

機関番号 : 34519
 研究種目 : 基盤研究 (C)
 研究期間 : 2007 ~ 2010
 課題番号 : 19590411
 研究課題名 (和文) KIT 遺伝子改変動物を用いた消化管運動ペースメーカー細胞に発現する分子の解析
 研究課題名 (英文) Analysis of the molecular mechanism in gastrointestinal pacemaker cell using KIT knock-in animal
 研究代表者
 磯崎 耕次 (ISOZAKI KOJI)
 兵庫医科大学・医学部・非常勤講師
 研究者番号 : 00425117

研究成果の概要 (和文) :

我々は、ICCに特異的に発現する分子を調べることを目的としており、接着分子であるcell adhesion molecule(CADM1)に注目し、解析を進めた。その結果、CADM1はICCだけでなく、GISTにも発現していることが明らかとなった。ヒトの散発性GISTについて調べた結果、小腸GIST (N=5)にCADM1蛋白およびmRNAが発現していたのに対して、胃GIST(N=5)には発現していないことが明らかとなった。以上の結果より、ヒトにおいて胃、小腸GISTでは細胞起源とするICCのタイプが異なっていることが示唆された。ここまでの研究成果を投稿準備中である。

研究成果の概要 (英文) :

CADM1 is an adhesion molecule mediating nerve-mast cell interactions. It was demonstrated that both CADM1 protein and mRNA expressed in GISTs of human small intestine but not in GISTs of human stomach. These results suggested that types of ICCs which are considered to be an origin of GISTs are different between gastric and intestinal GISTs.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 基礎医学 実験病理学

キーワード：(1) 多発性GIST (2) ノックインマウス (3)カハールの介在細胞 (4) c-kit 遺伝子 (5) 生殖系列 (6) 機能獲得性突然変異

1. 研究開始当初の背景

カハールの介在細胞(interstitial cells of Cajal= ICCs) はほぼ全消化管筋層に分布し、神経からの刺激を効率よく平滑筋細胞に伝達するとともに、自発的電氣的興奮をし、消化管内容物を運搬するのに有効な蠕動波を生み出す、消化管蠕動運動のペースメーカーの役割をしている。ICCs は約 100 年前に提唱されたが、ICCs を筋層平滑筋細胞を区別し、認識する方法は唯一電子顕微鏡による観察のみであったことから、ICCs に関する研究は長らく停滞していた。我々や諸家の研究により、ICCs に c-kit 受容体型チロシンキナーゼ (KIT) が発現していることが明らかになり、免疫染色法や in situ hybridization 法により、容易に認識できるようになった (Isozaki K et al. 109:456, 1995 Gastroenterology)。さらに、我々や諸家の研究により、KIT は ICCs の分化、増殖に必須であること、ICCs と平滑筋細胞は発生過程で共通の前駆細胞から分化することが明らかとなり、ICCs に関する研究は飛躍的に進歩した。我々は KIT をコードしている ckit 遺伝子に KIT の機能を減弱する機能喪失性変異を持つ動物 (Ws ミュータントラット) において ICCs が減少しており、それに基づく消化管運動異常がみられることを報告した (Isozaki K et al. 109:456, 1995 Gastroenterology)。さらに、我々は、特発性慢性偽腸閉塞症や二次性慢性偽腸閉塞症を引き起こす代表的疾患である糖尿病の症例の消化管筋層において、ICCs が減少していることを明らかにしてきた (Isozaki K et al. 92:332, 1997 Am J Gastroenterol, Nakahara M and Isozaki K et al. 17:666, 2002 J Gastroenterol Hepatol)。

一方、我々は、細胞起源が不明であった Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) に KIT が発現していることを発見し、検討の結果、GISTs は ICCs 由来の腫瘍であることを報告し、現在、この考えは世界中でコンセンサスを得ている (Hirota S and Isozaki K et al. 279:577, 1998 Science)。さらに、我々は、GISTs に発現する c-kit 遺伝子に KIT を恒常的に活性化させる機能獲得性変異が体細胞レベルでみられ、それが ICCs の腫瘍化に関与していることも明らかにした。我々は、家族性多発性 GISTs 症例において germline レベルで c-kit 遺伝子の機能獲得性変異がみられ、同時に、消化管筋層において ICCs の過形成がみられることを報告した (Nishida T, Hirota S and Isozaki K et al. 19:323, 1998 Nature genet, Isozaki K et al. 157:1581 2000 Am J Pathol)。現在、GISTs 対して KIT 阻害剤である分子標的薬 グリベックやスーテントによる治療が行われ、進行した GISTs 症例の予後が飛躍的に改善されたが、以上の我々の研究成果が大きく寄与している。最近、我々は、GISTs の腫瘍発生機構を調べる目的で、家族性 GISTs でみつけた c-kit 遺伝子のチロシンキナーゼ II 領域の機能獲得性変異 (codon 820 番 Asp to Tyr) に相当するマウス型変異を knock-in targetting 法を用いてマウスに導入した。作成された knock-in マウス (Asp820Tyr マウス) の消化管筋層に GISTs が発生することを確認するとともに、ICCs が増殖し層を形成していることに気がついた (Nakai N. and Isozaki K et al. 214:302, 2008 J Pathol)。我々は、作成した Asp820Tyr マウスの消化管筋層より、セルソーティング法を用いて、大量の KIT 陽性細胞、つまり、ICCs を採集す

る方法を確立した

2. 研究の目的

これまで、ICCsの分化、増殖機構の解明は進んだが、ICCsの機能が神経からのどのような伝達物質により制御されているのか、また、ICCsがどのように平滑筋細胞の収縮弛緩を制御しているのか、ICCsを介した消化管運動調節機構についてはほとんどわかっていない。以上を解明することは、過敏性大腸症候群など消化管運動異常症の病態解明および、ICCsをターゲットにした消化管運動調節薬の開発に繋がることから、極めて重要である。すでに、我々は、採取したICCsからmRNAを抽出し、cDNAおよびcDNAライブラリーの作製に成功した。本研究ではさらにICCsに高発現している分子を調べ、ICCsを介した消化管運動調節機構を明らかにすること、ICCsのcounterpartであるGISTsの腫瘍発生機構を調べることを目的とする。

3. 研究の方法

ICCs細胞の採集

(1) 2ヶ月齢のc-kit遺伝子改変マウス(Asp820Tyrマウス)より、胃を摘出し、長軸方向に展開する。解剖顕微鏡にて、GISTs発生の有無を確認する。これまでの検討により、c-kit遺伝子改変マウスにおいて、GISTsは盲腸部にのみ発生がみられたが、解剖顕微鏡による観察で、胃にGISTsが見られた場合は、GISTsを切除、除去する。

(2) カバーガラスを用いて機械的にAsp820Tyrマウス胃粘膜を剥離除去しcollagenase(1mg/ml)によりシングルセル化する。シングルセル化した細胞をFITCで標識した抗KIT抗体を用いて免疫染色し、高機能セルソーター(BD Bioscience FACS Aria)により、KIT陽性細胞(ICCs)を回収する。上記の操作を繰り返し、109個のICCsを採集する。

ICCs細胞のcDNAライブラリーの作製

採集したICCs細胞より、guanidine isothiocyanate法を用いてRNAを抽出する。逆転写酵素を用いて、cDNAに変換後、cDNAライブラリーを作製する。

消化管平滑筋細胞の採集およびcDNAライブラリーの作製

ICCsと消化管平滑筋細胞は共通の前駆細胞から分化することが明らかとなっており、ICCsに特異的に発現する分子を見つけるためには、平滑筋細胞との遺伝子発現の違いを比較するのが、最も効率がよいと考えられる。平滑筋細胞は消化管筋層において特異的にアセチルコリンレセプターを発現していることから、シングルセル化したAsp820Tyrマウスの胃筋層細胞をフィコエリスリンで標識した抗アセチルコリンレセプター抗体を用いて免疫染色し、高機能セルソーター(BD Bioscience FACS Aria)により、アセチルコリンレセプター陽性細胞(平滑筋細胞)を回収する。上記の操作を繰り返し、10⁹個の平滑筋細胞を採集する。採集した平滑筋細胞より、guanidine isothiocyanate法を用いてRNAを抽出する。逆転写酵素を用いて、cDNAに変換後、cDNAライブラリーを作製する。

ICCsに発現する分子のブラッシュアップ

以上より得られた、ICCsおよび平滑筋細胞のcDNAライブラリーを用いて、ICCsと平滑筋細胞間の遺伝子の発現の違いを検討する。多数の遺伝子発現の違いがみられると予測されるが、その中で、まず、ICCsに特異的に発現する分子を選び出す。

4. 研究成果

まず、作成したc-kit遺伝子のノックインマウスの特性を調べた。ヘテロノックインマウスでは、回盲部にGISTの発生、遠位食道、胃、近位十二指腸および大腸にICCの過形成を認

めた。ホモノックインマウスでは、ヘテロノックインマウスの場合と比較し、回盲部のGISTのサイズが大きく、また、より増殖したICC過形成像がみられた。次に、ノックインマウスに発生するGISTに対するイマチニブの抗腫瘍効果を調べた。その結果、イマチニブはin vivoにおいて、GIST増殖を抑制するが、GISTの腫瘍サイズを減少させないことが明らかとなった。この結果は、イマチニブがKITおよびKITの下流シグナルを十分に抑制できないことが原因であると考えられた。続いて、c-kit遺伝子のノックインマウスの消化管から高機能セルソーターを用い回収したICCのcDNAライブラリーを作成し、DNA Tipにより発現遺伝子を調べた結果、ICCに特異的に発現する分子が複数見つかった。その中で、まず、接着分子であるcell adhesion molecule(CADM1)に注目し、解析を進めた。その結果、c-kit遺伝子のノックインマウスにおいて、CADM1はICCだけでなく、GISTにも発現していることが明らかとなった。そこで、ヒトについて検討した結果、免疫染色において、正常消化管のICCにもCADM1が発現していることが分かった。さらに、ヒトの散発性GISTについて調べた結果、小腸GIST(N=5)にCADM1蛋白およびmRNAが発現していたのに対して、胃GIST(N=5)には発現していないことが明らかとなった。以上の結果より、ヒトにおいて胃、小腸GISTでは細胞起源とするICCのタイプが異なっていることが示唆された。ここまでの研究成果を投稿準備中である。現在、CADM1がGISTの腫瘍発生機構に関与しているのか、また、ICCに発現するCADM1が消化管運動調節に関与しているかについて、検討を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Isozaki K, Ishikawa T, Nakai K, Hirota S. in vivo effect of imatinib on progression of cecal GIST-like tumors in exon 17-type c-kit knock-in mice, Lab Invest, 査読あり, 89, 2009, 1161-1168

② Isozaki K, Nakai N, Hirota S. A mouse model of a human multiple GIST family with KIT-Asp820Tyr mutation generated by a knock-in strategy, J Pathol, 査読あり, 214, 2008, 302-311

[図書] (計1件)

① Isozaki K, 他, Bentham, Molecular mechanism and morphology in cancer, 2010, 144

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯崎 耕次 (ISOZAKI KOJI)
兵庫医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：00425117

(2) 研究分担者

廣田 誠一 (HIROTA SEIICHI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：50218856