

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06740

研究課題名(和文)細胞運命追跡法によるカハール介在細胞の可塑性と分子機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of plasticity of interstitial cells of Cajal and its molecular mechanism by cell fate tracing method

研究代表者

梶 典幸 (Kaji, Noriyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：20779318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：カハール介在細胞(ICC)のマーカであるANO1を発現する細胞を恒久的に標識したマウスにおいて、ICCだけでなく平滑筋にも標識が認められたことから、両者の共通前駆細胞がANO1を発現することが示唆された。抗ICC抗体AICを用いた免疫染色により消化管筋層間にc-Kit陰性AIC陽性細胞が一部認められた。腸炎モデルにおいて他のICCマーカに比べてAIC陽性細胞が保持されていたことから、AICが脱分化ICCのマーカとなる可能性が示唆された。培養ICCに対する一酸化窒素(NO)ドナー処置は低濃度で増殖促進、高濃度で細胞数の減少が生じるため、NOがICCの再生と障害を制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The reporter protein was expressed in the interstitial cells of Cajal (ICC) but also intestinal smooth muscle cells in ANO1-Cre; reporter mice. This result suggests that common precursor cell of ICC and smooth muscle cell express ANO1. The most of c-Kit-positive ICC at the myenteric plexus layer were also positive for AIC, an antibody for ICC. However, some of AIC-positive cells did not express c-Kit although the cells were connected with c-Kit-positive ICC networks. Since AIC-positive cells were retained, compared with other ICC markers, in the smooth muscle layer obtained from postoperative ileus model mouse, it was suggested that AIC could be a marker of dedifferentiated ICC. Treatment of cultured ICC with low concentration of nitric oxide (NO) donor promote the growth of ICC networks. On the other hand, treatment with high concentration of NO donor decreased c-Kit-positive ICC. This result suggest that NO is key molecule to regulate the fate of ICC.

研究分野：獣医薬理学

キーワード：カハール介在細胞 ICC 可塑性

### 1. 研究開始当初の背景

消化管は食物の消化・吸収や老廃物の排泄を行う生命活動にとって欠くことのできない臓器であり、消化管運動がこれらの機能を支持している。消化管運動は平滑筋細胞や神経細胞群、さらには消化管運動のペースメーカーを担うカハール介在細胞 (Interstitial cells of Cajal; ICC) が「消化管ネットワーク」を構成することで生み出される。

様々な炎症性の消化器疾患において、消化管運動が障害される。これまで、この病態時における平滑筋細胞や神経ネットワークの機能障害については多くの知見が蓄積されてきた。しかしながら、ICC の機能障害に関する知見は極めて少なく、さらに障害後の ICC がどのような過程を経て機能を回復するかを検討した報告はなかった。

我々はこれまでに炎症刺激による ICC の機能障害が一酸化窒素 (NO) および NO 関連酸化ストレスにより生じることを明らかにした。さらに、消化管筋層の炎症を呈する術後腸閉塞のモデルマウスにおいて、平滑筋や神経機能の障害に加え、NO を介した ICC の機能異常が消化管運動障害を引き起こしていることを明らかにした。この一連の研究において、炎症により障害された ICC のペースメーカー機能は他の機能 (平滑筋や神経) と比べ速やかに回復することが分かった。この性質は「ICC の可塑性」と呼ばれており、これまでにいくつかの研究グループによっても確認されている。しかし、炎症によりペースメーカー機能だけでなく ICC 特異的のマーカとされる c-Kit の発現も容易に低下してしまうため、ICC 自身が細胞死により消失してしまうのか、あるいは細胞は生存しているが脱分化して機能だけを失ってしまうのかという、可塑性の本質に関わるメカニズムの解明には至っていない。ICC が炎症により脱分化するならば、この ICC がどのような分子機構により再分化し、正常な機能を取り戻すのかを明らかにすることで、ICC を標的とした消化管運動機能不全の新たな治療戦略の基盤を構築することができる。また、ICC が細胞死するとすれば、失われた ICC を補充する細胞群やその分子機構を明らかにすることで、再生医療への応用も可能となる。

### 2. 研究の目的

本研究は消化管機能障害に対する ICC を標的とした新たな治療戦略の基盤構築を目指し、以下の2つの項目を明らかにする； Cre-loxP システムを用いた細胞運命追跡技術を用いることにより病態下における ICC 障害と回復過程を解明する、ICC のペースメーカー機能維持や増殖・障害からの機能回復に関与する因子を解明する。これらを明らかにした上で、ICC ネットワークの再建法確立の可能性を模索する。

### 3. 研究の方法

(1)細胞運命追跡マウスを用いた脱分化 ICC の有無の確認

ICC マーカーである ANO1 のプロモーター配列に Cre リコンビナーゼ遺伝子を配置した DNA を導入したマウス (ANO1-Cre) を作出し、このマウスをレポーター (YC3.60) マウスと交配することで ANO1 発現細胞特異的に恒久的な細胞標識をする。このマウスを用いて、正常組織における ICC のレポーター発現を c-Kit 免疫染色により確認する。ICC 特異的に標識がされたことが確認された後に、可塑性が認められている術後イレウスモデルを作製し、c-Kit 陰性レポーター発現陽性細胞 (= 脱分化 ICC) の存在を確認する。

(2)脱分化 ICC マーカーとしての AIC の有効性の検討

c-Kit または PDGFR 発現細胞が GFP ラベルされたマウス (c-Kit-eGFP、PDGFR -GFP マウス) に対して抗 ICC 抗体である AIC (抗原不明) を用いた免疫染色を行い、c-Kit および PDGFR 陽性細胞との局在を確認する。

(3) ICC 障害・再生因子としての NO の可能性の検討

ICC の障害と再生に関わる因子として NO に着目した。ICC を含む消化管筋層由来の小細胞塊に NO ドナーの濃度を低濃度 (50 μM) または高濃度 (500 μM) で処置し、24 時間後に c-Kit 免疫染色を行うことで、ICC ネットワークの成長に及ぼす影響を検討した。

### 4. 研究成果

(1)細胞運命追跡マウスを用いた脱分化 ICC の有無の確認

ANO1-Cre 遺伝子を C57BL/6 背景マウスの受精卵にインジェクションすることで、ANO1-Cre マウスを2系統得た。この ANO1-Cre マウスをレポーター (YC3.60; 本来はカルシウム指示タンパクであるが、本研究では緑色蛍光レポーターとして利用) マウスに交配し、ANO1 発現細胞が恒久的にラベルされたマウスを作出した。このマウスを用いて、消化管の免疫染色を実施したところ、レポータータンパクは ICC だけでなく平滑筋にも発現していることが明らかとなった (図1)。

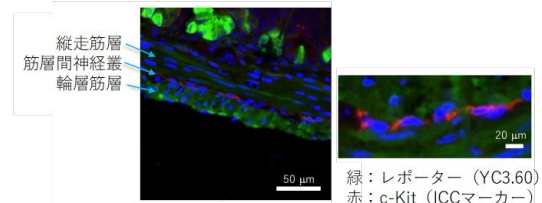


図1. ANO1-Cre; YC3.60マウスの回腸におけるレポーター発現部位

この結果は得られた2系統で同じ傾向であったため、トランスジーン挿入位置による影響である可能性は低いと考えられる。さらに、免疫染色では平滑筋細胞に ANO1 発現は認められないことから、発生段階において ICC と平滑筋の共通前駆細胞に ANO1 が発現す

る可能性が示唆された。ANO1-Cre マウスを用いた ICC の運命追跡は不可能であったが、これまで明らかとなっていなかった共通前駆細胞における ANO1 の発現が示唆された。今後は他のプロモーターの Cre ドライバーマウスの作出をすると共に、共通前駆細胞における ANO1 発現の確認を行うことで、ICC や平滑筋の発生における ANO1 の役割を解明する。

## (2) 脱分化 ICC マーカーとしての AIC の有効性の検討

c-Kit-eGFP マウスの消化管筋層 whole mount 標本に対し、AIC 抗体を用いた免疫染色を実施した。その結果、筋層間神経叢に分布する c-Kit 陽性 ICC は全て AIC 陽性であることが確認された。しかしながら、一部の AIC 陽性細胞は ICC ネットワークと繋がっているにも関わらず c-Kit を発現していなかった (図2)。

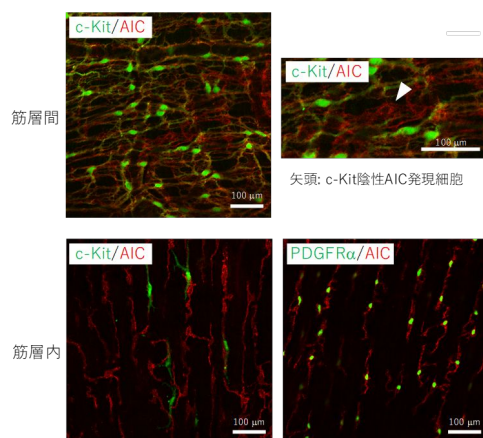


図2. AIC抗体を用いた回腸筋層のwhole mount免疫染色

さらに、筋層内に分布する c-Kit 陽性 ICC は AIC により染色されなかった。一方、PDGFR-GFP マウスの消化管の消化管筋層 whole mount 標本に対し、AIC 抗体を用いた免疫染色を実施した結果、筋層間神経叢においてほぼ全ての AIC 陽性細胞は PDGFR を発現していなかったが、ごく一部の細胞は PDGFR 陽性であった。また、筋層内に分布する AIC 陽性細胞は全て PDGFR を発現していた。これまでに我々は術後イレウスモデルマウスの消化管筋層において c-Kit や ANO1 の染色性に比べて AIC 抗体を用いた染色ではネットワークが保持されていることを見出しており、この結果は AIC が c-Kit 発現を失った「脱分化 ICC」のマーカーとなる可能性を示唆する。また、筋層間神経叢において AIC 陽性を示す細胞は主に ICC (c-Kit 陽性細胞) であるが筋層内においては PDGFR 陽性細胞という AIC のユニークな性質が明らかとなった。今後、AIC の抗原分子を明らかにすることで、脱分化マーカーとしての有用性を明らかにする必要がある。

## (3) ICC 障害・再生因子としての NO の可能性の検討

我々はこれまでに炎症時における ICC 障害因子として NO を同定した。一方、ICC を含む小細胞塊の培養液に NO ドナーを添加した場合、ICC ネットワークの成長が促進される可能性に気づいた。そこで、小細胞塊に対し、低濃度 (50 μM) または高濃度 (500 μM) の NO ドナー (NOR5) を処置することで、ICC ネットワークに及ぼす影響を検討した。その結果、低濃度処置では c-Kit 陽性 ICC のネットワークの成長が促進される傾向が確認された。一方、高濃度処置では c-Kit 陽性 ICC が失われた小細胞塊が多く認められた。この結果から、少量の NO は ICC の成長を促進するが、過剰な NO は c-Kit 陽性 ICC の数を減少させ、消化管運動障害を引き起こす可能性が考えられた。これは生理的レベルで神経から産生される少量の NO は ICC にとって正の作用を、炎症時に産生される多量の NO は ICC にとって負の作用を示すことを示唆する。しかしながら、本研究の手技では c-Kit 陽性 ICC ネットワークの定量が確立されていないため、今後は小細胞塊の大きさを統一した上で、c-Kit 陽性細胞ネットワークの面積を利用して定量化していく必要がある。

以上の研究成果より、ICC の可塑性を直接的に証明することはできなかったが、c-Kit 陰性 AIC 陽性細胞の存在や NO が ICC の細胞運命を調節する因子である可能性が示唆され、可塑性に関する手がかりを得ることができた。今後は他の ICC マーカーのプロモーターを用いた Cre ドライバーマウスの作製により、脱分化 ICC の存在を確認すると共に、NO が可塑性を引き起こすキー分子となるか否かを明らかにしていくことで、ICC を標的とした創薬の基盤を築いていく予定である。

## 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3件)

Kaji N, Nakayama S, Horiguchi K, Iino S, Ozaki H, Hori M, Disruption of the pacemaker activity of interstitial cells of Cajal via nitric oxide contributes postoperative ileus, *Neurogastroenterology and Motility*, 査読有, epub ahead of print, 2018, e13334, doi: 10.1111/nmo.13334

Yang Q, Fujii W, Kaji N, Kakuta S, Kada K, Kuwahara M, Tsubone H, Ozaki H, Hori M, The essential role of phosphor-T38 CPI-17 in the maintenance of physiological blood pressure using genetically modified mice, *The FASEB Journal*, 査読有, 32, 2018, 2095-2109, DOI:10.1096/fj.201700794R

Mihara T, Mikawa S, Kaji N, Endo M, Oikawa T, Tong-Rong J, Ozaki H, Hori M,

Therapeutic action of Honokiol on postoperative ileus via downregulation of iNOS gene expression, Inflammation、  
査読有、40、2017、1331-1341、doi:  
10.1007/s10753-017-0576-7

[学会発表](計2件)

梶 典幸、中山 晋介、堀口 和秀、飯野 哲、  
尾崎 博、堀 正敏、術後イレウスにおける  
消化管ペースメーカー細胞 Interstitial  
cells of Cajal の病態変化、第18回日本  
神経消化器病学会、2016年9月9日-10  
日、北海道大学医学部学友館(北海道札幌  
市)

梶 典幸、中山 晋介、堀口 和秀、飯野 哲、  
尾崎 博、堀 正敏、術後イレウスにおける  
消化管ペースメーカー細胞 Interstitial  
cells of Cajal の病態変化、第159回日  
本獣医学会学術集会、2016年9月6日-8  
日、日本大学藤沢キャンパス(神奈川県藤  
沢市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梶 典幸 (KAJI, Noriyuki)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・  
助授  
研究者番号：20779318