

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590250

研究課題名(和文)消化管における新しい機能調節素子としての線維芽細胞

研究課題名(英文)Fibroblasts and related cells in gastrointestinal tract

研究代表者

飯野 哲 (IINO, SATOSHI)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：40242854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：線維芽細胞および関連する間質細胞は、多様性を持ち各臓器において固有の機能を担うことを検討した。消化管において筋層にはPDGF受容体とSK3カリウムチャネルを発現する線維芽細胞とc-KitとTMEM16Aを発現する間質細胞(カハール介在細胞)、粘膜にはPDGF受容体を発現する上皮線維芽細胞(筋線維芽細胞)、粘膜下組織にはPDGF受容体とCD34を発現する線維芽細胞が分布した。またサイトグロビンは広く線維芽細胞に発現することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Fibroblasts and related cells including interstitial cells are thought to have proper functions in each organs. In this study, we analyzed fibroblasts in the murine gastrointestinal (GI) tract. In the GI musculature, there are two types of cells, fibroblasts (fibroblast-like cells) having platelet derived growth factor receptor (PDGFR) and SK3 potassium channel, and interstitial cells of Cajal (ICC) having c-Kit tyrosine kinase and TMEM16A. In the GI mucosa, subepithelial fibroblasts (myofibroblasts) showed PDGFR immunoreactivity and submucosal fibroblasts showed PDGFR and CD34 immunoreactivities. We also detected Cytoglobin immunoreactivity using newly generated antibody in various fibroblasts in the GI tract.

研究分野：解剖

キーワード：消化管 線維芽細胞 カハール介在細胞 平滑筋細胞 PDGF受容体 c-Kit

1. 研究開始当初の背景

線維芽細胞は、全身において結合組織を形成し各臓器の実質を支える組織の骨格として存在する。また実験医学的には iPS 細胞作製の出発点となり、臓器実質細胞への再プログラム化 (direct reprogramming) 研究にも用いられる。一方、慢性炎症においては線維芽細胞に由来する筋線維芽細胞が線維化を誘発し、腫瘍においては腫瘍関連線維芽細胞 (cancer associated fibroblast, CAF) が腫瘍の性質を左右する。では、正常組織における線維芽細胞は臓器や組織において各部位に特異性を持ち特異的な機能を持つのであろうか。

申請者は消化管筋層において運動調節に関与する間質細胞:カハール介在細胞 ICC を中心に研究を進めてきた。本細胞は線維芽細胞の類型とも言える形態学的特徴を持ち、広く間質細胞ととらえられる。機能的解析からカハール介在細胞が消化管運動に関わる事実が増えるほど、同時にカハール介在細胞だけでは説明しきれない報告が増えてきた。申請者は研究の過程で、別種の間質細胞を同定し、線維芽細胞様細胞 (fibroblast-like cells : FLC) と呼ばれてきた一種の線維芽細胞であると明らかにした (Iino et al, 2009)。線維芽細胞 FLC は PDGF 受容体 α (PDGFR α)、SK3 カリウムチャンネルを発現し、消化管粘膜を始めとする全身の線維芽細胞とは異なる特徴を持つ。さらに機能への関与を示唆する神経終末との近接、平滑筋細胞とのギャップ結合による接触、一酸化窒素受容分子であるグアニレートシクラーゼの発現を報告した。これらは線維芽細胞 (様細胞) と考えられてきた本細胞が消化管運動に関与することを示唆している。

カハール介在細胞欠損動物 (W ミュータントマウスなど) では抑制性神経伝達の早い成分 (主に ATP-プリン受容体に依存する IJP) の残存が知られていた。申請者は残存する成分はカリウムチャンネル SK3 が関与することから SK3

発現細胞を検索し、PDGFR α を発現する線維芽細胞であることを明らかにし、消化管運動への関与を示唆した (Iino et al, 2009)。2011 年、米国ネバダ大のグループは PDGFR α をマーカーとして筋層内線維芽細胞を単離し、電気生理学的にプリン受容体-SK3 カリウムチャンネルによる抑制性情報伝達の存在を示した (J.Physiol. 589:697-710)。この研究は Perspective (J.Physiol. 2011) として申請者の論文を引用し取り上げられ、線維芽細胞の臓器調節能は注目されつつある。

2. 研究の目的

線維芽細胞の細胞生物学的特徴を他の間質細胞と比較しつつ明らかにすることにより、消化管における線維芽細胞の臓器調節能を明らかにすることを目的とした。特に比較の対象として研究の進んでいる間質細胞であるカハール介在細胞を取り上げ、両者の特性について研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 線維芽細胞の機能形態学的特徴の解析

線維芽細胞の多様性を明らかにするため同細胞の DNA マイクロアレイを行い、特徴的な発現分子の解析を行った。続いて線維芽細胞での発現を明らかにするため、抗体を用いた免疫組織化学法による解析を行った。対象分子のいくつかに関してはペプチド合成による抗原を用いて動物に免疫を行い、抗体を作製し免疫組織化学法を行った。

(2) 間質細胞の機能形態学的解析

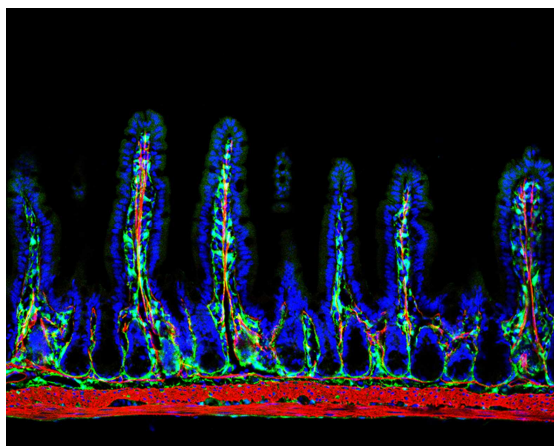
線維芽細胞を代表とする間質細胞の詳細な免疫組織化学的解析を進めるため、レポーター遺伝子を導入したマウス (c-Kit-copGFP, PDGFR α -EGFP, Myh11-Cre-EGFP) を用いた。

4. 研究成果

(1) 線維芽細胞の機能形態学的特徴の解析

線維芽細胞の中で PDGF 受容体 α を発現する細胞群を PDGFR α -EGFP マウス小腸よりセルソーターにより調整し、マイクロアレイを行った。アレイ解析の結果から発現の明らかな分子としてサイトグロビンに着目し、その発現解析を進めるために合成ペプチドを抗原として抗体を作製した。サイトグロビンは PDGF 受容体 α 発現を示す筋層内線維芽細胞のみならず、粘膜内の多くの線維芽細胞に発現が見られた。

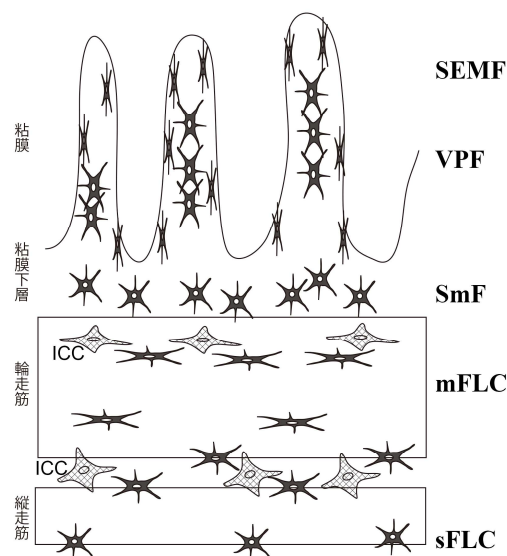
(下図: マウス小腸におけるサイトグロビン発現, サイトグロビン発現細胞は緑、平滑筋アクチンは赤、核は青で示す。サイトグロビン発現細胞は絨毛内の間質や粘膜下組織、筋層内に分布している。)



サイトグロビンはヘモグロビンなど一連のファミリーを形成するグロビン蛋白質であり組織中のガス代謝に関与することが示唆されており、線維芽細胞がその機能を担うことが考えられた。

次いで PDGF 受容体のもう一つのサブタイプである PDGF 受容体 β の発現についても検討を行った。同分子は血管周皮細胞に発現が知られるが、小腸粘膜を詳細に観察したところ、絨毛間質の線維芽細胞に分布し、一方 PDGF 受容体 α を発現する上皮下線維芽細胞では陰性であった。これらの発現解析とこれまでの結果をまとめると、絨毛粘膜上皮直下の筋線維芽細胞 SEMF (subepithelial myofibroblast : PDGFR α

+NG2 陽性)、絨毛固有層の線維芽細胞 VPF (villous lamina propria fibroblast : PDGFR β 陽性)、粘膜下組織の線維芽細胞 SmF (submucosal fibroblast : PDGFR α +PDGFR β +CD34 陽性)、筋層内線維芽細胞 mFLC (muscular fibroblast-like cell : PDGFR α +SK3 陽性)、漿膜直下の線維芽細胞 sFLC (serosal fibroblast-like cell : PDGFR α +SK3+CD34 陽性)として分類できる(下図)。



(2) 間質細胞の機能形態学的解析

消化管において線維芽細胞とカハール介在細胞の神経伝達に關与する機能を明らかにするため、ムスカリン性アセチルコリン受容体の発現を調べた。両細胞をセルソーターにより分離収集し、リアムタイムPCR法を用いて解析を行ったところ、M2およびM3サブタイプの発現のみを認めた。発現量の多いM2受容体発現をマウス消化管で免疫組織化学的に検索したところ、線維芽細胞とカハール介在細胞ともにM2受容体を発現し、かつコリン作動性神経終末(小胞体性アセチルコリントランスポーターを発現する)の近接を認めた。この結果から両細胞はアセチルコリンに反応する機能性があると考えられた。

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 5 件)

① Maehara T, Matsumoto K, Horiguchi K, Kondo M, Iino S, Horie S, Murata T, Tsubone H, Shimada S, Ozaki H, Hori M. Therapeutic action of 5-HT₃ receptor antagonists targeting peritoneal macrophages in post-operative ileus. *Br J Pharmacol.* 172(4):1136-47(2015). DOI: 10.1111/bph.13006. 査読有

② Islam M, Kusakabe M, Horiguchi K, Iino S, Nakamura T, Iwanaga K, Hashimoto H, Matsumoto S, Murata T, Hori M, Ozaki H. PDGF and TGF- β promote tenascin-C expression in subepithelial myofibroblasts and contribute to intestinal mucosal protection in mice. *Br J Pharmacol.* 171:375-388(2014). DOI:10.1111/bph.12452. 査読有

③ Tanahashi Y, Ichimura Y, Kimura K, Matsuyama H, Iino S, Komori S, Unno T. Cholinergic neuromuscular transmission mediated by interstitial cells of Cajal in the myenteric layer in mouse ileal longitudinal smooth muscles. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 387:377-388(2014). DOI:10.1007/s00210-013-0944-2. 査読有

④ Shozib HB, Suzuki H, Iino S, Nakayama S. Acceleration of Ileal Pacemaker Activity in Mice Lacking Interleukin-10. *Inflammatory Bowel Diseases* 19 :1577-85(2013). DOI:10.1097/MIB.0b013e31828eedf5. 査読有

⑤ Tanahashi Y, Waki N, Unno T, Matsuyama H, Iino S, Kitazawa T, Yamada M, Komori S. Roles of M2 and M3 muscarinic receptors in the generation of rhythmic motor activity in mouse small intestine. *Neurogastroenterol Motil.* 25 :e687-97(2013). DOI: 10.1111/nmo.12194. 査読有

[学会発表] (計 16 件)

① 堀口 里美, 堀口 和秀, 飯野 哲: マウス消化管におけるカハール介在細胞と線維芽細胞におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の発現, 第 120 回日本解剖学会全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会 合同大会, 2015.03.22, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

② 堀口 和秀, 堀口 里美, 日下部 守昭, 尾崎 博, 飯野 哲: 成体マウス消化管におけるテネascin C 産生細胞, 第 120 回日本解剖学会全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会 合同大会, 2015.03.22, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

③ 飯野 哲, 堀口 和秀, 堀口 里美: 消化管間質細胞におけるサイトグロビン発現, 第 55 回日本組織細胞化学会総会, 2014.09.27, 松本市中央公民館(長野県・松本市)

④ 飯野 哲, 堀口 和秀: マウス盲腸において c-Kit を発現する平滑筋細胞, 第 56 回日本平滑筋学会総会, 2014.08.7, 新横浜プリンスホテル(神奈川県・横浜市)

⑤ 飯野 哲, 堀口 和秀: c-Kit を発現する盲腸平滑筋細胞, 第 70 回日本顕微鏡学会総会, 2014.05.11, 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

⑥ 飯野 哲, 堀口 里美, 堀口 和秀: 消化管における各種間質細胞でのサイトグロビン発現, 第 70 回日本顕微鏡学会総会, 2014.05.11, 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

⑦ 飯野 哲, 堀口 和秀: マウス盲腸筋層に観察された c-Kit 発現平滑筋細胞, 第 119 回日本解剖学会総会, 2014.03.27, 自治医科大学(栃木県・下野市)

⑧飯野 哲, 堀口 里美, 堀口 和秀: 消化管間質細胞におけるサイトグロビン発現, 第119回日本解剖学会総会, 2014.03.27, 自治医科大学(栃木県・下野市)

⑨堀口 和秀, 堀口 里美, 日下部守昭, 飯野哲, 尾崎博: 成体マウス消化管におけるテネイシン C 発現, 第 119 回 日本解剖学会総会, 2014.03.27, 自治医科大学(栃木県・下野市)

⑩飯野 哲, 堀口 里美, 堀口 和秀: 消化管筋層のカハール介在細胞と線維芽細胞におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の発現, 第 55 回日本平滑筋学会総会, 2013.08.06, 旭川市大雪クリスタルホール(北海道・旭川市)

⑪飯野 哲, 堀口 和秀, 堀口 里美: 消化管筋層における間質細胞としてのカハール介在細胞と線維芽細胞, 第 69 回日本顕微鏡学会総会, 2013.05.20, ホテル阪急エキスポパーク(大阪府・吹田市)

⑫堀口 里美, 堀口 和秀, 飯野 哲: 消化管筋層のカハール介在細胞と線維芽細胞におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の発現, 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013.03.30, サンポートホール高松(香川県・高松市)

⑬S.Iino, K.Horiguchi, S.Horiguchi: Interstitial cells of Cajal in c-Kit mutant mice, The 7th international symposium on ICC, 2012.09.2-5, フイレンツェ(イタリア)

⑭S.Iino, S.Horiguchi, K.Horiguchi: Interstitial cells of Cajal in c-Kit signal deficient W-sash mutant mice, The 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2012.09.28, 京都国際会議場(京都府・京都市)

⑮K.Horiguchi, S.Iino: Connexin43 expression by interstitial cells of Cajal in the submucosal layer of the guinea-pig proximal colon, The 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2012.09.28, 京都国際会議場(京都府・京都市)

⑯堀口 和秀, 堀口 里美, 飯野 哲: マウス消化管各部位における平滑筋とカハール介在細胞の発生に関する免疫組織化学的解析, 第 54 回日本平滑筋学会総会, 2012.08.3, 東京慈恵医科大学(東京都・港区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

飯野 哲 (IINO SATOSHI)
福井大学・医学部・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・准教授
研究者番号:20377451

研究分担者

堀口 里美 (HORIGUCHI SATOMI)
福井大学・医学部・学術研究員
研究者番号:00595283

研究分担者

橋本 隆 (HASHIMOTO TAKASHI)
福井大学・医学部・特命助教
研究者番号:60712891

(3)連携研究者

中山 晋介 (NAKAYAMA SHINSUKE)
名古屋大学・医学研究科・准教授
研究者番号:30192230