

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460942

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)Role of enteric neurons in regulation of intestinal inflammation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腸管神経が過剰に存在しDSS誘導腸炎モデルにおいて高い感受性を示すNcx-KOマウスを用いて、腸管神経による腸内細菌の恒常性に対する影響および、腸炎との関わりについて明らかにした。NCX-KOマウス腸内細菌叢は、培養法およびPCR法により、好気性菌および腸内細菌科の菌が増加しており悪化していた。またNcx-KOマウスにおいては、病原性が高いNO還元酵素norVをもつ細菌が有意に増加していた。さらに、Ncx-KOマウスの糞便を野生型マウスに移植したところ、DSS誘導腸炎モデル悪化した。以上の解析から、腸管神経が腸内細菌叢の制御に重要な役割を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ncx-deficient (KO) mice exhibited increased number of enteric neuron (EN) and hyper sensitive to DSS induced colitis model. In this study, we characterized the fecal microbiota to examine whether increased number of EN affects enteric flora. CFUs of aerobic bacteria increased in the KO mice compared to those of wild type mice. Meta-genome analysis revealed that the family Enterobacteriaceae were significantly higher in the KO mice compared with the wild type mice. Since bacterial NO reductase gene V (NorV) which detoxify NO, determine a virulence of bacteria, more NorV+ bacteria were detected from the feces of the KO mice compared to that of wild type mice. To elucidate whether the dysbiosis affect the severity of the DSS-induced colitis, fecal transfer experiments were carried out. Mice transferred with feces of the KO mice developed more severe colitis than wild type transferred one. Our study implies that EN participates in regulation of intestinal microbiota.

研究分野：分子生物学 発生工学

キーワード：腸管神経 腸炎 腸内細菌叢 腸内細菌科

1. 研究開始当初の背景

我が国において、クローン病や潰瘍性大腸炎などの難治性炎症性腸疾患の患者数は年々増加傾向にあり、厚生労働省の特定疾患に指定されている。その病因については、腸管バリアの異常と細菌感染、自然免疫因子 NOD2 の機能欠損、腸内細菌異常などが原因であるといわれているが未だ不明である。一方で、腸管神経異常を示す遺伝子組み換えマウスでは、実験的腸炎モデルにおいて異常を示すという報告があり、腸管神経と腸炎症との関わりが示唆されている。

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 *Ncx* は、申請者の所属グループで単離された。*Ncx*-KO マウスでは、成長時におけるアポトーシス異常により腸管神経細胞数が増加し、胃から直腸まで腸管全領域で神経数が野生型と比較して約 1.5 倍増加し、腸管運動機能異常を認めている。

これまで、*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。一方で抗生物質投与により感受性が低下した。このことから、腸内フローラの異常が考えられた。本研究では、腸炎と腸内フローラの異常について、腸管神経の関与に着目して解析を進めた。

2. 研究の目的

腸管において、腸炎と腸内フローラの異常は密接に関連しており、相互作用によって両者が悪化するといわれている。本研究では、腸管神経が過剰に存在する *Ncx*-KO マウスを用いて、腸管神経による腸内細菌の恒常性に対する影響および、腸炎との関わりについて明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 腸内フローラについて、マウス糞便を用いて、嫌気条件下による GAM 培地培養および好気条件下による MacConkey 培地培養を行い、コロニーの計測を行った。

(2) マウス糞便 DNA の抽出を行い、菌属菌群特異的プライマーを用いた 16srRNA-Real Time PCR 法による腸内細菌叢の定量解析、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を行った。

(3) *Ncx*-KO マウスまたは野生型マウスの糞便を、抗生物質処理した野生型マウスに経口による移植を行い、DSS 誘導腸炎モデルを作製した。

4. 研究成果

(1) マウス糞便について、GAM 培地を用いて嫌気条件下で発育した善玉菌ともよばれる細菌数は、野生型と *Ncx*-KO マウスでは差を認めなかった。一方で、MacConkey 培地を用いて好気

条件下で発育したいわゆる悪玉菌とよばれる細菌数は、*Ncx*-KO マウスでは、野生型と比較して、10-1000 倍増加した。

(2) マウス糞便 DNA の抽出を行い、菌属菌群特異的プライマーを用いた 16srRNA-Real Time PCR 法による腸内細菌叢の定量解析を行ったところ、*Ncx*-KO マウスの糞便では野生型マウスと比較して、腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*) の菌が 10-1000 倍増加した。さらに次世代シーケンサーを用いた網羅的メタゲノム解析から、*Ncx*-KO マウスの糞便では野生型マウスと比較して、科 (family) レベルにおいて、*Bacteroidaceae*、*Flammeovirgaceae*、*Turicibacteraceae*、*Clostridiaceae*、*Peptostreptococcaceae*、*Enterobacteriaceae* の増加、*Flavobacteriaceae*、*Carboxydocellaceae*、*Peptococcaceae*、*Rhodospirillaceae* の低下を認めた。

以上から、*Ncx*-KO マウスの腸管では腸内フローラの異常が起きていると示唆された。一方で、*Ncx*-KO マウスの大腸組織では、神経系由来 NO 合成酵素 (nNOS) の発現が亢進していることから、NO の腸内細菌叢への影響が考えられた。NO 還元酵素 *norV* をもつ細菌は、脱窒反応を行い、ATP を合成し、嫌気条件において生育する。マクロファージは病原細菌を貪食すると、殺菌のために NO を産生するが、*norV* を持つ大腸菌は、マクロファージ由来 NO による増殖抑制を受けないことが報告されている。そこで、糞便 DNA を用いて、*norV* 遺伝子について解析し、*Ncx*-KO マウスでは多くの個体が高い *norV* 遺伝子の含有を示した。以上の結果から、*Ncx*-KO マウスの腸管では、過剰な NO の環境下の結果、*norV* 遺伝子を持った腸内細菌科の菌が増加していると考えた。

(3) *Ncx*-KO マウスまたは野生型マウスの糞便を、抗生物質処理した野生型マウスに経口による移植を行い、DSS 誘導腸炎モデルを作製したところ、*Ncx*-KO マウスの糞便を移植した野生型マウスは、野生型マウスの糞便を移植した野生型マウスと比較して、非常に高い感受性を示した。さらに DSS 誘導腸炎モデル作製 14 日後における大腸組織の HE 染色像では、*Ncx*-KO マウスの糞便を移植した野生型マウスにおいて激しい炎症像を認めた。

以上の結果から、腸管神経過剰である *Ncx*-KO マウスを用いた解析から、腸管神経が腸内フローラの制御に重要な役割を持つことが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

(1) Transcriptional repression of p27 is essential for murine embryonic development. Teratake Y, Kuga C,

Hasagawa Y, Sato Y, Kitahashi M, Fujimura L, Watanabe-Takano H, Sakamoto A, Arima M, Tokuhisa T, Hatano M. Scientific Reports. 2016. 査読あり online at www.nature.com/articles/srep26244.

(2) Screening of Transient Receptor Potential Canonical Channel Activators Identifies Novel Neurotrophic Piperazine Compounds. Sawamura S, Hatano M, Takada Y, Hino K, Kawamura T, Tanikawa J, Nakagawa H, Hase H, Nakao A, Hirano M, Rotrattanadumrong R, Kiyonaka S, Mori MX, Nishida M, Hu Y, Inoue R, Nagata R, Mori Y. Mol Pharmacol. 2016;89(3):348-63. doi: 10.1124/mol.115.102863. 査読あり

(3) Bidirectional role of IL-6 signal in pathogenesis of lung fibrosis. Kobayashi T, Tanaka K, Fujita T, Umezawa H, Amano H, Yoshioka K, Naito Y, Hatano M, Kimura S, Tatsumi K, Kasuya Y. Respir Res. 2015; 20;16:99. doi: 10.1186/s12931-015-0261-z. 査読あり

(4) Nepro is localized in the nucleolus and essential for preimplantation development in mice. Hashimoto M, Sato T, Muroyama Y, Fujimura L, Hatano M, Saito T. Dev Growth Differ. 2015;57(7):529-38. doi: 10.1111/dgd.12232. 査読あり

(5) DA-Raf-Mediated Suppression of the Ras-ERK Pathway Is Essential for TGF- β 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Type 2 Cells. Watanabe-Takano H, Takano K, Hatano M, Tokuhisa T, Endo T. PLoS One. 2015; 21;10(5):e0127888. doi: 10.1371/journal.pone.0127888. eCollection 2015. 査読あり

(6) Haploinsufficiency of the c-myc transcriptional repressor FIR, as a dominant negative-alternative splicing model, promoted p53-dependent T-cell acute lymphoblastic leukemia progression by activating Notch1. Matsushita K, Kitamura K, Rahmutulla B, Tanaka N, Ishige T, Satoh M, Hoshino T, Miyagi S, Mori T, Itoga S, Shimada H, Tomonaga T, Kito M, Nakajima-Takagi Y, Kubo S, Nakaseko C, Hatano M, Miki T, Matsuo M, Fukuyo M, Kaneda A, Iwama A, Nomura F. Oncotarget. 2015;10;6(7):5102-17. 査読あり

(7) DA-Raf-dependent inhibition of the Ras-ERK signaling pathway in type 2 alveolar epithelial cells controls alveolar formation. Watanabe-Takano H, Takano K, Sakamoto A, Matsumoto K, Tokuhisa T, Endo T, Hatano M. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; 3;111(22):E2291-300. doi: 10.1073/pnas.1321574111. 査読あり

(8) Tumor-suppressive microRNA-29a inhibits cancer cell migration and

invasion via targeting HSP47 in cervical squamous cell carcinoma. Yamamoto N, Kinoshita T, Nohata N, Yoshino H, Itesako T, Fujimura L, Mitsuhashi A, Usui H, Enokida H, Nakagawa M, Shozu M, Seki N. Int J Oncol. 2013;43(6):1855-63. doi: 10.3892/ijo.2013.2145. 査読あり

(9) Kinetics and protective role of autophagy in a mouse cecal ligation and puncture-induced sepsis. Takahashi W, Watanabe E, Fujimura L, Watanabe-Takano H, Yoshidome H, Swanson PE, Tokuhisa T, Oda S, Hatano M. Crit Care. 2013; 24;17(4):R160. doi: 10.1186/cc12839. 査読あり

(10) Integration of the mouse sperm fertilization-related protein equatorin into the acrosome during spermatogenesis as revealed by super-resolution and immunoelectron microscopy. Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Fujimura L, Hatano M, Miyado K, Toshimori K. Cell Tissue Res. 2013;352(3):739-50. doi: 10.1007/s00441-013-1605-y. 査読あり

〔学会発表〕(計4件)

(1) Fujimura L, Sakamoto A, Arima M, Tokuhisa T, Hatano M. Role of enteric neurons in regulation of intestinal homeostasis. 第44回日本免疫学会、2015年11月18日~20日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

(2) 藤村理紗、小原由紀子、大崎敬子、神谷茂、幡野雅彦、腸管恒常性維持における腸管神経の役割について、第19回腸内細菌学会、2015年6月18日~19日、北里大学コンベンションホール(東京都・港区)

(3) Fujimura L, Ohara Y, Sakamoto A, Arima M, Tokuhisa T, Hatano M. Role of enteric neurons in regulation of intestinal epithelial homeostasis. 第43回日本免疫学会、2014年12月10日~12日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

(4) Fujimura L, Ohara Y, Sakamoto A, Arima M, Tokuhisa T, Hatano M. Possible role of enteric neurons in regulation of intestinal microbiota. 第42回日本免疫学会、2013年12月11日~13日、幕張メッセ(千葉県・千葉市)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/biomedical/>

6. 研究組織

(1) 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

(2)研究分担者

幡野 雅彦 (HATANO Masahiko)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：20208523