

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K09375

研究課題名（和文）選択的蛍光可視化マウスを用いた腸炎疾患における筋層の障害と再生の分子基盤の解析

研究課題名（英文）The plasticity mechanism and gene expression of interstitial cells of Cajal (ICC) with inflammatory stimulations in colitis by using selective conditional mice

研究代表者

堀口 里美 (HORIGUCHI, SATOMI)

福井大学・学術研究院医学系部門・学術研究員

研究者番号：00595283

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、トリニトロベンゼンスルホン酸誘起腸炎疾患モデルマウスの種々の病態時において消化管筋層の遺伝子発現について解析し、腸炎急性期から回復期へ移行する分子基盤のメカニズムの探求を行った。網羅的遺伝子解析の結果、細胞増殖因子や転写制御因子など、特に炎症からの回復期の ICC において著明に発現量が変化する遺伝子が同定された。これにより、ICCの障害からの回復に関わる分子機構について新たに示唆することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「食べる」という行為は人間が生存する上で必須であり、基本である。

本研究では、慢性的な下痢や血便、腹痛などの症状を伴う炎症性腸疾患の慢性期への移行ないしは寛解において、どのような分子メカニズムが働くかを解明することで、新たな治療法の開発の一助とすることができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the gene expression of interstitial cells of Cajal, which are thought to be the regulatory cells of gut motility, in trinitrobenzene sulfonic acid-induced experimental colitis of mice. We suggested that the proliferation of ICC and smooth muscle cells is involved in the recovery of organs on muscularis inflammation. By microarray, we found some candidate genes related to ICC recovery including cell growth factors and transcription factors. These results may lead to the development of new therapeutic strategy for motility disorder of gut.

研究分野：消化器内科学

キーワード：カハール介在細胞 炎症性腸疾患 消化管運動 発現解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)蠕動運動をはじめとする消化管運動は、筋層を構成する平滑筋細胞の調和のとれた運動によって実現される。その調節機構としては、外来性の交感副交感神経に加えて壁内神経叢(腸管神経系)が第一に挙げられるが、さらにカール介在細胞 (Interstitial cells of Cajal; ICC) と呼ばれる特殊な間質性細胞の役割が重要である。

(2)これまで、腸運動障害を伴う炎症性腸疾患のモデル動物において ICC が減少することが報告されている。トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBs) による腸炎モデルマウスは急性期において ICC が減少してその細胞性ネットワークが崩壊し腸自動能が低下するが、回復期では腸自動能の回復とともに ICC 数と ICC ネットワーク構造が回復する可塑性を有することが示唆されている。しかしながら、腸運動障害を伴う腸炎疾患における ICC の障害と回復は現象としては明らかに認められるものの、その基盤となる分子機構については全く分かっていないのが現状である。

2. 研究の目的

以上の背景をふまえて、本研究では腸運動障害を伴う腸炎疾患時における ICC の障害と可塑性に関わる細胞と分子メカニズムの解明を目指す。そのため、腸炎疾患モデル動物の種々の病態時における ICC が発現する分子を解析する。具体的には TNBs 誘起腸炎疾患マウスを作成し、その病変腸管の筋層を材料としてサブトラクティブ・ハイブリダイゼーション法およびマイクロアレイにより網羅的遺伝子解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 動物と TNBs 誘起腸炎マウス作製：今回の研究では、腸炎疾患モデルとして TNBs 投与マウスを用いた。7週齢の雄 BALB/c マウスを用い、24時間絶食後、エーテル麻酔下に PE-20 カテーテルを肛門から 4cm 近位部に挿入し、100 μ l の 50%エタノール 50%生理食塩水に溶解した TNBs 2mg を注入した。対照群には TNBs を除き 50% エタノール 50%生理食塩水 100 μ l のみを注入した。

BrdU 投与：上述と同様 TNBS あるいは Vehicle 投与後 3日目～7日目まで、5日間連続で自由飲水により BrdU (0.8mg/ml in tap water) を投与した。

(2)形態学的解析:コントロールマウスおよび TNBS 投与マウスの大腸を摘出し、投与部を中心に定法に基づき 4% パラフォルムアルデヒド (凍結切片用)で固定処理を行った。凍結包埋後凍結切片を作成し、スライドガラスに貼り付けて免疫染色を行った。一部のサンプルは冷アセトンで固定後粘膜を剥離し、筋層全載伸展標本を作成した。標本を PBS にて洗浄し、非特異反応防止のため 1%ウシ血漿アルブミン加 PBS にて溶解した 5%正常ロバ血清液で室温、20分間反応させた後、一次抗体希釈液にて 4、2時間反応させた。PBS にて洗浄後、蛍光標識二次抗体+ DAPI (1000倍希釈)混合液にて室温、2時間反応させた。封入剤で封入し、LeicaTCS SP2 共焦点顕微鏡にて観察、撮影を行った。

(3) mRNA の調整: TNBs 投与 2日後、5日後、およびコントロールとして未処理マウスから薬剤投与部 (コントロールではそれに相当する肛門より 4cm 近位部) の結腸を摘出し、粘膜を剥離し、筋層から mRNA を調整した。

(4) サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション法およびマイクロアレイによる病態時回復期 ICC の網羅的遺伝子解析: 筋層からの mRNA より cDNA を合成後、サブトラクティブハイブリダイゼーション法により、TNBS 投与 2日と 5日、および 2日と正常コントロールの筋層からの mRNA との差次的遺伝子のライブラリーをそれぞれ作製した。同ライブラリーから TA クローニング後、マイクロアレイ化を行なった。更に上記の cDNA から作製したプローブを用いて、炎症時、および回復期 ICC に発現する遺伝子のスクリーニングを行ない、特異的遺伝子クローンを特定した。また同時にマイクロアレイにより網羅的解析を実施した。得られた候補遺伝子のうち、発現量の多い遺伝子クローンについて、シーケンスにより塩基配列を解読し、BLAST search を用いて相同性検索を行うことで対象遺伝子の同定を行った。

4. 研究成果

(1) KIT 免疫染色 TNBs 投与後の ICC の変化について KIT 免疫染色により検討を行った。その結果、従来の報告通り TNBs 投与 2 日目において投与部結腸筋層の KIT 発現細胞の著しい減少と 7 日目における回復が確認された。

(2) ki67 免疫染色により、TNBS 投与 5 日目において筋層に増殖細胞が認められた。各種細胞マーカーを用いた二重染色により、平滑筋、カハール介在細胞、線維芽細胞、白血球が増殖を示すことが明らかとなった。一方、神経細胞に増殖は認められなかった。また、ki67 と c-KIT 二重免疫染色による解析の結果、TNBS 投与後 4 日～6 日で筋層の c-KIT 発現細胞に ki67 陽性反応を示す細胞核が見出された。BrdU 投与実験でも、炎症回復過程において c-KIT 発現細胞が増殖を示すことが示された。全載伸展標本により、この BrdU を取り込む c-KIT 陽性細胞が形態学的にカハール介在細胞の特徴を示すことも明らかとなった。

(3) 病態時回復期筋層の網羅的遺伝子解析上の結果をふまえ、病態時を TNBS 投与 2 日目、回復期を投与 5 日目とし、それぞれの筋層から RNA の抽出を行い、agilent バイオアナライザ 2100 の解析の結果から、高品質のものであることが確認できたため、マイクロアレイ解析を進めた。マイクロアレイによる解析の結果、コントロールと TNBs 投与 2 日目および TNBS 投与 2 日目と 5 日目の比較でそれぞれ発現量の差が著しい遺伝子群を新たに見出すことが出来た。細胞増殖因子は、回復期である TNBs 投与 5 日目において発現量が増加するものが多く見出された。

(4) 上記の研究結果から TNBS 投与後の 3 日目と 4 日目のサンプルにおいても、変動の見られる分子群が多数出てきた。これらの分子群の分子動態の精査のため、TNBS 投与後、2, 3, 4, 5, 6, 7 日後のマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現評価を行った。

TNBS 誘起腸炎マウス作製後、2, 3, 4, 5, 6, 7 日後およびコントロールとして未処理マウスから薬剤投与部(コントロールではそれに相当する肛門より 4 cm 近位部)の結腸を摘出・筋層を除去、RNAlater に浸潤後、RNA 抽出を行い、マイクロアレイ解析を行い、顕著な分子動態を示す因子に関してはリアルタイム PCR を行った。その結果、5 日後で発現量が増加している分子は TNBs 投与後、3 日後に発現が認められる傾向があった。

細胞増殖因子・成長因子顕著に発現量が増加する kinase insert domain protein receptor (Kdr), tryptophan hydroxylase 1 (Tph1), phospholipase A2, regenerating islet-derived 3 beta (Reg3b), trombospondin, type 1, domain 1 (Thsd1) に関してリアルタイム PCR による発現解析を行った。その結果、kinase insert domain protein receptor (Kdr) は TNBs 投与 2 日目と比較して TNBs 投与 5 日目の筋層において約 7 倍、tryptophan hydroxylase 1 (Tph1) は約 4 倍、phospholipase A2 は約 5 倍、regenerating islet-derived 3 beta (Reg3b) は約 4 倍、trombospondin, type 1, domain 1 (Thsd1) は約 2 倍の発現量の上昇を示した。

また、成長因子としては insulin-like growth factor などに約 5 倍、islet-derived family, member 4 に約 6 倍の高い発現量の上昇が認められた。

腸炎疾患の急性期及び回復期をそれぞれ TNBs 投与 2 日目から TNBs 投与 7 日目と定義したサンプルから、発現量が高い分子に関しての発現量の傾向を示すことができた。今後はさらに、パスウェイ解析を行い、腸炎疾患の回復過程の分子動態の解析に繋げる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujii Takeshi, Mashimo Masato, Moriwaki Yasuhiro, Misawa Hidemi, Ono Shiro, Horiguchi Kazuhide, Kawashima Koichiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Expression and Function of the Cholinergic System in Immune Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2017.01085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Taiki Mihara, Wataru Otsubo, Kazuhide Horiguchi, Shoma Mikawa, Noriyuki Kaji, Satoshi Iino, Hiroshi Ozaki and Masatoshi Hori	4. 巻 79
2. 論文標題 The anti-inflammatory pathway regulated via nicotinic acetylcholine receptors in rat intestinal mesothelial cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci	6. 最初と最後の頁 1795-1802
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.17-0304	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Takeshi, Mashimo Masato, Moriwaki Yasuhiro, Misawa Hidemi, Ono Shiro, Horiguchi Kazuhide, Kawashima Koichiro	4. 巻 134
2. 論文標題 Physiological functions of the cholinergic system in immune cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 1~21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2017.05.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀口 和秀、橋本 隆、堀口 里美、飯野 哲
2. 発表標題 術後イレウスモデルマウス腸筋層の微細形態学的解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯野 哲、堀口 里美、堀口 和秀
2. 発表標題 マウス盲腸においてc-Kitを発現する平滑筋細胞
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯野 哲、本坊 優吾、橋本 隆、堀口 里美、堀口 和秀
2. 発表標題 消化管筋層の線維芽細胞は c-Kit リガンドを産生する
3. 学会等名 第60回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本 隆、堀口 和秀、堀口 里美、飯野 哲
2. 発表標題 成体マウス消化管における転写因子 Gli の局在解析
3. 学会等名 第60回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯野 哲、本坊 優吾、橋本 隆、堀口 里美、堀口 和秀
2. 発表標題 c-Kitリガンドを産生する消化管筋層の線維芽細胞
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀口 和秀、橋本 隆、堀口里美、飯野 哲
2. 発表標題 術後イレウスモデルマウスにおける腸筋層の組織学的解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯野哲、堀口里美、堀口和秀、橋本隆
2. 発表標題 c-Kitシグナル異常を持つマウスにおける小腸カハール介在細胞の発生
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第73回学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 飯野哲、堀口和秀、堀口里美、橋本隆、川原真代、杉本京平
2. 発表標題 TNBS腸炎モデルマウスにおける消化管筋層の傷害と回復過程
3. 学会等名 第59回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 飯野哲、堀口和秀、堀口里美、橋本隆、川原真代、杉本京平
2. 発表標題 TNBS腸炎モデルマウスを用いた結腸筋層の傷害と回復過程研究
3. 学会等名 第49回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本隆、堀口和秀、堀口里美、飯野哲
2. 発表標題 成体マウス消化管におけるGli1陽性細胞の同定
3. 学会等名 第58回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本隆、堀口和秀、堀口里美、飯野哲
2. 発表標題 成体マウス消化管における転写因子Gli1の局在解析
3. 学会等名 第59回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本隆、堀口和秀、堀口里美、飯野哲
2. 発表標題 成体マウス消化管における転写因子Gli1とGli2の局在解析
3. 学会等名 第123回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀口里美、堀口和秀、飯野哲
2. 発表標題 消化管筋層におけるc-KIT受容体型チロシンキナーゼ発現による細胞系譜制御の解明
3. 学会等名 第123回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀口和秀、堀口里美、橋本隆、飯野哲
2. 発表標題 TNBS腸炎モデルマウス筋層の炎症回復過程におけるカハール介在細胞増殖
3. 学会等名 第123回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	堀口 和秀 (Horiguchi Kazuhide) (20377451)	福井大学・学術研究院医学系部門・准教授 (13401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------