

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10626

研究課題名(和文) 消化管カハール介在細胞の分化・形質転換因子の探索と機能解析

研究課題名(英文) Identification of Molecular Mechanisms Involved in Differentiation and Transformation of Interstitial Cells of Cajal.

研究代表者

堀口 和秀 (Horiguchi, Kazuhide)

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

研究者番号：20377451

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、消化管における運動調節性間質細胞であるカハール介在細胞(ICC)の発生・分化に関わるシグナル伝達カスケードの解析を行った。
ICCの発生はマウス小腸では胎生16日にc-KIT受容体型チロシンキナーゼを介したシグナリングに依存性となる。microarray解析により、この時期に高い発現量を示す骨形成タンパク質(BMP)シグナル分子を見いだした。さらにタンパク質相互作用解析を用いてその関連分子の検索を行い、ICCの発生・分化に関わる候補分子を新たに同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では消化管の運動を調節する特殊な細胞であるカハール介在細胞(ICC)の発生・分化に関わる分子について解析を行った。ICCは消化管の筋層にあって、蠕動運動といった正常な消化管運動が行われるよう調節している。また、腸炎や糖尿病など腸の運動異常を伴ういくつかの疾患でICCが欠損することや、病態の回復過程でICCも回復することが知られている。本研究の結果はICCの正常発生および細胞分化の分子メカニズムの解明に役立つと同時に、こうしたICCの病態や回復メカニズムの理解にもつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study we analyzed the signaling cascades which involve the development and differentiation of the regulatory cells of gut motility, namely Interstitial Cells of Cajal (ICC).

The development of ICC in mice small intestine depends on the signaling through c-KIT receptor tyrosine kinase at embryonic day 16. By microarray analysis, we found the significant increased expression of bone morphogenetic protein (BMP) signaling molecules in this period. Furthermore, by protein-protein interaction analysis, we identified the related molecules which may involve the development and differentiation of ICC.

研究分野：解剖学

キーワード：カハール介在細胞 消化管 発生 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) 消化管運動を司る主要素は、運動の主体となる平滑筋細胞とこれを調節する外来・内在の神経系である。これに加えて、消化管運動を調節する細胞要素として、KIT チロシンキナーゼを発現するカハール介在細胞(Interstitial Cells of Cajal, ICC)が腸蠕動運動のペースメーカーとして、また神経と筋の間であって神経伝達の介在を行っている。私たちはこれまで ICC の神経筋伝達機能について主として形態学的研究を進め、その興奮性及び抑制性神経伝達における働きを明らかにしてきた。消化管筋層内で ICC が細胞性ネットワークを形成し、神経や平滑筋に作用を及ぼしながら全体として調和のとれた消化管運動が実現するものと考えられる。

(2) ICC の発生には KIT 受容体型チロシンキナーゼを介したシグナル伝達が必要であるが、それ以外の分子の役割についての理解は不十分である。私たちはこの点について、胎生マウスによる解析を行い、新たに ICC の発生に関わる候補遺伝子を見出してきた。しかしながら ICC の発生分化を司る分子メカニズムの解明は現時点で十分とは言えず、未だ解明すべき点が多く残されている。

(3) また、ICC は腸炎や糖尿病など消化管運動異常を伴う種々の疾患において傷害を受け減少することや、障害が除かれると回復することが報告されている。この点については、障害により何らかの分子メカニズムによって ICC が KIT 発現と正常機能を失い、障害が除かれると再びこれらが回復するものと考えられているが、これにどのような分子メカニズムが関与しているかは分かっていない。このような、ICC の病態および再生という問題の解明にも ICC の発生・分化メカニズムの詳細を検討することが不可欠であるとの考えを持つに至った。

2. 研究の目的

以上の背景をふまえて、本研究では胎生期における ICC 発生・分化に関わる分子群を明らかにすることを目的とする。具体的には胎生期マウス小腸の ICC を分取し、マイクロアレイ解析を行い、胎生期 ICC の発生・分化に関わる候補遺伝子を新たに同定するとともに、この新規に同定された遺伝子について、細胞内タンパク相互作用解析により関連分子の検索を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学:動物は Balb/c マウスを用いた。胎生期(E10.5-E18.5)のマウスより遠位小腸を摘出し、Zamboni 液で 4 °C、2 時間固定した後、OCT コンパウンドに包埋し、凍結切片を作製した。標本は PBS にて洗浄後、抗 c-KIT ラットモノクローナル抗体(clone ACK4, Acris antibodies、1:1000)にて 4 °C、一晚反応 次いで Alexa Fluor488 標識抗ラットまたはウサギ IgG 抗体(1:1000)+Cy3 標識抗 -smooth muscle actin モノクローナル抗体 (clone 1A4, Sigma-Aldrich、1:1000)+4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI;1:1000)混合液にて室温、2 時間反応させ、封

入したのち共焦点顕微鏡にて観察を行った。

(2)マイクロアレイおよび新規細胞内タンパク相互作用解析法：胎生マウス ICC 前駆細胞の発生に関わる遺伝子の同定のため、胎生中期から後期の KIT 発現細胞における遺伝子発現の変化についてマイクロアレイにより検索を行った。具体的には、Balb/c マウスの胎生 12.5 日目-胎生 17.5 日の仔から小腸を摘出、各サンプルより RNA 抽出を行い、マイクロアレイ解析(Agilent Technologies)を行った。また、同サンプルの胎生 14.5、16.5 日の RNA 抽出を用いて、cDNA 合成を行い、タンパク質相互作用解析用のライブラリーの作製を行った。このライブラリーを用いて、胎生 14.5、16.5 日タンパク質相互作用解析を用いてその関連分子の検索を行った。

4. 研究成果

(1)形態学的解析： SMA 発現は近位小腸では胎生 11.5 日、中間部および遠位部では胎生 12.5 日目から発現が認められた。c-KIT は胎生 12.5 日目に将来縦走筋層になる部位に広く発現が認められるようになる。その後、胎生 14.5 日目で KIT 陽性細胞の一部に SMA 発現が認められるようになり、胎生 15.5 日目において、KIT 発現は筋層間の ICC にのみ限

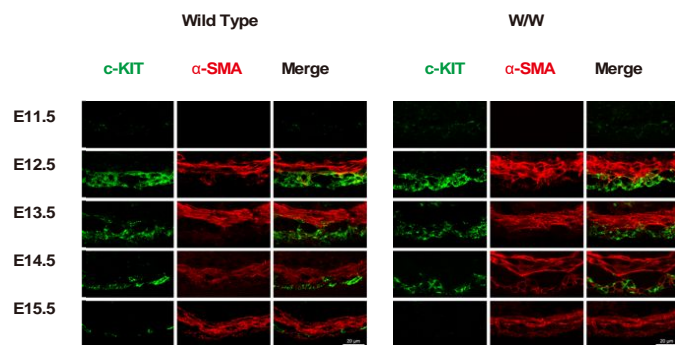


図1. 野生型(左)および KIT 変異(W/W 右)胎生期マウス小腸における c-KIT および SMA 発現

局し、KIT 発現を失った SMA 細胞は縦走筋に分化するものと考えられた。また、KIT 変異マウス(W/W)においては胎生 14.5 日目までは変異 KIT タンパクを野生型同様に発現する細胞が認められたが、胎生 15.5 日目において、筋層間 ICC と平滑筋が分化する時期以降 KIT 陽性 ICC は消失した(図1)。このことから、小腸筋層間 ICC が縦走筋層の平滑筋との共通前駆細胞から KIT 依存性に分化する時期が胎生 15.5 日目であることが分かった。以上の結果より、本研究ではその前後である胎生 14.5 日および 16.5 日の遺伝子発現量を比較し、16.5 日に発現量の多い細胞増殖・細胞内シグナル関連遺伝子を、ICC が ICC・平滑筋共通前駆細胞から分化する時期に働く、候補遺伝子とすることとした。

(2)マイクロアレイ及び新規細胞内タンパク相互作用解析法：解析の結果、胎生 16.5 日に発現量の増加する遺伝子群としては、ICC 発生への関与が示唆されている骨形成因子 BMP シグナル群、細胞接着因子として、cadherin1,

	<u>E16.5/E14.5(Log10 ratio)</u>
cadherin1	12.2
cadherin associated protein delta1	8.7
mucin-like protocadherin transcript variant1	2.1
mucin-like protocadherin transcript variant2	2.8
protocadherin24	5.6
cingulin	9.3

表1. 胎生 16 日に発現量の高い遺伝子(細胞接着因子関連)

cadherin associated protein delta1, mucin-like protocadherin transcript variant1, mucin-like protocadherin transcript variant2, protocadherin24, cingulin などが見いだされた(表1)。その他の

遺伝子では、signal transduction に関係する遺伝子群として、cGMP dependent protein kinase type2, adenylate cyclase のスプライシングバリエーション群、ATPase 受容体のスプライシングバリエーション群などの高い発現が認められた(表 2)。

また、胎生 16.5 日に高い発現する

遺伝子群のうち、ICC 発生への関与が示唆されている骨形成因子 BMP を bait としたタンパク相互作用解析の結果、その関連遺伝子群として、BMP inducible kinase, SMAD1 などの発現の有意な増加が確認された。

(3)本研究の結果により、ICC の発生に関わる候補遺伝子を新規に見いだすことができた。またこれらのうち BMP の関連分子の発現量上昇も明らかとなり、このことから ICC 発生に関わる BMP シグナリング経路の詳細について新たに示唆することができた。

	E16.5/E14.5(Log10 ratio)
cGMP dependent protein kinase type2	9.7
adenylate cyclase 8	6.4
adenylate cyclase 7	6.8
ATPase class 1 type8B	4.3

表 2 胎生 16 日に発現量の高い遺伝子(signal transduction 関連)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iino S, Horiguchi K, Horiguchi S	4. 巻 379(1)
2. 論文標題 c-Kit-stem Cell Factor Signal-Independent Development of Interstitial Cells of Cajal in Murine Small Intestine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell & Tissue Research	6. 最初と最後の頁 121-129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-019-03120-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10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 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 里美 (HORIGUCHI SATOMI) (00595283)	福井大学・学術研究院医学系部門・学術研究員 (13401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	橋本 隆 (HASHIMOTO TAKASHI)		