

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18790453

研究課題名（和文） 消化管ペースメーカー細胞の発生に関わる分子機構

研究課題名（英文） Genes related to development of intestinal pacemaker cells

研究代表者

堀口 和秀 (HORIGUCHI KAZUhide)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：20377451

研究成果の概要：消化管の筋層にはカハール介在細胞と呼ばれる特殊な細胞が存在し、これは腸蠕動運動の歩調とり（ペースメーカー）細胞と考えられている。その細胞の発生は c-KIT という分子を介した情報伝達により調節されることは知られているが、それ以上のことは分かっていない。そこで本研究では胎生期マウス腸管を材料に分子生物学的実験を行い、カハール介在細胞の発生に関わる候補遺伝子をあらたに同定することができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	270,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：消化管、カハール介在細胞、発生、サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション法、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

(1) 個体の生命維持に必要な消化吸収活動は、消化管筋層の調和のとれた運動によって遂行される。特に腸蠕動は、食物塊を口側から肛門側へと送るのに、極めて重要である。その運動調節機構としては、外来性の交感・副交感神経に加え、壁内神経（腸管神経）が第一に挙げられるが、更にカハール介在細胞

（Interstitial cells of Cajal; ICC）と呼ばれる特殊な細胞群の機能に関心が集まっている。

(2) 近年の広範な電気生理学的・形態学的研究から、消化管筋層に存在するカハール介在細胞は腸蠕動のペースメーカー電位である緩徐波（slow wave）を発生するペースメーカー

細胞として、ギャップ結合で連結したネットワークを構成することが知られてきている。カハールの介在細胞の形態や機能については国際的に精力的な研究が進められてきたが、その細胞学的本態に迫る分子生物学的解析は乏しいのが現状である。

(3) 特に、カハール介在細胞の発生に関わる分子としては、これまでc-kit遺伝子の産物であるKIT受容体型チロシンキナーゼが知られるのみである。当該細胞の発生の分子機構を知ることは、その細胞の本態を理解する上で重要と考える。

2. 研究の目的

そこで本研究では、このカハール介在細胞の発生に関わる分子機構を遺伝子レベルで解明することを目的とする。このために、同細胞の発生段階において発現量の変化する遺伝子を、分子生物学的手法により同定する。すなわち、発生時におけるカハール特異的遺伝子を、サブトラクション法により同定し、発現解析を行なうことで明らかにする。

3. 研究の方法

本研究の主目的である、カハール介在細胞の発生に関わる遺伝子の同定を、胎生マウス腸管を材料に、以下の分子生物学的手法により遂行する。

(1) 材料として c-kit 遺伝子に変異を持つ W mutant マウスとその同腹野生型 (+/+) マウスの胎生期小腸を用いる。W mutant は KIT 受容体の膜貫通領域に変異を持つため KIT 受容体が細胞膜に組み込まれず、この受容体を介したシグナル伝達が阻害されている。そのため発生を KIT に依存する細胞が消失する。

(2) サブトラクション法によるカハール介在細胞特異的遺伝子のスクリーニング

小腸筋層においてKIT受容体の発現が認められるようになる胎生(E)14日の時点で、野生型、W mutantそれぞれの小腸からm-RNAを抽出する。それぞれの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、野生型にのみ特異的に発現する差次的遺伝子のライブラリーを作製する。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う。更に上記2種類のcDNAから作製したプローブを用いてスクリーニングを行ない、特異的遺伝子クローンを特定する。これら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なう。

(3) 発現解析

(2)項の結果に基づき、対象遺伝子の発現解析を行う。野生型および W mutant の発生の初段階における対象遺伝子の発現量の比較をリアルタイム PCR 法により検討する。さらに、凍結切片を用いた免疫組織化学法により、対象遺伝子の産物がカハール介在細胞に発現するかどうか検討を行う。

4. 研究成果

(1) 従来の研究では、W/W^dあるいはS1/S1^dといった、kit シグナリングに障害を持つ変異動物において ICC の欠損が報告されているが、本研究で用いた W/W mutant についての ICC の報告はない。そこで本研究では、始めに W mutant においてカハール介在細胞が本当に欠損しているかどうかについて確認を行った。

小腸筋層全載伸展標本を用いた免疫染色

の結果から、生後7日の野生型マウスにおいては筋層間領域(図1A)にICC-MYのネットワークが観察されたが、W mutantの同部位にはKIT陽性のICCはほとんど認められなかった(同B)。一方、深部筋神経叢領域については、従来のW/W^yやS1/S1^dでの報告同様、野生型(同C)およびW mutant(同D)いずれにもKIT陽性のICC(ICC-DMP)が認められた。このことから、本研究で用いたW mutantにおいてもICC-MY(小腸蠕動運動のペースメーカーの役割を担う)が欠損していることが確認された。さらにICC-DMPはKIT非依存性に発生することと、本研究で用いた抗KIT抗体(ACK4)は正常KITタンパク同様に変異KITタンパクの検出にも有効であることが示された。

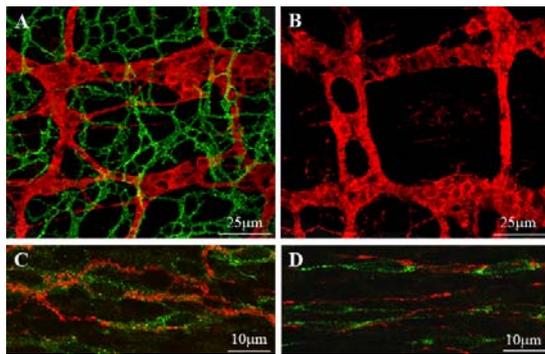


図1. 生後7日の野生型(A, C)およびW mutant(B, D)小腸におけるICC(緑、KIT抗体による)の分布。A, Bは筋層間神経叢領域、C, Dは深部筋神経叢領域。赤は神経。

(2) 次に、サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション法により、野生型に発現しW mutantでは発現の低い遺伝子の検索を行った。具体的にはE14の野生型、W mutantそれぞれの小腸遠位部を摘出し、mRNAを抽出した。抽出したmRNAよりcDNAを合成し、野生型-W mutantのサブトラクションを行い、差次的遺伝子のライブラリを作成した後、E14の野生型の小腸遠位部から抽出したRNAより

合成したcDNAをプローブとしてスクリーニングを行った。

その結果1011の遺伝子クローンが得られ、そのうちの185クローンが発現量3倍以上(すなわち、W mutantに比べ野生型で3倍以上の発現量)であった。さらに、その185クローンのうちで複数のクローンが得られた4遺伝子(表)を、ICCの発生に関わる候補遺伝子とした。

胎生14日マウス中腸において、Wマウスに比べ野生型で発現量の多かった遺伝子		
	Number of clones	Log10 Ratio
msh-like 2 (Msx2)	10	1.41
neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2 (Ntrk2)	10	1.31
procollagen, type I, alpha 1 (Col1a1)	11	0.66
Fas (TNF receptor superfamily member) (Fas)	11	0.58

表. サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション法により同定された、ICCの発生に関わる候補遺伝子

4遺伝子のうち、msh-like 2 (Msx2) およびneurotrophic tyrosine kinase receptor, type2 (Ntrk2) 遺伝子は、特に発現量の差が大きく(Msx2は9.4倍、Ntrk2は8.7倍野生型で多く発現している)、しかも従来の報告でそれぞれさまざまな細胞の発生に関わることが知られていることから、この2遺伝子に注目して発現解析を進めることとした。

(3) 野生型およびW mutantの胎生期におけるMsx2およびNtrk2発現量について、リアルタイムPCR法により解析した(図2)。E13~E18、P0、P7の各時期について、野生型およびW mutantそれぞれの小腸遠位部から得たmRNAを用い、野生型の発現量を1として各時期での両遺伝子の発現量を比較した。

その結果、E15 での Msx2 以外の全ての測定時期において、両遺伝子とも W mutant に比べ野生型で有意に発現量が多いことが示された。特に E13 では両遺伝子とも発現量の差が大きく、E14, 15 と発生が進むにつれて発現量の差は減少する傾向にあった。しかしながら出生直前の E18 では再び発現量の差が開き始め、P0 では両遺伝子とも再び発現量の差が大きくなる傾向が見出された。

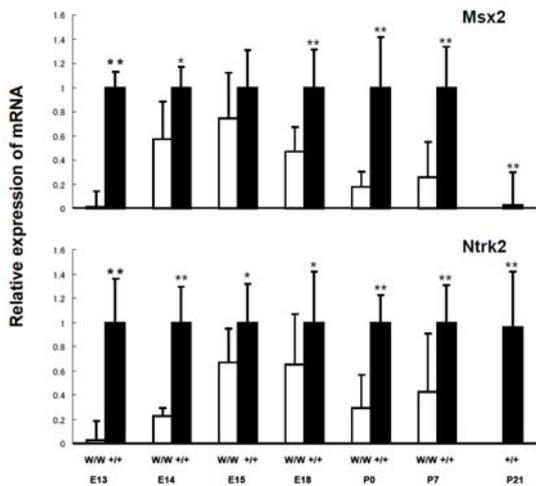


図2. 小腸における Msx2、Ntrk2 mRNA 発現量。各発生段階における野生型での発現量を1としたときの野生型と W mutant での比較。** p<0.01、* p<0.05

(4)最後に、両遺伝子の筋層における発現について凍結切片を用いた免疫染色法により解析を行った。P0 において、野生型マウス小腸筋層における Msx2 様免疫反応は、KIT 陽性の ICC-MY を含む細胞の核に見出された (図 3A)。一方、W mutant の筋層においては、Msx2 陽性反応はほとんど認められなかった (図 3B)。

(5) 本研究の結果から Msx2 および Ntrk2 を ICC の発生に関わる遺伝子として新たに同定

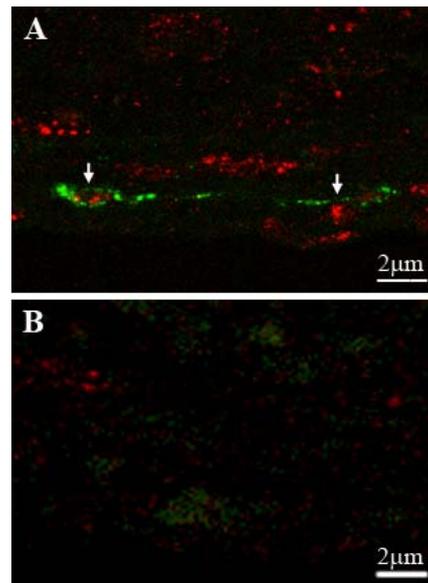


図3. P0 小腸筋層の凍結切片による Msx2 免疫染色像 (A: 野生型、B: W mutant)。野生型では Msx2 陽性反応 (赤) は KIT (緑) 陽性の ICC-MY を含む細胞の核に見出される。一方 W mutant の筋層においては Msx2 陽性反応はほとんど認められない。

することができた (現在英文学術誌に投稿準備中)。ICC は消化管運動の調節細胞として重要な役割を果たしており、腸運動障害を伴う種々の疾患での障害が報告されている。当該細胞の発生調節の解明は臨床方面への発展も期待されるところであり、今後は本研究で同定された遺伝子の役割について検討したい。

5. 主な発表論文等 [学会発表] (計4件)

①堀口和秀、堀口里美、飯野哲、野条良彰：
W 変異マウスの胎生期小腸における c-KIT 発現細胞の動態 第 114 会日本解剖学会総会・
学術集会 岡山 2009 年 3 月 28 日

②堀口里美、堀口和秀、野条良彰、飯野哲：
マウス胎生期小腸におけるカハール介在細胞の発生に関わる遺伝子群の探索 第 114 会

日本解剖学会総会・学術集会 岡山 2009年
3月28日

③堀口里美、堀口和秀、野条良彰、飯野哲：
消化管ペースメーカー細胞の発生に関わる
遺伝子群の探索 第7回日本神経消化器病学
会 東京 2008年9月30日

④堀口里美、堀口和秀、野条良彰、飯野哲：
カハール介在細胞の発生に関わる分子群
第50回日本平滑筋学会 青森 2008年7月
4日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀口 和秀 (HORIGUCHI KAZUHIDE)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：20377451

(2) 研究協力者

堀口 里美 (HORIGUCHI SATOMI)
福井大学・医学部・大学院生