

「腸管神経系の再生能を有するシュワン細胞系譜細胞の同定」

神戸大学大学院医学研究科

上坂 敏弘

1 研究の背景と目的

腸管には数多くのニューロンによって腸管神経系が構成されており、腸内環境を感知し、腸管機能（分泌、吸収、腸管運動など）を制御する役割を担っている。また感知した情報を求心性のニューロンに伝え、情報を中枢神経系に上げている重要な神経系である。これらのニューロンが腸炎や加齢により減少することが腸管機能の低下につながるということが明らかになってきており、日々の生命活動にとって腸管神経系の組織恒常性を維持することが重要だと考えられている。消失した腸管ニューロンを補う細胞ソースが明らかになれば腸管神経系の再生がより実現可能になると期待される。我々はこれまでの研究により、腸管に投射する外来神経線維上に附随するシュワン細胞系譜の細胞が、生後に腸管ニューロン産生の細胞ソースになっていることをマウスにおける細胞系譜解析によって明らかにしてきた。現在、このシュワン細胞系譜からのニューロン産生は、腸管ニューロンの減少に応じて、ニューロン産生能が高まることや、また腸内環境に依存していることを見出しており、腸管神経系の組織恒常性維持に寄与している可能性が高まっている。シュワン細胞系譜の細胞においてどのような細胞が腸管ニューロンを産生し得るのかを明らかにすることができれば、生体内に存在する細胞を利用して腸管神経系を維持する方法の開発につながられるのではと考えた。

肛門から直腸・結腸遠位部にかけて腸管ニューロンがうまく機能しないと重度の便秘や腸閉塞に陥ることが知られている。シュワン細胞系譜からのニューロン産生は、大腸遠位部・直腸において多く見られることから、骨盤神経叢から出て投射する神経線維が生後腸管ニューロンを産生する能力を有した細胞のニッチとしての役割を果たしているのではないかと注目した。

骨盤神経叢（図1）は胎児期に直腸と尿生殖洞（泌尿生殖器の発生段階での一形態）の間に形成される。注目したのは、生後になってから骨盤神経叢から派生する4つの枝（膀胱底

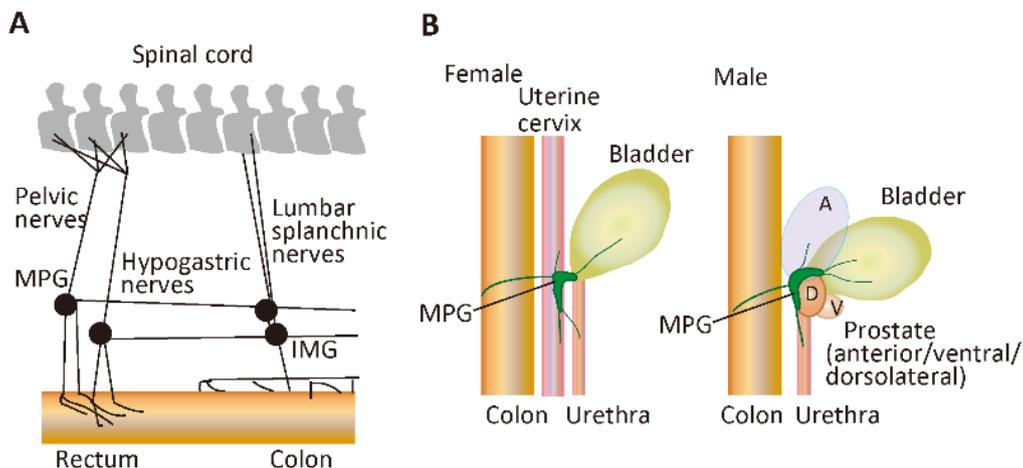


図1 骨盤神経叢 (A) 脊髄から結腸・直腸への神経路骨盤神経叢 (MPG) には下腸間膜神経節 (IMG)からの下腹神経 (hypogastric nerve) や骨盤内臓神経 (pelvic nerve) が入る。(B) 雄、雌の MPG の位置 MPG から大腸・直腸 (colon, rectum)、膀胱 (bladder)、尿道 (urethra)、生殖器 (uterine cervix, prostate) に神経線維が出ていく。

と尿管下端部 [AG I], 膀胱と前立腺の境界部 [AG II], 直腸 [AG III], 外尿道括約筋と陰茎海綿体[AG IV]) にニューロン形成が生じる点である (図2)。生後の腸管や泌尿生殖器の

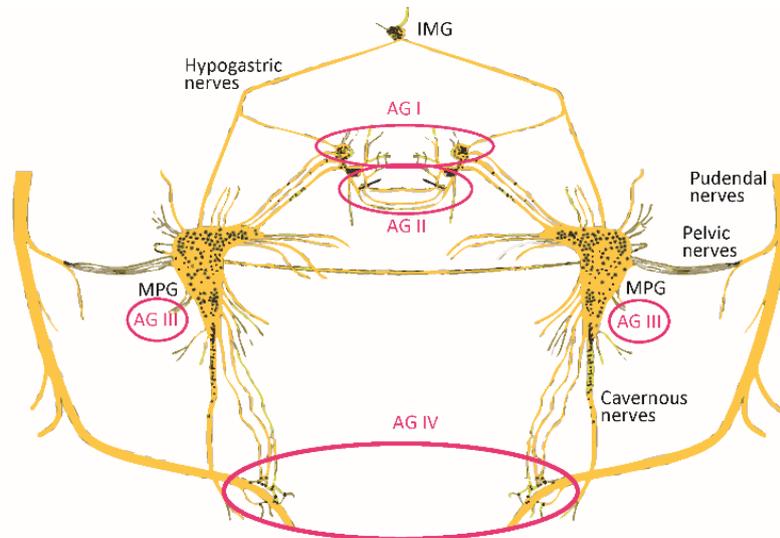


図2 雄ラットの骨盤神経叢と派生した神経群 骨盤神経叢から派生した4つの神経群の場所をAG I~IVとして示す。この図は、Arellano 等 (Autonomic Neuroscience 217:26-34, 2019) の図を引用し、少し改変した。

発達に伴い、それらを制御するニューロンが生み出されていると考えられ、これらのニューロン産生にシュワン細胞系譜の細胞が寄与している可能性が高い。そこで、マウスを用いて遺伝学的なシュワン細胞系譜解析を行い、生後から成獣に至るまで骨盤神経叢から出る神経線維に由来するニューロン産生能を持つ細胞について検証した。

## 2 研究方法・研究内容

体を構成する細胞において、神経堤に由来しシュワン細胞系譜に運命付けされた細胞を選択的かつ遺伝学的に標識するために *Desert Hedgehog (Dhh)* 遺伝子のプロモーターの制御下において Cre 組換え酵素を発現するマウスを用いた(図3)。この *Dhh::Cre* ドライバーは、シュワン細胞系譜に運命付けられた細胞特異的に組換え酵素 Cre を発現するので、Cre

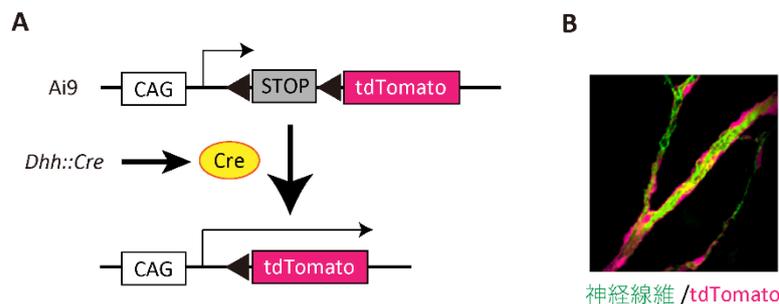


図3 遺伝子改変マウスを用いたシュワン細胞系譜解析

(A) 種々の細胞に遺伝子発現を誘導するプロモーター CAG の下流に遺伝子の転写を停止させる STOP カセットが入り、それ以降の蛍光タンパク質 tdTomato 遺伝子の発現を従来は止めている遺伝子座を持つマウスに、*Dhh::Cre* トランスジーンを組み込んだマウスを掛け合わせて、シュワン細胞系譜の細胞でのみ Cre による組換えをおこし、tdTomato を発現させることができる。(B) このマウスを用いることで生体内における tdTomato 陽性のシュワン細胞系譜の細胞運命を追跡した。

によって組換えが生じると赤の蛍光タンパク質 **tdTomato** を発現するようになるレポーター一遺伝子座と組み合わせたマウスを産出し、シュワン細胞系譜の細胞を選択的に **tdTomato** 標識し、陽性細胞の運命追跡を行った。

成熟した神経線維上に、増殖能を有するシュワン細胞系譜の細胞が存在するのかを検証するために、DNA 合成をしている細胞を修飾ヌクレオチド **EdU** の取込を検出する方法で存在の有無を検証した。解析の2時間前に **EdU** をマウスに腹腔内注した。**EdU** の検出には **Click-iT EdU Cell Proliferation Kit (Thermofisher)** を使用して、**EdU** に蛍光分子を選択的に化学結合させる方法をとった。

シュワン細胞への運命付けがなされた前駆細胞の制御に関与することが知られているシグナル分子 (**Notch**, ニューレギュリン、エンドセリンなど) の影響を見るために、これらのシグナル経路の欠損マウスとシュワン細胞系譜をトレースするマウスをかけ合わせて、シュワン細胞系譜からのニューロン産生の影響を生体レベルで検証した。また胎児期から成獣、種々の部位の神経線維上に存在するシュワン細胞系譜細胞のシングルセル **RNA-seq** 解析データ(公表されているもの)を元にニューロンとグリアの双極性が見られる細胞、神経幹細胞のプロファイルに近い細胞の有無について検証を行った。

### 3 研究成果

#### (1) 直腸・結腸遠位部におけるシュワン細胞系譜からのニューロン産生

迷走神経堤に由来する腸管神経前駆細胞が胎児期に腸管全体の筋層間に行き渡り腸管神経系を形成する。そして生後になって腸管に投射する外来神経線維に由来するシュワン細胞系譜の細胞から新生ニューロンが供給されることを以前見出した (**Uesaka et al., J. Neurosci., 2015**)。生後、ニューロン新生がまず観察されるのは直腸、結腸遠位部であり(図 4A)、直腸に投射する神経線維上には細胞増殖しているシュワン細胞系譜の細胞が多く観察された(図 4B)。このように細胞増殖能を有する細胞の存在は成獣マウスでも存在することがごく最近に報告されており (**Pan et al., Stem Cells Transl. Med., 2022**)、これら神経線維は個体が成熟した後も増殖能を有した前駆細胞が存在する場であることが予想された。

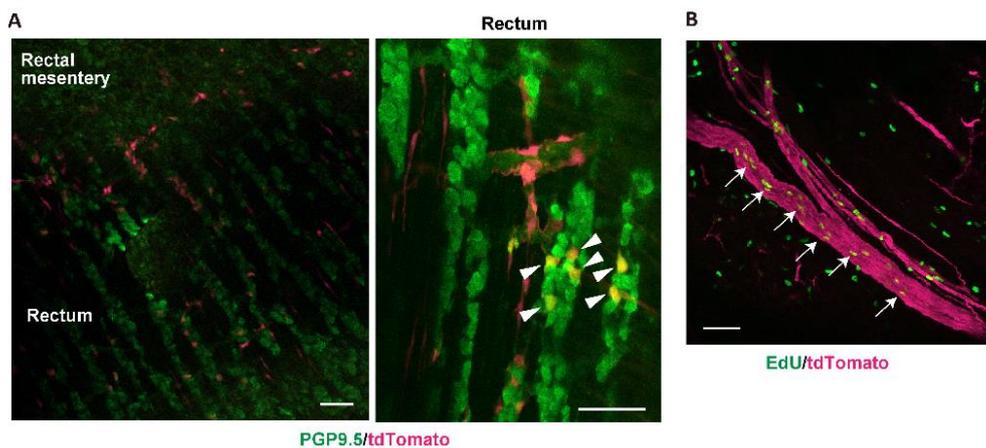


図4 直腸におけるシュワン細胞系譜からのニューロン新生

(A) 直腸筋層間神経叢におけるシュワン細胞系譜の細胞 (**tdTomato** 陽性細胞) 分布. 生後1週齢、矢頭で示すようにシュワン細胞系譜の新生ニューロンが認められた。(B) 直腸に投射する外来神経線維上に生後存在する増殖能を有するシュワン細胞前駆細胞. **EdU** 取込標識を利用して増殖能を有する細胞を検出したところ、直腸に投射する神経線維上のシュワン細胞系譜の細胞が多く生後でも存在することが分かった (矢印) . Scale bars, 50  $\mu$ m.

## (2) 生後骨盤神経叢から派生するニューロン新生

増殖能を有する細胞が存在する神経線維は骨盤神経叢から来ていることから、骨盤神経叢から出て泌尿生殖器官に投射する神経線維上にもニューロン産生能を有する細胞が存在するのではと考え、投射先である泌尿生殖器官での新生ニューロンについて検証した。胎児期に膀胱尿道近傍に形成される骨盤神経叢（MPG、図5A）は仙骨神経堤に由来し、シュワン細胞系譜ではないことが既に報告されており（Espinosa-Medina et al., *Science*, 2016）、同様にこの実験系においても MPG ニューロンは tdTomato で標識されないことを確認した（図5B）。一方で、骨盤神経叢から派生したニューロン群（AG）においては、より MPG からより離れた位置に存在する AG に tdTomato 陽性のニューロンが存在することが確認された（図5C）。このことは、生後にシュワン細胞系譜からのニューロン産生が腸管だけでな

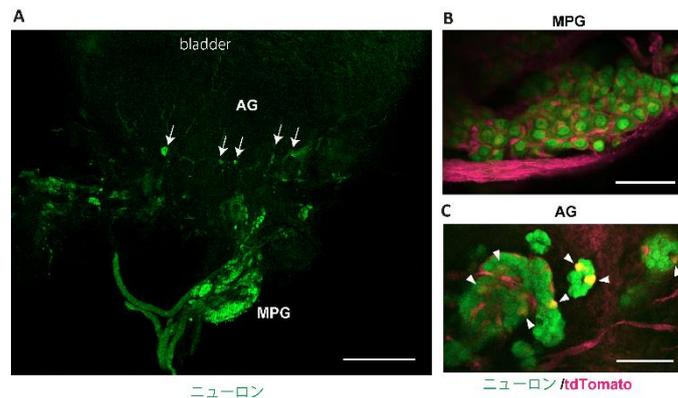


図5 骨盤神経叢から派生した新生ニューロン

(B) 骨盤神経叢（MPG）から出る神経線維から派生した新生ニューロン群（矢印, AG). (B) MPG ニューロンはシュワン細胞系譜ではない（tdTomato 非陽性）. (C) シュワン細胞系譜の細胞が AG ニューロンを産生している（tdTomato 陽性, 矢頭）. Scale bars: A, 500 μm; B, 50 μm.

く、泌尿生殖器官系でも生じることを示し、また骨盤神経叢がニューロン産生能を有する細胞を供給するソース元であり、神経線維を介して生後に AG を発達させていることを示唆している。

## (3) シュワン細胞系譜からのニューロン産生に影響するシグナル分子

シュワン細胞系譜の運命付けに関与していると予想されるシグナル経路については、シグナル経路欠損マウスとシュワン細胞系譜解析用のマウスを掛け合わせることで生体レベルでの検証を進めている。これまでのところ、ある受容体を欠損させるとニューロン群の形成が促進されることを見ているが、実証するためにデータ数を増やしているところである。

## 4 生活や産業への貢献および波及効果

骨盤神経叢から生後派生したニューロン群は、消化管、泌尿器、生殖器の制御に寄与していると考えられる。加齢や前立腺全摘などの外科的処置によって生じた神経系の機能不全が、下腹部臓器の障害の直接的な原因になることが知られている。研究で明らかになった骨盤神経叢周辺におけるニューロン産生能を有する細胞に着目して、これら細胞を体内で保護し維持する方法やニューロン産生を適切な標的組織で促す方法の開発が、新たな治療法の開発に直接つながると期待される。神経発生は主に胎児期に完了することが知られているが、生後の食環境の変化、支配する臓器の発達に伴って生じるニューロン産生の制御メカニズムを理解することは、健康維持を目指す上で、重要な新たなポイントである。