

機関番号：13401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790655

研究課題名（和文） ICC発生調節機構の解析とICC幹細胞の探求

研究課題名（英文） Identification of molecules regulating the development of intestinal pacemaker cells (ICC) and search for ICC stem cell

研究代表者

堀口 和秀 (HORIGUCHI KAZUHIDE)

福井大学・医学部・講師

研究者番号：20377451

研究成果の概要（和文）：消化管筋層にはカハール介在細胞（ICC）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。本研究では胎生期におけるICC前駆細胞を単離し分子生物学的解析を行い、当該細胞の発生に関わる分子機構について示唆することができた。さらに胎生期におけるICC前駆細胞を、セルソーターを用いてより特異的に単離する方法の確立に成功した。

研究成果の概要（英文）：Interstitial cells of Cajal (ICC), which are located in the gastrointestinal musculature, are suggested to be pacemaker cells of the gut motility. In this study we examined the gene expression of ICC precursor cells during the embryonic stage of mice to clarify the genes associated with the development of ICC. By using DNA microarray we found some candidate genes including BMP signaling related genes and TGFβ signaling related genes. In addition we established specific isolation of ICC using a cell sorter.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：微細形態学、消化器病学

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：カハール介在細胞（ICC）、消化管、発生、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

(1) 蠕動運動をはじめとする消化管運動は、筋層を構成する平滑筋細胞の調和のとれた運動によって実現される。その調節機構としては、外来性の交感副交感神経に加えて壁内

神経叢（腸管神経系）が第一に挙げられるが、さらにカハール介在細胞（Interstitial cells of Cajal; ICC）と呼ばれる特殊な間質性細胞の役割が重要である。

(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、その他の分子の役割については分かっていない。申請者はこの点について、胎生14日マウスを用いた解析により、新たにICCの発生に関わる候補遺伝子を見出してきた。

(3) さらに形態学的解析から、ICC前駆細胞の発生がKIT依存性になるのは胎生16日以降であり、それ以前はKIT非依存性に発生することが明らかとなったため、申請者は、ICCの発生については胎生16日以降の検討が重要であるとの考えを持つに至った。

(4) また、ICCは2型糖尿病や実験的腸閉塞モデルなどにおいて傷害を受け減少するが、障害が除かれるとICCも回復することが報告されている。この点については、障害による何らかのシグナルにより一度脱分化して平滑筋様になったものが再分化してICCに戻るという考えもあるが、生体組織中にICCのいわば幹細胞が存在し、回復期にはこれから新たにICCが分化してくる可能性もある。

2. 研究の目的

(1) 以上の背景をふまえて、本研究では第一に胎生期におけるICC前駆細胞が発現する分子を解析し、その細胞学的特性を明らかにすることを目的とする。具体的にはICCがc-KIT依存性に分化を始める胎生16日以降について野生型-Wミュータント(ICC欠損マウス)のサブトラクティブ・ハイブリダイゼーション・microarray・定量PCR・免疫組織化学・in situ hybridizationを行い、ICC前駆細胞特定遺伝子を同定するとともに、新規に同定された遺伝子の働きについて機能的解析を行い明らかにする。

(2) 第二の目的として、ICC幹細胞の同定および発生機構について検討する。すなわち、胎生期におけるIGF-1、KIT、CD44、Insr、Igf1rの遺伝子・タンパク発現を定量PCR法および免疫組織化学的手法により解析し、ICC幹細胞(Lorinczらの報告した“ICC progenitor”)が胎生期にも存在するのか、存在するとしたらそれは申請者が研究対象とする発生途上のICC前駆細胞と一致するのか、あるいはその一部であるのか、またはまったく異なるpopulationであるのかについて検討したい。

3. 研究の方法

(1) 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、初年度は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microarray法により検索を行った。具体的には胎生16,17,18日のBALB/cマウス胎仔の遠位回腸をコラゲナーゼ処理して細胞分散し、KIT発現細胞を磁気抗体を用いて標識した後、MACS(Miltenyi Biotec)分離法により細胞分取を行った。その後、各サンプルよりRNA抽出、cDNA合成後、microarray(Agilent Technologies)による遺伝子発現解析を行った。

(2) 上記の磁気ビーズ標識抗体を用いた細胞分取法は、特異性の高い手法として確立されているものの、消化管にはICC以外にもマスト細胞や胎生期における腸上皮細胞がKITを発現することが想定されるため、当初の研究目的に加えて、ICC(およびその前駆細胞)のより特異性の高い分取方法の開発が必須と考えられるに至った。そこで次年度はより特異的にICCを分取するためにセルソーターによるICC分取法の確立を目指して実験

を行った。マウス胎生期小腸を酵素処理し細胞分散した後に、蛍光標識 KIT 抗体および CD45 抗体（マスト細胞特異マーカー）、E-cadherin 抗体（上皮細胞特異的マーカー）で染色し、セルソーターにより KIT⁺CD45⁻E-cadherin⁺細胞として ICC の分取を試みた。

4. 研究成果

(1) MACS 分離法による KIT 陽性細胞の遺伝子発現の変化

MACS 分離法による分離後の細胞から抽出した RNA は agilent バイオアナライザ 2100 の解析の結果から、高品質のものであることが確認できたため、microarray の解析を進めた。

この実験は方法手段として、KIT 抗体を用いての細胞分取を用いている。このため、分取した細胞は KIT の発現が高いことが、コントロールの意味を持つ。本研究において、microarray での KIT 発現は、いずれの段階においても、非常に高い発現量であることを確認し、本研究の細胞分取法が有効であることが確認できた。

そこで、microarray による解析を進めた結果、胎生 16 日以後に発現量が顕著に増加する遺伝子群を新たに見出すことができた。特に、細胞発生への関与が深く考えられる遺伝子群として、骨形成因子 (BMP) シグナリングに関連する遺伝子、TGFβ シグナル関連遺伝子、細胞接着因子、signal transduction に関連する遺伝子などに顕著な遺伝子変化が見出された。

BMP シグナリングに関連する遺伝子としては、BMP 受容体タイプ 1B、BMP inducible

kinase、SMAD1、TGFβ シグナル関連遺伝子としては、TGFβ 受容体、smad 3) に顕著な発現量の増加が認められ、胎生 16 日の発現量と比較して、3 倍から 5.8 倍の発現量であった (図 1、図 2)。

	Log10 Ratio	
	E17/E16	E18/E16
bone morphogenetic protein receptor, type 1B (Bmpr1b)	0.79	1.52
BMP2 inducible kinase (Bmp2k)	1.18	0.9
SMAD1	1.74	1.68
core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2, translocated to, 3 (Cbfa2t3)	1.22	1.32

図1 BMP signaling関連遺伝子

	Log10 Ratio	
	E17/E16	E18/E16
transforming growth factor, beta receptor 1 (Tgfb1)	1.14	1.00
SMAD3	1.67	1.60
mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3 (Mapkapk3)	1.54	1.34

図2 TGF-β signaling関連遺伝子

加えて、細胞接着因子 (Cadherin1、cadherin associated protein delta1、mucin-like protocadherin transcript variant 1、mucin-like protocadherin transcript variant 2、protocadherin 24、cingulin) に関しては、胎生 16 日と比較して胎生 18 日では、4 倍から 13 倍の非常に高い発現量を示している。

その他の遺伝子としては signal transduction に関係する遺伝子として、cGMP-dependent protein kinase type II、adenylate cyclase 8、adenylate cyclase 7 transcript variant 1、adenylate cyclase 7 transcript variant 3、ATPase Na⁺/K⁺ transporting alpha 1 polypeptide、ATPase class I type 8B member 1 などが候補遺伝子として挙げられ、胎生 16 日と比較して胎生

18日では9倍から13倍の非常に高い発現量が観察された。

胎生後期 KIT 発現細胞における BMP/TGF β シグナル関連遺伝子および各種細胞接着因子の発現量の増加は、この時期の ICC の発生にこれらの遺伝子が関与することを示唆するものである。

(2) セルソーターによる ICC 分取法の確立

上述の実験は磁気標識抗 KIT 抗体を用いて KIT 発現細胞を特異的に分取した後に行ったものであるが、研究を進める過程でより特異的に ICC のみを分取する方法が必要であると考えられたため、セルソーターによる ICC 分取法の確立のため実験を行った。具体的には、胎生期マウス小腸を摘出し酵素処理による細胞分散後、蛍光標識 KIT 抗体および CD45 抗体（マスト細胞特異マーカー）、E-cadherin 抗体（上皮細胞特異的マーカー）で染色し、セルソーターにより KIT⁺CD45⁻E-cadherin⁺細胞として ICC の分取を試みた。

FACSセルソーターによる細胞分取の結果（図3, 4）は、胎生15日では全細胞数 3×10^6 個に対し KIT⁺CD45⁺細胞は 4.5×10^2 個、KIT⁺CD45⁻細胞は 2.5×10^3 個、胎生16日では全細胞数 1×10^7 個に対し KIT⁺CD45⁺細胞は 1.3×10^3 個、KIT⁺CD45⁻細胞は 1×10^4 個、胎生17日では全細胞数 4×10^7 個に対し KIT⁺CD45⁺細胞は 4.0×10^4 個、KIT⁺CD45⁻細胞は 1.4×10^4 個、胎生18日では全細胞数 5×10^7 個に対し KIT⁺CD45⁺細胞は 2.5×10^4 個、KIT⁺CD45⁻細胞は 1.2×10^4 個であった。KIT⁺CD45⁻細胞に関するこの結果は、胎生期における KIT 免疫染色の結果ともほぼ一致するものであった。さらに分取する細胞の精度を上げるため、上皮特異的マーカーである E-cadherin 抗体を加えた3種類の蛍光抗体により染色を行い、c-KIT⁺CD45⁻E-cadherin⁺細胞の分取を行い、

良好な結果が得られた。

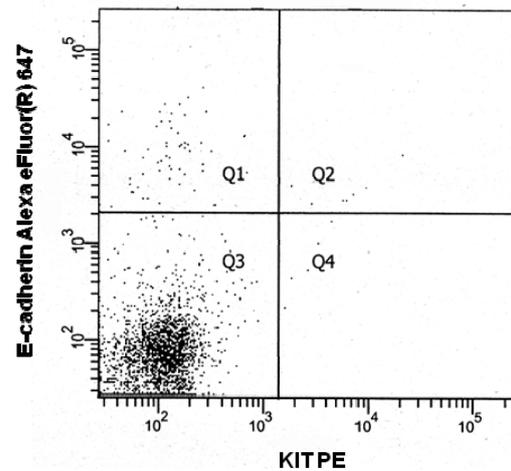


図3

Alexa eFluor(R) 647標識E-cadherin抗体、eFluor(R) 450標識CD45抗体、PE標識KIT抗体の三重染色によるドットプロット解析(E-cadherin⁺、KIT⁻細胞)

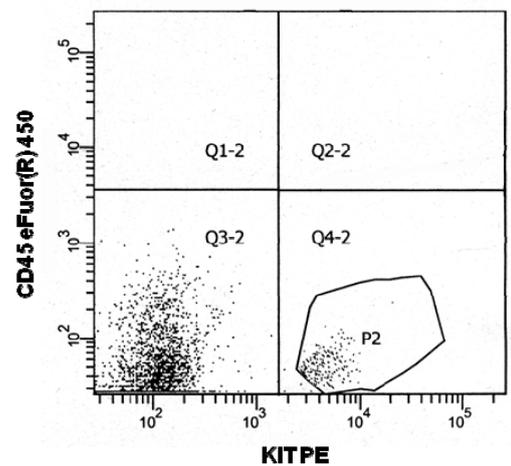


図4

Alexa eFluor(R) 647標識E-cadherin抗体、eFluor(R) 450標識CD45抗体、PE標識KIT抗体の三重染色によるドットプロット解析(CD45⁻、KIT⁺細胞)

現在までに、同方法を用いて胎生15日の胎仔 62 匹の小腸からの 1.9×10^5 個の KIT⁺CD45⁻E-cadherin⁺細胞を分取した。同方法によって得た細胞から RNA 抽出し検定したところ、以後の解析に進むのに十分な質の RNA が得られていることが確認された。この方法により、今後は磁気抗体標識法以上に精度の高い ICC 発現遺伝子の解析が行えるものと期待された。ICC の発生や障害・再生時に

おける今後の遺伝子発現解析につなげていきたいと考えている。

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 1 件)

- ① Horiguchi S, Horiguchi K, Nojyo Y, Iino S, Downregulation of msh-like 2 (msx2) and neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 (ntrk2) in the developmental gut of KIT mutant mice, *Biochem Biophys Res Commun.*、査読有、396 (3)、774-779、2010

[学会発表] (計 5 件)

- ① 堀口里美, 堀口和秀, 飯野哲, Differential screening による胎生期カハール介在細胞特異的遺伝子の探索, 第 116 回 日本解剖学会総会, 横浜, 2011. 3. 29 (地震のため書面による発表になった)
- ② 堀口和秀, 堀口里美, 飯野哲, 胎生期マウスにおける小腸ペースメーカー細胞の発生, 第 51 回日本組織細胞化学会総会, 東京都, 2010. 9. 4
- ③ 堀口和秀, 堀口里美, 飯野哲, Differential screening による ICC 特異遺伝子の探索, 第 115 回 日本解剖学会総会, 盛岡, 2010. 3. 30
- ④ 飯野哲, 堀口和秀, 堀口里美, 野条良彰, W ミュータントマウスにおける小腸カハール

介在細胞の発生, 第 50 回日本組織細胞化学会総会, 大津市, 2010. 9. 27

- ⑤ 堀口里美, 堀口和秀, 野条良彰, 飯野哲, 胎生 W マウスを用いたカハール介在細胞の発生に関する形態学的・分子生物学的解析, 第 51 回日本平滑筋学会総会, 名古屋, 2009. 7. 22

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 連携研究者

堀口 里美 (HORIGUCHI SATOMI)
福井大学・重点研究高度化推進本部・特命助教
研究者番号：00595283