堤幹細胞塊の作製をこころみた。また、SOX10-VENUSマウス胎子の腸管を用いた組織培養をおこない、細胞外マトリックスであるラミニンを添加することで、無添加の腸管より有意に腸管神経系の発達が促進されるか否かを検討した。

(図1)

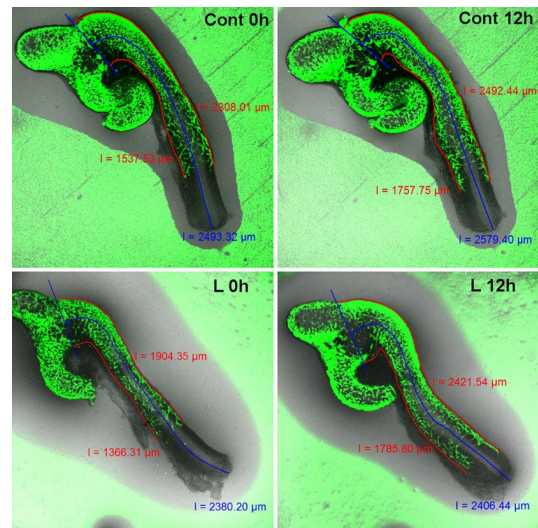


図1) ラミニン添加による腸管神経系への作用を比較した。培養開始より12時間後の神経支配の進展を画像上で計測した。上段:無添加群 下段:ラミニン添加群

4. 研究成果

マウス胎仔の腸管から神経堤細胞を外科的に除去した条件下において、外来神経線維の増生の有無を観察し、ヒルシュスプルング病の無神経節領域腸管と同様に外来神経線維が増生することを明らかにした。(図2) この結果、H病における外来神経増生は、神経系発生過程の異常で見られる二次的現象であることを示した。さらに今後の検討において、この外来線維増生の機序を探索するための有用な方法を確立することができたといえる。

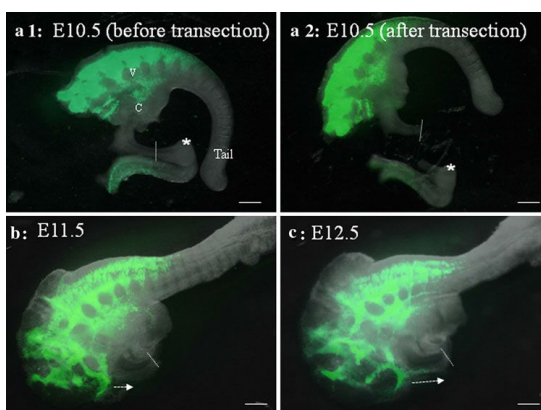


図2)

腸管の神経支配領域を切除し2日間培養した。非切除群と比較し外来神経の増生(矢印)が観察された。

また、本疾患の新たな治療法の確立を目指して、SOX10-Venus マウスの腸管より蛍光タンパク Venus 陽性の細胞のみを cell sorting により分離し、神経堤幹細胞塊を作製し腸管とともに培養することでその神経堤細胞が腸管内に侵入し定着するか、またその機序を解析することを当初計画していたが、他の研究施設からの報告により同様の研究の進捗が進んでいるため、まずはSOX10-Venus マウスの腸管を用いた腸管神経系の発達を促進する要素を見出す検討を行った。腸管組織に細胞外マトリックスであるラミニンを添加することで、無添加の腸管より有意に腸管神経系の発達が促進されることを明らかにし

た。ここまでの成果は正常な腸管での知見であるため、現在H病モデルマウス腸管を用いた検討を開始している。

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 2件)

1. Laminin-1 promotes enteric nervous system development in mouse embryo. Nakazawa N, Miyahara K, Okawada M, Yamataka A, Suzuki R, Akazawa C, Tomikawa-Ichikawa N, Arikawa-Hirasawa E: *Pediatr Surg Int.* 2013 Nov;29(11):1205-8.
2. Anorectal neural crest derived cell behavior after the migration of vagal neural crest derived cells is surgically disrupted: implications for the etiology of Hirschsprung's disease. Miyahara K, Kato Y, Suzuki R, Akazawa C, Tanaka N, Koga H, Doi T, Lane GJ, Yamataka A: *Pediatr Surg Int.* 2013 Jan;29(1):9-12

[学会発表](計 3件)

1. Anorectal neural crest derived cell behavior after the migration of vagal neural crest derived cells is surgically disrupted: Implications for the etiology of Hirschsprung's disease: N Nakazawa, K Miyahara, R Suzuki, Y Kato, GJ Lane, C Akazawa, H Koga, T Doi, A Yamataka: 25th International symposium on paediatric surgical research, London, UK, 21-22 September, 2012
2. Laminin-1 promotes neuronal

development in mouse embryonic gut.

N Nakazawa, K Miyahara, M Okawada, Y Liu, C Akazawa, A Yamataka, E Arikawa-Hirasawa: 25th International symposium on paediatric surgical research, London, UK, 21-22 September, 2012

3. Laminin-1 promotes neuronal development in mouse embryonic gut. N Nakazawa, K Miyahara, M Okawada, R Suzuki, M Urao, C Akazawa, A Yamataka, E Arikawa-Hirasawa: 第 50 回日本小児外科学会 2013 年 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

1. Aesculap Prize (Second Prize) at the 25th International Symposium of Paediatric Surgical Research, London, UK, 2012

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中奈々 (NANA TANAKA)

順天堂大学 医学部 助教

研究者番号 : 50530656

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし