

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590213

研究課題名（和文） 受容体型チロシンキナーゼを介した消化管間質細胞の発生分化

研究課題名（英文） Receptor tyrosine kinase-mediated development and differentiation of interstitial cells in the gastrointestinal tract

研究代表者

飯野 哲 (IINO SATOSHI)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：40242854

研究成果の概要（和文）：マウス消化管筋層における間質細胞（カハール介在細胞と線維芽細胞）の発生分化について、受容体型チロシンキナーゼ *c-Kit* と PDGF 受容体 α の発現と機能解析を行った。カハール介在細胞は胎生中期から *c-Kit* を発現し各種 *W* ミュータント (*c-Kit* 遺伝子変異) では細胞種特異的に発生が阻害された。PDGF 受容体 α は胎生初期から中胚葉由来細胞に広く発現し、胎生後期に線維芽細胞に特異的に発現することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We observed the expression of receptor tyrosine kinase, *c-Kit* and PDGFR α , that are specific markers of interstitial cells of Cajal and fibroblast-like cells in the murine gastrointestinal tract. *c-Kit* expression was observed in gastrointestinal tract from mid embryonic stage. *W* mutant mice that have *c-kit* mutations showed cell type specific deficiency of interstitial cells of Cajal. PDGFR α expression in gastrointestinal tract was observed from early embryonic stage in mesoderm cells and in fibroblast-like cells in late embryonic stage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：消化管間質細胞、カハール介在細胞、消化管神経系、*W* ミュータントマウス、*c-Kit*、PDGF 受容体 α 、SK3 チャネル、消化管運動

1. 研究開始当初の背景

消化管運動を司る主要素は、運動の動力となる平滑筋と運動を誘発する消化管神経系である。更に消化管運動を調節する要素として、*Kit* チロシンキナーゼを発現するカハール介在細胞（interstitial cells of Cajal, ICC）が

ペースメーカーとして、また神経筋伝達の介在を行う。私たちはカハール介在細胞の神経筋伝達機能の研究を進め、その興奮性及び抑制性神経伝達における働きを明らかにしてきた。また、カハール介在細胞とは異なる間質細胞が筋層には存在し、受容体型チロシン

キナーゼである PDGF 受容体 α (PDGFR α) を発現することが分かってきた。現在、PDGFR α 発現細胞は筋層線維芽細胞 (fibroblast-like cell, FLC) と呼ばれる。消化管筋層では、受容体型チロシンキナーゼ (c-Kit, PDGFR α) を発現する 2 種の間質細胞がネットワークを形成し、神経や平滑筋に作用を及ぼしながら全体としての調和を保つと考えられる。

2. 研究の目的

(1) 私たちはカハール介在細胞を欠損する W ミュータントマウスの解析を進めてきた。自然発症型の *c-kit* 遺伝子異常を持つ W ミュータントは、チロシンキナーゼ活性が異なる多数のミュータントがある。マウス小腸では胎生 12 日頃から将来の筋層領域全体に c-Kit 分子発現が始まり、次いで平滑筋細胞とカハール介在細胞の共通前駆細胞に c-Kit 発現が局在し、胎生 18 日には c-Kit 発現カハール介在細胞が分化し平滑筋細胞の c-Kit 発現は消失する。私たちは c-Kit チロシンキナーゼがカハール介在細胞の発生分化において、幼若型カハール介在細胞の発生と成熟型への分化の段階の両方に必要であると考え、W ミュータントを用いることによりカハール介在細胞の発生にどのような違いが見られるのか、カハール介在細胞のサブタイプ間の比較を含めて検討することを目的とする。

(2) カハール介在細胞とは異なる間質細胞として PDGFR α 発現細胞を私たちは同定している。本細胞の特性としてカハール介在細胞と同じく神経終末に近接することから神経筋伝達能を持つ機能性細胞と考えられる。本細胞を同定するマーカーである PDGFR α の発現を胎生期に遡って探ることにより、本細胞の特性を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *c-kit* 遺伝子変異 W ミュータントマウスを用いた解析

キナーゼ活性が異なる数種類の W ミュータントを用いて、カハール介在細胞の発生分化に関わる c-Kit チロシンキナーゼの意義を明らかにする。W ミュータントとしてキナーゼ活性の高い順 (正常に近い順) に Wf、Wv、Wjic、W を維持しており、胎児では PCR による遺伝子型から、生後は体色 (貧血による

白色傾向と白色体毛) (また PCR) からホモマウスを同定する。Wsh マウスは c-Kit 発現を示さない。これらマウスを用い、カハール介在細胞の分布を免疫組織化学法 (c-Kit 抗体および TMEM16A 抗体) により明らかにする。また、腸管神経の形態についても PGP9.5 抗体により 2 重染色法によって明らかにする。

(2) c-Kit シグナルとカハール介在細胞発生分化

カハール介在細胞の発生分化における c-Kit シグナル要求性の違いを各種遺伝子変異マウスを用いて解析する。W ミュータントに加え、c-Kit リガンドである stem cell factor (SCF) 遺伝子異常を持つ Sl/Sl マウス (Sl/+として維持) を用いる。(1)と同じく免疫組織化学法によりカハール介在細胞を解析する。

(3) PDGFR α を発現する線維芽細胞の発生分化

線維芽細胞のマーカーである PDGFR α を可視化するため GFP ノックインマウスを導入する。PDGFR α は発生中期 (マウス胎生 13-14 日) には筋層全体に発現し、その後低下する (Kurahashi 2008) ことが報告されているが、胎生期全体にわたって PDGFR α -GFP を観察することで、その動態を解析する。

(4) PDGFR α 発現細胞の発生学および機能的特性に関わる分子の探索

線維芽細胞の持つ分子基盤を網羅的に解析するため DNA マイクロアレイ法を用いる。サンプルに小腸の筋層線維芽細胞、漿膜下線維芽細胞、粘膜下線維芽細胞を用いる。消化管の粘膜と筋層に分離後、コラゲナーゼ処理により細胞を分散し、抗体反応の後、細胞をセルソーターで収集し、mRNA 調整を経てマイクロアレイ法解析を行う。線維芽細胞分離のため PDGFR α -GFP マウスを用い、漿膜下線維芽細胞、粘膜下線維芽細胞を分離するため CD34 を標識する。

4. 研究成果

(1) *c-kit* 遺伝子変異 W ミュータントマウスを用いた解析

下図に示す 4 種類のミュータントマウスの解析を行った。各マウスにおいて c-Kit チロ

シンキナーゼの活性が異なり、W/W では生後間もなく死亡するため生体での解析が出来なかったが、他のミュータントでは消化管全体にわたってカハール介在細胞の変化を解析した。観察したミュータント全てにおいて、胃 ICC-IM は欠損、胃 ICC-MY は減少、小腸 ICC-MY は欠損、結腸 ICC-IM は欠損、結腸 ICC-MY は減少していた (表 1)。減少の割合はキナーゼ活性に応じたものであり、カハール介在細胞の数が c-Kit キナーゼによることが示唆された。同細胞の欠損や減少は生後から観察されていることから、c-Kit シグナルは同細胞の数を発生的に調節すると考えられる。

ミュータント	W	Ww	W ^{jic}	W ^{sh}
写真				
体色 (ホモ)	腹部白斑 (白)	腹部白斑 薄い体色 (白)	白斑 (白)	腹部带状白斑 (白)
ホモの特徴	重度貧血 周産期死亡	貧血 不妊 肥満細胞減少	貧血 不妊 肥満細胞減少	肥満細胞減少
キナーゼ活性	無	中度低下	無	無
ICCの変化	多数の欠損	多数の欠損	多数の欠損	多数の欠損

(2) c-Kit シグナルとカハール介在細胞発生分化

c-Kit チロシンキナーゼとそのリガンド SCF がカハール介在細胞の発生分化に關与する意義を調べるため、各種分子の遺伝子変異を持つミュータントマウスを解析した。その過程で、c-Kit シグナルと関係なく発生するカハール介在細胞の一群を見いだした。各種 W ミュータントマウスにおいて小腸輪走筋に存在する ICC-DMP は正常マウスと同じく多数がネットワークを作っていた。電子顕微鏡による微細形態学的研究においても神経終末と近接し、ギャップ結合により周囲の細胞と連絡することが観察され、c-Kit シグナル欠損でも正常に発生分化することが明らかとなった。

(表 1) ミュータントマウスにおけるカハール介在細胞数 (++ : 正常、- : 欠損)

		ICC-IM ICC-DMP	ICC-MY	ICC-SM
Esophagus	+/+	++	/	/
	W ^v /W ^v	-	/	/
	W/W ^v	-	/	/
Fundus	+/+	++	/	/
	W ^v /W ^v	-	/	/
	W/W ^v	-	/	/
Corpus	+/+	++	++	/
	W ^v /W ^v	-	+	/
	W/W ^v	-	+	/
Antrum	+/+	++	++	/
	W ^v /W ^v	-	++	/
	W/W ^v	-	++	/
Small intestine	+/+	++	++	/
	W ^v /W ^v	++	~+	/
	W/W ^v	++	~+	/
Cecum	+/+	++	++	/
	W ^v /W ^v	-	+	/
	W/W ^v	-	+	/
Proximal colon	+/+	++	++	++
	W ^v /W ^v	-	++	++
	W/W ^v	-	+	++
Distal colon	+/+	++	++	++
	W ^v /W ^v	-	~+	++
	W/W ^v	-	~+	++
	W ^{jic} /W ^{jic}	-	-	++

更に **c-Kit** リガンドである **SCF** 遺伝子の変異を持つ **Sl** においても正常な **ICC-DMP** が観察された。これらから、カハール介在細胞には **c-Kit** キナーゼに依存して発生する細胞群が多数であるが、**c-Kit** に依存せずに発生するサブタイプがあり、**c-Kit** 以外にも発生に関与する因子があることを示している。

(3) **PDGFR α** を発現する線維芽細胞の発生分化

PDGFR α -GFP マウスの胎児消化管を観察したところ、**PDGFR α** 発現細胞は上皮細胞と神経細胞以外の中胚葉由来の細胞に広く発現していた。胎生中期に筋層平滑筋が分化してくると平滑筋細胞では **PDGFR α** 発現が見られなくなった。この時期、**c-Kit** 発現がカハール介在細胞に限局してくるが、**PDGFR α** は観察された。胎生末期には平滑筋細胞とカハール介在細胞ともに **PDGFR α** 発現が見られなくなった。**PDGFR α** は胎生初期から中胚葉由来細胞に発現し、やがて細胞分化が進むと線維芽細胞に限局するようになった。

(4) **PDGFR α** 発現細胞の発生学および機能的特性に関わる分子の探索

セルソーターを用いて **PDGFR α** 発現細胞を分取する方法を確立することが出来た。成体マウスからは線維芽細胞が **PDGFR α ⁺CD34⁻** グループとして約 3.5%、漿膜下線維芽細胞は **PDGFR α ⁺CD34⁺** グループとして 0.2% の細胞が分取出来る。また、粘膜内の線維芽細胞も **PDGFR α ⁺CD34⁺** グループ (粘膜内の 0.4%) として分取した。現時これらの細胞から抽出した RNA を用いたマイクロアレイ法を行い解析を進めている。線維芽細胞の発生に関わる分子の探索として同じく細胞分取を進め今後、分子の解析を進めることとしている。

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 9 件)

① Interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal musculature of *W(jic) c-kit* mutant mice. S. Iino, S. Horiguchi, K. Horiguchi, J Smooth Muscle Res, 査読有, 2011, 47 (3-4):111-21, DOI:10.1540/jsmr.47.111

② Serotonin augments gut pacemaker activity via 5-HT₃ receptors. Liu H.N, S. Ohya, Y. Nishizawa, K. Sawamura, S. Iino, Syed M.M, K. Goto, Y. Imaizumi, S. Nakayama, PLoS One., 査読有, 2011, 6(9)e24928, DOI: 10.1371/journal.pone.0024928

③ Participation of ventral and dorsal tail muscles in bending movements of rat tail. H. Hori, T. Fukutani, H. Nakane, S. Iino, Y. Nojyo, Anat Sci Int., 査読有, 2011, 86(4): 194-203, DOI: 10.1007/s12565-011-0110-1

④ Properties of acetylcholine-induced relaxation of smooth muscle isolated from the proximal colon of the guinea-pig. Y. Kodama, S. Iino, Y. Shigemasa, H. Suzuki, J. Smooth Muscle Res., 査読有, 2010, 46: 185-200, DOI: 10.1540/jsmr.46.185

⑤ Downregulation of msh-like 2 (*msx2*) and neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 (*ntrk2*) in the developmental gut of *KIT* mutant mice, S. Horiguchi, K. Horiguchi, Y. Nojyo, S. Iino, Biochem Biophys Res Commun., 査読有, 2010, 396 (3) 774-9, DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.05.030

⑥ Expression of soluble guanylate cyclase in the vasculature of rat skeletal muscle, T. Fukutani, S. Iino, Y. Nojyo, Arch. Histol. Cytol, 査読有, 2009, 72: 117-126, DOI: 10.1679/aohc.72.117

⑦ Immunohistochemical demonstration of *c-Kit*-negative fibroblast-like cells in murine gastrointestinal musculature. S. Iino, Y. Nojyo, Arch. Histol. Cytol, 査読有, 2009, 72: 107-115, DOI: 10.1679/aohc.72.107

⑧ Acupuncture modulates mechanical responses of smooth muscle produced by excitation of intramural nerves in gastric antrum of genetically hyperglycemic rats. H. Fukuta, M. Koshita, E. Nakamura, . Nakamura,

A. Yamada, Y. Kawase, T. Ishigami, Y. Kurono, S. Iino, H. Suzuki, J. Smooth Muscle Res, 査読有, 2009, 45 : 167-185, DOI : 10.1540/jsmr.45.167

⑨ c-Kit-negative fibroblast-like cells express platelet-derived growth factor receptor α in the murine gastrointestinal musculature. S. Iino, K. Horiguchi, S. Horiguchi, Y. Nojyo, Histochem. Cell Biol, 査読有, 2009, 131 : 691-702, DOI : 10.1007/s00418-009-0580-6

[学会発表] (計 20 件)

① 飯野哲, 堀口和秀, 堀口里美, 消化管筋層における線維芽細胞の形態と機能、第 89 回日本生理学会大会、松本市、2012. 03. 30

② 飯野哲, 堀口和秀, 堀口里美, 消化管における線維芽細胞の特性、第 117 回日本解剖学会総会、甲府市、2012. 03. 28

③ 堀口和秀, 堀口里美, 飯野哲、胎生期マウス消化管における平滑筋マーカーおよび c-KIT 受容体型チロシンキナーゼ発現、第 117 回日本解剖学会総会、甲府市、2012. 03. 27

④ 堀口和秀, 堀口里美, 飯野哲、マウス胎生期消化管における c-KIT 受容体型チロシンキナーゼ発現の解析、第 52 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、金沢市、2011. 09. 24

⑤ 飯野哲, 堀口和秀, 堀口里美、c-Kit を発現しない Wsh ミュータントマウスにおけるカハール介在細胞、第 52 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、金沢市、2011. 09. 24

⑥ 堀口和秀, 飯野哲、マウス消化管筋層における線維芽細胞様細胞の組織学的検討、第 53 回日本平滑筋学会総会、東京、2011. 08. 4

⑦ 飯野哲, 堀口和秀, 堀口里美、c-Kit 遺伝子異常を持つ W ミュータントマウスにおける消化管カハール介在細胞、第 53 回日本平滑筋学会総会、東京、2011. 08. 3

⑧ K. Horiguchi, S. Iino, Ultrastructural

observation of the fibroblast-like cells in murine gastrointestinal musculature、第 116 回日本解剖学会総会、誌上開催、2011

⑨ S. Horiguchi, K. Horiguchi, S. Iino, Differential gene expression in interstitial cells of Cajal at developmental stage in murine small, 第 116 回日本解剖学会総会、誌上開催、2011

⑩ S. Iino, K. Horiguchi, S. Horiguchi, ICC and fibroblast-like cells: Interstitial cells in the gastrointestinal musculature, 第 116 回日本解剖学会総会、誌上開催、2011

⑪ 棚橋靖行, 松山勇人, 市村嘉郎, 木村佳織, 海野年弘, 飯野哲, 小森成一、マウス小腸縦走筋のコリン作動性神経-平滑筋間の情報伝達におけるカハール細胞の役割、第 150 回日本獣医学会学術集会、帯広、2010. 09. 16

⑫ 堀口和秀, 堀口里美, 飯野哲、胎生期マウスにおける小腸ペースメーカー細胞の発生第 51 回日本組織細胞化学会総会、東京都 2010. 09. 4

⑬ 飯野哲, 堀口和秀, 堀口里美、c-Kit 遺伝子異常を持つ W ミュータントマウスにおける消化管カハール介在細胞、第 51 回日本組織細胞化学会総会、東京都、2010. 09. 4

⑭ 堀口和秀, 堀口里美, 飯野哲、Differential screening による ICC 特異遺伝子の探索、第 115 回日本解剖学会総会・学術集会、盛岡市、2010. 03. 30

⑮ 飯野哲、筋層線維芽細胞の特性とネットワーク構成、第 115 回日本解剖学会総会・学術集会、盛岡市、2010. 03. 30

⑯ 飯野哲, 堀口和秀, 堀口里美, 野条良彰、マウス消化管筋層における線維芽細胞の免疫化学的特徴、第 50 回日本組織細胞化学会総会、大津市、2009. 09. 27

⑰ 飯野哲, 堀口和秀, 堀口里美, 野条良彰、W ミュータントマウスにおける小腸カハール介在細胞の発生、第 50 回日本組織細胞化学

会総会、大津市、2009.09.27

⑱ S. Iino, K. Horiguchi, S. Horiguchi,
Y. Nojyo, Immunohistochemical
demonstration of c-Kit-negative
fibroblast-like cells in the murine
gastrointestinal
musculature., Post-Genomic Advances in the
Physiology of Smooth Muscle Satellite
Symposium of the IUPS 2009, 名古屋市、
2009.07.22

⑲ 堀口里美, 堀口和秀, 野条良彰, 飯野
哲, 胎生 W マウスを用いたカハール介在細胞
の発生に関する形態学的・分子生物学的解析、
第 51 回日本平滑筋学会総会、名古屋市、
2009.07.22

⑳ 飯野哲, 堀口和秀, 堀口里美, 野条良彰、
マウス消化管筋層に分布する c-Kit 陰性線維
芽細胞の免疫化学的特徴、第 51 回日本平滑
筋学会総会、名古屋市、2009.07.22

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯野 哲 (IINO SATOSHI)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：40242854

(2) 研究分担者

堀口 和秀 (HORIGUCHI KAZUhide)
福井大学・医学部・講師
研究者番号：20377451

(3) 連携研究者

堀口 里美 (HORIGUCHI SATOMI)
福井大学・医学部・特命助教
研究者番号：00595283