

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15058

研究課題名(和文) 改変型TRECK法による消化管ペースメーカー細胞再生機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of regeneration mechanism of digestive tract pacemaker cell by modified TRECK method

研究代表者

堀 正敏 (Hori, Masatoshi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：70211547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：カハールの介在細胞(ICC)はペースメーカー細胞として消化管運動を制御している。本研究では、TRECK法を用いて後天的にICCを特異的に欠損したマウスを作製し、さらにGFP-間葉系幹細胞を移植し、ICCの再生過程とペースメーカーと消化管輸送能との連関を解析することで、消化器疾患における新たな治療標的としてのICC再生医療の基盤を構築することを目的にした。ANO-1およびc-kit遺伝子における発現調節領域約15-20kbを、ヒト由来のDTレセプター(hDTR)/loxp配列遺伝子、およびCreリコンビナーゼ遺伝子に接続した2つのコンストラクトを作製し、両トランスジェニックマウスの作製を試みた。

研究成果の概要(英文)："Interstitial Cells of Cajal (ICC)" controls gastrointestinal motility as pacemaker cells. In this study, we tried to establish ICC specifically attacked mice using TRECK method, then we investigate gastrointestinal motility dysfunction and GFP-mesenchymal stem cells transplantation in vivo. Finally we aimed to establish the basis of ICC regenerative medicine as a new therapeutic target in gastrointestinal diseases by analyzing the linkage between the process and pacemaker function and gastrointestinal tract transporting ability. Two constructs were constructed by linking the expression regulatory region of about 15-20 kb in the ANO-1 and c-kit genes to the human-derived DT receptor (hDTR) / loxp sequence gene and the Cre recombinase gene, and transgenic (Tg) Mouse was attempted. We are now establishing several transgenic mice, and investigating rate of gene expression.

研究分野：Veterinary pharmacology

キーワード：カハール介在細胞 TRECKマウス c-kit ANO-1 ジフテリア毒素 消化管

1. 研究開始当初の背景

消化管は自動能を持つ臓器であり、間葉系幹細胞由来の「カハールの介在細胞」(Interstitial Cells of Cajal; ICC) がペースメーカー細胞として機能することで蠕動運動が維持されている。近年、ICC の分化や機能を制御する遺伝子の先天性異常や、様々な炎症性刺激によって ICC の機能が低下し、消化管運動機能が障害されることが報告され、糖尿病性胃腸症をはじめ様々な消化管運動異常を呈する疾患の新たな責任細胞として ICC は注目されている。一方、ICC の遺伝子異常による疾患は致死的であり、再生医療を視野に入れた ICC の機能再建も期待されている。しかし現状では、間葉系幹細胞由来である ICC の細胞傷害後の再生過程、炎症刺激などによる脱分化機構など、未解決な問題が多く、ICC を対象とした再生医療の実現や炎症性腸疾患や糖尿病性胃腸症における ICC を標的にした創薬展開は現段階では困難な状況である。

2. 研究の目的

本研究では、改良型 TRECK (Toxin Receptor mediated Cell-Knockout) 法により、マウス体内から ICC をコンディショナルかつ特異的に欠損可能なマウスを作製し、この ICC 欠損マウスに GFP-間葉系幹細胞を移植し、ICC の再生過程と、ペースメーカー機能や消化管輸送能との連関を解析することで、消化器疾患における新たな治療標的としての ICC 再生医療の基盤を構築する。

3. 研究の方法

消化管運動のペースメーカーを担う ICC の機能が障害されたモデル動物は、現在のところ前述の遺伝的に c-kit に異常を持つ W/W^v マウスしかない。しかし、このマウスは c-kit 変異に起因する造血機能の異常や肥満細胞欠失といった消化管機能に関与する複数の表現型を示し、その病態モデルとしての使用には限界がある。そのため、ICC の機能障害が消化管運動系や全身の健康状態において正確にどのような影響を与えるか解析する術はなかった。

TRECK 法は、比較的細胞特異性の高い 1 つの遺伝子プロモーターを利用した細胞破壊法である。しかし、ICC のマーカー分子とされてきた c-kit を標的に TRECK 法を用いた場合、それを発現する肥満細胞等の他細胞種も傷害することになり W/W^v マウス同様の問題が生ずる。これに対し、本申請でチャレンジする DPD-TRECK 法は、標的細胞の特異性を相乗的に高めた画期的な改良法であり、c-kit に加え、もう一つの ICC のマーカーとされる ANO-1 の両遺伝子を

同時に発現する細胞のみを破壊できる。

一方、ICC のペースメーカー機能解析法としては Cell cluster を用いた解析法を開発して利用した。消化管筋層の薄片を組織培養してできる小細胞塊 (Cell cluster) は平滑筋、神経、ICC、マクロファージなど消化管筋層部を構成する細胞群が完全に維持されており、生理的なペースメーカー機能を Ca オシレーションとして測定した (Ca 蛍光指示薬である Fluo-3 による Ca オシレーション測定)。

4. 研究成果

1) ANO-1 と c-kit を標的にした ICC KO DPD-TRECK マウスの作製

ANO-1 および c-kit 遺伝子における発現調節領域約 15-20kb を、両端に loxP 配列を配置した kanamycin 耐性遺伝子 (kan) 等のマーカー遺伝子を介してヒト由来の DT レセプター (hDTR) 遺伝子に接続、および Cre リコンビナーゼ遺伝子に接続した 2 つのコンストラクトを作製し、各々トランスジェニック (Tg) マウスの作製を試みた。

ANO-1 については、ANO-1/Cre マウスの作出に成功し、合計 3 系統の Tg マウスが得られたが、そのうち 1 系統は子供が生まれなかったため現在 2 系統を維持している。ANO-1 Cre の遺伝子組み換えを確認するために、研究室で所有する Cre リコンビナーゼ依存的にカルシウムインジケーター cameleon を発現するマウスと細胞膜に局在して mCherry を発現するマウスをレポーターマウスとして ANO-1Cre による遺伝子組み換えの確認を試みた。結果いずれのレポーターマウスでも ANO-1 Cre の発現が認められた。しかし、回腸全層標本において平滑筋細胞と思われる葉巻型の細長い細胞に緑色の蛍光が明瞭に観察された。ANO-1 mCherry を用いた場合も平滑筋細胞での発現が認められた。ANO-1 は ICC に特異的に発現しているとの報告があるが、今回の結果では平滑筋細胞にも ANO-1 が発現している可能性が示唆された。この成績は、ICC と平滑筋細胞の Progenitor 細胞が共通であることから、発生段階で progenitor 細胞が ANO-1 を発現してしまっている可能性を示唆するものである。

一方、c-Kit 遺伝子発現の上流に DTR (ジフテリア毒素の受容体) を組み込んだ c-Kit-AG-pBHC のコンストラクトを作製し、Tg マウスの作製を試みた。20 匹ほどのマウスでジェノタイピングを行ったところ、Tg のマウスの確認はできなかった。その後、数度にわたりコンストラクトのデザインを変更し、Tg マウスの作出を試み、現在も作製

中である。

今後は、ANO-1 が平滑筋細胞にも発現していることから、ICC に比較的高発現し平滑筋細胞には発現していない ANO-1、c-Kit 以外の遺伝子を標的にし、3 遺伝子を標的にした TRECK マウス作製を目指す。

2) 消化管回腸の筋層標本をミンチ状の小組織塊にし、組織培養することで Cell cluster 標本を作製した。本標本に Fluo-3 を負荷して Ca imaging にて ICC のペースメーカー機能を測定し、各種炎症性メディエーターの ICC のペースメーカー機能へ与える影響について解析した。結果、LPS と IFN- γ の両刺激により ICC の機能が著しく低下することが明らかになった。この LPS + IFN- γ 刺激による ICC の機能低下は、c-Kit のタンパク質並びに遺伝子発現の低下を伴っており、一酸化窒素 (NO) 合成酵素 (NOS) の阻害薬である L-NAME によって完全に回復した。さらに、LPS + IFN- γ 刺激により誘導型 NOS (iNOS) の mRNA 発現の増加が認められ、免疫染色の結果、iNOS は消化管筋層部常在型マクロファージと平滑筋層に発現していた。以上の成績から、LPS と IFN- γ による ICC のペースメーカー機能低下は、平滑筋細胞並びにマクロファージに作用し iNOS を誘導し、産生された NO が隣接する ICC に作用して c-Kit の発現低下を伴ってペースメーカー機能低下を引き起こすことが明らかになった。

今後は、ICC の TRECK マウスの作出を完成させ、ジフテリア毒素投与による後天的 ICC 欠損マウスを用いた研究系を樹立し、炎症応答に伴う ICC の機能異常の分子機構と NO の関係、さらには今回できなかった間葉系幹細胞による ICC の機能再生についてさらに研究を進めていく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(全て査読 あり)

1. Kaji N, Nakayama S, Horiguchi K, Iino S, Ozaki H, Hori M. Disruption of the pacemaker activity of interstitial cells of Cajal via nitric oxide contributes to postoperative ileus. *Neurogastroenterol. Motil.* (2018) In press DOI: 10.1111/nmo.13334
2. Mihara T, Mikawa S, Kaji N, Endo M, Oikawa T, Jan T-R, Ozaki H, Hori M. Therapeutic action of honokiol on postoperative ileus via downregulation of iNOS gene expression. *Inflammation* (2017) 40:1331-1341. DOI: 10.1007/s10753-017-0576-7.

3. Morishita H, Noda T, Mochizuki N, Kaji N, Hori M, Kajio S, Nakayama S. Micro-coordination of pacemaker potentials in the intestine of the mouse. *Gastroenterology (in Motion section)* (2017),152;1831-1833. DOI:10.1053/j.gastro.2017.04.016
4. Kaji N, Horiguchi K, Iino S, Nakayama S, Ohwada T, Otani Y, Firman, Murata T, Sanders KM, Ozaki H, Hori M. Nitric oxide-induced oxidative stress impairs pacemaker function of murine interstitial cells of Cajal during inflammation. *Pharmacol Res.* (2016) 111:838-848. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.07.030.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Mucosal and muscularis immune responses-motility linkage in digestive tract 堀正敏, 第 95 回 日本生理学会 2018.3.28-30 サンポートホール高松・高松シンボルタワー (香川県、高松市)
2. Neural anti-inflammatory action mediated through two types of ACh receptors of small intestine in POI model mice. For Mosapride citrate. Hori M ANMA & JSNM Joint Meeting 2017 (5th Biennial Congress of the Asian Neurogastroenterology & Motility Association (ANMA) and 19th Japanese Society of Neurogastroenterology and Motility (JSNM)) March 23-25, 2017 Osaka International Convention Center (OICC) (Osaka・Osaka-city)
3. 術後イレウスにおける消化管ペースメーカー細胞 interstitial cells of Cajal の病態変化 梶典幸, 中山晋介, 堀口和秀, 飯野哲, 尾崎博, 堀正敏 第 159 回 日本獣医学会学術集会 2016.9.6-8 (神奈川県 藤沢市・日本大学生物資源学部)
4. Th1/Th2/Th17 誘導型各種消化管炎症応答と消化管運動機能異常 堀正敏, 梶典幸, 尾崎博 58th 日本平滑筋学会 2016-8.17-19 東北医科薬科大学 (宮城県・仙台市)
5. The function of intestinal pacemaker cells is impaired by nitric oxide derived from resident macrophages and smooth muscle cells during Th1 inflammation. Kaji N, Horiguchi K, Iino S, Nakayama S, Ozaki H and Hori M. The 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (MMCB2016)

- June 4-5, 2016 Sola city conference center (東京都・千代田区)
6. The function of intestinal pacemaker cells is impaired by nitric oxide derived from resident macrophages and smooth muscle cells during Th1 inflammation. Kaji N, Horiguchi K, Iino S, Nakayama S, Ozaki H and Hori M.
The 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (MMCB2016)
June 4-5, 2016 Sola city conference center (東京都・千代田区)
7. Th1 inflammatory signaling impairs pacemaker function of interstitial cells of Cajal through nitric oxide-induced oxidative stress. Kaji N, Nakayama S, Horiguchi K, Iino S, Ozaki H and Hori M
The 89th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society
March 9-11, 2016 (Yokohama)

〔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.vm.a.u-tokyo.ac.jp/yakuri/kiban-s/index.htm>

受賞 (計 2 件):

1. The function of intestinal pacemaker cells is impaired by nitric oxide derived from resident macrophages and smooth muscle cells during Th1 inflammation. Kaji N, Horiguchi K, Iino S, Nakayama S, Ozaki H and Hori M.
The 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (MMCB2016)
June 4-5, 2016 Sola city conference center (東京都・千代田区) 優秀演題賞受賞 (梶典幸)
2. Th1 inflammatory signaling impairs pacemaker function of interstitial cells of Cajal through nitric oxide-induced oxidative stress. Kaji N, Nakayama S, Horiguchi K, Iino S, Ozaki H and Hori M
The 89th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society
March 9-11, 2016 (Yokohama) 優秀演題賞受賞 (梶典幸)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀正敏 (HORI MASATOSHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号: 70211547

(2) 研究分担者

神沼修 (KAMINUMA OSAMU)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号: 80342921

(3) 研究分担者

米川博道 (YONEKAWA HIROMICHI)

公益財団法人東京医学総合研究所・基盤技術研究センター・特任研究員

研究者番号: 30142110