

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861219

研究課題名(和文) 消化管腺腫発症に伴う ICC の形態的・機能的変化の解析

研究課題名(英文) Morphological and functional changes in the interstitial cells of Cajal in adenoma regions of the small intestine.

研究代表者

菊田 幸子 (Kikuta, Sachiko)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：10367089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ApcMin/+マウス小腸の腺腫形成領域における形態変化を明らかにすることを目的として、消化管運動の調節機構として働く ICC に特に注目しながら解析を行った。ApcMin/+マウス小腸の腺腫形成領域では、腺腫の発症に伴って筋層が肥厚していくが、肥厚には筋細胞の増殖と細胞間隙の拡大が関与していた。また、ICC も腺腫の発症に伴って増殖し、新たな方向に突起を伸ばしていた。特に輪走筋層に向けて伸ばした突起は、神経線維や平滑筋と密接し、コネクシンを発現していた。このことから、粘膜層における腺腫形成が、筋層においても細胞増殖や機能変化を示唆する形態変化を引き起こしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The present study has been designed to clarify the morphological changes in tunica muscularis in adenoma regions, with special reference to interstitial cells of Cajal (ICC). We noted that the thickening of tunica muscularis and the increase of ICC occurred in adenoma regions of ApcMin/+ mice. ICC act as both pacemakers and intermediates between nerves and smooth muscle cells. In the adenoma region, the increase in the mass of intercellular substances caused thickening of the tunica muscularis, resulting in the loss of attachments among smooth muscle cells. The proliferation of ICC was involved in a dense distribution of ICC associated with the myenteric plexus (ICC-MP). Cytoplasmic processes of ICC-MP elongated into circular and longitudinal muscle layers. These processes were closely associated with the nerves and showed the gap-junction protein expression. These results may suggest that ICC compensate the lack of connections among smooth muscle cells with their mediator function.

研究分野：医歯薬学

キーワード：カハールの介在細胞 消化管

## 1. 研究開始当初の背景

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。その調節機構には、神経系に加えてカハールの介在細胞 (Interstitial cells of Cajal; ICC) が極めて重要な役割を担っている。ICC は、消化管のほぼ全長にわたって筋層で認められ、大きく分けて二つの機能を担っている。一つ目は蠕動運動におけるペースメーカー機能で、この機能により消化管はリズムカルな収縮運動を行うことができている。もう一つは興奮伝達機能で、神経のシグナルは一旦 ICC に伝わり、その後 ICC から平滑筋細胞へとギャップ結合を介して伝えられると考えられている。ヒルシュスプルング病や炎症性腸疾患、アカラシア、慢性偽性腸閉塞症、難治性慢性便秘といった様々な消化器系疾患において、ICC の減少や分布異常が報告されており、ICC は消化管の正常な運動機能を維持するために必要不可欠な細胞であると言える。

ところで、家族性大腸腺腫症のモデル動物である *Apc<sup>Min/+</sup>* マウスは、腸にポリープ状の腺腫を高頻度に自然発症する事が知られている。申請者は、このマウスの腺腫形成領域の筋層が、腺腫の発達に伴って肥厚していることに注目した。肥厚した筋層では、筋細胞数の増加や細胞間隙の拡大に加えて、ICC の増加と形態変化が認められた。

筋層における筋細胞数の増加や細胞間隙の拡大といった形態変化は、喘息において肥大増生(リモデリング)した気道筋層においても報告されているが、このような筋層では過剰な収縮等の運動異常が報告されている。従って、腺腫形成領域において形態変化した筋層でも、平滑筋細胞の調和のとれた運動が困難になっている可能性が考えられる。

そこで申請者は、腺腫形成領域の筋層では、形態変化によって運動機能に障害が生じており、その結果 ICC が増殖ならびに形態変化を起こし、筋層の運動機能の正常化を図っているのではないかと推測した。本研究では、この推測に基づき、*Apc<sup>Min/+</sup>* マウスの腫瘍発症の現場での微小環境の変化に伴う ICC の変化を、主に形態面から追跡していく事を計画した。

## 2. 研究の目的

申請者は、*Apc<sup>Min/+</sup>* マウスの腺腫形成領域において肥厚した筋層では、平滑筋細胞の調和のとれた運動が困難となっており、増殖ならびに形態変化を起こした ICC が、筋層の運動機能の正常化を図っているのではないかと推測し、*Apc<sup>Min/+</sup>* マウスの腫瘍発症の現場での微小環境の変化に伴う ICC の変化を、主に形態学的手法を用いて追跡していく事を計画した。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料

*Apc<sup>Min/+</sup>* マウスは、3か月頃からポリープ状の腺腫を自然発症する事が知られている。腺腫は、しばしば大腸においても認められるが、主として小腸において認められる。解析には、腺腫がある程度発達する5~7か月齢の C57BL/6 *Apc<sup>Min/+</sup>* マウスの小腸を用いた。

### (2) 免疫組織化学的解析

4%PFA による還流固定、あるいはアセトンによる浸漬固定を行った後に、腺腫形成領域あるいは正常領域を採取し、切片標本ならびに全載標本を作製した。ICC (CD117 ; c-Kit 抗体) や、神経要素 (Protein Gene Product 9.5 ; PGP9.5 抗体)、平滑筋 (Smooth Muscle Actin ; SMA 抗体)、ギャップ結合 (connexin-43 ; コネキシン抗体) を多重免疫染色により検出した。観察には主に共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SL; Leica Microsystems) を用い、二次元ならびに三次元的な解析を行った。

### (3) 免疫電子顕微鏡観察

4%PFA による還流固定後、凍結切片を作成した。ICC の免疫染色を行い、DAB で発色させた後に樹脂に包埋し、電子顕微鏡用の試料を作製した。観察には透過型電子顕微鏡 (JEM-1400 Plus, 日本電子株式会社) を用いた。

### (4) 細胞増殖の検出

細胞増殖マーカーとして、チミジンのヌクレオシド類似体である EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) を1日1回、50mg/kg、5日間連続して腹腔内投与した後に、腺腫形成領域と正常領域を採取し、各種染色を行った。EdU 陽性細胞の検出には、Click-iT® EdU Imaging Kits (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 腺腫の発達と筋層の厚みの関係

予備的な解析において、*Apc<sup>Min/+</sup>* マウス小腸の腺腫形成領域の筋層が、腺腫の発達に伴って肥厚している傾向が認められた。そこでまず、腺腫のサイズ(直径)と筋層の厚みを測定し、両者の関係を解析したところ、両者の間に高い相関性が認められた(図1)。

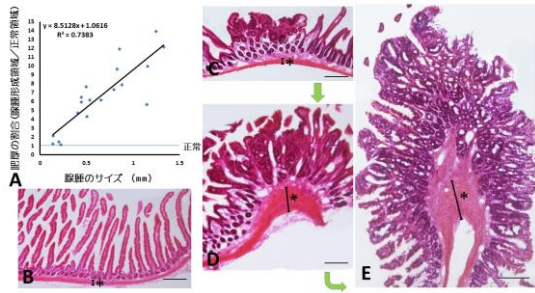


図1. 腺腫の発達と筋層の厚みの関係：腺腫のサイズと筋層の厚みの間に高い相関性が認められた (A)。正常 (B) ならびに様々な段階の腺腫 (C-E) の組織像 (HE 染色) を示した。筋層の厚み (\*) は腺腫の発達に伴って増加した。矢印は腺腫の発達を示す。Bar = 50um

### (2) 腺腫形成領域における筋層の形態変化

初期の腺腫では、平滑筋細胞数の増加が認められたが、発達した腺腫では平滑筋細胞間隙の顕著な拡大が認められた。拡大した細胞間隙には形質細胞や肥満細胞といった炎症細胞が多く認められた他に、線維成分も認められたが、線維成分の増加は、粘膜下層において特に認められた。

### (3) 腺腫形成領域における ICC の形態変化

ICC には複数のサブタイプが存在し、どのサブタイプが存在するかは消化管の部位毎に異なる特徴が認められる。通常小腸では、主に筋層間神経叢に付随するタイプである ICC-MP と深部筋神経叢に付随するタイプである ICC-DMP が存在する。

腺腫形成領域の ICC-DMP には、正常領域と異なる特徴は特に認められなかった。

しかし ICC-MP においては、腺腫の発達に伴った細胞数の増加が認められた。また、通常 ICC-MP は、同種細胞間で連絡し、筋層間に二次元的に広がる細胞性ネットワークを形成するが、腺腫形成領域の ICC-MP では、同種細胞間の細胞性ネットワークを形成すると同時に、正常領域では認められない方向 (輪走・縦走筋層) への突起の伸長が認められた (図2)。

輪走筋層へ伸びた突起は、神経束に密接しながら伸長し、突起の先にはギャップ結合の構成蛋白であるコネクシンの発現が認められた。

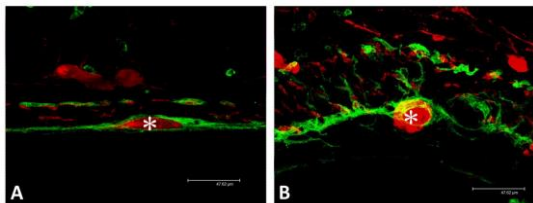


図2. 正常領域 (A) と腺腫形成領域 (B) における ICC (緑) と神経要素 (赤) の免疫染色結果 (横断像)：腺腫形成領域においても、ICC は筋層間神経叢 (\*) および深部筋神経叢に付随する形で分布していた。筋層間神経叢に付随するサブタイプである ICC-MP は、腺腫の発達に伴って増加し、神経線維に密接しながら輪走・縦走筋層内に突起を伸長させていた。

### (4) 腺腫形成領域の ICC の微細構造

腺腫形成領域の ICC の超微形態的特徴を明らかにするため、免疫電子顕微鏡法を用いた解析を行った。その結果、輪走筋層へ伸びた突起は、神経束に密接しながら伸長し、周囲の平滑筋細胞とも密接している事が明らかになった。これらの結果から、腺腫形成領域において認められた ICC-MP の輪走筋方向へと伸長した突起は、神経線維と密接しながら平滑筋細胞とギャップ結合を形成している可能性が示唆された。通常、ICC-MP は同種細胞間でギャップ結合を形成し、細胞性ネットワークを形成するが、平滑筋細胞の間ではギャップ結合はほとんど認められない。従って、腺腫形成領域の ICC-MP が新たな機能を獲得した可能性も考えられる。

また、腺腫形成領域の ICC-MP の細胞質は、平滑筋よりも低い電子密度を示し、多数のミトコンドリアとカベオラを持つことが明らかになった。これらの特徴は、正常領域の ICC-MP の特徴と一致していた。しかし、腺腫形成領域の ICC-MP は、正常領域と比べて大きく明るい核を有していた。これらの結果から、腺腫形成領域の ICC-MP が正常領域より活発な状態にあり、分裂あるいは代謝を行っているものと推測された。

### (5) 細胞の増殖

腺腫形成領域で認められた ICC や平滑筋細胞の増加が、細胞増殖によるものであるかを明らかにすることにした。その結果、*Apc<sup>Min/+</sup>*マウスの腺腫形成領域の筋層では、ICC、平滑筋細胞共に EdU 陽性の細胞が認められたが、正常領域の筋層では、ICC、平滑筋細胞共に EdU 陽性の細胞はほとんど認められなかった (図3、4)。この結果から、腺腫形成領域では、ICC ならびに平滑筋細胞の増殖が行われている事が明らかとなった。

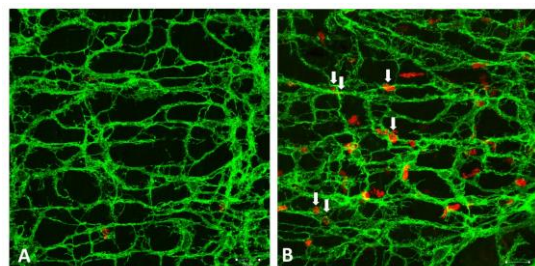


図3. 正常領域 (A) と腺腫形成領域 (B) における EdU (赤) と ICC (緑) の染色結果 (ホルマウント) : 腺腫形成領域において、EdU 陽性の ICC (矢印) が認められた。

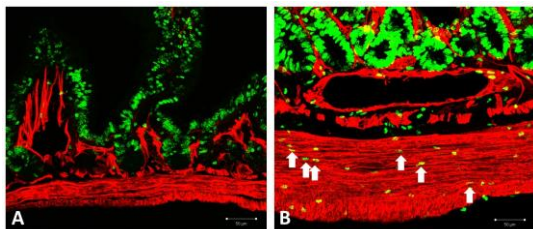


図4. 正常領域 (A) と腺腫形成領域 (B) における EdU (緑) と平滑筋 (赤) の染色結果 : 腺腫形成領域の筋層において、EdU 陽性の平滑筋細胞 (矢印) が認められた。

本研究によって、粘膜層における腺腫の発達に伴って、筋層においても平滑筋細胞ならびに ICC-MP が増殖している事が明らかとなった。また、発達した腺腫の筋層では、平滑筋細胞間隙の顕著な拡大が認められ、ICC-MP は新たに輪走・縦走筋層に向けて突起を伸ばしていた。特に輪走筋層に向けて伸ばした突起は、神経線維や平滑筋と密接し、コネキシンを発現していた。このことから、細胞間隙が拡大し、細胞間連絡が疎となった腺腫形成領域の筋層では、ICC が増殖し、新たに伸ばした突起によって平滑筋とギャップ結合を形成し、何らかの情報伝達を補っている可能性が考えられた。これらの変化の発生機序や、機能について、今後更なる解析が必要であろうと考えている。

#### 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 4 件)

- ① 宮本 (菊田) 幸子、北原秀治、森島正恵、江崎太一  
*Apc<sup>Min/+</sup>*マウス小腸の腺腫形成領域における ICC の形態的特徴、東京女子医科大学総合研究所 紀要、査読無、37、2017、印刷中
- ② 宮本 (菊田) 幸子、北原秀治、森島正恵、江崎太一  
*Apc<sup>Min/+</sup>*マウス小腸腺腫形成領域における ICC-MP の超微細形態学的解析、東京女子医科大学総合研究所 紀要、査読無、35、2015、印刷中
- ③ Sachiko Miyamoto-Kikuta, Masae Morishima, Taichi Ezaki  
Morphological changes in tunica muscularis in adenoma regions of the small intestine in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice, with special reference to the interstitial cells of Cajal、

The Journal of Physiological Sciences、査読無、vol.65, supplement 1, 2015, p.S194

- ④ 宮本 (菊田) 幸子、北原 秀治、森島正恵、江崎 太一  
*Apc<sup>Min/+</sup>*マウス小腸腺腫形成領域における筋層の変化 : 超微細構造学的解析、東京女子医科大学総合研究所 紀要、査読無、33、2013、p.14-15

[学会発表] (計 4 件)

- ① 宮本 (菊田) 幸子、北原 秀治、森島正恵、川島 章子、江崎 太一  
*Apc<sup>Min/+</sup>*マウス小腸の腺腫形成領域における ICC の増殖  
第 122 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 2017 年 3 月 長崎大学 (長崎県・長崎市)
- ② 宮本 (菊田) 幸子、北原 秀治、森島正恵、江崎 太一  
*Apc<sup>Min/+</sup>*マウス小腸の腺腫形成領域における ICC の形態変化  
第 121 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 2016 年 3 月 ビッグパレットふくしま (福島県・郡山市)
- ③ Sachiko Miyamoto-Kikuta, Masae Morishima, Taichi Ezaki  
Morphological changes in tunica muscularis in adenoma regions of the small intestine in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice, with special reference to the interstitial cells of Cajal.  
第 120 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 2015 年 3 月 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- ④ 宮本 (菊田) 幸子、北原 秀治、森島正恵、江崎 太一  
*Apc<sup>Min/+</sup>*マウス小腸の腺腫形成領域における筋層の形態変化  
第 119 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 2014 年 3 月 自治医科大学 (栃木県・下野市)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊田 幸子 (KIKUTA SACHIKO)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 10367089