

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 1 日現在

機関番号：32620
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2014～2016
 課題番号：26861488
 研究課題名(和文)細胞外マトリックスを用いた、ヒルシュスプルング病に対する内科的治療法への挑戦

 研究課題名(英文) Potential of extracellular matrix for non-operative treatment for Hirschsprung disease

 研究代表者
 田中 奈々 (TANAKA, Nana)

 順天堂大学・医学部・准教授

 研究者番号：50530656
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：腸管神経堤由来細胞(以下ENCC)が可視化されたトランスジェニックマウスとエンドセリンBレセプター欠損マウスを交配し、新しいヒルシュスプルング病(H病)モデルマウスを作製し、H病モデルの胎仔腸管におけるENCC先進部でのラミニンの発現がコントロールと比べ変化していることを示した。また、ENCCのmigrationをライブイメージング法にて観察し、3D/4D画像解析ソフトを行い、H病マウスにおけるENCC先進部において、個々のENCCの移動速度はコントロールに比べ低下するものの、方向性に差はみとめられないことを示した。さらに、細胞培養を施行し細胞レベルでのH病マウスのENCCの動態研究を行った。

研究成果の概要(英文)：We have recently created a Venus-positive, Sox10 Tg mouse with a deletion of the endothelin-B receptor (Ednrb) gene, Sox10-Venus+/Ednrb-/- mouse, to investigate the behavior of enteric neural crest derived cells (ENCC) in HD. Firstly, we examined laminin-1 expression in the fetal gut at each developmental stage of ENCC migration. The results showed that spatiotemporal regulation of laminin-1 is required for normal ENCC migration. However, the expression of laminin-1 is altered in HD mice. Moreover, we compared the ENCC behavior when the wavefront of ENCC reaches the mid-hindgut between HD mice and control. Dissected fetal hindguts were cultured and the time-lapse images were analyzed by using Imaris software. The results showed that the track speed of ENCC advancement was markedly decreased in the HD mice compared to controls. This technique has potential for further elucidating the altered behavior of ENCC in HD.

研究分野：小児外科

キーワード：ヒルシュスプルング病 腸管神経系 腸管神経堤細胞 ラミニン ライブイメージング 細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

Hirschsprung 病 (以下 H 病) は 5000 出生に 1 人の発生頻度で、肛門側腸管の壁内神経節細胞の先天的欠如により新生児期より腸閉塞症状きたす、最も代表的な小児外科疾患のひとつである。正常な腸管神経の発達には、神経堤細胞由来細胞 (以下 ENCC) が、正常に増殖・移動・分化することが不可欠であるが、H 病では胎生期に食道から肛門まで下降性に分布していく神経堤由来の細胞が途中で停止してしまうことにより、停止部以降の腸管が無神経節腸管となり、正常な蠕動運動が妨げられ、腸閉塞症状をきたすと考えられている。現在のところ、治療は外科手術のみとなるが、手術をしても、排便機能障害が残存する例は少なくない。また無神経節腸管が長域の重症例では、小腸移植が必要となったり、死に至ることもあり、新たな治療法の開発が望まれている。

近年、申請者らは、腸管の神経節細胞の遊走・分布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、腸管神経ネットワークを始めとする ENCC 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 Tg マウス) を作製した [1]。このマウスは病理組織学的操作 (免疫染色等) を施すことなく、ENCC の動きを観察することができる。さらに、SOX10-VENUS Tg マウスに、H 病のモデルマウスとして広く利用されている、エンドセリン B レセプター欠損マウスを交配させることにより、ENCC のみが蛍光発色する H 病モデルマウスを作製することに成功した [2]。

さて、H 病では ENCC の分化・増殖・移動に何らかの問題があるとされているが、ENCC そのものが原因か、それともそれを取り巻く環境因子によるものなのか、という問題は、未だ解決していない。しかし、近年、ENCC そのものではなく、腸管の細胞外マトリックスや細胞増殖因子といった、環境因子の変化が H 病の本質と示唆される報告がなされている [3]。細胞外マトリックスの主要分子であるラミニンは、神経の発達に深くかかわっており、H 病との関連が示唆されている。

2. 研究の目的

申請者は、近年、SOX10-VENUS Tg マウスの腸管培養を用いて腸管神経におけるラミニン - 1 の効果を検討した。これにより、ラミニン - 1 が、マウスの正常腸管において、口側から肛門側へ下降していく ENCC の発達を促進することを初めて明らかにした [4]。ここでひとつの疑問が生じる。では、胎生期に食道か

ら肛門まで下降性に分布していく腸管神経系が途中で停止することにより発症する H 病において、ラミニンは、その停止位置を伸長することができるのだろうか？すなわち、H 病が薬で治る日があるのだろうか？この疑問に答えるべく、今回の実験を計画した。

今回使用する SOX10-VENUS Tg マウスは、胎生期から成体まで生きたまま明るい蛍光シグナルで免疫染色などの病理組織学的手技を加えずに神経堤細胞を観察できる、という 4 つの大きな利点を持っている。H 病モデルマウスをかけあわせることにより、H 病における神経ネットワークの形成及び無神経節部腸管の発生過程をライブイメージングで観察することが可能である。その培養液にラミニンを加えることで、生きたまま、H 病腸管における、ラミニンの効果を可視化することができる。さらに、この実験系が確立されれば、これまで H 病との関連を示唆されてきた、他の細胞外マトリックスや細胞増殖因子に関しても、比較的容易にその効果を次々と試すことができるという、実験系としての将来性も秘めている。我々がすでに実証した、正常の腸管の場合と同様、H 病腸管においても、ラミニンが神経発達を促進する効果が明らかとなれば、今まで手術にしか根治し得ないとされてきた H 病の治療に新たな風を吹き込むことは間違いなさだろう。また、実際臨床の場では、術中病理迅速診断にて腸管の切除範囲を決定するが、無神経節腸管が残存することにより、便秘などの術後合併症がおこることがある。投薬による腸管神経の伸長効果が実用化されれば、術後の補助療法としても、効果が期待できる。

3. 研究の方法

本実験は以下のごとく計画された。

A 神経堤細胞のみが蛍光発色する H 病モデルマウスの作製
H 病腸管におけるラミニンの発現と分布の解析、コントロールとの比較検討

B H 病モデルの腸管神経系の発達における、ラミニンの効果の検討

C 生体マウスへのラミニンの投与方法の検討

A - 1 実験動物の作製

SOX10-VENUS Tg (ヘテロ接合: +/-) マウスと H 病モデルマウス EDNRB (ヘテロ接合: +/-) の交配を行い、SOX10-VENUS (+/-) / EDNRB (-/-) マウスを作製する。

- 2 表現型の解析

作製されたマウスが HD モデルであることを以下の方法にて検討する。

- a. 神経節細胞の存在：病理組織染色を施行し、腸管神経節細胞を探索することでH病の所見である無神経節領域の検討をする。
- b. エンドセリンBレセプターの発現量：H病原因遺伝子として同定されているエンドセリンBレセプターの欠失をreal time PCR法(TaqMan法)にて証明する。
- A H病腸管におけるラミニンの発現と分布の解析、コントロールとの比較検討
発生過程・部位別にラミニンの発現のコントロールと比較する。
1. コントロール腸管において、異なった発生過程(E9-E15)におけるラミニンの発現の分布を免疫染色・in situ hybridizationにて検討する。
 2. HDモデルにおける正常神経節腸管無神経節腸管、その移行部におけるラミニンの発現を同様に調査し、同時期のコントロール腸管の相当部位と比較検討する。
- B H病モデルの腸管神経系の発達における、ラミニンの効果の検討
培養環境下にて器官培養を行う。ラミニンの添加方法に関しては、申請者らの報告に準ずる[4]。
1. リアルタイムイメージングにて経時変化を撮影する。
 2. それぞれの神経堤細胞の遊走の速度とベクトル、神経突起伸長の速度を測定し、比較する。
 3. 神経細胞の動態を解析するためのソフト(Imaris, ZEISS社)にて解析する。
- C 生体マウスへのラミニンの投与方法の検討
最も有効なラミニンの投与時期と投与方法を検討する。
1. 母体に対する、経静脈・経腸管・腹腔内投与での比較検討
 2. 最適な投与時期・投与期間を検討
4. 研究成果
実験動物の作製とH病腸管におけるラミニンの発現と分布の解析、コントロールとの比較検討
まず、ENCCが可視化されたトランスジェニックマウス(Sox10-Venus Tg)とエンドセリンBレセプター欠損マウスを交配し、新しいH病モデルマウスを作製した。エンドセリンBレセプターの欠失はreal time PCR法(TaqMan法)にて証明した。胎生13.5日齢と胎生16.5日齢の腸管を実体顕微鏡下に摘出し、腸管各部位(中腸、近位後腸、遠位後腸)におけるENCC migrationの評価を行った。次に、各部位におけるラミニン-1の発現を、Sox10-Venus+/Ednrb-/-マウス(H病モデル)と、Sox10-Venus+/Ednrb+/+マウス(コントロール)とで比較した。ENCCのmigrationの先

進部は、コントロールでは胎生13.5日には遠位後腸にすでに達しているのに対し、H病腸管ではまだ中腸にとどまっていた。胎生16.5日になると、コントロールではすでにENCCは腸管遠位端まで到達しすでに神経支配を完了している状態であったが、H病腸管ではまだ遠位後腸にあった。部位別におけるラミニン-1の発現を免疫染色にて評価した。部位別のラミニン-1の発現は、胎生13.5日では中腸、近位後腸、遠位後腸のすべての部位において、H病群でコントロールに比べ高く発現していた。両群とも胎生13.5日のENCC先進部にて高く発現しておりその後ENCCの支配が完了すると、発現が低下する、という同一の傾向がみられた。しかしながら、胎生16.5日になっても、無神経節腸管である、H病遠位後腸においては、ラミニン-1の発現が高いままであった。すなわち、通常は、ラミニン-1の発現の上昇がENCCのmigrationに先行し、神経支配後にはその発現が低下すること、ENCCのmigrationが途中で停止してしまうH病では、無神経節腸管でラミニン-1の発現が高いままとなっていることが示唆された。以上の結果より、正常腸管における、ENCCのmigrationは時間的空間的なラミニン-1の発現の変化に制御されており、H病ではそれが変化していることにより、無神経節腸管となる可能性が示唆された。

H病モデルの腸管神経系の発達における、神経堤細胞の動態解析(器官培養)

の結果を踏まえ、H病モデルの腸管神経系の発達における、ラミニンの効果の検討するにあたり、まずは、H病モデルにおいて、ENCC先進部でのENCCの動態を、より詳細に観察しておく必要性があると考え、従来の、2次元の評価に加え、深部方向の情報を得るための実験を先行することとした。すなわち、まずは、H病において、ENCCのmigrationが肛門まで到達できずに、途中で停止してしまうのは、ENCCのmigrationの方向性に問題があるのか、それとも速度に問題があるのかを、ENCCの移動ベクトルを3次元で評価することにより明らかにする。その上で、ラミニンがH病におけるENCCのmigrationにどういった効果を及ぼすかを検討する方針とした。

H病胎仔腸管の後腸でのENCC先進部における個々のENCCの動態を比較するため、胎生15.5日齢のH病モデルマウスと、胎生12.5日齢のコントロールマウスの後腸を実体顕微鏡下で摘出し、培養環境下で、共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光ライブイメージング法にて360分間リアルタイムに観察した。得られた画像にて、腸管の長軸(口側肛門側)をY軸とし、高精細3D/4D画像解析ソフト(Imaris, ZEISS)を用いて、先進部における個々のENCCをX,Y,Z座標上に

てトラッキングし、解析した(図1)。

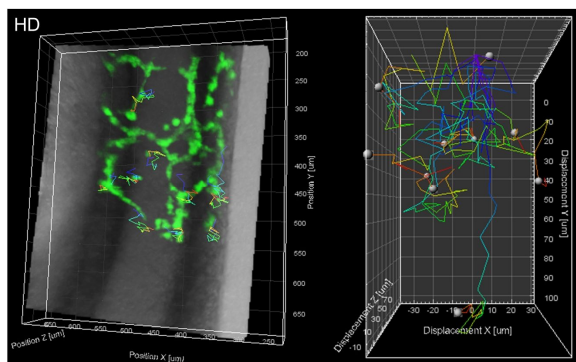


図1: 口側から肛門側へ伸展する緑色の腸管神経の先端部における個々の腸管神経堤由来細胞(ENCC)を、イマリスを用いて X,Y,Z 座標上にてトラッキングすることにより、3次元での ENCC の移動距離、移動方向、移動量を測定。

蛍光ライブイメージングでは、ENCC がネットワークを構成しながら後腸を肛門側へと伸展していく様子が観察された。解析ソフトを用いて、先端部における個々の ENCC を X,Y,Z 座標上にてトラッキングすることにより、3次元での ENCC の移動距離、移動方向、移動量、速度が測定可能であった。Y 移動距離、すなわち ENCC の口側から肛門側への移動距離は、コントロールで 63.48 μm であったのに対し、H 病では 34.56 μm と有意に低下していた。XZ 面での移動距離、すなわち、腸管の横軸方向への移動距離も、コントロールで 98.84 μm 、H 病で 38.70 μm と有意に低下していた。

コントロール腸管における平均移動速度は、248.29 $\mu\text{m}/\text{h}$ であったのに対し、H 病腸管では、72.87 $\mu\text{m}/\text{h}$ と著明に低下していた。しかし、Y 移動距離/XZ 移動距離、すなわち、短軸方向へ対する肛門側への移動の割合は、2 群間で有意さは見られなかった。H 病マウスの後腸における ENCC 先端部の移動速度は、コントロールに比べ著明に低下するものの、その方向性に有意な差はみられなかった。この結果より、H 病における無神経節腸管は、口側から肛門側へ向かう ENCC の migration の方向性が変化するためではなく、migration の速度が低下することにより、引き起こされる可能性が示唆された。LSM を用いた蛍光ライブイメージング法で得られた画像情報を高精細 3D/4D 画像解析ソフトにて解析することにより、ENCC の伸展速度、方向を 3次元で評価することができた。この技術は、従来の 2次元解析に加え、深度方向への情報を加えた、より詳細な ENCC の動態を追跡することができることから、H 病腸管における神経堤細胞の動態異常を新たに解明するツールとなりえることが期待される。

ENCC の動態を細胞レベルで解析

さらに、器官培養に加え細胞培養を施行し、細胞レベルでの、H 病モデルマウスにおける ENCC の動態の研究を行った。胎生 13.5 日齢と胎生 15.5 日齢の H 病モデルマウス及びコントロールマウスから後腸を採取し、Venus 陽性の腸管神経堤由来細胞のみを fluorescence-activated cell sorting (FACS) を用いて遊離し、7日間培養した。ニューロンのマーカーとして PGP9.5、グリアのマーカーとして GFAP を用い免疫染色をおこなった。7日間の培養後、ニューロスフェアを形成していたが、H 病群のニューロスフェアの細胞数はコントロールに比べ、有意に減少しており、細胞増殖が妨げられていることが示された。また、GFAP の発現は H 病群で有意に亢進しており、グリアへの分化が亢進していることが示唆された。一方、ニューロンのマーカーである PGP9.5 の発現 2 群で差がなかった。以上より、H 病では、グリアへの分化が亢進することにより、正常な腸管神経系の構築が妨げられている可能性が示唆された。

<引用文献>

1. Miyahara K. et al. Visualization of enteric neural crest cell migration in SOX10 transgenic mouse gut using time-lapse fluorescence imaging. *J Pediatr Surg.* 2011 46:2305-8
2. Miyahara K et al. Abnormal enteric innervation identified without histopathologic staining in aganglionic colorectum from a mouse model of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 2010 45:2403-7
3. Druckenbrod NR. et al. Age-dependent changes in the gut environment restrict the invasion of the hindgut by enteric neural progenitors. *Development.* 2009 136:3195-203
4. Nakazawa N. et al. Laminin-1 promotes enteric nervous system development in mouse embryo. *Pediatr Surg Int.* 2013 29:1205-8

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

1. 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*, 2016; 32:3-7 DOI: 10.1007/s00383-015-3806-9 査読有
2. 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.* 2016; 32:1095-1101
査読有

〔学会発表〕（計 13 件）

1. Nana Nakazawa, Katsumi Miyahara, Ryota Suzuki, Masahiko Urao, Chihiro Akazawa, Atsuyuki Yamataka
Altered relationship between enteric neural crest cells migration and laminin-1 expression in aganglionic colon of EDNRB (-/-) mice
European Paediatric Surgeons' Association Conference 2014, Dublin Ireland, 19 June 2014
2. 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.
The 28th International Symposium on Paediatric Surgical Research -Dublin, Ireland September 24-26, 2015
3. 田中奈々, 宮原克, 藤原なほ, 浦尾正彦, 赤澤智宏, 児島邦明, 宮野武, 山高篤行
高精細 3D/4D 画像解析ソフトを用いたヒルシュスプルング病モデルマウスにおける腸管神経堤細胞の動態解析
第 51 回日本小児外科学会学術集会 兵庫・神戸 2015 年 5 月 27 ~ 30 日
4. 田中奈々, 宮原克, 藤原なほ, 浦尾正彦, 赤澤智宏, 児島邦明, 宮野武, 山高篤行
エンドセリンレセプター B 欠損マウスにおける腸管神経堤細胞の 3D/4D 解析
第 53 回日本小児外科学会学術集会、福岡、2016 年 5 月 24 - 26 日
5. N Fujiwara, K Miyahara, N Nakazawa-Tanaka, C Akazawa and A Yamataka
Altered differentiation of enteric neural crest derived cells from endothelin-B receptor null mouse model of Hirschsprung's disease
The 29th International Symposium on Paediatric Surgical Research -Frankfurt, Germany, September 8-10, 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 奈々 (TANAKA, Nana)
順天堂大学 医学部 准教授

研究者番号 : 50530656

(4) 研究協力者

藤原 なほ (FUJIWARA, Naho)
順天堂大学 医学部 助教
研究者番号 : 50530656
宮原 克 (MIYAHARA, Katsumi)
順天堂大学 医学部 技術員
研究者番号 : 00420844
高橋 美麗 (TAKAHASHI, Mirei)
順天堂大学 医学部 研究補助員