

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06505

研究課題名(和文) 脳腸相関に着目した消化管グリアの動態と病態生理の解明

研究課題名(英文) Pathophysiological role of enteric glia in gut-brain axis

研究代表者

井村 徹也 (Imura, Tetsuya)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00405276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：消化管神経システムの主要なコンポーネントである消化管グリア細胞(EGC)について、ヒト腸管における分布や病態下における変化について検討を行った。ヒト結腸では各陰窩間に3-5個程度のEGCが存在し、細い突起を粘膜固有層内に伸長していた。加齢に伴って粘膜内のEGCの数は保たれていたが、老齢期には陰窩底周囲に集積する傾向がみられた。大腸前癌病変では粘膜内EGCの数は減少しており、その分布や粘膜内神経突起には疾患特異的な変化が見られた。In vitro共培養モデルを用いた検討から、EGCは大腸腫瘍細胞の細胞内情報伝達を修飾し、粘液産生などの腫瘍形質を調節している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物モデルを用いた検討から、EGCが消化管の恒常性維持に重要な役割を果たしていることはわかっているが、一方でヒト腸管における分布・機能や病態機序への関与については殆どわかっていない。今回の成果は、ヒトEGC研究へのフレームワークを提供するとともに、疾患特異的なEGCの変化を初めて明らかにしたことに意義があり、腫瘍発生・進展における腫瘍間質成分としてのEGCに光をあて、将来の新たな治療標的の創出につながるものである。

研究成果の概要(英文)：Enteric glial cells (EGC) are a major component of enteric nervous system (ENS) and we have investigated the distribution of EGC in human colon under physiological and pathological conditions. A several EGC exist in every inter-crypt and extend fine process within the lamina propria of normal colon. The number of EGC is well preserved during aging, but EGC tend to accumulate in close proximity to the base of the crypt in aged colon. The number of EGC decreases in the colonic mucosa of precancerous lesion, but the distribution of EGC and the processes of ENS neurons are altered in a disease-specific manner. An in vitro coculture model indicates that EGC modulate intracellular signaling of neoplastic cells to control their characteristics such as mucus production.

研究分野：実験病理学

キーワード：消化管 グリア細胞 腫瘍発生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

消化管は発達した神経システム (enteric nervous system; ENS) を有しており、ヒト ENS にはおよそ 500 万個ものニューロンが存在している。ENS では、筋層間及び腸粘膜下層の神経叢のニューロンに加えて、enteric glia (EGC) とよばれる特殊なグリア細胞が様々な非神経細胞と相互作用を行っており、その複雑さは“第2の脳”とも称されている。EGC は神経堤に由来し嘗てはシュワン細胞の一つとみなされていたが、中枢神経のアストロサイトに類似の性質をもつ消化管に特有の細胞集団であり、神経叢ニューロン周囲のみならず、その神経突起に沿って粘膜固有層まで全層にひろく分布している。EGC をターゲットとした動物モデルでの解析から、EGC がバリア機能維持や炎症制御・腸内細菌叢の調節といった消化管機能に重要な役割を果たしていることが示されている (Bush et al., Neuron 1998; Savidge et al., Gastroenterology 2007; Imura et al., Stem Cells 2010)。さらには、近年脳と消化管システムの両方向性の相互作用、いわゆる脳腸相関が注目されている。例えば、腸内細菌叢の変化は動脈硬化や糖尿病といった全身疾患のみならず、気分障害・自閉症等の精神疾患や老化に伴う認知機能低下に関与していることが想定されている。また Parkinson 病や多発性硬化症をはじめとする幾つかの神経変性疾患では、全身病態の表出として脳と同様の病理学的変化が ENS でも惹起されていることが報告されている。

こうしたことから、EGC の動態の解明は神経疾患・非神経疾患両方の病態生理における ENS の役割のみならず、診断・治療に関わるマーカーとしても大きな可能性を有していると考えられる。しかしながら、消化管研究でも神経疾患研究でも EGC はこれまで注目されることが少なく、未だその機能的意義の不明な細胞集団であり、特にヒト消化管における系統的な解析は殆ど行われていない。このため、その生理的な分布・形態や病態・加齢における変化といった基本的な知見についても殆どわかっていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究ではヒト検体を用いて、異なる部位・年齢・性別における EGC の分布・形態・分子発現を解析し、ヒト EGC 研究のフレームワークの構築を試みる。特に様々な消化管機能に重要と想定されているが、なお未解明な点の多い粘膜内 EGC の動態に着目する。次いでヒト疾患における EGC 及び ENS の変化を病理組織学的解析により明らかとし、その病態生理における意義を *in vitro* モデルを用いて検討する。そこで得られた知見をヒト検体の解析にフィードバックすることで、疾患マーカー・治療標的としての EGC の新たな可能性を探索することを企図する

### 3. 研究の方法

1) ヒト検体の病理学的解析：京都府立医科大学附属病院及び附属北部医療センターで 2006 年 1 月 1 日より 2023 年 3 月 31 日の期間に手術され病理診断がなされた 20 歳以上の症例を用いた。異なる部位・年齢・性別における EGC の分布の解析には、外科的に切除された小腸・大腸検体の非病変部位の病理標本を使用し、免疫組織化学により評価した。病態下における EGC の変化の解析には、内視鏡的に切除された大腸前癌病変 (腺腫・鋸歯状病変) の病理標本を使用

し、非病変部位を対照として免疫組織化学により評価した。本研究は、京都府立医科大学医学倫理審査委員会の審査を受け、研究機関長の承認を得て施行されている(ERB-C-1408-3)。

2) *in vitro* モデルの解析: 大腸腫瘍細胞と EGC との相互作用の解析を *in vitro* 共培養モデルを用いて行った。BRAF 変異を有するヒト大腸癌細胞株 HT-29-luc(JCRB1383)とラット由来 EGC(ATCC-CRL-2690)をカルチャーインサートを用いて 2 層性培養し、薬物刺激下における変化を RT-PCR, ウェスタンブロット, フローサイトメトリー, ELISA, 免疫組織化学にて解析した。

#### 4. 研究成果

##### 1) ヒト粘膜内 EGC の形態と部位・年齢・性別における分布

ヒト EGC のマーカーとして、SOX10・p75NTR の発現を用いて評価した。ヒト粘膜 EGC は粘膜固有層内に散在性に分布し、双極性の細い突起を有し、その突起は時に上皮基底膜に接するように分布していた。このヒト EGC の形態は、遺伝的に蛍光蛋白で標識されたマウス EGC と類似したものであった。次に、SOX10 をマーカーとして、異なる年齢・部位・性別における粘膜内 EGC の数・分布を解析した。回腸では結腸(右半・左半)に比して EGC の密度は低い傾向がみられた(5-35 個/mm<sup>2</sup> vs 10-50 個/mm<sup>2</sup>)。成人群(20-45 歳)と加齢群(>80 歳)、あるいは女性・男性の比較では、回腸・右半結腸・左半結腸いずれにおいても有意な差はみられず、EGC は性別に関わらず加齢腸管においても維持されていた。結腸においては各陰窩間におおよそ 3-5 個程度の EGC が分布していた。ただし、EGC の密度には個体間で小さくない差がみられ、年齢・性別・部位以外の何らかの要因の関与が示唆された。また、いずれの年齢においても、EGC は粘膜内では陰窩底部周囲に高い密度で分布していた。興味深いことには、加齢群では表層の EGC が減少し、結果的に陰窩底部周囲により偏る傾向がみられた。

##### 2) 大腸前癌病変における粘膜内 EGC 及び ENS 神経突起の変化

次に病態下における粘膜内 EGC の変化を、大腸前癌病変の切除検体を用いて検討した。周囲の非病変部を対照群として比較した。結果、大腸前癌病変部では粘膜内 EGC の密度は非病変部の 1/3 以下に減少していた。近傍非病変部の密度も外科的切除検体正常部位に比較して低い傾向が見られたが、採取法の違いによる影響は考慮された。異なる病変間での EGC 密度には有意な差はみられなかった。このように EGC 密度は前癌病変で減少していたため、次いで神経突起の変化について、神経突起マーカー Tuj1 の免疫染色を用いて評価を行った。神経突起密度は病変依存的に異なっており、低下を示すグループと逆に増加を示すグループに分かれていた。以上から、ある種の前癌病変では投射される神経線維は保たれた状態でありながら、EGC が選択的に減少していることが示された。

##### 3) *in vitro* モデルでの検討

大腸腫瘍発生における EGC と神経の変化の機能的意義を、大腸癌細胞株 HT-29 と EGC 細胞株の共培養を用いて検討した。粘膜への神経投射刺激のモデルとして、basolateral side から血管作動性腸管ペプチド(VIP)の投与を行った。VIP 刺激により HT-29 細胞での粘液構成タンパク質 muc2・muc5ac の転写は 9 倍程度増加した。一方、EGC との共培養下では VIP による muc2・muc5ac の転写促進効果が抑制された。次に、EGC による粘液構成タンパク質の転写抑制の機序を検討し

た。主要な VIP 受容体 VPAC1 は HT-29 細胞で全周性に発現しており、フローサイトメトリーを用いた検討では EGC 共培養下での発現低下などはみられなかった。また細胞内 cAMP を上昇させると HT-29 細胞での粘液構成タンパク質の転写が増加したが、EGC 共培養下では VIP と同様の抑制効果が見られた。HT-29 細胞では細胞内 cAMP の上昇によって細胞内情報伝達分子 ERK のリン酸化が抑制された。一方、EGC 共培養下では ERK のリン酸化は亢進しており、細胞内 cAMP の上昇によって同様に ERK は抑制されたが、対照群に比較して活性の残存が見られた。以上から、EGC はリガンド・受容体レベルではなく、細胞内情報伝達レベルに影響し粘液構成タンパク質の発現を修飾することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Abo Hirohito, Muraki Aoi, Harusato Akihito, Imura Tetsuya, Suzuki Maki, Takahashi Kohta, Denning Timothy L., Kawashima Hiroto	4. 巻 8
2. 論文標題 N-acetylglucosamine-6-O sulfation on intestinal mucins prevents obesity and intestinal inflammation by regulating gut microbiota	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.165944	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 井村 徹也	4. 巻 6
2. 論文標題 消化管神経システムの生理と病理	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 京都府立医科大学附属北部医療センター誌	6. 最初と最後の頁 2-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------