

平成 26 年 4 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650325

研究課題名(和文) 生きたままの腸管神経を覗く

研究課題名(英文) Looking into living enteric neurons

研究代表者

高木 都 (Takaki, Miyako)

奈良県立医科大学・医学部・その他

研究者番号：00033358

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)：本研究では、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、2光子励起顕微鏡(2PM)による正常な腸壁内神経のin vivo(生体内)イメージングにまず成功した。

ついで、この2PMを用いてin vivoイメージングを同様に行い、腸管切離吻合モデルマウスにおける吻合部の損傷腸壁内神経の再生・新生過程を明らかにした。さらに、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)を特定し、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であろうことを明らかにした。

これまでリハビリテーション分野ではほとんど着手されていない、画期的な研究である。

研究成果の概要(英文)：In the present study, using transgenic mice (TG) expressing GFP in neurons we succeeded in in vivo imaging of enteric neurons with 2 photon microscopy (2PM).

Then, the process of neurogenesis of injured enteric nervous system in TG mouse transected and re-anastomosed gut was revealed by in vivo imaging with 2PM. We determined that a 5-HT4 receptor agonist facilitated to generate newborn enteric neurons at the anastomosis mediated via 5-HT4 receptor from neural stem cells. The neurogenesis of enteric neurons would give an improvement of dysfunction of gut function and defecation function.

This study is revolutionary and unexplored in medical field of rehabilitation.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：リハビリテーション医学 5-HT4 受容体 腸壁内神経 神経細胞 再生 新生 吻合部 トランスジェニックマウス

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 各種大腸肛門疾患、術後障害、先天異常などに加え、近年は加齢やパーキンソン病による排便機能障害者も急増しており、それによる生活の質 (Quality of Life: QOL) の低下や診療需要の増加は計り知れない。排泄行為は、生物学的な行為であると同時に自律性を伴う社会的な行為でもあることから、その障害による身体的、心理的負担は容易に想像できる。しかし、その行為の特徴やイメージ等から、排泄行為について追究することがこれまででは軽視され、先行研究の集積や体系化はいまだ不十分である。

(2) 一方、申請者は、数年に亘って、直腸切離吻合モデルにて 5-HT<sub>4</sub> 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; Neurogastroenterol. Motil. 22: 806-814, 2010)。

(3) 本研究は消化管機能障害や排便機能障害に悩む多くの患者の失われた腸壁内神経細胞を取り戻し、その機能回復を早期に可能にし、患者本人はもちろん介護者の身体的・精神的負担を軽減・消滅させ共に QOL の改善をもたらすことができる非常に意義ある研究である。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、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。

(2) 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) 過程を明らかにし、最終的には神経活動に応じて神経が光るトランスジェニックマウスを用いた 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-HT<sub>4</sub> 受容体刺激薬等) を特定し、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) 本研究は、腸壁内神経障害によって起こる消化管機能・排便機能障害を根本的に治療する方法を開発する基礎研究で、これまでリハビリテーション分野ではほとんど着手されていない、画期的な研究である。

### 3. 研究の方法

(1) 自然科学研究機構生理学研究所 鍋倉研究室の協力を得て、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 TG マウスを使って、腸管切離吻合モデルやパーキンソン病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と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と予測される。まずは奈良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教室より H-line マウスの供与を受け、切離吻合モデルマウス腸管の 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。(老齢 H-line マウスが入手できれば腸壁内神経系の加齢変化を、パーキンソン病モデルマウスが作成できれば腸壁内神経系損傷像を in vivo イメージングでとらえる。)

(4) 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 TG マウスの提供を受けて、in vivo Ca<sup>2+</sup> イメージングでの生理実験法を確立する。

910nm の波長で吻合部より肛門側で遺伝子組換え型蛍光カルシウムプローブ (Genetically encoding calcium indicators; ECIs) の反応を測定する。腸管の切離吻合術後再生した神経軸索や、新生した神経細胞を探索後、ラインスキャンを行う。

吻合部をチャンバーに確実に固定した後に、吻合部より口側の腸管内に挿入したバルーンを側光部位に影響を及ぼさないように水を注入して伸展するか、粘膜の電気刺激を行う。さらに、神経節刺激薬を尾静脈より注射する。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。

(5) 最後に、この TG マウスの腸管切離吻合モデル、パーキンソン病、老齢モデルに低分子候補化合物の局所投与や飲水投与による腸壁内神経系の再生・新生作用を検討し、創薬へと展開する。

### 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<sup>2+</sup> 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、Thy-1 をプロモーターにして GFP を神経に発現させた H-line マウスの供与を受けて、腸壁内神経の in vivo イメージング観察を試みた。

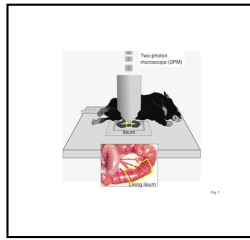


図1 腸壁内神経の in vivo イメージング観察のためのセッティング

正常 H-line マウスの腸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2)

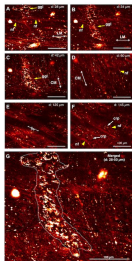


図2 小腸の正常アウエルバッハ神経節の in vivo イメージング像

(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。麻酔下にて皮切後、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 マウスの供与を受け、切離吻合モデルマウスを作成し、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-HT<sub>4</sub> 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3)

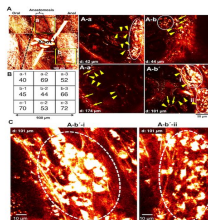


図3 吻合部新生神経節様の構造物

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したチャンバーに固定する(図1)

GFP 蛍光を発すれば、漿膜表面から 100 μm の深さまでこの顕微鏡で可視化できることが明らかとなったので、まず切離吻合モデルの腸壁内神経系でも同様に適応されるかどうかを明らかにすることにした。

これらの新生神経細胞群は吻合部に偏りなくみられ、表面からの深さは MOS 投与1週目では浅く(100 μm)、2週目では深い所にもみられた。

MOS のこのような効果は 5-HT<sub>4</sub> 受容体遮断薬の同時投与により完全に消失したので、5-HT<sub>4</sub> 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で観察された神経細胞群が新生された物である事を確認できた(図4)

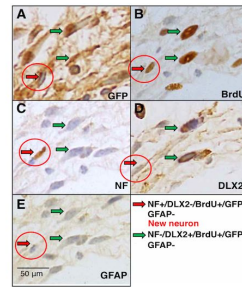


図4 吻合部の BrdU 陽性神経細胞

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。

(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<sup>2+</sup> イメージング

まず埼玉大学埼玉大学中井教授が作成した中枢神経系で神経の光る GCaMP TG マウスを使って2PMあるいは共焦点顕微鏡でいきたまま 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 が図5に示すように、アウエルバッハ神経細胞は緑色の蛍光を示し、マイスナー神経細胞は赤色の蛍光を示す事が認められた。

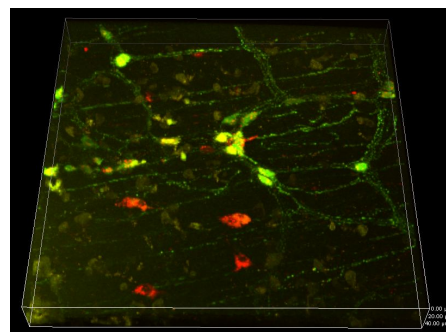


図5 腸壁内神経細胞の in vivo イメージング

図5は三次元表示をしている。この結果は、マイスナー神経細胞の非刺激時の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> 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

A は GFP 陽性細胞、B は BrdU 陽性細胞、C は neuro-filament (NF) 陽性細胞、D は神経幹細胞マーカー (DLX2) 陽性細胞で、新生神経細胞は GFP+、BrdU+、NF+、DLX2-であった。

伸展しても、神経節刺激薬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ため、今後は除脳モデル等で検討する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6件)

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.

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-HT<sub>4</sub> 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. doi: 10.1152/ajpgi.00284.2011.

Takaki M, Goto K, Kawahara I. [Review] 5-HT<sub>4</sub> 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.

〔学会発表〕(計 9件)

Takaki M, Kuniyasu H, Kawahara I, Goto K, Matsuyoshi H. In vivo neural regeneration and neurogenesis promoted by 5-HT<sub>4</sub> receptor activation. *Neuro-*

*gastroenterology 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-HT<sub>4</sub> 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. *Physiol Sci* 64 (Suppl. 1): S195, 2014.

第 91 回日本生理学会大会 2014 年 3 月 18 日 鹿児島.

〔図書〕(計 1 件)

高木 都:「ギャノン生理学」原書 24 版, Kim E. Barrett, Susan M. Barman, Scott Boitano, Heddwyn L. Brooks 著, 岡田泰伸 監訳, (分担) 第 IV 編 消化器生理学 概論 pp.521, Chap. 27. 消化管運動 pp.569-581, B5 判 総頁 860 頁, 2014 年 1 月 29 日 丸善株式会社

〔産業財産権〕

取得状況(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 21 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.

## 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) 連携研究者

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

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