

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07485

研究課題名(和文) 消化器官のグリア細胞・星細胞におけるカルシニューリンと細胞間相互作用の役割

研究課題名(英文) Roles of calcineurin and cell-cell interactions in glial and stellate cells in the digestive system

研究代表者

田中 正彦 (Tanaka, Masahiko)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・准教授

研究者番号：60267953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：グリア細胞特異的カルシニューリンノックアウトマウスの小腸グリア細胞及び肝・膵星細胞について詳細に解析した。小腸の腸管グリア細胞でカルシニューリンが欠損することにより増殖能・生存能、活性化状態、分泌物質の発現量・分泌量が変化して、神経細胞や上皮細胞との細胞間相互作用に異常が生じ、消化・吸収機能やバリア機能の低下につながる可能性が示された。また、肝臓や膵臓の星細胞でカルシニューリンが欠損することにより細胞数が減少し、肝臓や膵臓の組織構造に異常が生じ、消化機能の低下につながる可能性が示された。以上の研究成果は、腸管グリア細胞や星細胞におけるカルシニューリンと細胞間相互作用の役割の重要性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、小腸の腸管グリア細胞及び肝臓・膵臓の星細胞におけるカルシニューリンと細胞間相互作用の新しい役割を明らかにした。本研究をさらに進展させることで、腸管グリア細胞の異常によって引き起こされる腸疾患(炎症性腸疾患等が想定される)や星細胞の異常によって引き起こされる肝臓・膵臓疾患の原因究明が可能となり、そうした疾患の新しい治療法・治療薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed small-intestinal glial cells and hepatic and pancreatic stellate cells in glial calcineurin B1-conditional knockout mice. In the small intestine, calcineurin B1 deficiency in enteric glial cells induced reduced proliferation and survival, abnormal activation and altered levels of secreted substances, leading to abnormalities in glia-neuron and glia-epithelial cell interactions. In the liver and pancreas, calcineurin B1 deficiency in stellate cells reduced the number of stellate cells, leading to histological abnormalities. These abnormalities may cause maldigestion, malabsorption and barrier dysfunction. These findings suggest the important roles of calcineurin and cell-cell interactions in glial and stellate cells in the digestive system.

研究分野：分子神経生物学、実験病理学

キーワード：グリア細胞 星細胞 小腸 肝臓 膵臓 カルシニューリン 炎症 疾患モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 腸管グリア細胞と神経細胞・上皮細胞との細胞間相互作用の役割

神経系を構成する神経細胞以外の細胞であるグリア細胞は、従来支持細胞程度の位置づけであったが、中枢神経系における最近の研究によって、様々な形で神経機能に積極的に関与することが明らかになりつつある。しかし、末梢神経系におけるグリア細胞の役割についてはいまだ知見が少ない。そうした中で、腸管神経系におけるグリア細胞の役割の研究が活発化してきていた。腸管グリア細胞が様々な栄養因子・生理活性物質を分泌して腸の神経細胞や上皮細胞と相互作用することが明らかになり、こうした細胞間相互作用の役割に注目が集まり始めていた (Ochoa-Cortes et al., 2016; Grubisic et al., 2018)。腸管グリア細胞は、神経細胞と相互作用することによって蠕動運動を制御し、上皮細胞と相互作用することによってバリア機能を維持する役割を果たすことが想定された。

(2) 腸管グリア細胞におけるカルシニューリンの役割

腸管グリア細胞におけるカルシニューリンの役割については、全くわかっていなかった。一方で、神経系のグリア細胞(アストロサイト)におけるカルシニューリンの役割については、いくつかの研究報告があった。アストロサイトをカルシウムイオノフォア、ATP、interleukin-1 β (IL-1 β)、tumor necrosis factor α (TNF α) 等によって刺激するとカルシニューリンが活性化し、転写因子 nuclear factor of activated T cells (NFAT) の活性化につながる (Pérez-Ortiz et al., 2008; Sama et al., 2008; Furman et al., 2010; Serrano-Pérez et al., 2011)。腸管グリア細胞とアストロサイトは多くの共通した性質を有するため、腸管グリア細胞においてもカルシニューリンシグナルが重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

(3) 肝臓・膵臓の星細胞におけるカルシニューリンの役割

肝臓や膵臓に存在する星細胞は、グリア繊維性酸性蛋白 (GFAP) を発現する点や、細長い突起を有し星型の形態をとる点で、神経系のグリア細胞(アストロサイト)と一部共通の性質を持つと見ることができる。星細胞の機能としては、ビタミン A を貯蔵することや活性化するとコラーゲンを産生し線維化の原因になることが知られている。しかし、肝星細胞や膵星細胞におけるカルシニューリンの役割については、腸管グリア細胞と同様、全くわかっていなかった。

2. 研究の目的

我々が中枢神経系のグリア細胞におけるカルシニューリンの役割を調べる目的でグリア細胞特異的カルシニューリンノックアウトマウス(GFAP-Cre CNB1^{fl/fl}マウス)を作製したところ、意外にも小腸の変性と炎症を起こすとともに、消化・吸収機能が低下し、成長が低下して、離乳期後に衰弱して死亡した (Fujita et al., 2018; Okura et al., 2019)。中枢神経系においては、致死の原因となるような大きな異常は見られなかった。これらの所見から、このノックアウトマウスではカルシニューリンを欠損することで生じた腸管グリア細胞の異常が神経細胞や上皮細胞との細胞間相互作用の異常につながり、小腸の消化・吸収機能やバリア機能の低下をもたらしたのではないかと考えられた。

また、このノックアウトマウスではグリア細胞と同様に GFAP を発現する肝臓や膵臓の星細胞でもカルシニューリンを欠損すると考えられるので、星細胞の異常が原因となって肝臓や膵臓に異常が生じ、消化機能の低下につながる可能性もある。特に肝臓に関しては、野生型マウスと比べて著しく小さいことがわかっていたため、何らかの異常が生じている可能性が高かった。

そこで本研究では、以下の2点を目的とした。

- (1) 小腸の腸管グリア細胞でカルシニューリンが欠損することによって、神経細胞及び上皮細胞との細胞間相互作用にどのような異常が生じるかを明らかにし、その異常が小腸の消化・吸収機能やバリア機能にどのように影響するかを検討する。
- (2) 肝臓や膵臓の星細胞でカルシニューリンが欠損することによって、星細胞にどのような異常が生じるか、さらに、その異常が肝臓や膵臓の組織構造や消化機能にどのように影響するかを明らかにする。

3. 研究の方法

ノックアウトマウス:GFAP-Cre マウスと floxed CNB1 マウス(いずれも Jackson Laboratory) をかけ合わせて、GFAP-Cre CNB1^{fl/fl} マウスを得た。

(1) 小腸グリア細胞と神経細胞・上皮細胞との細胞間相互作用の解析

小腸グリア細胞の増殖能と細胞死の解析

生後約 20 日齢のコントロール及びノックアウトマウスの小腸組織をコラゲナーゼ処理により分散し初代培養した。Bromodeoxyuridine 処理後に抗 bromodeoxyuridine 免疫染色を行い、増殖能を比較した。Annexin V-FITC によってアポトーシスを、propidium iodide によってネクローシスを検出し比較した。グリア細胞は抗 GFAP 免疫染色によって同定した。

小腸グリア細胞の単離培養系の確立

線維芽細胞のコンタミネーションを抑え、グリア細胞の純度を高める培養法を検討した。基礎培地として M199 と DMEM/F12 を比較するとともに、クローニングシリンダーを用いたグリア細胞の単離、ピペットチップを用いた線維芽細胞のスクレイピング、fetal bovine serum の代わりに G5, N2 supplement を添加した無血清培養期間を設けることを試した。

小腸グリア細胞の分泌物質量の解析

[3-1] 分泌物質及び関連分子の発現量の解析

コントロール及びノックアウトマウス由来小腸グリア細胞単離培養系のライセートをサンプルとして S100B, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65, inducible nitric oxide synthase (iNOS), GFAP の Western blotting を行い、発現量を比較した。

[3-2] NF- κ B のリン酸化の解析

コントロール及びノックアウトマウス由来小腸グリア細胞単離培養系のライセートをサンプルとして、NF- κ B の p65 サブユニットをリン酸化特異的及び非特異的に検出する Western blotting を行い、p65 のリン酸化を比較した。

[3-3] TGF- β 1 の分泌量の解析

コントロール及びノックアウトマウス由来小腸グリア細胞単離培養系の上清をサンプルとして TGF- β 1 の ELISA を行い、分泌量を比較した。

小腸グリア細胞と神経細胞との細胞間相互作用の解析

コントロール及びノックアウトマウス由来小腸初代培養系において抗 β III-tubulin 免疫染色を行い、神経細胞数を比較した。

小腸グリア細胞と上皮細胞との細胞間相互作用の解析

Culture plate (12 well) 上に小腸グリア細胞を、cell culture insert (0.4- μ m pore, translucent) 上に上皮細胞 (Caco-2) を播種し、共培養を行った。Lucifer Yellow の透過性試験や抗 ZO-1 免疫染色を行い、上皮細胞のバリア形成を評価した。

(2) 肝臓・膵臓の星細胞や組織構造の解析

免疫組織化学的及び組織学的解析

生後約 25 日齢のコントロール及びノックアウトマウスの肝臓・膵臓の凍結切片を作成し、以下の染色を行った。

[1-1] 星細胞の免疫染色

抗 GFAP 免疫染色によって星細胞を染色し、その形態や数を比較した。

[1-2] 肝臓・膵臓の組織染色

一般染色として、Hematoxylin-Eosin 染色を行った。線維化検出染色として、Aniline Blue-Orange G 染色及び Sirius Red-Fast Green 染色を行った。

Western blotting

コントロール及びノックアウトマウス由来肝臓・膵臓のライセートをサンプルとして GFAP や TGF- β 1 の Western blotting を行い、発現量を比較した。

4. 研究成果

(1) 小腸グリア細胞と神経細胞・上皮細胞との細胞間相互作用の異常の解析

小腸グリア細胞の増殖能と細胞死の解析

小腸初代培養系におけるグリア細胞の増殖能と細胞死を解析したところ、ノックアウトマウス由来細胞で増殖能の低下と細胞死(アポトーシス)の増加が見られた。このことが、ノックアウトマウス小腸におけるグリア細胞からの分泌物質低下につながりうる。

小腸グリア細胞の単離培養系の確立

小腸グリア細胞における分泌物質の発現量や分泌量を解析するために、線維芽細胞のコンタミネーションを抑え、グリア細胞の純度を高めた単離培養系を開発した (Teramoto et al., 2022)。培養条件の検討の末、基礎培地として DMEM/F12 を使用し、ピペットチップを用いた線維芽細胞のスクレイピングと G5, N2 supplement を添加した無血清培養期間を設けることを組み合わせることによって、約 90%の純度で小腸グリア細胞を培養することに成功した。

小腸グリア細胞の分泌物質量の異常の解析

で開発した培養系を用いて、以下のことを明らかにした。小腸グリア細胞から放出されて神経細胞や上皮細胞の生存・増殖・分化等を調節する S100B の発現量が、ノックアウトマウス由来細胞で増加していた。S100B と関連する（相互に活性化する）転写因子 NF- κ B の p65 サブユニットの発現上昇及びリン酸化増強、NF- κ B による転写制御を受ける iNOS の発現上昇、グリア細胞マーカーである GFAP の発現上昇も見られたことから、ノックアウトマウスの小腸グリア細胞には活性化している側面があると考えられた。上皮の成熟・保護効果をもつ TGF- β 1 については、その分泌量が減少していた。同様の効果をもつ GDNF については、発現量は減少していたが分泌量に変化はなかった。

小腸グリア細胞と神経細胞との細胞間相互作用の異常の解析

小腸初代培養系における神経細胞数を解析したところ、ノックアウトマウス由来培養系で神経細胞数に変化は見られなかった。

小腸グリア細胞と上皮細胞との細胞間相互作用の異常の解析

小腸グリア細胞と上皮細胞 (Caco-2) を共培養し、上皮細胞のバリア形成を評価する実験系を確立した。

以上の結果より、このノックアウトマウスの小腸グリア細胞では、カルシニューリンが欠損することにより増殖能・生存能、活性化状態、分泌物質の発現量・分泌量が変化していることが明らかになった。このような異常によってもたらされる神経細胞や上皮細胞との細胞間相互作用の異常の詳細や、小腸の消化・吸収機能及びバリア機能への影響を解明していくことが今後の課題である。

(2) 肝臓・膵臓の星細胞や組織構造の異常の解析

肝臓の星細胞の免疫染色を行ったところ、ノックアウトマウスで星細胞数が減少していた。星細胞の形態には明確な違いは見られなかった。Western blotting によって GFAP の発現量を解析したところ、ノックアウトマウスで減少しており、星細胞数の減少を反映した結果だと考えられる。また、肝臓の組織構造を観察したところ、ノックアウトマウスで類洞が拡張している例が見られた。さらに、肝星細胞から分泌され肝星細胞の活性化や肝臓の線維化に参与する TGF- β 1 の発現量を解析したところ、ノックアウトマウスで増加傾向が見られた。ただし、線維化を検出する組織染色を行っても肝臓の線維化は見られなかった。

膵臓においても免疫染色と Western blotting を行うと、星細胞数と GFAP 発現量が減少していた。星細胞の形態には明確な違いは見られなかった。膵臓の組織構造を観察したところ、腺房細胞が萎縮している例が見られた。

以上の結果より、このノックアウトマウスの肝臓や膵臓の星細胞ではカルシニューリンが欠損することにより細胞数が減少すること、肝臓や膵臓の組織構造にも異常が生じていることが明らかになった。このような異常の消化機能への影響を解明していくことが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yuki Horie, Toshiaki Arame, Naohide Hirashima, Masahiko Tanaka	4. 巻 458
2. 論文標題 Promotion of dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells by Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II, II and IV and possible involvement of CREB phosphorylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 87-98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2021.01.024	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 Hikaru Teramoto, Naohide Hirashima, Masahiko Tanaka	4. 巻 45
2. 論文標題 A simple method for purified primary culture of enteric glial cells from mouse small intestine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 547-551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00038	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14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中正彦, 成瀬美結, 平嶋尚英
2. 発表標題 小脳プルキンエ細胞の樹状突起形成におけるphospholipase C の役割
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会合同大会 (NEURO2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部幸希, 望月雄司, 二宮里帆, 田中正彦, 鈴木 亮, 平嶋尚英
2. 発表標題 マスト細胞の分泌におけるOrai-2の2つの役割
3. 学会等名 第41回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺本 光, 平嶋尚英, 田中正彦
2. 発表標題 Calcineurin欠損腸管グリア細胞の培養下における生存能・増殖能の評価
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中正彦, 大倉宇海, 平嶋尚英
2. 発表標題 グリア細胞でのカルシニューリン欠損がもたらす消化・吸収不良、低血糖、致死の機構解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中正彦, 寺本 光, 與那覇和希, 平嶋尚英
2. 発表標題 Calcineurinを欠損した小腸グリア細胞の異常と蠕動運動低下及び変性・炎症との関連
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中正彦, 荒目俊明, 平嶋尚英
2. 発表標題 Dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells is promoted by CREB phosphorylation downstream of Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II , II and IV
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺本 光, 平嶋尚英, 田中正彦
2. 発表標題 小腸の変性・炎症機構解明を目指したマウス由来腸管グリア細胞の単離培養法の開発
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺本 光, 平嶋尚英, 田中正彦
2. 発表標題 カルシニューリン欠損小腸グリア細胞は、培養下において増殖能が低下し分泌物質量が変化する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺本 光, 平嶋尚英, 田中正彦
2. 発表標題 Calcineurinを欠損した小腸グリア細胞における増殖能低下と分泌物質量変化：小腸機能異常及び恒常性破綻との関連の探求
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二宮里帆, 服部幸希, 鈴木瑠理子, 田中正彦, 平嶋尚英
2. 発表標題 マスト細胞の活性化における分泌顆粒膜タンパク質Orai-2の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中正彦, 荒目俊明, 平嶋尚英
2. 発表標題 Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II , II , IVによる小脳プルキンエ細胞の樹状突起形成促進機構
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 篠田 桃, 平嶋尚英, 田中正彦
2. 発表標題 GFAP-Cre calcineurin B fl/fl miceにおける肝星細胞および肝臓の異常
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 棚橋佑史, 平嶋尚英, 田中正彦
2. 発表標題 小腸炎を引き起こすGFAP-Cre calcineurin B fl/fl miceにおけるマスト細胞安定化薬及び抗菌薬の効果
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤大介, 松村綾子, 板倉 誠, 鈴木瑠理子, 田中正彦, 平嶋尚英
2. 発表標題 セロトニン受容体アンタゴニストmethiothepinによるマスト細胞からの炎症性メディエーター遊離抑制作用とその作用機序解明
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生体超分子システム解析学分野ホームページ
<https://www.nagoya-cu.ac.jp/phar/grad/soyaku/seimei/chobunshi/>

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