

内在性神経幹細胞を利用した 難治性ヒルシュスプルング病の新規治療法の作出

神戸大学大学院医学研究科神経分化・再生分野 講師 佐藤 祐哉



【研究概要】

ヒルシュスプルング病（HSCR）は先天性の腸管神経系欠損症です。腸管神経節を欠損する領域は患者によって異なるものの、神経を欠損する領域が長いほど予後が悪いことが知られています。特に大腸全体や小腸に無神経領域が及ぶタイプ（全結腸型、小腸型）は治療が困難で死亡率も高く、難治性HSCRとして難病指定されています。HSCRの原因として、これまでにRetやSox10、Ednrbなど10種類程度の遺伝子が報告されています。しかしながら、大多数のHSCRでは発症原因が不明であるため、HSCR 発症機序の解明や新規治療法の開発が待たれていました。本研究では迷走神経堤細胞・シュワン細胞に由来する腸管神経幹細胞を再駆動し、神経を再形成させる技術基盤の開発を通じて、HSCR患者の腸管神経幹細胞を用いた新規の難治性HSCR治療法を目指して研究を行いました。

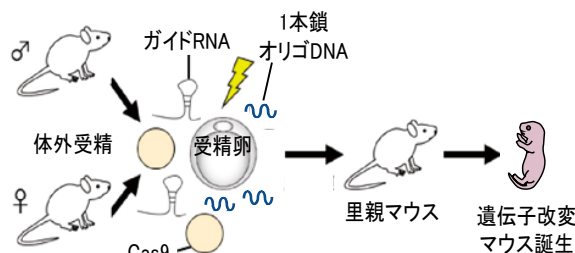
（1）新規HSCRモデルマウスの作出

これまでに様々な種類のRet遺伝子変異がHSCR患者において報告されています。しかしながら、これらの変異をマウスRet遺伝子に導入しても、単独ではHSCRを発症させることはできません。そのため、これまでの研究ではEdnrbやSox10などの遺伝子変異を組み合わせる必要がありました。そこで、Ret遺伝子変異単独でHSCRを発症するモデルマウスの作製を行いました。2016年に、片腎欠損、全結腸無神経節症などを発症し、Ret遺伝子に変異を有する日本人HSCR患者の症例が報告されていました。この報告を参考にして、本研究ではマウスのRet遺伝子座にこの患者と同じ変異を導入しました。

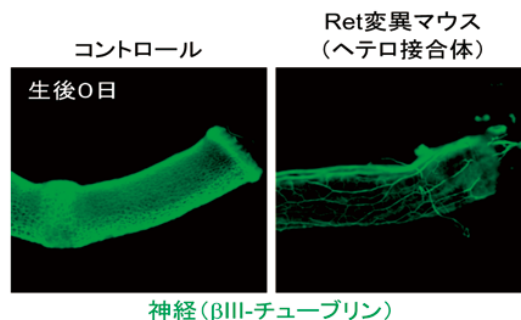
変異マウスの作製には、近年飛躍的な発展を遂げているCRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術を活用しました（図1）。Ret遺伝子の変異導入部位から12塩基下流にガイドRNAを設計し、導入したい遺伝子変異を有する1本鎖オリゴデオキシヌクレオチドとガイドRNAをCas9蛋白質と共にC57BL/6マウスの受精卵に導入し、偽妊娠マウスの卵管に移植しました。得られた産仔の遺伝子型ならびに遺伝子配列を解析し、一部の産仔で予想通りのRet遺伝子変異が導入されていることが確認できました。以上の結果から、新しいRet変異マウスを樹立することに成功しました。

（2）作製したRet変異マウスの表現型解析

作製したRet変異マウス（野生型とのヘテロ接合体）は生存可能であったものの、野生型マウスと比較して有意な生存率の低下が見受けられました。そこで出生直後のRet変異マウスの腸管神経を観察す



【図1】 ゲノム編集技術を利用した遺伝子改変マウス作製
マウス受精卵にガイド RNA、Cas9、1本鎖オリゴ DNA を導入し、受精卵を偽妊娠マウスに移植することで遺伝子改変マウスを得る。



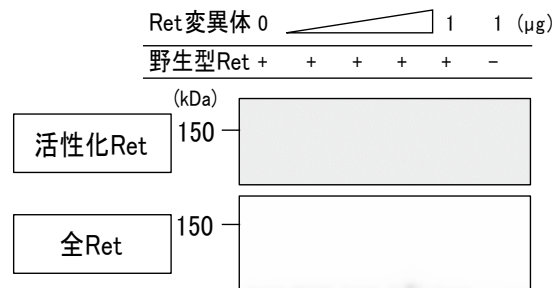
【図2】 作製した Ret 変異マウスの腸管神経分布
Ret 変異マウスでは腸管を覆う神経の密度が著しく減少し、HSCR の病態に酷似した表現型を呈している。

ると、Ret変異マウスでは腸管神経前駆細胞の増殖が有意に減少し、腸管神経系の形成不全が見られるなど、全ての変異マウスがHSCR患者と同じような腸管神経系欠損症を呈していました（図2）。

また胎児期の変異マウスにおいて、腸管神経前駆細胞の移動が顕著に低下していました。

加えて、11%の変異マウスで片腎欠損が観察されました。

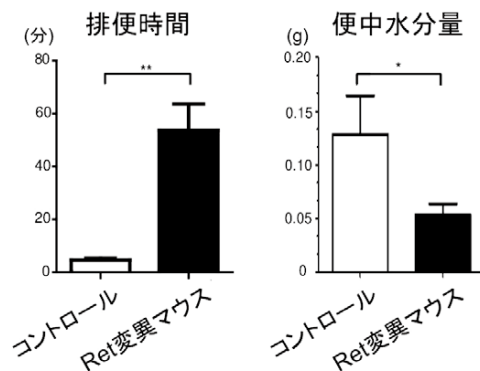
興味深いことに、通常のRetノックアウトマウスでは、ヘテロ接合体で表現型を呈することはありません。一方で、作製したRet変異マウスはヘテロ接合体で表現型を呈します。この事実は、導入したRet遺伝子変異が単純な機能喪失変異ではなく、正常型Retの機能も妨げる優性阻害変異であることを示唆しています。そこでこの変異Retが正常型Retの機能も抑制するかどうかを解析しました。正常型Retと変異体を共発現させたヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293Tの抽出液を抗Ret抗体で免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロット法を用いて活性化Retを検出しました。その結果、Ret変異体の発現量に依存して正常型Retの活性化レベルが著しく低下し、正常型と変異体を等量発現させると活性化Retが消失しました（図3）。この結果はRet変異体が正常型Retの活性化を阻害する優性阻害型変異体であることを証明し、ヘテロ接合体のRet変異マウスで著明な表現型が生じることを裏付けています。



【図3】 Ret 変異体による野生型 Ret の優勢阻害活性
Ret 変異体を野生型 Ret と共発現させると、変異体の発現量依存的に活性化 Ret が減少する。

（3）成体Ret変異マウス腸管の機能的評価と腸管神経系分化能の解析

成体まで生存したRet変異マウスの腸管機能の評価したところ、このマウスでは腸管内容物の胃腸通過時間の増加、排便時間の増加、便中水分含量の有意な減少が認められ、総じて排便機能の著しい低下が観察されました（図4）。これらの結果は腸蠕動を制御する腸管神経系の形成に異常があることを示唆しています。そこで様々な腸管神経サブタイプの分化に異常があるかどうかを、各種腸管神経サブタイプに対する免疫染色を行うことで解析しました。その結果、NADPH-d（抑制性運動ニューロン）、AChE（興奮性運動ニューロン）、カルレチニン（興奮性運動ニューロンおよび上行性介在ニューロン）、ソマトスタチン（下行性介在ニューロン）陽性の神経細胞が顕著に減少していました。以上の結果から、作製したRet変異マウスがヘテロ接合体で腸管神経系の形成不全を呈する優性阻害変異マウスである事が明らかとなりました。



【図4】 成体 Ret 変異マウスの排便機能低下
Ret 変異マウスでは排便時間の増加（左）、便中水分量の減少が認められる。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

（4）HSCR原因遺伝子変異を人為的に修復できるモデルマウスの作出

HSCRを発症するRet変異マウスの作出に成功しましたので、次にRet変異体遺伝子の両端にloxP配列を挿入したマウスを作製しました。これにより、通常時はHSCRを発症しますが、Creリコンビナーゼを発現させるとRet変異体が除去され、HSCRの発症を抑えられると考えられます。loxP配列を挿入したマウスがHSCRを発症することも確認できましたので、今後はこのマウスを活用し、どの時期にHSCR原因遺伝子を修復すれば腸管神経系の再形成が可能か、どの程度の遺伝子修復効率であれば排便機能の改善が見込めるのかを検討し、新規HSCR治療法の作出に向けた基盤情報を取得する予定です。