

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19723

研究課題名(和文) 下咽頭・食道・気管におけるtelocyteの役割

研究課題名(英文) Roles of telocytes in the hypopharynx, esophagus and trachea

研究代表者

楯谷 一郎 (Tateya, Ichiro)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：20526363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：テロサイトは長い突起(テロポッド)を持つ細胞であり、子宮、心臓、乳腺といった全身の様々な臓器の上皮直下・血管・神経・分泌腺の傍の間質に存在することが知られている。その長い突起を介して局所環境のコントロールに寄与していることが推察されているが、本研究ではダブルトランスジェニックマウスを用いて下咽頭、気管の上皮下にLgr5を発現するテロサイトが存在しており、損傷時には細胞数が増殖していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下咽頭・食道は上部消化管であり、通過する飲食物に対する何らかの知覚とそれに対する応答を行っていると考えられるが、テロサイトがそれを媒介し、咽喉頭異常感、嚥下障害、アレルギー等の疾患に関連している可能性が示唆された。これまでのテロサイト研究は主に電子顕微鏡に依存していたが、今回作成したテロサイトを恒久的に標識する遺伝子改変マウスを利用して、食道・咽頭・気管粘膜の局所環境コントロールや創傷治癒に関する研究の新しい展開が得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Telocytes are characterized with having long telopods. These cells are reportedly located in the subepithelial interstitium stroma adjacent to microvessels, nerves, and secretory glands, and are suggested to control local environment via telopods. In this study, we have used double transgenic mice and have shown that telocytes expressing Lgr5 are located in the hypopharynx, esophagus and trachea, and revealed that the number of telocytes increase following tissue injury.

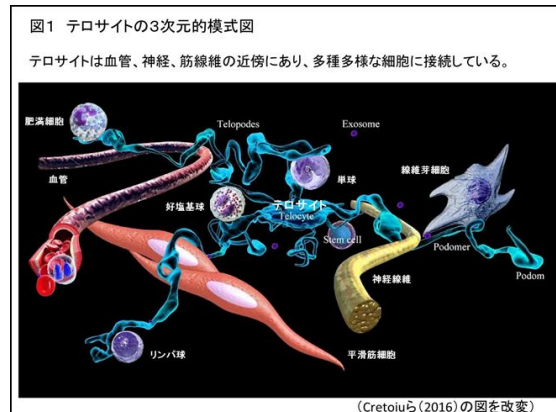
研究分野：気管食道科学

キーワード：テロサイト 下咽頭 食道 気管 損傷

1. 研究開始当初の背景

Telocyte (以下: テロサイト) は近年に偶然発見された特殊な間葉系細胞であり、テロサイト関連研究領域自体が大きな可能性を秘めた発展途上の研究領域である。爬虫類・鳥類・哺乳類の間質に見られることが報告されてきている (Cretoiou 2016)。最初の報告は Popescu らによるもので、ヒトとラットの膵臓に消化管のカハール介在細胞に類似した細胞が発見された (Popescu 2005)。

カハール介在細胞は消化管蠕動運動の局所ペースメーカーであり、平滑筋細胞と電気的に連結されていることが知られている。それゆえカハール介在細胞は平滑筋細胞がない組織にはみられないと考えられており、膵臓のカハール介在細胞類似細胞は謎の存在であった。その一方で、カハール介在細胞類似細胞は子宮、心臓、乳腺といった全身の様々な臓器に発見され、長い突起 (テロポッド telopod、ギリシャ語の接辞 telos = 遠く離れて) を持つことからテロサイトと名付けられた。



テロサイトの定義は「テロポッドを持つ細胞」とされ、上皮直下・血管・神経・分泌腺の傍の間質に見いだされることが多い。その長い突起を介して局所環境のコントロールに寄与していることが推察されている。

耳鼻咽喉科・頭頸部外科領域では、気管や食道にあるという報告があるが、電子顕微鏡観察のみで機能含め詳細は不明であった (Rusu 2012, Chen 2013)。

2. 研究の目的

本研究は、下咽頭・食道・気管におけるテロサイトの特徴とその機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

Lgr5 は Wnt シグナルの標的遺伝子であり、腸管上皮幹細胞に発現している。Lgr5-EGFP-i-res-CreER ノックインマウスと Rosa-Cre 蛍光レポーターマウスを交配させたダブルトランスジェニックマウスを作成し、咽喉頭・気管・食道領域に Lgr5 陽性細胞示す細胞の存在を調べた。本ダブルトランスジェニックマウスでは、Lgr5 を発現している細胞は GFP で標識されるが、Lgr5 を発現しなくなると GFP も発現しなくなる。

一方、薬剤 (タモキシフェン) 投与時に Lgr5 を歯厚限している細胞で Cre 組み替え酵素が作用してゲノム DNA の悔い換えが起こり、以後 hemagglutinin-monomeric real fluorescent protein 1 (HA-mTFP1) が発現するようになるため、組み替えが起こった細胞の系譜細胞は HA-mTFP1 が発現し、子孫細胞を恒久的にラベルすることが出来るようになる。このマウスを用いて、1) 系譜追跡実験と、2) 気管損傷実験を行った。

1) 系譜追跡実験

タモキシフェンを 2mg/body で 2 日連続経口投与し、投与後 4 日、18 日、8 週で経時的に HA-mTFP1 の発現を観察することで、Lgr5 陽性細胞から分裂した系譜細胞の増減、局在を観察した。さらに各種マーカー抗体で標識することで、分化後の細胞がどのような細胞であるかを検討した。

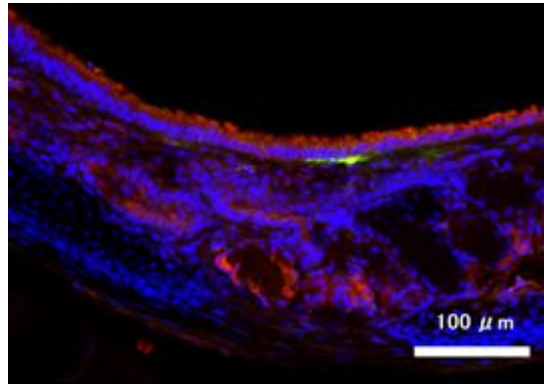
2) 気管損傷実験

タモキシフェン投与 4 日後に気管を露出した後に、第 2 気管輪から第 5 気管輪のレベルで気管に縦切開を加えた後に閉創し、タモキシフェン投与後 7 日、10 日、18 日、8 週目でサンプルを回収した。系譜細胞実験と同様に、経時的に HA-mTFP1 の発現を観察することで Lgr5 陽性細胞から分化した細胞の局在を調べた。

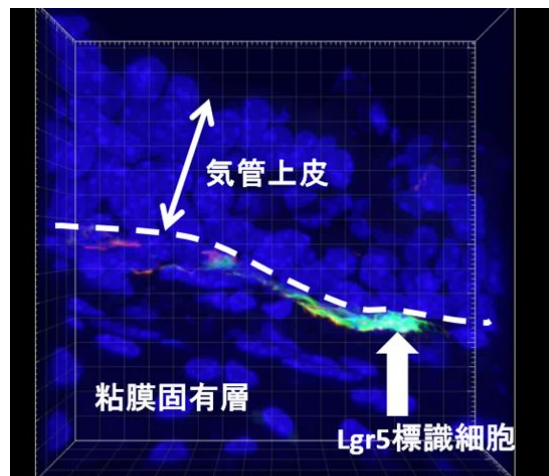
4. 研究成果

1) 系譜追跡実験

タモキシフェン投与4日目のサンプルでは、HA-mTFP1 陽性細胞はごく少数であったが、タモキシフェン投与18日目のサンプルではHA-mTFP1 陽性細胞は増加していた。さらにタモキシフェン投与後8週目のサンプルでは多数のHA-mTFP1 陽性細胞を器官に認めた。この結果により、Lgr5 陽性細胞は比較的長寿命であり細胞分裂をしていることが示唆された。



GFP 陽性細胞および HA-mTFP1 陽性細胞は気管粘膜固有層に存在し、多数の長い突起を細胞体よりのばしていた。免疫染色による検討では、GFP 陽性細胞および HA-mTFP1 陽性細胞は、いずれも上皮系のマーカーであるサイトケラチン5、E カドヘリンを発現しておらず、上皮下の粘膜固有層に存在していた。また、神経系マーカーである GFAP、Tuj1、平滑筋のマーカーである SMA も発現しなかったが、間葉系細胞マーカーであるビメンチンは発現していた。



緑:Lgr5 赤:恒久的標識

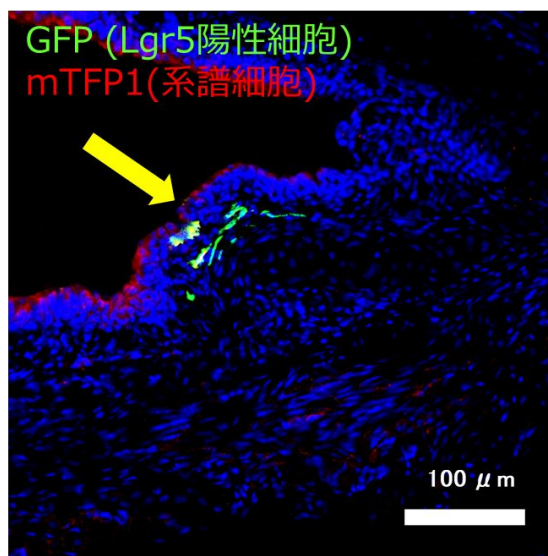
テロサイトの特異的マーカーは見いだされていないが、多数の長い突起を持つこと、ビメンチンに陽性を示すことが知られている。系譜追跡実験で確認された Lgr5 陽性細胞もテロサイトと同様に上皮直下や血管、神経の近傍に観察されており、また形態からもテロサイトそのものであることが強く示唆された。

2) 気管損傷実験

トランスジェニックマウス8週齢マウスにタモキシフェン投与4日目に気管に損傷をあたえ、更にその6日後にサンプルを作成した。作成したサンプルでは、気管障害部周囲に GFP 陽性、HA-mTFP1 陽性の細胞が多数存在していた。さらに気管損傷後8週のサンプルでは、多数の GFP 細胞、HA-mTFP1 陽性細胞を局所に認めた。これは気管損傷によって Lgr5 陽性細胞が増殖し、組織修復に何らかの役割があることを示唆していた。

タモキシフェン投与後、気管で HA-mTFP1 陽性細胞を観察したところ、経時的に HA-mTFP1 陽性細胞は増加していたことより、Lgr5 陽性細胞は比較的長寿命であり、また細胞分裂をしていることが示唆された。標識細胞は上皮マーカー、神経マーカーは陰性であり、間葉系マーカーであるビメンチンは陽性であった。その特徴的な形態とビメンチン陽性、細胞の発現部位より、標識細胞はテロサイトであることが強く示唆された。さらにテロサイトの発現を詳細に観察したところ、テロサイトは声帯には発現せず、

気管損傷2か月後



気管の他には下咽頭梨状陥凹と食道を中心に多くの細胞が存在することが明らかとなった。下咽頭・食道は上部消化管であり、通過する飲食物に対する何らかの知覚とそれに対する応答を行なっていると考えられるが、テロサイトがそれを媒介している可能性があり、咽喉頭異常感、嚥下障害、アレルギー等の疾患に関連する知見が得られる可能性が期待された。

これまでテロサイトがLgr5を発現しているという報告はなく、テロサイトとWntシグナルの関係については不明である。これらのテロサイトが全てLgr5陽性細胞系譜であるのか、Lgr5陽性細胞系譜のなかでLgr5発現を保つものと失うものの性質に違いがあるのかどうかも含め、食道・咽頭・気管粘膜におけるWntシグナルの役割についてさらなる解析が必要と思われる。

これまでのテロサイト研究では主に電子顕微鏡に依存していたが、Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2マウスを用いた実験系はテロサイトの恒久的標識が可能であり、今後はこの実験系を利用して食道・咽頭・気管粘膜の局所環境コントロールや創傷治癒に関する研究の新しい展開が得られることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

坂本進・中西印刷．気管におけるLgr5陽性細胞．喉頭・気管の再生医療、2017, 82-88.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：末廣 篤
ローマ字氏名：SUEHIRO, Atsushi
所属研究機関名：京都大学
部局名：大学院医学研究科
職名：助教
研究者番号(8桁)：00738247

研究分担者氏名：楯谷智子
ローマ字氏名：TATEYA, Tomoko
所属研究機関名：京都大学
部局名：大学院医学研究科
職名：特定病院助教
研究者番号(8桁)：10512311

研究分担者氏名：山下 勝
ローマ字氏名：YAMASHITA, Masaru
所属研究機関名：京都大学
部局名：大学院医学研究科
職名：客員研究員
研究者番号(8桁)：10635519

研究分担者氏名：北村守正
ローマ字氏名：KITAMURA, Morimasa
所属研究機関名：京都大学
部局名：大学院医学研究科
職名：助教
研究者番号(8桁)：60543262

研究分担者氏名：岸本 曜
ローマ字氏名：KISHIMOTO, Yo
所属研究機関名：京都大学
部局名：大学院医学研究科
職名：特定病院助教
研究者番号(8桁)：80700517

研究分担者氏名：大森孝一
ローマ字氏名：OMORI, Koichi
所属研究機関名：京都大学
部局名：大学院医学研究科
職名：教授
研究者番号(8桁)：10233272

(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。