

平成21年4月1日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590187
 研究課題名（和文） 消化管筋層における間質細胞のネットワークと運動制御機構
 研究課題名（英文） Cellular network and motility regulation of interstitial cells in the gastrointestinal musculature
 研究代表者
 飯野 哲（IINO SATOSHI）
 福井大学・医学部・准教授
 研究者番号：40242854

研究成果の概要：消化管筋層においてカハール介在細胞とともに非カハール間質細胞が独自のネットワークを構成することが明らかとなった。カハール介在細胞は c-Kit 発現細胞として、非カハール間質細胞は PDGF 受容体 α と SK3 カリウムチャンネル発現細胞として同定することが可能であり、非カハール間質細胞は消化管神経の近傍に位置し、可溶性グアニレートシクラーゼを発現し一酸化窒素神経伝達を受容することが可能であると考えられた。非カハール間質細胞はカハール介在細胞と共に消化管運動を調節すると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：非カハール間質細胞、カハール介在細胞、消化管神経系、W ミュータントマウス、Kit チロシンキナーゼ、PDGF 受容体 α 、SK3 チャンネル、消化管運動

1. 研究開始当初の背景

(1) 消化管筋層におけるカハール介在細胞

カハール介在細胞 (interstitial cells of Cajal, ICC) は消化管筋層中に存在する間質性の細胞であり、緩徐波と呼ばれる膜電位変化を平滑筋にもたらすペースメーカー機能や神経終末からの神経伝達を受容し平滑筋に伝達する機能を持ち、消化管運動の機能調節を担う間質性の細胞である。カハール介在細胞は受容体型チロシンキナーゼ c-Kit を発現し c-Kit をマーカーとして同定出来る。

(2) 消化管筋層における非カハール間質細胞

消化管筋層の電子顕微鏡的研究によりカハール介在細胞とは異なる細胞群が見出されており、その特徴から線維芽細胞様細胞 (fibroblast-like cell) と呼ばれてきた。消化管筋層のカルシウム活性化カリウムチャンネルの研究から、SK3 と呼ばれる K^+ チャンネル分子がカハール介在細胞に類似した間質細胞に発現すると報告され、カハール介在細胞とは異なる (c-Kit を発現しない) 細胞と考えられた。これらの細胞は非カハール間質細胞 (NCIC, non-Cajal interstitial cells)

と呼ばれることがあり、その細胞学的特性と機能については不明であった。

(3) 非カハール間質細胞の持つ神経伝達受容能

SK3はアパミンにより機能阻害される K^+ チャンネルであり、筋層においてアパミン感受性膜電位変化が抑制性神経刺激(ATPによると想定される)によりもたらされる。よって、非カハール間質細胞には抑制性神経情報を受容・伝達する機能が想定された。また堀口らの電子顕微鏡観察によると、非カハール間質細胞は小さなギャップ結合により周囲の細胞と連絡を持つ(J. Autn. Nerv. Sys., 2000)。これらの点から非カハール間質細胞は消化管筋層において神経や他の細胞から情報を受容し伝達する細胞と考えられた。

2. 研究の目的

(1) 非カハール間質細胞の形態学的同定とネットワーク構造の解明

非カハール間質細胞が消化管筋層内において、どの様な分布やネットワーク構築を持つのか、カハール介在細胞との関係は如何なるものか、消化管神経との関係は如何なるものか、同細胞のマーカーと考えられるSK3に対する抗体を用いて詳細に検討する。合わせて非カハール間質細胞のマーカーとなる分子の検索を行う。

(2) 非カハール間質細胞と神経伝達

一酸化窒素が作用する分子・可溶性グアニレートシクラーゼは消化管筋層においてカハール介在細胞に発現すると共にカハール介在細胞以外の細胞にも発現することが分かっている。グアニレートシクラーゼ発現細胞の同定を進め、一酸化窒素神経伝達が非カハール間質細胞においても行われうるか検討する。

3. 研究の方法

(1) 非カハール間質細胞の形態学的同定

非カハール間質細胞を同定するために特異抗体を用いた免疫組織化学法を用いる。抗体として抗SK3抗体(Alomene社の市販抗体APC-025とアミノ末端のペプチドを抗原としアフィニティー精製を行った自作抗体SR8)、抗PDGF受容体 α 抗体(Cell Signaling Tech社のウサギモノクローナル抗体D1E1E、eBioscience社のラットモノクローナル抗体APA5)を用いる。カハール介在細胞を同定するために抗c-Kit抗体(Acris社のラットモノクローナル抗体ACK4、及び自作したウサ

ギ抗体SR1)、消化管神経系を同定するために抗PGP9.5抗体(Ultraclone社のウサギ抗体RA95101)を用いた。さらに非カハール間質細胞が発現する分子を多種の抗体を用いて検索した。

抗体の特異性を検定するために、消化管筋層ホモジネートを用いたイムノプロット法を行い、抗原が入手できる場合には抗原により吸収を行った抗体を用いたイムノプロット及び免疫組織化学を行った。

形態学的解析は蛍光抗体法を用い、共焦点レーザー顕微鏡Leica TCS-SP2を用いて標本を画像化した。免疫陽性細胞の超微細形態を捉えるためにABC法を用いDABにより反応した標本をエポキシ樹脂に包埋し、電子顕微鏡で観察することも合わせて行った。

対象動物はマウス成獣を用い、通常の解析にはBALB/cマウス、カハール介在細胞欠損モデルとしてW/Wv及びWv/Wvマウスを本学実験施設で繁殖させて用いた。

分子発現を遺伝子レベルで解析するために、消化管筋層から調整したmRNAを用いたリアルタイムRT-PCR法を用いた。アプライドバイオシステム社のTaqMan Gene Expression Assay Kitを用いて定量的に解析した。

(2) 非カハール間質細胞と神経伝達

一酸化窒素による神経伝達経路を明らかにするため、シグナル伝達系分子の発現を免疫組織化学法により解析した。一酸化窒素の受容分子としての可溶性グアニレートシクラーゼに対する抗体(sGC α 1とsGC β 1に対する抗体、G4280, G4405, Sigma社)、グアニレートシクラーゼ活性化の結果産生されるcGMPに対する抗体(Dr de Vente, Maastricht Univ. より供与)、cGMP依存性プロテインキナーゼIに対する抗体(Stressgen社、KSA-PK005)を用いた。解析にはモルモット消化管を用い、共焦点レーザー顕微鏡と電子顕微鏡を用いて標本の観察解析を行った。

4. 研究成果

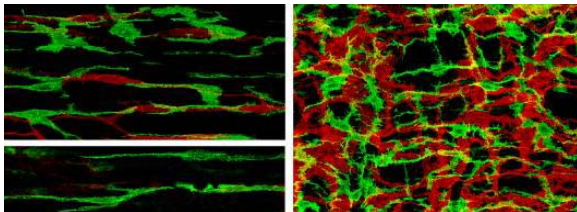
(1) 非カハール間質細胞はカリウムチャンネルSK3を発現する

非カハール間質細胞のマーカーと考えられるカリウムチャンネルSK3に対するペプチド抗体SR8を作製し、正常マウス、W/Wvマウス、Wv/Wvマウスを検索し、カハール介在細胞のマーカーであるc-Kitを発現していない別の細胞群がSK3を発現していることが明らかとなった(投稿準備中)。

(2) 非カハール間質細胞はPDGF受容体 α を発現する

非カハール間質細胞にPDGF受容体 α が特異的に発現し、SK3カリウムチャンネル発現も同時に見られることを明らかにした。Wミュータントの解析から非カハール間質細胞はカハール介在細胞とは独立して発生し、カハール介在細胞よりも多数が筋層内に存在することが明らかとなった (Iino et al. in press)。

* 下図はマウス小腸においてPDGF受容体 α 発現細胞 (緑) とc-Kit発現カハール介在細胞 (赤) の存在を示す。左は輪走筋内、右は筋層間における細胞分布。



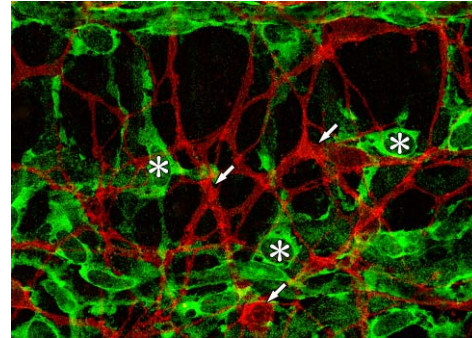
(3) 非カハール間質細胞はカハール介在細胞とは独立した細胞である

非カハール間質細胞を明確に同定するためにc-Kit遺伝子に異常を持つWミュータントマウスを自家繁殖させ解析し、従来知られているW/Wvマウスと同様のカハール介在細胞欠損をw/wマウスが示すことを明らかとした (Iino et al. 2007)。これらのマウスでは非カハール間質細胞は正常マウスと同様の分布を示し、同細胞がカハール介在細胞とは独立した細胞腫であることを示した。

(4) 非カハール間質細胞は一酸化窒素受容能を持つ

神経伝達物質としての一酸化窒素シグナルの伝達経路を検討し、一酸化窒素の受容分子グアニレートシクラーゼが主としてカハール介在細胞、また一部の非カハール間質細胞に強く発現していることを明らかにした (Iino et al. 2008)。更に、一酸化窒素により産生される2次メッセンジャーcGMPがカハール介在細胞内で誘導され、カハール介在細胞の一酸化窒素神経伝達における重要性を示した (Iino et al. in press)。またcGMP依存性キナーゼやcGMP特異的フォスホジエステラーゼがカハール介在細胞に強く発現し、一連のシグナル伝達系が発現していることを明らかにした (論文投稿準備中)。非カハール間質細胞においても発現することが観察された。

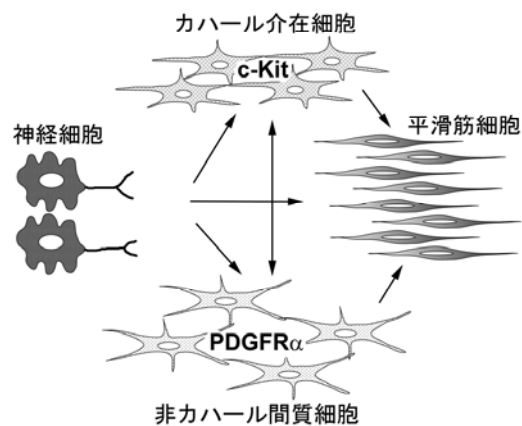
* 下図はモルモット小腸筋層間において可溶性グアニレートシクラーゼ発現細胞 (緑) とc-Kit発現カハール介在細胞 (赤) の分布を示す。



(5) まとめと展望

本研究により消化管筋層には間質性の細胞として従来より知られるカハール介在細胞 (c-Kit発現細胞) と非カハール間質細胞 (PDGF受容体 α 及びSK3発現細胞) が独立したネットワークを構成して存在することが明らかとなった。非カハール間質細胞はカハール介在細胞と共に神経伝達を受容することが可能な形態学的基盤及び分子発現をすることが明らかとなった。消化管筋層では下図に示すとおり消化管神経が筋層を支配すると共にカハール介在細胞や非カハール間質細胞を支配し、互いに調節を行い、全体として調和のとれた消化管運動を行うと考えられる。今後、各細胞の詳細な機能を検討すると共に、炎症など病態において如何なる変化がもたらされるか検討する必要がある。

消化管筋層における細胞ネットワーク



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

- ① Iino S, Horiguchi K, Horiguchi S, Nojyo Y. c-Kit-negative fibroblast-like cells express platelet-derived growth factor receptor α in the murine gastrointestinal musculature. *Histochem. Cell Biol.* (2009) in press
- ② Iino S, Horiguchi K, Nojyo Y, Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal contain signaling molecules for transduction of nitrergic stimulation in guinea pig caecum. *Neurogastroenterol. Motil.* (2009) in press
- ③ Iino S, Horiguchi K, Nojyo Y. Interstitial cells of Cajal are innervated by nitrergic nerves and express nitric oxide-sensitive guanylate cyclase in the guinea pig gastrointestinal tract. *Neuroscience* 152:437-448 (2008)
- ④ Ito T, Hioki H, Nakamura K, Kaneko T, Iino S, Nojyo Y. Some gamma-motoneurons contain gamma-aminobutyric acid in the rat cervical spinal cord. *Brain Res.* 1201:78-87 (2008)
- ⑤ Iino S, Horiguchi S, Horiguchi K, Nojyo Y. Interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal musculature of W mutant mice. *Arch. Histol. Cytol.* 70:163-173 (2007)
- ⑥ Ito T, Hioki H, Nakamura K, Tanaka Y, Nakade H, Kaneko T, Iino S, Nojyo Y. Gamma Aminobutyric acid-containing sympathetic preganglionic neurons in rat thoracic spinal cord send their axons to the superior cervical ganglion. *J. Comp.*

Neurol. 502:113-125 (2007)

- ⑦ 飯野 哲, 堀口和秀, カハール介在細胞と神経伝達. *消化管運動* 9:10-15 (2007)

[学会発表] (計11件)

- ① 飯野 哲 (2008年10月12日) マウス小腸カハール介在細胞の発生における、第68回日本解剖学会中部地方会 (愛知)
- ② 飯野 哲 (2008年9月30日) カハール介在細胞における一酸化窒素受容システム、第7回日本神経消化器病学会 (東京)
- ③ 飯野 哲 (2008年7月4日) カハール介在細胞はcGMPシグナル伝達系分子を発現する、第50回日本平滑筋学会総会 (弘前)
- ④ 飯野 哲 (2008年3月28日) Wミュータントマウスにおける消化管カハール介在細胞、第113回日本解剖学会総会 (大分)
- ⑤ 飯野 哲 (2008年3月28日) 消化管カハール介在細胞におけるcGMPシグナル伝達系分子、第113回日本解剖学会総会 (大分)
- ⑥ 飯野 哲 (2007年10月13日) イマチニブ投与によるマウス胃底部でのカハール介在細胞欠損と神経筋伝達不全、第67回日本解剖学会中部地方会 (愛知)
- ⑦ Satoshi Iino (6 October 2007) Loss of interstitial cells of Cajal and neuromuscular transmission caused by imatinib administration in the murine gastric fundus, The 4th Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience, Kyoto Japan
- ⑧ Satoshi Iino (28 September 2007) Interstitial Cells of Cajal (ICC-IM) Are Cellular Targets for Nitric Oxide

Dependent Neurotransmission, The 21st
International Symposium on
Neurogastroenterology and Motility, Jeju,
Korea

⑨ Satoshi Iino (28 August 2007)
Interstitial Cells of Cajal (ICC-IM) Are
Cellular Targets for Nitric Oxide
Dependent Neurotransmission, The 4th
Pfizer Science and Research Symposium,
Nagoya Japan

⑩ 飯野 哲 (2007年7月5日) カハール介在細胞は一酸化窒素を受容する、第49回日本平滑筋学会総会 (奈良)

⑪ 飯野 哲 (2007年5月21日) 消化管運動調節を司るカハール介在細胞の機能形態学的研究、日本顕微鏡学会第63回学術講演会・風戸研究奨励会シンポジウム (風戸奨励賞受賞講演) (新潟)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯野 哲 (IINO SATOSHI)
福井大学・医学部・准教授
研究者番号：40242854

(2) 研究分担者

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

伊藤 哲史 (ITO TETSUFUMI)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：90334812

(3) 連携研究者

無