

令和元年5月21日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08744

研究課題名（和文）小腸の機能制御と恒常性維持における腸管グリア細胞とカルシニューリンの役割

研究課題名（英文）Roles of enteric glial cells and calcineurin in the function and homeostasis of the small intestine

研究代表者

田中 正彦（Tanaka, Masahiko）

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：60267953

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：グリア細胞特異的カルシニューリンノックアウトマウスの小腸、消化機能、炎症状態について詳細に解析した。小腸のグリア細胞でカルシニューリンが欠損することによってグリア細胞及び腸管神経系の異常が引き起こされ、蠕動運動が低下して消化・吸収不良につながるるとともに、バリア機能が損なわれて炎症が惹起されることが明らかになった。以上の研究成果は、腸管グリア細胞におけるカルシニューリンの役割、ひいては小腸の機能制御や恒常性維持における腸管グリア細胞の役割の重要性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで不明であった腸管グリア細胞におけるカルシニューリンの役割、ひいては小腸の機能制御や恒常性維持における腸管グリア細胞の役割を明らかにするものである。本研究が進展することで、小腸の機能や恒常性が破綻することによって引き起こされる腸疾患（炎症性腸疾患等）の原因を解明するための新しい手がかりが得られ、そうした腸疾患の新しい治療法・治療薬開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the small intestine, digestive function, and inflammation state of glial calcineurin B1-conditional knockout mice. In the small intestine, calcineurin B1 deficiency in enteric glial cells induced glial dysfunction and disorganized enteric nervous system, leading to reduced gastrointestinal motility and maldigestion/malabsorption, as well as impaired barrier function and inflammation. These findings suggest the important roles of calcineurin and enteric glial cells in the function and homeostasis of the small intestine.

研究分野：分子神経生物学、実験病理学

キーワード：細胞・組織 神経科学 小腸 グリア細胞 カルシニューリン 蠕動運動 消化・吸収 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 腸の機能と恒常性における腸管グリア細胞の役割

神経系を構成する神経細胞以外の細胞であるグリア細胞は、従来支持細胞程度の位置づけであったが、中枢神経系における最近の研究によって、様々な形で神経機能に積極的に関与することが明らかになりつつある。しかし、末梢神経系におけるグリア細胞の役割についてはいまだ知見が少ない。そうした中で、腸管神経系におけるグリア細胞の役割の研究が活発化してきていた。腸管グリア細胞が様々な栄養因子・生理活性物質を分泌して腸の神経細胞や上皮細胞と相互作用することが明らかになり、腸管グリア細胞が腸の機能制御や恒常性維持において果たす役割に注目が集まり始めていた (Gulbransen & Sharkey, 2012; Neunlist et al., 2014; Coelho-Aguiar et al., 2015; Ochoa-Cortes et al., 2016)。腸管グリア細胞は、神経細胞と相互作用することによって蠕動運動を制御し、上皮細胞と相互作用することによってバリア機能を維持する役割を果たすことが想定された。

いくつかの研究グループは、腸管グリア細胞の異常によって腸で炎症が起こる可能性を示す研究報告を行っていた。そのさきがけとして、Bush et al. (1998) は、腸管グリア細胞死が起こる遺伝子組換えマウスにおいて、小腸に炎症が起こってマウスが死亡することを発見した。Cornet et al. (2001) は、別の腸管グリア細胞死が起こる遺伝子組換えマウスにおいて、低成長と腸炎が起こって死亡することを示した。こうした研究結果から、腸管グリア細胞が炎症を防ぐ役割を果たしている可能性が考えられた。

(2) 腸管グリア細胞におけるカルシニューリンの役割

腸管グリア細胞におけるカルシニューリンの役割については、全くわかっていなかった。一方で、脳のグリア細胞 (アストロサイト) におけるカルシニューリンの役割については、いくつかの研究報告があった。アストロサイトをカルシウムイオノフォア、ATP、interleukin-1 β (IL-1 β)、tumor necrosis factor α (TNF α) 等によって刺激するとカルシニューリンが活性化し、転写因子 NFAT の活性化につながる (Pérez-Ortiz et al., 2008; Furman et al., 2010; Serrano-Pérez et al., 2011)。また、TNF α 刺激後にはカルシニューリン活性化を介して転写因子 FoxO3 (forkhead box O3) の活性化が起こることも示されていた (Fernandez et al., 2012)。腸管グリア細胞とアストロサイトは多くの共通した性質を有するため、腸管グリア細胞においてもカルシニューリンシグナルが重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

我々は、当初は中枢神経系のグリア細胞におけるカルシニューリンの役割を調べることを目的として、グリア細胞特異的カルシニューリンノックアウトマウス (GFAP-Cre; CNB1^{fl/fl} マウス) を作製した。ところが、意外にもこのノックアウトマウスは小腸の変性と炎症を起こし、成長が低下して、離乳期後に衰弱し死亡した。離乳期以降に練り餌を与えると、成長や生存が回復した。脳を含めた小腸以外の臓器では、死につながるような大きな異常は見られなかった。こうした実験結果から、このノックアウトマウスでは、小腸グリア細胞におけるカルシニューリンノックアウトが腸管神経系の異常、ひいては小腸での消化・吸収不良と変性・炎症を引き起こし、個体の死につながると考えられた。このことは、腸管グリア細胞が小腸の機能制御や恒常性維持に重要な役割を果たすことを示唆していた。しかし、このノックアウトマウスにおける小腸グリア細胞の異常の詳細、腸管神経系の異常の詳細、小腸機能の異常の詳細、分子レベルでの異常、グリア細胞の異常が神経細胞や上皮細胞の異常にどのようにつながるのかなど、多くの点が未解明であった。

そこで本研究では、このノックアウトマウスにおける小腸及び腸管グリア細胞の異常や、グリア細胞と神経細胞・上皮細胞との相互作用の異常を詳細に解析することで、腸管グリア細胞におけるカルシニューリンの役割、さらには腸管グリア細胞が小腸の蠕動運動制御やバリア機能維持に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

具体的には、このノックアウトマウスにおける (1) 小腸の蠕動運動異常及び消化・吸収不良の解析、(2) 小腸のバリア機能異常及び炎症状態の解析、(3) 小腸のグリア細胞及び神経系の異常の解析、(4) 小腸グリア細胞と神経細胞・上皮細胞との相互作用の異常の解析、(5) 遺伝子組換えが起こっている細胞の確認を行った。

3. 研究の方法

ノックアウトマウス：GFAP-Cre マウスと floxed CNB1 マウス (いずれも Jackson Laboratory) をかけ合わせて、GFAP-Cre; CNB1^{fl/fl} マウスを得た。

(1) 小腸の蠕動運動異常及び消化・吸収不良の解析

蠕動運動：エバンスブルーで着色したカルボキシメチルセルロースを経口投与し、小腸内移動速度を測定した。

血清中栄養分：血清中のグルコース及び蛋白質濃度を、それぞれグルコースオキシダーゼ法及び BCA 法によって定量した。

糞中栄養分：糞中のデンプン、グルコース、蛋白質、脂質の定量を、固形餌（通常の餌）を与えた場合と練り餌を与えた場合に分けて行った。糞からの各栄養分の抽出方法については、必要に応じて条件検討を行い、それぞれの栄養分に最適な方法を用いた。抽出液中のデンプン、グルコース、蛋白質、脂質の濃度を、それぞれヨウ素デンプン反応、グルコースオキシダーゼ法、BCA法、重量法によって定量した。

摂食量：マウスを個飼いして練り餌を与え、練り餌の減少量（乾燥重量）を測定することによって摂食量を調べた。

(2) 小腸のバリア機能異常及び炎症状態の解析

上皮細胞の観察：小腸の凍結切片に対して、Vulcan Fast Red（Biocare Medical；アルカリホスファターゼ基質）を用いたアルカリホスファターゼ染色を行い、上皮細胞を観察した。

血管透過性：エバンスブルーを尾静注し、小腸からの漏出をホルムアミドで抽出し測定した。

ミエロペルオキシダーゼ活性：小腸組織より hexadecyltrimethylammonium bromide と凍結融解の繰り返しによってミエロペルオキシダーゼを抽出し、tetramethylbenzidine を用いた活性測定を行った。

血便：糞中のヘモグロビン量をペルオキシダーゼ様活性測定によって定量した。

免疫細胞の集積・浸潤：小腸の筋層伸展標本における肥満細胞、好中球、マクロファージを観察するために、それぞれアビジン染色、抗 Ly-6G 免疫染色、抗 F4/80・CD11b 免疫染色を行った。

炎症性サイトカイン：小腸組織中の TNF α 量を ELISA によって定量した。

(3) 小腸のグリア細胞及び神経系の異常の解析

グリア細胞での GFAP 発現：小腸の筋層伸展標本（腸管神経系を含む）に対して抗 GFAP 免疫染色や抗 Sox10 免疫染色を行ってグリア細胞を観察した。また、小腸筋層組織溶解サンプル中の GFAP 発現量を比較するために Western blotting を行った。

腸管神経系の網目構造：小腸の筋層伸展標本（腸管神経系を含む）に対して抗 HuC/D 免疫染色を行った。

培養下でのグリア細胞の解析（NFAT 核移行）：小腸グリア細胞を培養し、ATP で刺激した上で抗 NFAT 免疫染色を行い、刺激にともなう NFAT の核移行を観察した。

培養下でのグリア細胞の解析（形態及び増殖・生存）：小腸グリア細胞を培養し、抗 GFAP 免疫染色等を行って、その形態や細胞数（増殖・生存）について観察した。

(4) 小腸グリア細胞と神経細胞・上皮細胞との相互作用の異常の解析

小腸組織溶解サンプル中の TGF- β 1 発現量を比較するために Western blotting を行った。

(5) 遺伝子組換えが起こっている細胞の確認

GFAP-Cre マウスと Rosa26-GNZ マウス（いずれも Jackson Laboratory）をかけ合わせて、GFAP-Cre; Rosa26-GNZ マウスを得た。このマウスの小腸筋層伸展標本（腸管神経系を含む）に対して抗 GFP, Sox10, HuC/D 三重蛍光免疫染色を行って、組換えが起こっている細胞について観察した。

4. 研究成果

(1) 小腸の蠕動運動異常及び消化・吸収不良の解析

蠕動運動

ノックアウトマウスで小腸の蠕動運動が低下しているかを検証するために、流動性疑似餌の小腸内移動速度を測定したところ、ノックアウトマウスにおいて移動速度が低下しており、小腸の運動能が低下していることが示された。

この蠕動運動低下とマウスの日齢及び体重減少との相関関係を解析したところ、蠕動運動低下は日齢及び体重減少と正の相関関係にあることが示された。ノックアウトマウスの日齢が進み体重が減少するとともに蠕動運動が低下することが示された。

血清中栄養分

ノックアウトマウスの栄養状態を評価するために血清中のグルコースと蛋白質を定量したところ、グルコース濃度はコントロールマウスより減少していたが、蛋白質濃度には差が見られなかった。

糞中栄養分

ノックアウトマウスで消化・吸収が低下しているかを検証するために、糞中のデンプン、グルコース、蛋白質、脂質の定量を、固形餌（通常の餌）を与えた場合と練り餌を与えた場合に分けて行った。固形餌を与えたノックアウトマウスにおいて、デンプンと脂質の含量が多かつ

た。練り餌を与えたノックアウトマウスにおいては、デンプン、グルコース、脂質の含量が多かった。蛋白質含量にはどちらの食餌条件でも差が見られなかった。ノックアウトマウスの血清中グルコース濃度が減少していることも考慮すると、このノックアウトマウスにおいて消化・吸収が低下していることが示唆された。

摂食量

ノックアウトマウスの摂食量に異常がないか調べたところ、ノックアウトマウスはコントロールマウスと同程度に練り餌を摂食した。

(2) 小腸のバリア機能異常及び炎症状態の解析

上皮細胞の観察

アルカリホスファターゼ活性を利用して小腸の上皮細胞を染色して観察することによって、ノックアウトマウスの小腸上皮が変性していることが示された。

血管透過性

尾静注したエバンスブルーの小腸における漏出を測定したところ、ノックアウトマウスで漏出が見られ、血管透過性が亢進していることが示された。

ミエロペルオキシダーゼ活性

ノックアウトマウスの小腸で炎症が起こっていることを確認するために、ミエロペルオキシダーゼ（好中球が有する酵素）の活性測定を行った。ノックアウトマウスにおいて高い活性が認められ、ノックアウトマウスの小腸で炎症が起こっていることが確認された。

ミエロペルオキシダーゼ活性とマウスの日齢及び体重減少との相関関係を解析したところ、明確な相関関係は認められなかった。炎症の発生・増悪は、蠕動運動低下とは異なり、日齢や体重減少の進行とは別のタイミングで生じると考えられる。

血便

糞中のヘモグロビン量を定量したところ、重症のノックアウトマウスではヘモグロビン量が高く、血便が生じていることが確認された。

免疫細胞の集積・浸潤

小腸における肥満細胞、好中球、マクロファージの集積・浸潤を観察したところ、ノックアウトマウスにおいてより多くの肥満細胞が認められた。好中球とマクロファージについては、明確な染色像が認められなかった。

炎症性サイトカイン

小腸組織中の TNF α 量を測定したところ、ノックアウトマウスにおいて増加傾向が認められた。

(3) 小腸のグリア細胞及び神経系の異常の解析

グリア細胞での GFAP 発現

小腸の筋層伸展標本（腸管神経系を含む）に対して抗 GFAP 免疫染色を行ってグリア細胞を観察すると、ノックアウトマウスの一部の領域で GFAP の発現が低下しているのが見られた。このような GFAP 発現低下は、Western blotting によっても確認された。抗 Sox10 免疫染色（核が染まる）で陽性のグリア細胞を計数するとノックアウトマウスで少くはなかったため、グリア細胞はノックアウトマウスでも十分に存在しているが、その一部で GFAP の発現が低下していると考えられる。

腸管神経系の網目構造

小腸の筋層伸展標本（腸管神経系を含む）に対して抗 HuC/D 免疫染色を行って腸管神経系の網目構造を観察すると、ノックアウトマウスの網目構造の縮小や変形が見られた。

培養下でのグリア細胞の解析：NFAT 核移行

NFAT はカルシニューリンの下流シグナルとして働く転写因子であり、刺激に応じてカルシニューリン依存的に活性化すると核移行することが多くの細胞で知られている。培養小腸グリア細胞を ATP で刺激すると、コントロールマウス由来細胞では NFAT が核移行するが、ノックアウトマウス由来細胞では核移行が起こらないことを確認した。

培養下でのグリア細胞の解析：形態及び増殖・生存

培養小腸グリア細胞の形態を観察したところ、ノックアウトマウス由来細胞に明らかな異常は見られなかった。細胞数については、培養中に低下しやすい傾向が認められた。

(4) 小腸グリア細胞と神経細胞・上皮細胞との相互作用の異常の解析

小腸グリア細胞から放出されて神経細胞や上皮細胞に対して働く可能性がある栄養因子・生理活性物質の産生・分泌量を測定したところ、ノックアウトマウスにおいて TGF- β 1 の減少傾向が認められた。今後、他の栄養因子・生理活性物質についても解析を進めたい。

(5) 遺伝子組換えが起こっている細胞の確認

Cre による組換えに応じて GFP-β-gal 融合蛋白質を発現するレポーターマウス(GFAP-Cre; Rosa26-GNZ マウス) を用いた解析によって、小腸神経系においてこの組換えが起こる細胞はグリア細胞であることを確認した。

以上の研究成果より、小腸のグリア細胞でカルシニューリンが欠損することによってグリア細胞及び腸管神経系の異常が引き起こされ、蠕動運動が低下して消化・吸収不良につながるとともに、バリア機能が損なわれて炎症が惹起されることが示された。本研究によって、腸管グリア細胞におけるカルシニューリンの役割、ひいては小腸の機能制御や恒常性維持における腸管グリア細胞の役割が明らかになりつつある。

腸管グリア細胞が炎症を防ぐ役割を果たしていることを示唆する遺伝子組換えマウスは以前から報告されているが (e.g., Bush et al., 1998; Cornet et al., 2001)、これらのマウスでは腸管グリア細胞が死んでしまうため神経細胞や上皮細胞との細胞間相互作用の異常について調べることができない。我々のノックアウトマウスでは腸管グリア細胞が死なないため、神経細胞や上皮細胞との細胞間相互作用の研究に用いることができる。また、我々のノックアウトマウスには、腸管グリア細胞におけるカルシニューリンの役割の重要性を示しているという特長もある。よって、我々のノックアウトマウスにおいて、カルシニューリンを欠損した腸管グリア細胞と神経細胞や上皮細胞との細胞間相互作用がどのような異常を起こしているのかを明らかにしていくことが、今後の重要な課題の1つである。

ヒトにおいても腸管グリア細胞でこのノックアウトマウスと同様の異常が起こった場合には、小腸の機能や恒常性が破綻して、腸疾患が引き起こされる可能性がある。そのような形で本研究に関連する可能性がある腸疾患として、原因不明の難病である炎症性腸疾患が挙げられる。炎症性腸疾患の原因としては一般に過剰な免疫応答が想定されているが、腸管神経系の生理学的変化も指摘されている (Neunlist et al., 2013)。本研究が進展することで、炎症性腸疾患等の腸疾患の原因を解明するための新しい手がかりが得られる可能性がある。腸管グリア細胞を標的とした腸疾患治療法はこれまでにないため、本研究の成果は腸疾患の新しい治療法・治療薬の開発につながることを期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

大倉宇海・平嶋尚英・田中正彦、*Calcineurin B1 deficiency in glial cells reduces gastrointestinal motility and results in maldigestion and/or malabsorption in mice*, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 42 巻、印刷中、2019

藤田真弥・八木孝樹・大倉宇海・田中順一・平嶋尚英・田中正彦、*Calcineurin B1 deficiency in glial cells induces mucosal degeneration and inflammation in mouse small intestine*, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 41 巻、786–796、2018
DOI: 10.1248/bpb.b18-00041

井上悠・長谷川靖司・宮地克真・山田貴亮・中田悟・一本嶋佐理・日比輝正・根本知己・田中正彦・鈴木亮・平嶋尚英、*Development of 3D imaging technique of reconstructed human epidermis with immortalized human epidermal cell line*, *Experimental Dermatology*, 27 巻、563–570、2018
DOI: 10.1111/exd.13672

田中正彦・千田知美・平嶋尚英、*Expression of the GluA2 subunit of glutamate receptors is required for the normal dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells*, *Neuroscience Letters*, 657 巻、22–26、2017
DOI: 10.1016/j.neulet.2009.06.068

〔学会発表〕(計17件)

田中正彦、Calcineurin を欠損した小腸グリア細胞の異常と消化・吸収不良との関連、日本薬学会第 139 年会 (金沢)、2019 年 3 月

大倉宇海、グリア細胞における calcineurin 欠損が小腸の変性・炎症と消化・吸収不良を引き起こす、第 40 回日本分子生物学会年会 (ConBio 2017; 神戸)、2017 年 12 月

田中正彦、Pathological and inflammatory small intestine caused by calcineurin B1 deficiency in glial cells, The 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2017; Washington, DC, USA)、2017 年 11 月

田中正彦、GFAP-Cre calcineurin B $\alpha^{fl/fl}$ mice の小腸における変性・炎症と腸管神経系の異常、第 40 回日本神経科学大会（千葉）、2017 年 7 月

田中正彦、グリア細胞におけるカルシニューリン欠損が小腸の変性と炎症を引き起こす、第 39 回日本分子生物学会年会（横浜）、2016 年 12 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.nagoya-cu.ac.jp/phar/grad/soyaku/seimei/chobunshi.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。