

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008 ～ 2010
 課題番号：20590741
 研究課題名（和文） 消化管運動におけるカハール介在細胞の関与-2 型糖尿病における病的意義
 研究課題名（英文） Involvement of interstitial cells of Cajal in gut movement, especially in type2 diabetes mellitus.
 研究代表者
 筒井 秀作（TSUTSUI SHUSAKU）
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：10359846

研究成果の概要（和文）：

消化管運動を調節する細胞としてカハール介在細胞（ICC）が注目されている。

- 1) 我々は2型糖尿病マウス *db/db* マウスに注目し、消化管運動が障害されていること、消化管の ICC が全般的に減少していることを示した。以上より、2型糖尿病性消化管運動の原因として ICC 傷害の可能性が示唆された。
- 2) ICC の生存因子として IGF-1 が知られている。我々は、*db/db* マウスに IGF-1 の持続注入を試みたが、ICC の傷害軽減効果を認めなかった。2型糖尿病における ICC 傷害の克服が今後の課題である。

研究成果の概要（英文）：

Recently, interstitial cells of Cajal (ICC) are recognized as one of fundamental factors that regulates gut movement.

- 1) We first analyzed *db/db* mice as a model of type 2 diabetes mellitus and found that gut movement was disturbed and the area of ICC was decreased in stomach, small intestine and colon in these mice. The results suggest that ICC may be involved in the disturbed gut motility in type 2 diabetes mellitus.
- 2) We then attempted to reduce damage in ICC in *db/db* mice pharmacologically. Because IGF-1 was reported to support the survival of ICC in tissue culture, we started the delivery of IGF-1 continuously into *db/db* mice before the onset of diabetes and continued its infusion for 7 weeks. However, the area of ICC was comparable to control mice (saline infusion). The method to reduce damage in ICC remains to be solved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：カハール介在細胞、消化管運動、糖尿病

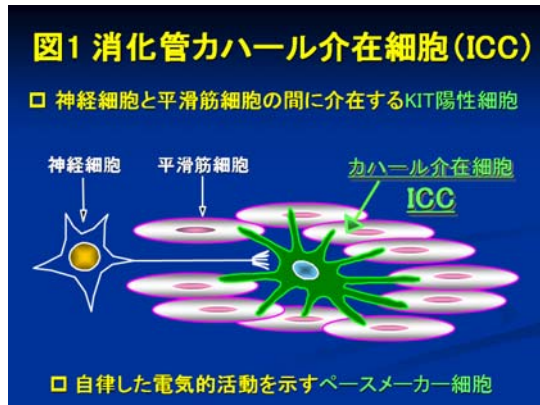
1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者の約3割に消化管運動障害が出現することが知られている。消化管運動障害は、

腹部症状出現により患者の QOL を損ねると同時に、消化吸収が変則的になることから血糖管理を困難とさせるため糖尿病を悪化さ

せる原因となる。消化管運動障害を引き起こす原因として神経障害が古くから指摘されているが、これに反する結果の報告も見られるため包括的な理解には至っていない。そして、臨床的に消化管運動を評価するための方法が特に大腸において未発達である。

カハール介在細胞 (ICC) は、神経細胞と平滑筋細胞の間を介在する KIT 陽性細胞で、自律した周期的電気活動を示す細胞である。(図 1)



消化管運動障害における ICC の関与は慢性偽性腸閉塞症や1型糖尿病で報告されているが、2型糖尿病における関与は報告されていない。

2. 研究の目的

2型糖尿病モデルマウスを用いて (1) カハール介在細胞の減少と消化管運動障害の関連性、(2) カハール介在細胞が減少する機序、(3) カハール介在細胞の減少を抑制する方法を明らかにする。

ヒトの消化管運動を評価するツールを開発するため、(4) 大腸運動における cine MRI の有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 2型糖尿病モデルマウス *db/db* を解析対象とする。消化管運動障害を胃排泄能、全消化管通過時間で計測する。ICC は KIT の免疫染色で計測する。

(2) カハール介在細胞の生存因子である SCF-KIT シグナルに関連する SCF と KIT の発現を RT-PCR で計測する。SCF の供給源は ICC 周囲の平滑筋細胞であるため、平滑筋細胞を *Myh11* の RT-PCR で評価する。

(3) ICC の組織培養系において ICC の維持に必要な因子として IGF-1 が報告されている。*db/db* が糖尿病を発症する前から IGF-1 を持続注入することで ICC に生じる傷害を回避できるか検討する。

(4) 健常人の大腸を対象に cine MRI を撮像 (HASTE 法、5 秒間隔)、どの条件で測定した場合にどのような結果が得られるのかを網羅的に検討する。

4. 研究成果

(1) 糖尿病を発症した 12 週令 *db/db* マウスは対照マウスと比べて、胃排泄と全腸管通過時間の遅延を認め (図 2,3)、小腸の自動運動能はその正確なリズムを失っていた。

図2 *db/db* マウスは胃排出率が低下

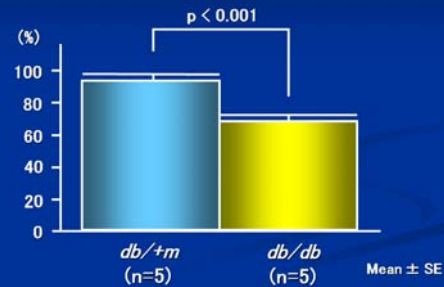
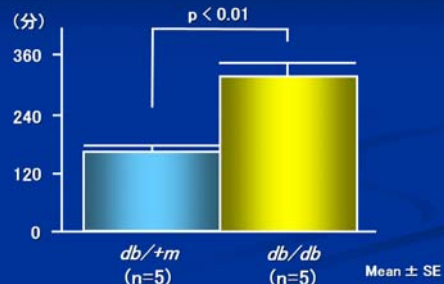


図3 *db/db* マウスは全消化管通過時間が延長



db/db マウスは糖尿病性消化管運動障害を調べるための適したモデルである。

次に ICC 面積を KIT の免疫染色で測定すると、12 週令 *db/db* マウスは対照マウスと比べて胃・小腸・大腸いずれにおいても減少していた (図 4)。以上より、糖尿病性消化管運動障害における ICC の関与が示唆された。

図4 *db/db* マウスの ICC は検討した全消化管臓器で減少した

		<i>db/+m</i> (n=6)	<i>db/db</i> (n=6)	p value
胃 (前庭部)	IM	55582 ± 5606	26532 ± 2111 ↓	< 0.001
	MY	54307 ± 4186	36484 ± 2819 ↓	< 0.01
近位小腸	DMP	6220 ± 561	1763 ± 284 ↓	< 0.001
	MY	16483 ± 1478	8589 ± 706 ↓	< 0.001
遠位小腸	DMP	6912 ± 858	1893 ± 437 ↓	< 0.001
	MY	20423 ± 2132	11223 ± 775 ↓	< 0.005
中部大腸	SMP	21793 ± 1451	11008 ± 782 ↓	< 0.001
	MY	41989 ± 5717	21967 ± 1948 ↓	< 0.01

IM: intramuscular 領域 MY: myenteric plexus 領域
DMP: deep muscular 領域 SMP: submuscular 領域 Mean ± SE (pixels/mm²)

(2) 12 週令 *db/db* マウスの消化管における SCF 発現量は、胃前庭部、小腸、大腸いずれにおいても対照マウスと比べて減少してい

た(図5)。ICC周囲の平滑筋はHE染色において形態学的に著差を認めなかったが、Myh11のRT-PCRを施行すると、12週令 *db/db* マウスの Myh11 発現量は対照マウスと比べて胃においては同等であったが、小腸および大腸においては低下していた(図6)。

図5 *db/db*マウスではSCF遺伝子の発現量が低下した

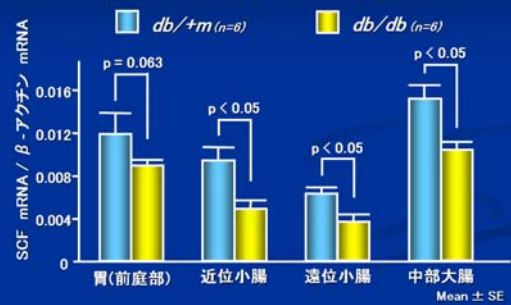
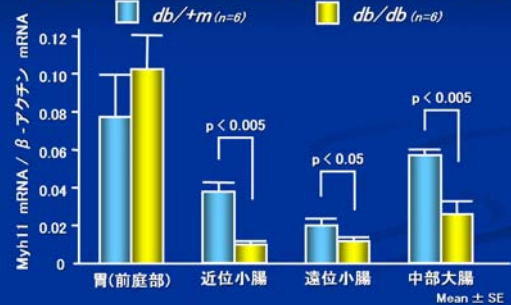


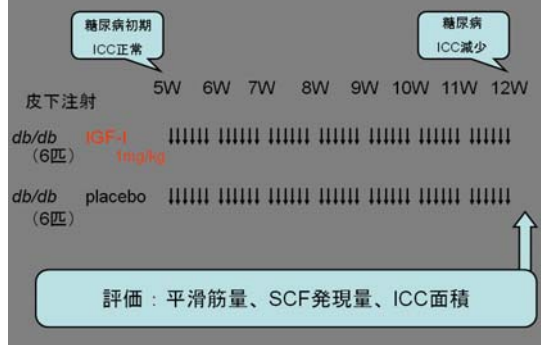
図6 *db/db*マウスではMyh11遺伝子(平滑筋マーカー)の発現量が低下した



以上より、*db/db*マウスにおいてICCが傷害される原因として、平滑筋傷害およびそれによるSCF発現量低下が示唆された。

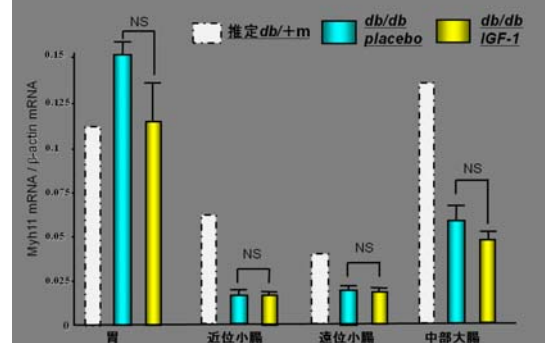
(3) 糖尿病によるICC減少が、平滑筋傷害によるSCF減少が責任として考えられるならば、その平滑筋傷害をIGF-1によって抑制することで、ICC減少が抑制するのではないかと期待される。過去に、組織培養系におけるIGF-1の平滑筋保護効果が報告されている。そこで、糖尿病を発症する前にかつICCの減少を認めない5週令 *db/db* マウスに浸透圧ポンプを装着して7週間持続でIGF-1を過剰量注入した(図7)。

図7 方法



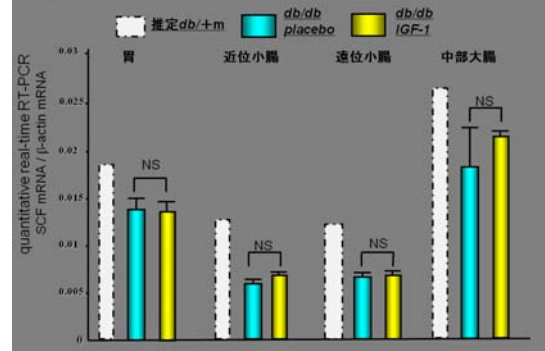
まず、平滑筋量を Myh11 の RT-PCR で評価したが、IGF-1 の投与は Myh11 の発現量を変化させなかった。すなわち、平滑筋傷害を抑制できなかった(図8)。

図8 *db/db*マウスへのIGF-1投与は平滑筋の減少を抑制せず



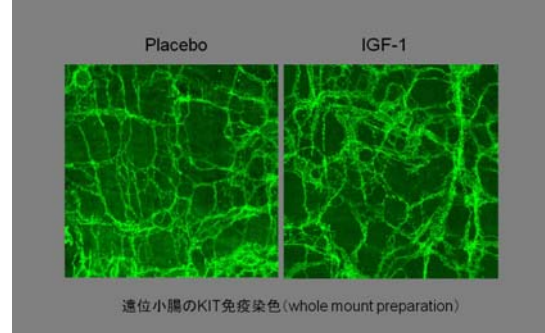
次に、SCFの発現量をRT-PCRで測定した。その結果、IGF-1の投与はSCF発現量を変化させなかった。すなわち、SCF発現量の低下を抑制できなかった(図9)。

図9 *db/db*マウスへのIGF-1投与はSCFの減少を抑制せず



最後に、ICC細胞量を whole mount preparation によるKIT免疫染色で評価した。IGF-1の投与はICC細胞量を変化させなかった。すなわち、ICCの減少を抑制できなかった(図10)。

図10 *db/db*マウスへのIGF-1投与はICCの減少を抑制せず



(4) 上行結腸を矢状断、横行結腸を冠状断、下行結腸を矢状断で撮像した。上行結腸と下行結腸は連続して撮像される長さが短くかつ呼吸性変動を受けやすかった。一方、横行

結腸は 20cm 程度の距離で安定して画像を取得出来た (図 11)。



芋虫のようなリズムカルな動きが連続して観察され局所的な収縮と考えられた。ときに長い距離を移動する収縮も見られた。これらは、いずれもマンメトリーで記録・分類されてきた所見と類似しており、cine MRI が大腸運動を非侵襲的に解析するのに適したツールである可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件、いずれも査読あり)

(1) Ishii S, Tsuji S, Tsujii M, Nishida T, Watabe K et al. Restoration of gut motility in Kit-deficient mice by bone marrow transplantation. *J Gastroenterol* 2009;44(8):834-41

(2) Yamamoto T, Watabe K, Nakahara M, Ogiyama H, Kiyohara T, Tsutsui S et al. Disturbed gastrointestinal motility and decreased interstitial cells of Cajal in diabetic *db/db* mice. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008; 23(4):660-667

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筒井 秀作 (TSUTSUI SHUSAKU)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：10359846

(2) 研究分担者

渡部 健二 (WATABE KENJI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：50379244

木曾 真一 (KISO SHINNICHI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：40335352

吉田 雄一 (YOSHIDA YUICHI)

大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：30457014

(3) 連携研究者

なし