

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：32701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14604

研究課題名(和文)一酸化窒素による消化管ペースメーカー細胞の生存/障害機構の解明

研究課題名(英文) Survival and death signaling in interstitial pacemaker cells induced by nitric oxide

研究代表者

梶 典幸 (KAJI, NORIYUKI)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：20779318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：カハール介在細胞(ICC)は消化管腸運動のペースメーカー細胞である。一酸化窒素(NO)は炎症時におけるICC障害因子である一方、正常時にはICCネットワークの恒常性維持に必要であることが知られている。しかし、NOがICCに対して生存と障害という全く反対の作用を示す機構は不明である。そこで本研究は、NOへの暴露量がICCの生存と障害の運命を決定すると仮説を立て、これを検証した。その結果、多量のNOはICCを障害し、少量のNOはICCの生存に必要であることが示唆された。しかし、NOによるICC恒常性維持機構はICCに対する直接的な作用ではなく、他の細胞を介した間接的な作用である可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ICCは正常な消化管運動を生み出すために欠かすことができない機能を担っているが、炎症性疾患や糖尿病時にはICCの減少や機能障害が生じることが報告されている。このようなICC障害を治療する方法は未だ確立されておらず、ICCを標的とした消化管運動不全の治療法確立が期待されている。本研究によりNOへの暴露の程度がICCの生存や障害を左右する要因であることが示唆された。本研究の成果はNOの制御によりICC障害の予防や治療が行える可能性を示すとともに、治療戦略構築における基盤的知見となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Interstitial cells of Cajal (ICC) are pacemaker cells for gastrointestinal motility. Nitric oxide (NO) can disrupt ICC during intestinal inflammation, while it is required for maintaining of the ICC network during healthy conditions. However, the mechanism by which NO exerts completely opposite effects on ICC, survival and disruption, is not well understood. In this study, we hypothesized that the amount of NO exposure to ICC determines the fate of ICC. The results suggest that large amounts of NO impaired ICC and small amounts of NO were necessary for ICC survival. However, the mechanism of ICC survival by NO may not be a direct action on ICC, but may be an indirect action via other types of cells. We examined the possible involvement of apelin signaling in NO-induced ICC survival, but further investigations are needed.

研究分野：獣医薬理学

キーワード：カハール介在細胞 消化管運動 炎症 一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

カハール介在細胞 (Interstitial cells of Cajal; ICC) は消化管運動における電氣的ペースメーカーを担う間質細胞である。我々はこれまでに、炎症時に産生される一酸化窒素 (NO) が (c-Kit を発現する) ICC を減少させるとともに、ペースメーカー機能を障害することで、消化管運動不全に陥ることを報告した。一方、神経が生理的に産生している NO は抑制性の消化管運動調節シグナルとして働くだけでなく、ICC ネットワークの恒常性を維持するために必要であることも報告されている。しかし、どのような機構により NO が ICC に対して生存と障害という全く反対の作用を示すかは不明である。炎症性腸疾患や糖尿病患者において、ICC の障害が認められるが、ICC を標的とした消化管運動不全の治療法は確立していない。本課題を明らかにすることは NO 関連シグナルを標的とした ICC 障害の治療戦略基盤を構築できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は「ICC に作用する NO の量的な違いが生存と障害の運命を決定する」と作業仮説を立て、これを検証することで、NO による ICC の生存/障害シグナルを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NO 暴露量と ICC ネットワークの変化

我々が以前に確立した消化管筋層の環境を高度に保持する cell cluster 培養を用いて、NO 暴露量と ICC ネットワークの変化を検討した。Cell cluster に対し NO ドナーである NOR5 を 0, 50, 500 μM で処置した。処置開始から 24 時間後に cell cluster をアセトンで固定し、c-Kit に対する免疫染色を実施した。また、生体においても同様に NO 暴露量と ICC ネットワークの変化を検討するために、NO 合成阻害薬である L-NAME (1 g/L) または NO 合成を促進するシトルリン (20 g/L) を飲水中に溶解し、C57BL/6J マウスに 2 週間自由摂取させた。胃 (胃体部)、空腸、結腸の筋層を採取し、c-Kit に対する免疫染色を実施した。本研究では c-Kit を発現し、ネットワーク構造を示す細胞を正常な ICC と定義し、c-Kit 陽性細胞面積を測定した。

(2) NO 合成阻害が ICC 増殖に及ぼす影響

上記と同条件でマウスに L-NAME を 1 週間摂取させた後に、L-NAME に加えて BrdU (0.8 g/L) を添加した飲料水をさらに 1 週間自由摂取された。その後、c-Kit および BrdU に対する免疫染色を実施し、NO 合成阻害による ICC の増殖に及ぼす影響を検討した。

(3) 神経由来 NO の標的細胞の検討

神経由来 NO の標的細胞となる細胞を明らかにするために、NO を受容した後に下流で産生される cGMP に対する免疫染色を実施した。cGMP の分解は早いため、ホスホジエステラーゼ阻害薬である IBMX を処置した後に組織の固定を行った。

(4) mRNA 発現網羅解析

上記と同条件でマウスに L-NAME を 2 週間摂取させ、筋層の total mRNA を抽出した後に、RNA-seq により mRNA 発現の網羅解析を実施した。

4. 研究成果

(1) NO 暴露量と ICC ネットワークの変化

Cell cluster に対して NO ドナーを高濃度 (500 μM) で処置した結果、cluster 内に存在する ICC が著しく減少した。一方、NO ドナーを低濃度 (50 μM) で処置すると、ICC 面積が増加傾向を示した (図 1A)。

マウスに対して L-NAME を 2 週間投与した結果、胃体部および空腸の筋層間神経叢 (MY) に位置する ICC ネットワーク面積が有意に減少した。一方、大腸筋層には ICC の変化が認められなかった。シトルリンの投与は ICC ネットワーク面積を増加させる傾向にあったが、有意な差ではなかった。また、いずれの場合も筋層内または深部神経叢に位置する ICC (ICC-IM および ICC-DMP) には影響を与えなかった。

以上の結果から、ICC に作用する

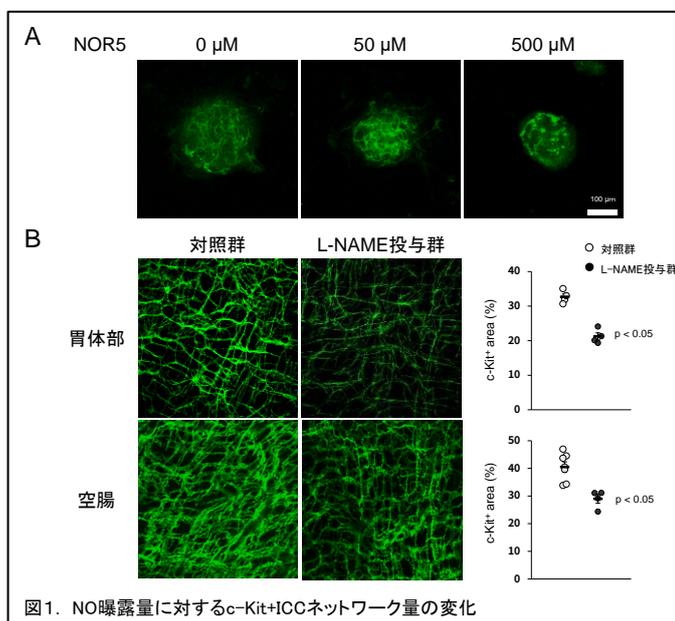


図1. NO暴露量に対するc-Kit+ICCネットワーク量の変化

NO が過剰な状態では ICC ネットワークが障害される一方、NO が適度な量で作用すると ICC の生存に働く可能性が示唆された。また、NO による ICC 障害の発生は非常に多くの NO が暴露された場合に生じ、NO 産生量の微量な増加は ICC を障害することなく、むしろ増殖を促進する可能性が考えられた。

(2) NO 合成阻害が ICC 増殖に及ぼす影響 (図 2)

ICC は増殖とアポトーシスによりターンオーバーしていることが知られている。そこで、NO 合成を阻害した際に生じる ICC ネットワーク面積の減少が、ICC の増殖阻害によって生じている可能性を検討した。その結果、対照群と L-NAME 投与群の間で増殖した ICC (BrdU+c-Kit⁺) の数に違いはなかった。一方、ICC 以外の増殖した細胞 (BrdU+ c-Kit⁻) の数は L-NAME の投与により有意に増加していた。以上の結果から、NO 合成抑制による ICC の減少は ICC の増殖阻害によらないことが示唆された。

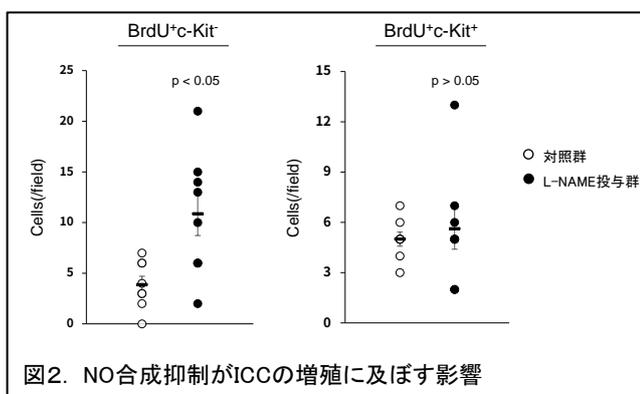


図2. NO合成抑制がICCの増殖に及ぼす影響

(3) 神経由来 NO の標的細胞の検討 (図 3)

健康な消化管において ICC が神経由来 NO の標的細胞となっているかを明らかにするために、NO を受容した後に下流で産生される cGMP を指標として検討した。その結果、空腸において cGMP 免疫染色に対して陽性を示す ICC-MY は観察されず、主に神経が存在する位置に cGMP を強く持つ細胞が認められた。また、ICC によって頻度が制御されている自発性収縮の頻度は L-NAME 処置によって変化しなかったことから、正常な空腸の ICC-MY はほとんど神経由来 NO の作用を受けていない可能性が示唆された。

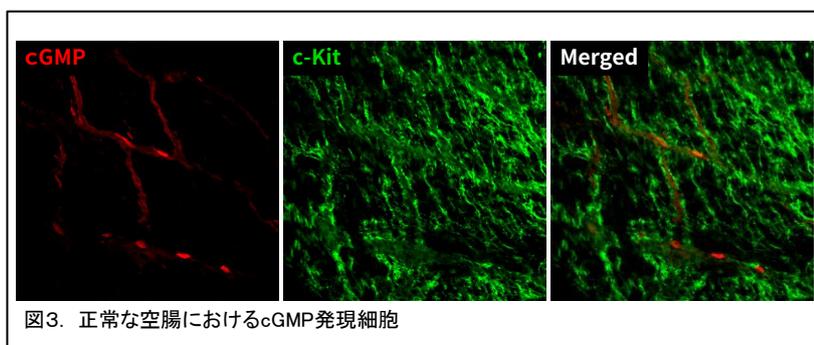


図3. 正常な空腸におけるcGMP発現細胞

(4) NO 合成阻害による消化管筋層の mRNA 発現変化

正常な消化管では ICC-MY が神経由来 NO の作用を受けていない可能性が高いにもかかわらず、NO 合成阻害により ICC が減少したことから、NO 合成阻害が他の細胞への作用を介して、間接的に ICC の生存に影響する可能性を考えた。まず、ICC の生存に必要なことが知られている stem cell factor の mRNA 発現量を比較したが、有意な変化は認められなかった。そこで次に、筋層全体に対して mRNA 発現の網羅解析を実施した。その結果、NO 合成抑制によって発現が低下した遺伝子が胃体部において 84 種類、空腸において 111 種類存在していた。このうち、胃と空腸に共通する遺伝子は 4 種類であった。これとは反対に NO 合成抑制によって発現量が増加した遺伝子が胃体部において 99 種類、空腸において 90 種類存在していた。このうち、胃と空腸に共通する遺伝子は 5 個であった。さらに候補を絞るために、nNOS 陽性神経と ICC の減少が知られている老化マウス (24 カ月以上) における筋層の mRNA 遺伝子発現と比較し、アペリン/アペリン受容体シグナルに着目した。

アペリン受容体 mRNA の発現は L-NAME 投与群の胃体部および空腸の筋層で有意に低下していた。アペリンが消化管運動に及ぼす影響を検討した結果、アペリン (1 μM) は自発性収縮の張力および頻度に影響を与えなかったことから、アペリン/アペリン受容体シグナルは消化管運動には寄与していないことが示唆された。次に、アペリン (1 μM) を cell cluster に処置し、24 時間培養したが、ICC に変化は認められなかった。

(5) 総括

本研究により ICC に作用する NO の量的な違いが生存と障害の運命を決定することが明らかとなった。すなわち、炎症時に産生される多量の NO は ICC を障害する一方、生理的レベルで産生される少量の NO は ICC の生存に必要なことが示唆された。しかし、正常な消化管において産生される神経由来 NO は ICC-MY にほとんど作用していないことが示唆されたことか

ら、神経由来 NO による ICC ネットワークの恒常性維持機構は ICC に対する直接的な作用ではなく、他の細胞を介した間接的な作用である可能性が考えられた。NO と ICC 恒常性維持をつなぐシグナル経路の候補としてアペリン/アペリン受容体シグナルを見出したが、その詳細は十分に検討できておらず、今後、更なる検討が必要である。また、炎症時に産生される多量の NO による ICC 障害機構として酸化ストレスが関与することを以前に報告しているが、本実験では炎症を伴わず、NO の増加のみを模しているため、ICC 障害に酸化ストレス以外のシグナルが関与していた可能性が考えられ、こちらについても更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kishi Kazuhisa, Kaji Noriyuki, Kurosawa Tamaki, Aikiyo Satoshi, Hori Masatoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Hyperglycemia in the early stages of type 1 diabetes accelerates gastric emptying through increased networks of interstitial cells of Cajal	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0222961
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0222961	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kishi Kazuhisa, Kaji Noriyuki, Endo Mari, Tsuru Yoshiharu, Oikawa Tetsuro, Hori Masatoshi	4. 巻 68
2. 論文標題 Development of a quantitative method for evaluating small intestinal motility using ultrasonography in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 381～389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.19-0030	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 -

1. 著者名 Kimura Hitomi, Imura Yu-ki, Tomiyasu Hiroataka, Mihara Taiki, Kaji Noriyuki, Ohno Koichi, Unno Toshihiro, Tanahashi Yasuyuki, Jan Tong-Rong, Tsubone Hirokazu, Ozaki Hiroshi, Hori Masatoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Neural anti-inflammatory action mediated by two types of acetylcholine receptors in the small intestine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-019-41698-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 KISHI Kazuhisa, KAJI Noriyuki, ENDO Mari, TSURU Yoshiharu, OIKAWA Tetsuro, HORI Masatoshi	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Development of a quantitative method for evaluating small intestinal motility using ultrasonography in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.19-0030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mikawa Shoma, Kondo Makoto, Kaji Noriyuki, Mihara Taiki, Yoshitake Ryohei, Nakagawa Takayuki, Takamoto Masaya, Nishimura Ryohei, Shimada Shoichi, Ozaki Hiroshi, Hori Masatoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Serotonin 3 receptor signaling regulates 5-fluorouracil mediated apoptosis indirectly via TNF-production by enhancing serotonin release from enterochromaffin cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 1669 ~ 1680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201701200RR	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 -

1. 著者名 ISLAM Md. Shafiqul, KAJI Noriyuki, MIKAWA Shoma, YANG Qunhui, KUSABE Moriaki, HORI Masatoshi, OZAKI Hiroshi	4. 巻 80
2. 論文標題 Induction of myosin light chain kinase and CPI-17 by TGF- accelerates contractile activity in intestinal epithelial cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 977 ~ 984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.17-0684	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaji N., Nakayama S., Horiguchi K., Iino S., Ozaki H., Hori M.	4. 巻 30
2. 論文標題 Disruption of the pacemaker activity of interstitial cells of Cajal via nitric oxide contributes to postoperative ileus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurogastroenterology & Motility	6. 最初と最後の頁 e13334 ~ e13334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nmo.13334	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yang Qunhui, Fujii Wataru, Kaji Noriyuki, Kakuta Shigeru, Kada Kodai, Kuwahara Masayoshi, Tsubone Hirokazu, Ozaki Hiroshi, Hori Masatoshi	4. 巻 32
2. 論文標題 The essential role of phospho-T38 CPI-17 in the maintenance of physiological blood pressure using genetically modified mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 2095 ~ 2109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201700794R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶 典幸、中山 晋介、飯野 哲、堀口 和秀、堀 正敏
2. 発表標題 炎症病態における消化管ペースメーカー細胞の機能破綻とその治療法の探索
3. 学会等名 第140回日本薬理学会関東部会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶 典幸、岸 和寿、黒澤 珠希、堀 正敏
2. 発表標題 Gastrin-releasing peptide modulates the pacemaker function of interstitial cells of Cajal
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会（大阪国際会議場、大阪）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶典幸、槇郁風、尾崎博、堀正敏
2. 発表標題 ミオシンホスファターゼ阻害因子CPI-17欠損による消化管運動抑制
3. 学会等名 第60回日本平滑筋学会総会（東京慈恵医科大学、東京）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

麻布大学 獣医薬理学研究室HP https://lab-navi.azabu-u.ac.jp/vv-07/
--

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
---------	---------