

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 30 年 5 月 1 日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所 属 機 関・部 局 名 金沢医科大学・小児外科学
職 名 講師
研 究 代 表 者 名 吉崎 尚良

下記のとおり平成29年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号:281026)

1. 共同利用研究 課題名	腸管神経発生における PKN ファミリーの役割			
2. 共同利用研究 目的	PKN2 flox/flox マウスを用いた腸管神経発生の研究を行う。			
3. 共同利用研究 期間	平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 30 年 3 月 31 日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 吉崎 尚良	金沢医科大学小児外科学	講師	研究統括	
(分担研究者)				
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル機能制御研究 部門・生体膜機能研究 分野	氏 名	向井 秀幸

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:281026)

6. 共同利用研究計画

ヒルシュスプルング病 (HSCR)は、新生児期に便秘、腹部膨満を主訴とする疾患で、消化管の神経節細胞の欠如が原因とされる。神経節細胞は神経堤をその起源とし、腸管壁内を口側から肛門側に向けて移動することで形成される。申請者は、マウス腸管神経堤由来細胞 (ENCCs) の運動メカニズムの解明を進めることで、HSCR の病態を明らかにすることを目的に研究を進めている。

PKN2 flox/flox マウスの胎生12日の胎仔から腸管を取り出し、Youngら(J Neurosci 2001)の方法を用いて腸管神経堤由来細胞の培養を行う。Cre 発現ベクターをトランスフェクションし PKN2 をノックアウトする。PKN2 ノックアウト ENCCs および、対照の 5-OHT 未処理 PKN2 flox/flox マウス由来 ENCCs の細胞運動、細胞増殖、神経細胞への分化能を比較することで PKN2 シグナルが Neural crest の細胞機能に与える影響を調べる。昨年度は ENCCs の樹立の遅れで研究の進展が遅れた。今後は MEF の細胞運動における PKN の役割も同時に調査し、PKN を介した細胞運動の基本メカニズムの同定を行っていく。

7. 共同利用研究の成果

腸管神経の発達に Rho ファミリーGTPase が関与することはこれまでに報告されている (Stewart AL et al. Dev Biol. 2007, Schill EM et al. Dev Biol. 2016)。しかしながらそのメカニズムについては、ほとんど知られていない。本共同研究ではまず細胞運動に対する PKN2 の影響を調べた。PKN2 flox/flox マウスの胎仔から MEF を調製した。そして、アデノウイルスベクターによる Cre 遺伝子の導入にて PKN2 をノックダウンすることによる細胞運動、骨格への影響を、タイムラプス顕微鏡及び、蛍光免疫染色で調べた。その結果 PKN2 をノックダウンすることによる MEF の細胞運動への影響はほとんど観察されなかった。しかしフィブロネクチン基質への細胞接着アッセイでは、アクチン骨格への影響が観察された。現在細胞運動への影響がなぜでなかったのか、アクチン骨格への影響の分子メカニズムとの違いを検証している。今後、現在我々が保持している Wnt1-Cre と PKN2 flox/flox を掛け合わせ、腸管神経の発生に影響が出ないか確認し、MEF で検証している分子メカニズムとあわせて細胞運動における PKN2 の役割を明らかにする。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。