

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08150

研究課題名(和文) 遺伝的細胞系譜追跡法を用いた消化管間質細胞の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of gastrointestinal interstitial cells using genetic labeling technique

研究代表者

飯野 哲 (IINO, SATOSHI)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：40242854

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)：消化管における間質細胞としてカハール介在細胞と線維芽細胞に焦点を当て、遺伝的に標識されたマウスを用いて間質細胞の機能解析を行った。筋層内において線維芽細胞はカハール介在細胞の発生に必須であるc-KitリガンドSCFを発現すること、線維芽細胞とカハール介在細胞はヘッジホッグシグナルを受容するGli1およびGli2発現を示し発生に関与することが明らかとなり、これら間質細胞が消化管形成や機能発現に深く関与することが明らかとなった。

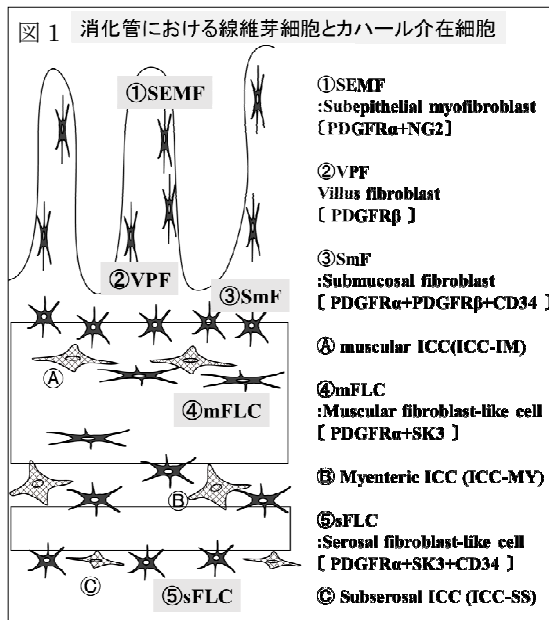
研究成果の概要(英文)：We observed gastrointestinal interstitial cells such as interstitial cells of Cajal (ICC) and fibroblasts (fibroblast-like cells) using genetic labeling mice. We showed that fibroblasts in the musculature expressed c-Kit ligand SCF (stem cell factor) that is essential for ICC development. Using lacZ reporter mice, we showed that ICC and fibroblasts expressed zinc finger protein Gli1 and Gli2 known as glioma-associated oncogene. These proteins are transcription factors mediating the hedgehog pathway and regulate gastrointestinal tract development. Our findings suggest that ICC and fibroblasts are regulated by hedgehog signaling in development and maintenance of gastrointestinal tract.

研究分野：解剖学

キーワード：間質細胞 線維芽細胞 カハール介在細胞 PDGF受容体 c-Kit ヘッジホッグ

### 1. 研究開始当初の背景

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。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  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ )、SK3 カリウムチャンネルを発現し、これらは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。



マウス消化管の線維芽細胞は部位により (図 1)、① 絨毛粘膜上皮直下の筋線維芽細胞、② 絨毛固有層の線維芽細胞、③ 粘膜下組織の線維芽細胞、④ 筋層内線維芽細胞、⑤ 腹膜下組織の線維芽細胞に大別可能であり、それぞれが胃・小腸・大腸固有の分子プロファイルと固有の機能を有する可能性が考えられる。

筋層線維芽細胞に関しては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 $\alpha$  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)。米国ネバダ大のグループは PDGFR $\alpha$  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

消化管における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。特に間質細胞の発生と維持のために様々なシグナルが関与するが、カハール介在細胞の発生に必須である c-Kit シグナルまた消化管上皮から分泌されるヘッジホッグシグナルを中心とした解析を行うため遺伝的に標識された変異マウスを用いた。

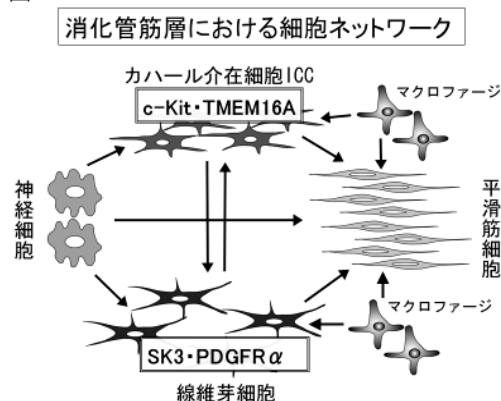
### 3. 研究の方法

線維芽細胞の標識マウスとして PDGFR $\alpha$ -EGFP マウス、比較する間質細胞であるカハール介在細胞の標識マウスとして c-Kit-copGFP マウス、他に c-Kit リガンドのレポーターマウスとして KitL-EGFP マウス、間質細胞あるいは中胚葉由来細胞の標識マウスとして Gli1-LacZ マウス、Gli2-LacZ マウスの形態学的解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 消化管筋層線維芽細胞は c-Kit リガンドを発現する : 線維芽細胞の筋層内分布を観察するとカハール介在細胞に近接して位置する細胞が多いことが明らかとなっている。カハール介在細胞の発生には c-Kit リガンドが必要であることから線維芽細胞がリガンド発現を行うかについてレポーターマウスにより検討した。KitL-EGFP マウスは c-Kit リガンドである SCF(stem cell factor) を EGFP で可視化されており、ホモマウスは SCF 欠損による重度貧血のため生後死亡した。ヘテロマウスを観察すると、消化管筋層では PDGFR $\alpha$  を発現する線維芽細胞に EGFP 発現が観察された。過去に腸管神経細胞が SCF 産生細胞と報告があるが、腸管神経を欠損するマウス (GDNF-KO マウスなど) においてもカハール介在細胞は発生する。今回の結果は線維芽細胞が SCF 産生細胞であり、かつカハール介在細胞に近接して位置し、カハール介在細胞の発生分化に深く関与していることが示唆された(図 2)。

図 2



消化管筋層において構成する細胞は互いに様々な機能形態学的関係を持つ。腸管神経はカハール介在細胞と線維芽細胞、平滑筋細胞に神経伝達を行い、カハール介在細胞と線維芽細胞は互いにまた平滑筋細胞とギャップ結合により機能的連絡を持つ。今回線維芽細胞が SCF を発現することでカハール介在細胞の発生を制御することが明らかとなった。

(2) 消化管におけるヘッジホッグシグナル受容細胞としての間質細胞 : ヘッジホッグシグナルは消化管形成において重要な要素であり、Shh の欠損では消化管回転異常や絨毛異形成、腸管神経形成異常、Ihh 欠損では消化管回転異常や絨毛低形成、腸管神経欠損などが生じる。ヘッジホッグリガンドは上皮で産生され、その受容細胞は転写因子 Gli を発現し主に間質に存在する。Gli1、Gli2 発現細胞を明らかにするために遺伝的に LacZ を挿入したマウスの解析を進めた。

Gli1、Gli2 とともに筋層平滑筋、粘膜筋板平滑筋、粘膜内平滑筋に発現を確認した。更に間質細胞を各種マーカーにより分類すると、Gli1 はカハール介在細胞なかでも小腸 ICC-DMP と結腸 ICC-SM に発現が見られ、Gli2 は小腸と結腸の ICC 全体に発現が確認された。線維芽細胞を PDGFR $\alpha$  により標識し Gli 発現を観察すると Gli1 は粘膜上皮直下の筋線維芽細胞に観察され、Gli2 は上皮下筋線維芽細胞、粘膜線維芽細胞、筋層線維芽細胞のほぼ全てに発現が観察された(図 3)。

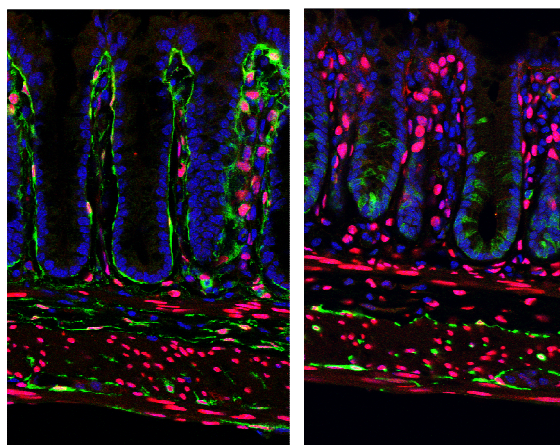


図 3. 結腸における Gli2(赤)のカハール介在細胞(左図 c-Kit 緑)および線維芽細胞(右図 PDGFR $\alpha$  緑)の発現

これらから Gli は小腸と結腸で発現パターンが異なるが、消化管平滑筋、カハール介在細胞、線維芽細胞の多くで発現し、ヘッジホッグシグナルを受容し消化管形成に関与する事が示唆された。

## 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 6 件)

- ①T.Mihara, W.Otsubo, K.Horiguchi, S.Mikawa, N.Kaji, S.Iino, H.Ozaki, M.Hori : The anti-inflammatory pathway regulated via nicotinic acetylcholine receptors in rat intestinal mesothelial cells, *J Vet Med Sci*,79(11):1795-1802.2,DOI:10.1292/jvms.17-0304, 査読有,2017
- ②MS.Islam, K.Horiguchi, S.Iino, N.Kaji, S.Mikawa, M.Hori, H.Ozaki : Epidermal growth factor is a critical regulator of the cytokine IL-33 in intestinal epithelial cells, *Br J Pharmacol*,173(16),2532-42,DOI: 10.1111/bph.13535, 査読有,2016
- ③N.Kaji, K.Horiguchi, S.Iino, S.Nakayama, T.Ohwada, Y.Otani, Firman, T.Murata, KM.Sanders, H.Ozaki, M.Hori : Nitric oxide-induced oxidative stress impairs pacemaker function of murine interstitial cells of Cajal during inflammation, *Pharmacol Res*,111,838-48, DOI:10.1016/j.phrs. 2016.07.030, 査読有,2016
- ④T.Kodera, H.Arishima, R.Kitai, K.Kikuta, S.Iino, S.Noriki, H.Naiki : Utility of postmortem imaging system for anatomical education in skull base surgery, *Neurosurg Rev*, 38(1), 165-70,DOI: 10.1007/s10143-014-0574-2, 査読有,2015
- ⑤T.Maehara, K.Matsumoto, K.Horiguchi, M.Kondo, S.Iino, S.Horie, T.Murata, H.Tsubone, S.Shimada, H.Ozaki, M.Hori : Therapeutic action of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists targeting peritoneal macrophages in post-operative ileus, *Br J Pharmacol*,172(4),1136-47, DOI:10.1111/bph.13006, 査読有,2015

⑥T. Ito, H. Hioki, J. Sohn, S. Okamoto, T. Kaneko, S. Iino, D. L. Oliver : Convergence of lemniscal and local excitatory inputs on large GABAergic tectothalamic neurons, *J Comp Neurol*,523(15),2277-96, DOI: 10.1002/cne.23789 , 査読有,2015

[学会発表] (計 21 件)

- ①橋本隆、堀口和秀、堀口里美、飯野哲 : 成体マウス消化管における転写因子 Gli1 と Gli2 の局在解析, 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2018
- ②堀口里美、堀口和秀、飯野哲 : 消化管筋層における c-KIT 受容体型チロシンキナーゼ発現による細胞系譜制御の解明, 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2018
- ③堀口和秀、堀口里美、橋本隆、飯野哲 : TNBS 腸炎モデルマウス筋層の炎症回復過程におけるカハール介在細胞増殖, 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2018
- ④飯野哲、堀口里美、堀口和秀、橋本隆 : c-Kit シグナル異常を持つマウスにおける小腸カハール介在細胞の発生, 日本顕微鏡学会第 73 回学術講演会, 2017
- ⑤飯野哲、堀口和秀、堀口里美、橋本隆、川原真代、杉本京 : TNBS 腸炎モデルマウスにおける消化管筋層の傷害と回復過程, 第 59 回日本平滑筋学会総会, 2017
- ⑥飯野哲、堀口和秀、堀口里美、橋本隆、川原真代、杉本京, TNBS 腸炎モデルマウスを用いた結腸筋層の傷害と回復過程研究,第 49 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 2017
- ⑦橋本隆、堀口和秀、堀口里美、飯野哲 : 成体マウス消化管における Gli1 陽性細胞の同定, 第 58 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 2017
- ⑧橋本隆、堀口和秀、堀口里美、飯野哲 : 成体マウス消化管における転写因子 Gli1 の局在解析, 第 59 回日本平滑筋学会総会, 2017
- ⑨堀口里美、堀口和秀、飯野哲 : 胎生期マウ

ス消化管筋層の c-KIT 受容体型チロシンキナーゼの発現解析, 第 122 回日本解剖学会総会全国学術集会, 2017

⑩堀口和秀、河原真代、杉本京平、堀口里美、橋本隆、飯野哲: TNBS 腸炎モデルマウスにおける消化管筋層の傷害と回復過程, 第 122 回日本解剖学会総会全国学術集会, 2017

⑪橋本隆、堀口和秀、堀口里美、飯野哲: マウス消化管における転写因子 Gli1 の局在解析, 第 122 回日本解剖学会総会全国学術集会, 2017

⑫堀口里美、堀口和秀、橋本隆、飯野哲: TNBs 腸炎マウス筋層におけるカハール介在細胞回復過程の組織学的検討, 第 121 回日本解剖学会総会全国学術集会, 2016

⑬橋本隆、松田 賢一、吉井 崇喜、河田 光博、飯野哲: PTSD モデルストレス負荷に伴う、ラット脳内 CRH の発現異常, 第 121 回日本解剖学会総会全国学術集会, 2016

⑭堀口里美、堀口和秀、飯野哲: マウス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解析, 日本解剖学会第 75 回中部支部学術集会, 2015

⑮橋本隆、松田賢一、吉井崇喜、河田光博、飯野哲: PTSD モデルラットの脳内における CRH の発現変化, 日本解剖学会第 75 回中部支部学術集会, 2015

⑯飯野哲、堀口和秀: 消化管間質を構成する細胞群の形態学的特性, 第 57 回日本平滑筋学会総会, 2015

⑰T.Hayashi, M.Takeya, K.Uemura, T.Kanazawa, S.Iino, T.Igawa, K.Nakamura: The expression of small conductance calcium-activated potassium (SK3) channel is specifically concentrated at interstitial cells of the spaces between detrusor smooth muscle cells in the fovea pig urinary bladder, Symposium on Multicellular Inputs Regulating Muscle Excitability ,

2015

⑱梶典幸、中山晋介、堀口和秀、飯野哲、尾崎博、堀正敏: 術後イレウスにおける Interstitial cells of Cajal の病態変化特性, 第 57 回日本平滑筋学会総会, 平滑筋臓器の間質を構成する細胞群の特性と運動調節, 2015

⑲飯野哲、堀口和秀: 消化管間質を構成する細胞群の形態学的特性, 第 57 回日本平滑筋学会総会, 平滑筋臓器の間質を構成する細胞群の特性と運動調節, 2015

⑳飯野哲: 消化管におけるカハール介在細胞とその類縁細胞, 第 47 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 消化管病態の分子形態学的解析, 2015

㉑橋本隆、松田賢一、飯野哲、河田光博: PTSD モデルラットの脳内におけるストレス関連因子の発現変化, 第 38 回日本神経科学大会, 2015

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

飯野哲 (IINO, SATOSHI)  
福井大学・学術研究院医学系部門・教授  
研究者番号: 40242854

### (2) 研究分担者

堀口和秀 (HORIGUCHI, KAZUHIDE)  
福井大学・学術研究院医学系部門・准教授  
研究者番号: 20377451

橋本隆 (HASHIMOTO, TAKASHI)

福井大学・学術研究院医学系部門・特命助教  
研究者番号: 60712891

### (3) 連携研究者

堀口里美 (HORIGUCHI, SATOMI)  
福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員  
研究者番号: 00595283

(平成 27・28 年度)