

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06845

研究課題名(和文) 消化管平滑筋の多様性を生み出す細胞間相互作用および分子機構の解析

研究課題名(英文) Cellular interactions and molecular mechanisms underlying the diversification of smooth muscle in the digestive tract.

研究代表者

石井 泰雄 (Ishii, Yasuo)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：20582430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：羊膜類の消化管運動は、粘膜筋板、輪走筋、縦走筋から構成される平滑筋層の収縮によって起こる。これらは消化管全体にわたって存在するが、その緻密な分布や収縮を制御する自律神経叢の分布は器官ごとに異なる。チロシンキナーゼ受容体およびそのリガンドをコードするEph/ephrin遺伝子群の発現解析を出発点に、消化管の平滑筋層が異なったEph/ephrin遺伝子を発現する多様な筋層/器官特異的平滑筋から構成されていること、平滑筋と自律神経系のニューロンの中で器官特異的なEph-ephrinシグナル伝達が起こりうること、平滑筋の器官特異性が初期の周囲環境の影響を受けることを示す結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管運動に異常を呈するさまざまな疾患が知られている。それらの中には、胃食道逆流症やヒルシュスプルング病のような明確な運動の異常を示すものから、感情的ストレスの影響のように巨視的な異常を伴わないものまで含まれる。消化管運動を引き起こすのは平滑筋の収縮と弛緩であり、その活動は自律神経系によって制御される。本研究から得られた成果は、消化管平滑筋の多様性、平滑筋と自律神経系間のシグナル伝達、周囲組織との相互作用の重要性を示唆するものであり、分子機構や細胞分化のプロセスのさらなる解明を経て、消化管運動制御システムの異常に起因する諸疾患の理解や、それらの治療法の開発に寄与ことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The movement of the digestive tract is generated through the coordinated contraction of three smooth muscle layers: the muscularis mucosa, circular muscle, and longitudinal muscle. While these muscle layers are present throughout the entire digestive tract, their precise arrangement and the distribution of the autonomic nervous system vary depending on the organ. Our analysis of the expression of Eph/ephrin family genes, which encode tyrosine kinase receptors and their ligands, revealed that the smooth muscle of the avian embryonic digestive tract consists of layer- and/or organ-specific smooth muscle subtypes that express different Eph/ephrin family genes. Our data also suggest that organ-specific Eph/ephrin signaling can occur between smooth muscle and the autonomic nervous system, and that the organ specificity of the smooth muscle is controlled early in gut morphogenesis by influences of the surrounding environment.

研究分野：発生生物学

キーワード：発生 消化管 平滑筋 細胞間相互作用 内胚葉 臓側中胚葉

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

消化管運動に異常を呈するさまざまな疾患が知られている。それらの中には、胃食道逆流症やヒルシュプルング病のような明確な運動の異常を示すものから、感情的ストレスの影響のように巨視的な異常を伴わないものまで含まれる。消化管運動は平滑筋の収縮と弛緩によって起こり、その活動は自律神経系によって制御される。消化管運動制御システムの発生に関する新たな知見は、その異常に起因する諸疾患の理解や、それらの治療法の開発の基盤となりうる。

食道、胃、腸をはじめとする消化器官は、内腔に面した内胚葉性の上皮とそれをとりまく中胚葉性の間葉からなる単純な一本の管から生じる。平滑筋は間葉に由来し、内腔に近い側から、粘膜筋板、輪走筋、縦走筋の3層に分類される。これら3層は消化管のほぼ全長にわたって存在するが、興味深いことに、筋層の数や厚さ、緻密な線維の走行は、器官ごとに異なる(図1)。また、自律神経の末梢部をなす神経叢や、蠕動運動のペースメーカーとしてはたらくカハールの介在細胞も、器官固有の分布を示す。平滑筋の器官特異性の分子的基盤はどのようなものか、この特異性はいつどのような過程を経て生じ、自律神経系の発生とどのような関わりを持つか。これらの疑問に答える研究は、これまでほとんどなされてこなかった。

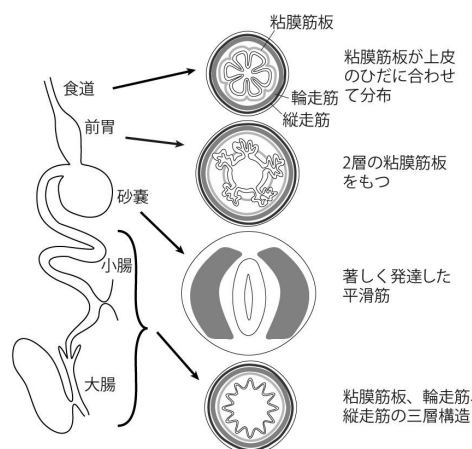


図1 消化管平滑筋の分布(ニワトリ)

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、以下3つの仮説の検証を通じて、消化管運動を担う平滑筋の分子的多様性、その多様性の成立過程および発生学的意義を明らかにすることである。

[仮説1] 胚期消化管平滑筋は、分子レベルにおいて多様である。

[仮説2] 発生初期の周囲環境が、平滑筋に「個性」を与える。

[仮説3] 平滑筋は、運動制御システムの構築に必要な位置情報を提供する。

### 3. 研究の方法

主にニワトリ胚を実験材料として用い、遺伝子クローニング、組織学的解析、胚操作、in vitro 培養、遺伝子導入法などの手法を用いた。

### 4. 研究成果

(1) 発生過程の消化管平滑筋は遺伝子発現レベルにおいて多様である

消化管の発生過程では、上皮間葉相互作用や間葉細胞間のシグナル伝達を経て、内胚葉と臓側中胚葉のそれぞれから平滑筋を含む様々な細胞が生じる。われわれは、接触を介した細胞間相互作用を担うEph受容体およびephrinリガンド遺伝子群の消化器官における発現パターンを解析した。6日胚から14日胚までのニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) 胚から、食道、前胃、砂嚢、小腸、大腸を摘出し、凍結切片を作成後、Ephファミリー遺伝子 (*EphA1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, B1, B2, B3, B6*) および *ephrin* ファミリー遺伝子 (*ephrinA2, A5, A6, B1, B2*) の発現を *in situ hybridization* 法を用いて検出した。明瞭なシグナルの検出されなかった *EphA6* を除き、解析した16種類すべての *Eph/ephrin* ファミリー遺伝子の発現が、消化管のいずれかの組織で検出された。*EphA3, EphA7, EphB1, EphB3, ephrinB1* の4つが、発生過程の平滑筋において、筋層もしくは器官特

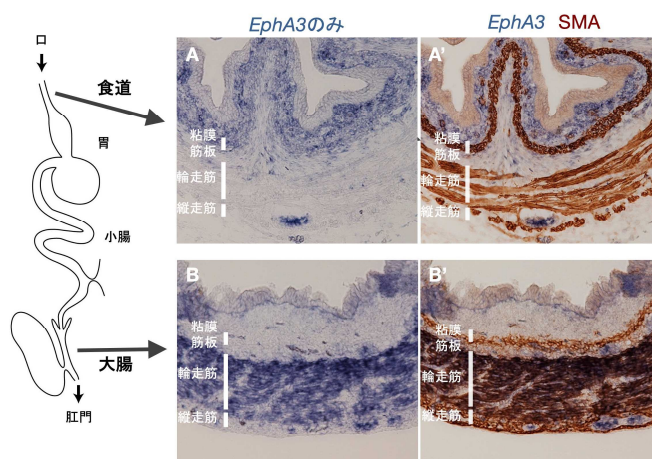


図2 *EphA3* 遺伝子の発現。食道 (A, A') および大腸 (B, B') の同一切片に対して、*EphA3* 単独 (A, B) および *EphA3* と Smooth muscle actin (SMA) (A', B') に対する染色を行った。*EphA3* の発現は、腸の輪走筋に見られるが、食道の輪走筋には見られない

性なシグナルの検出されなかった *EphA6* を除き、解析した16種類すべての *Eph/ephrin* ファミリー遺伝子の発現が、消化管のいずれかの組織で検出された。*EphA3, EphA7, EphB1, EphB3, ephrinB1* の4つが、発生過程の平滑筋において、筋層もしくは器官特

異的な発現パターンを示した。これらすべてを発現する大腸では、*EphA3* および *EphA7* の発現が輪走筋で、*EphB1* と *ephrinB1* の発現が粘膜筋板と輪走筋で検出された。興味深いことに、これらの遺伝子の発現開始時期は遺伝子ごとに異なっていた。*EphrinB1* の発現は平滑筋層出現前の 4 日胚の時点で既に検出され、消化管壁の内外軸に沿った明瞭な勾配をなしていた。*EphA3* の発現は 6 日胚以降に、*EphB1* の発現は 8 日胚以降に、*EphA7* の発現は 10 日胚以降に検出された。これらの遺伝子はいずれも器官特異的な発現パターンを示したが、特に明瞭な特異性を示したのは *EphA3* であった。*EphA3* の発現は腸の輪走筋に特異的であり、食道や胃の輪走筋には発現は検出されなかった。これらの結果は、羊膜類の消化管平滑筋が異なった *Eph/ephrin* 遺伝子を発現する多様なサブタイプから構成されていること、この多様性の成立過程が数日間におよぶ多段階的プロセスであることを示している。

## (2) EphA-ephrinA シグナル伝達の活性化は腸の平滑筋や自律神経系に特異的に起こりうる

腸の輪走筋に特異的に発現する *EphA3* は、チロシンキナーゼ受容体をコードしている。EphA 受容体の関与するシグナル伝達が、胚期消化管のどこで起こるかを明らかにするため、ニワトリで同定されている全 7 種類の EphA (*EphA1*, *EphA2*, *EphA3*, *EphA4*, *EphA5*, *EphA6*, *EphA7*) および 3 種類のリガンド (*ephrinA2*, *ephrinA5*, *ephrinA6*) の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて詳しく解析した。凍結切片に加え、より薄いパラフィン切片を用いた免疫染色との二重染色も行った。

1) 解析した *EphA* 遺伝子群のメンバーのうち消化管壁で強い発現を示すものは、*EphA3* のみであった。2) *ephrinA* 遺伝子の発現は、平滑筋層が明瞭になりはじめる 6 日胚の消化管壁の広い範囲に検出され、発生の進行とともに自律神経系のニューロンに限局していった。これらの結果は、*ephrinA*-EphA 順行性シグナル伝達が腸の輪走筋で特異的に、EphA-*ephrinA* 逆行性シグナルが腸の自律神経系に特異的に活性化されうること示している。

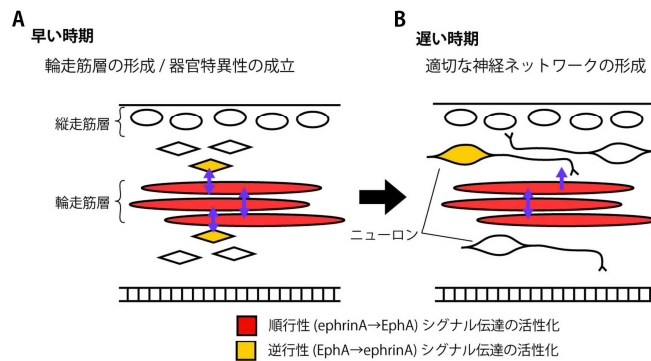


図3 小腸、大腸における *ephrinA*/EphA シグナル伝達の活性化。EphA3 の発現は輪走筋に (赤)、*ephrinA* 遺伝子ファミリーメンバーの発現は、早い時期には間葉の広い範囲に、遅い時期には自律神経系のニューロンに検出される。輪走筋では *ephrinA*-EphA 順行性シグナル伝達、自律神経系では EphA-*ephrinA* 逆行性シグナル伝達が、腸特異的に活性化される。

## (3) 周囲環境が平滑筋の器官特異性に影響を与える

*EphA3* 陽性の腸特異的輪走筋の形成に与える周囲環境の影響を解析するため、移植実験を行った (図 4)。さまざまな発生段階のウズラ胚から予定腸中胚葉を単離し、ニワトリ 1.5 日胚の予定食道/胃領域に移植した。移植胚を 10 日胚になるまで発生させ、ウズラ特異的抗体等を用いた免疫染色や *in situ* ハイブリダイゼーションによる染色を行った。消化管形成後間もない 2.5 日胚以前の若い予定腸中胚葉を移植した場合、移植片は移植先の環境に合わせて *EphA3* 陰性 (胃/食道タイプ) の輪走筋のみを形成した。より発生の進んだ予定腸中胚葉を移植した場合、移植片は *EphA3* 陽性 (腸タイプ) の輪走筋を形成した。これらの解析により、予定腸中胚葉の発生運命が消化「管」形成が行われている比較的早い時期に定まること、腸特異的な *EphA3* 陽性の輪走筋が腸に固有の周囲環境に依存して生じることが明らかとなった。

周囲環境の影響の詳細を明らかにするため、未分化な胃の間葉の指標である *Barx1*, *Six2*, *Wnt5a* の移植片における発現、および未分化な腸の間葉の指標である *Nkx2.3* の移植片における発現を調べた。結果は明快であった。2.5 日胚以前の予定腸中胚葉を食道や胃に移植したときのみ、移植片は本来発現しない胃のマーカー遺伝子を発現した。これらの結果は、平滑筋の器官特異性に関わる上記の周囲環境が、同時に初期の中胚葉に作用し、器官ごとのアイデンティティをもたらすものであるという考えを支持している。この周囲環境の形成に一翼を内胚葉が担っていることを示唆する結果も得た。

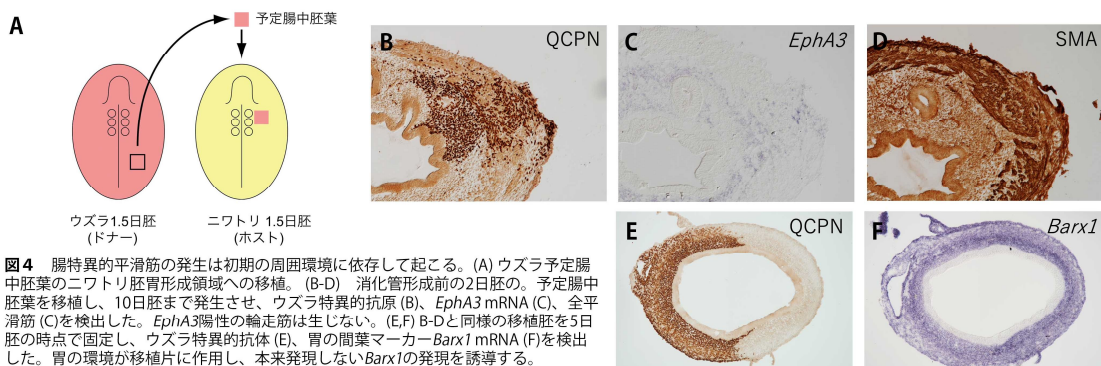


図4 腸特異的平滑筋の発生は初期の周囲環境に依存して起こる。(A) ウズラ予定腸中胚葉のニワトリ胚胃形成領域への移植。(B-D) 消化管形成前の2日胚の。予定腸中胚葉を移植し、10日胚まで発生させ、ウズラ特異的抗体を用いた免疫染色を行った。2.5日胚以前の若い予定腸中胚葉を移植した場合、移植片は移植先の環境に合わせて *EphA3* 陰性 (胃/食道タイプ) の輪走筋のみを形成した。より発生の進んだ予定腸中胚葉を移植した場合、移植片は *EphA3* 陽性 (腸タイプ) の輪走筋を形成した。これらの解析により、予定腸中胚葉の発生運命が消化「管」形成が行われている比較的早い時期に定まること、腸特異的な *EphA3* 陽性の輪走筋が腸に固有の周囲環境に依存して生じることが明らかとなった。(E,F) B-Dと同様の移植胚を5日胚の時点で固定し、ウズラ特異的抗体 (E)、胃の間葉マーカー *Barx1* mRNA (F) を検出した。胃の環境が移植片に作用し、本来発現しない *Barx1* の発現を誘導する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 石井泰雄、浦瀬香子、満友陽子	4. 巻 42
2. 論文標題 消化管間葉の器官特異性と周囲環境の影響	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 東京女子医科大学総合研究所紀要	6. 最初と最後の頁 2-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Yoshihi Koya, Kato Kagayaki, Iida Hideaki, Teramoto Machiko, Kawamura Akihito, Watanabe Yusaku, Nunome Mitsuo, Nakano Mikiharu, Matsuda Yoichi, Sato Yuki, Mizuno Hidenobu, Iwasato Takuji, Ishii Yasuo, Kondoh Hisato	4. 巻 149
2. 論文標題 Live imaging of avian epiblast and anterior mesendoderm grafting reveals the complexity of cell dynamics during early brain development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev199999
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.199999	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 -
1. 著者名 石井泰雄、浦瀬香子、満友陽子	4. 巻 41
2. 論文標題 腸特異的平滑筋層の形成に及ぼす周囲環境の影響	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 東京女子医科大学総合研究所紀要	6. 最初と最後の頁 2-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Teramoto Machiko, Sugawara Ryo, Minegishi Katsura, Uchikawa Masanori, Takemoto Tatsuya, Kuroiwa Atsushi, Ishii Yasuo, Kondoh Hisato	4. 巻 9
2. 論文標題 The absence of SOX2 in the anterior foregut alters the esophagus into trachea and bronchi in both epithelial and mesenchymal components	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology Open	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） 10.1242/bio.048728	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井泰雄、芦田航、満友陽子、八杉貞雄
2. 発表標題 鳥類胚腸間充織のアイデンティティに及ぼす周囲環境の影響
3. 学会等名 日仏生物学会第196回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井泰雄、芦田航、満友陽子、八杉貞雄
2. 発表標題 鳥類胚間充織における腸のアイデンティティの成立と周囲環境
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井泰雄、芦田航、満友陽子、八杉貞雄
2. 発表標題 鳥類胚消化管における器官特異的平滑筋層の形成
3. 学会等名 日本動物学会第92回米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井泰雄
2. 発表標題 ニワトリ胚期消化管におけるEphAおよびephrinA遺伝子群の発現
3. 学会等名 日仏生物学会193回例会
4. 発表年 2020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	菊田 幸子  (Kikuta Sachiko)  (10367089)	東京女子医科大学・医学部・助教   (32653)	
研究 分担者	浦瀬 香子  (Urase Koko)  (40349642)	東京女子医科大学・医学部・助教   (32653)	

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
---------	---------