

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462715

研究課題名(和文)二分脊椎症における排便・排尿障害の病態解明と新規予防・治療法を目指した基礎研究

研究課題名(英文)Elucidation of the pathogenesis of dyfecation/dysuria and development of novel treatment for spina bifida using animal model.

研究代表者

山高 篤行(YAMATAKA, ATSUYUKI)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：40200703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：二分脊椎症モデルマウスを用いた組織学的検討により腸管神経系の分布異常を見出し、その腸管ではグリア細胞由来神経栄養因子GDNFの発現の変化を観察し得た。また腸管神経系の修復に関連する因子を見出すための腸管虚血再灌流実験では、再灌流後の腸管グリア細胞の増減と反発性軸索ガイダンス分子セマフォリン3Aの関連が示唆される結果を得た。

研究成果の概要(英文)：This study demonstrated that the abnormality of distribution of enteric nerve system (ENS) and the expression change of GDNF was observed in the intestine of the mouse model of spina bifida. In addition, in the intestinal ischemic reperfusion experiment to detect the related factors to the restoration of ENS, we obtained the correlation between semaphorin 3A and intestinal glial cells after reperfusion.

研究分野：小児外科学

キーワード：二分脊椎症 鎖肛 腸管神経系 セマフォリン3A

1. 研究開始当初の背景

二分脊椎症は二分頭蓋や無脳症などと共に神経管閉鎖不全に分類される疾患であり、我が国においては出生 1000 人に 0.3 ~ 0.4 人とされている。神経管閉鎖不全は、神経管(初期発生で見られる神経板が管状になったもの。脳や脊髄などの中枢神経系に分化する。)の形成が発生第3週から4週にかけて、神経板が神経管に変形する過程で管状にならずに閉鎖不全が起こる事で生じる。予防法の一つとして、妊娠初期での葉酸の摂取で、70%程度発症のリスクを低減できる事がわかっており、今年の主要な論文においても、神経管閉鎖におけるミトコンドリアでの葉酸代謝の重要性を裏付ける報告がされた。(*Human Molecular Genetics*, 2012, Vol.21, No.7 1496-1503) その発生の原因としては他の先天性障害同様に、環境因子の影響によるもの(妊娠初期の葉酸、ビタミン B12、亜鉛の摂取不足や肥満、糖尿や高熱)と遺伝的要因によるものが報告されている。遺伝的要因では、マウスにおいて 200 以上の遺伝子が神経管閉鎖症の候補遺伝子として同定されており、人間では主に葉酸代謝経路に関わるホモシステイン再メチル化遺伝子 MTHFR が神経管閉鎖を1.8倍程度多く引き起こす事が知られているが、人種に偏りがあるなど未だ不明な点も多い。(*J Pathol* 2010;220:217-230、 *Human Molecular Genetics*;2009:18, R113-R129) 二分脊椎症には開放性と潜在性があり、開放性二分脊椎症の患児においては両下肢の運動と知覚障害と共に膀胱直腸の機能障害が見られる。膀胱の機能障害、すなわち神経因性膀胱は二分脊椎症の場合、末梢神経の障害により膀胱括約筋が収縮せず排尿困難から尿閉になることが多く、また排尿困難により残尿が増加し、溢流性の尿失禁となる。治療は膀胱平滑筋の筋弛緩・

収縮性を高めるために抗コリン剤服用による内科的治療、膀胱拡大術、尿が腎臓への逆流を防ぐ逆流防止のための逆流防止術などが施行され、腎機能の保護を目的とした治療をおこなう。同様に直腸機能障害では、内・外肛門括約筋ともに正常と変わらずに存在し、腸管壁内に神経節細胞も存在し、内肛門括約筋の不随意的な反射(直腸肛門反射)も認めるが、外肛門括約筋ならびに肛門挙筋をコントロールしている末梢神経が障害されているため、排便機能障害を呈すると考えられている。上記のように、二分脊椎を持つ患者の多くは便秘や便失禁といった排便障害、神経因性膀胱による排尿障害に悩まされており、自己の身の日常生活活動が極度に制限される。これら排尿・排便機能障害は根治が難しく、患者の生活の質を向上させるために、詳細な発症メカニズムを解明し障害に対する理解を深めることが重要であると考えられている。

これまで我々は神経堤細胞の遊走・分化に関連する遺伝子である Sox10 に緑色蛍光タンパクの一つである VENUS を標識し、神経堤由来の細胞を生きたままの状態を観察できるトランスジェニックマウス (Sox10-VENUS) を用いて小児外科領域における最も代表的な機能性腸閉塞疾患であり、腸管運動障害を呈するヒルシュスプルング病の基礎研究を行ってきた。(Miyahara K et al. *J Pediatr Surg*. 2010, 2011 *Pediatr Surg Int*. 2012.) これらの研究の経験を通し、Sox10-VENUS マウスでは仙骨神経(骨盤神経)の発生過程および腸管や膀胱を支配する神経分布が明瞭に認識できる事がわかった。そこで Sox10-VENUS マウスで二分脊椎症を発症するモデルマウスを作製し、排便・排尿機能障害の発生メカニズムについて新たな知見を見出すことで、新たな予防・治療法を開発するための基礎研究へつなげることができる、と考えた。

2. 研究の目的

これまでの二分脊椎症における膀胱直腸の機能障害は末梢神経障害により引き起こされていることが知られているが、近年における発症機序・新しい治療に関して検討された報告は極めて少ない。本研究では、神経堤由来細胞マーカーである Sox10 遺伝子の動態を直接観察できる二分脊椎症モデルマウスを用いて胎生期における経時的な解析を行い、発生機序を明らかにする。また、本疾患の排便機能障害は骨盤神経の障害などによる外因性的原因だけではなく、腸管神経系の形成自体にも障害がある内因性的原因・機序が影響しているか否にも着目し、本モデルマウスにおける腸管神経系の発生に関わる分子の発現変化を検討するとともに、腸管神経系の修復に関連する因子を見出すための腸管虚血再灌流モデルを用いた腸管神経系の修復に関連する分子を探索するための実験を行い、新規診断・治療法開発を検討する為の基礎研究につなげることを目指した。

3. 研究の方法

・二分脊椎症発生機序の解析

- 1) Sox10-VENUS マウスを交配し、全トランス型レチノイン酸を 100 mg/kgの濃度で妊娠母マウスの胃に直接投与し二分脊椎症モデルマウスを作製する。取り出した胎仔における膀胱・直腸に関わる神経と筋の発現変化を Protein Gene Product9.5 (PGP9.5) 抗体と抗 Actin 抗体を用いた免疫組織染色を施行し観察した。
- 2) モデルマウスの腸管神経系における発生過程で、腸管神経系細胞の発生を制御する重要な因子のひとつであるグリア細胞由来神経栄養因子 GDNF とその受容体である RET の発現を免疫染色で観察した。

・腸管神経系の修復に関連する因子の探索

- 1) 腸管の虚血再灌流障害モデルを用いてセマフォリン3A に焦点を絞り、その発現変化

を免疫組織染色で検討した。Sox10-Venus マウスの回腸を使用し、3 時間の虚血を生じさせた。再灌流後 0, 3, 12, 24, 48, 96 時間のタイミングでそれぞれのマウスから検体を採取し免疫染色を施行した。セマフォリン 3A に関しては画像解析ソフト Image J で輝度と染色部位の面積を評価し発現量を比較した。また神経細胞に関しては PGP9.5 で染色し、神経細胞数の変化を評価した。グリア細胞、神経節に関しては Sox10 の発現を蛍光顕微鏡で評価した。

4. 研究成果

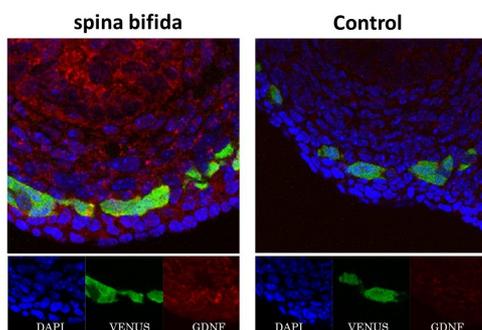
1) 二分脊椎症モデルの形態と病理組織の変化

胎仔は胎生 16.5 日と 19.5 日齢で解析を行った。全てのモデル群の胎仔は尻尾の形成が不全で肛門が欠損していることが確認された。組織切片で形態を観察したところ、直腸盲端部が膀胱の横に位置している高位鎖肛を伴うモデルであることが確認された。免疫組織染色においてモデル群の腸管では PGP9.5 陽性神経細胞が直腸盲端部で減少していた。また、外来神経線維の増成も認められた。actin 陽性細胞はコントロール群において膀胱、内肛門括約筋と外肛門括約筋の周囲に認められた。モデル群においては膀胱周囲にのみ確認され肛門において肛門周囲では認められなかった。この結果より、二分脊椎症を伴う鎖肛モデルの腸管盲端部において腸管神経系の分布が正常発生と異なっていることを明らかにすることができた。臨床における患者においても同様の変化が認められるか明らかにすることが今後の重要な検討課題である。

2) 二分脊椎症モデル腸管での GDNF とその受容体である RET の発現

胎生 15 日齢のモデル胎仔の腸管を摘出

し正常コントロールとともに免疫組織染色での発現を比較した。GDNF の受容体である RET の発現に変化は認められなかったが、GDNF に関して発現に差が見られる個体が認められた。(図 1)この発現に変化があることが本疾患の排便機能障害に影響を与える腸管神経系の発生不良の原因を示しているのか、さらに踏み込んだ検討(遺伝子改変によるモデルマウスによる検討など)が必要であるが、Ret-GDNF は腸管神経系の発生に重要で必須なシグナル経路であることから、今後本疾患モデルを用いた腸管神経系発生異常の検討のために有用な結果であると考察している。



(図 1)
二分脊椎症モデルマウス(spina bifida)と正常発生コントロールマウス(control)における神経堤細胞(緑)と GDNF (赤)の発現。コントロールに比べ、モデルマウスに GDNF が強く発現している。

3) 腸管神経系の修復に関連する因子探

- ・セマフォリン 3A は、再灌流後 3,12 時間の群において著明な上昇が認められた。その後は徐々に発現の低下を認め徐々に発現の低下を認め 96 時間の時点では、コントロールと同程度まで低下を認めた。
- ・Sox10 に関しては、0, 3, 12 時間の群において発現の低下が認められた。(p<0.05)。また 24 時間以降の群においては徐々に Sox10 の発現の回復を認め、96 時間の群においてもその過程は顕著に観察された。
- ・一方で PGP9.5 に関しては細胞数の低下傾向を認めるも、有意な差は認められなかった。

セマフォリン 3A と Sox10 はいずれも再灌流障害後、早期に反応が認められ、特に Sox10 の方が早期の段階で変化が認められ腸管虚血再灌流障害との関連性が示唆された。今後両者が虚血障害のマーカーとして有用であるか検討する予定である。

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 4 件)

1. Yamataka A, Koga H, Ochi T, Imashimizu K, Suzuki K, Kuwatsuru R, Lane G, Nishimura K, Inada E, Suzuki K. Pulmonary lobectomy techniques in infants and children. *Pediatr Surg Int.* (査読有) 2017 Apr;33(4):483-495. doi:10.1007/s00383-016-4052-5.
2. Takeda M, Miyahara K, Okawada M, Akazawa C, Lane GJ, Yamataka A. Semaphorin 3A expression following intestinal ischemia/reperfusion injury in Sox10-Venus mice. *Pediatr Surg Int.* (査読有) 2017 Mar;33(3):383-388. doi: 10.1007/s00383-016-4039-2.
3. Fujiwara N, Miyahara K, Nakazawa-Tanaka N, Akazawa C, Yamataka A. Altered differentiation of enteric neural crest-derived cells from endothelin receptor-B null mouse model of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int.* (査読有) 2016 Dec;32(12):1095-1101.
4. Nakazawa-Tanaka N, Miyahara K, Fujiwara N, Urao M, Akazawa C, Yamataka A. Three- and four-dimensional analysis of altered behavior of enteric neural crest derived cells in the Hirschsprung's disease mouse model. *Pediatr Surg Int.* (査読有) 2016 Jan;32(1):3-7. doi:

10.1007/s00383-015-3806-9.

[学会発表] (計 3 件)

1. Takeda M, Miyahara K, Okawada M, Akazawa C, Lane GJ, Yamatata A. Semaphorin 3A expression following intestinal ischemia/reperfusion injury in Sox10-Venus mice. The 29th International Symposium on Paediatric Surgical Research, Goethe university (Frankfurt, Germany), September 8-10, 2016
2. 宮原 克, 鈴木 亮太, 村上 寛, 土井 崇, 赤澤 智宏, 山高 篤行 神経堤細胞イメージングマウスを用いたレチノイン酸誘導直腸肛門奇形マウスの病態解析 第 51 回日本小児外科学会、大阪国際会議場(大阪府大阪市)、2014 年 5 月 10 日
3. 宮原 克, 鈴木亮太, 村上寛, 土井崇, 赤澤智宏, 山高篤行 神経堤細胞イメージングマウスを用いたレチノイン酸誘導直腸肛門奇形マウスの病態解析 第 44 回日本小児消化管機能研究会、大阪大学(大阪府大阪市)、2014 年 2 月 15 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山高 篤行(Yamatata, Atsuyuki)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号:40200703

(2)研究分担者

宮原 克(Miyahara, Katsumi)
順天堂大学・医学研究科・研究技師
研究者番号: 00420844

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()