

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：13401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790782
 研究課題名（和文） 腸炎疾患におけるカハール介在細胞の可塑性を制御する分子機構と組織幹細胞
 研究課題名（英文） Identification of molecules regulating the plasticity of interstitial cells of Cajal (ICC) in the experimental colitis and investigation of stem cells of ICC
 研究代表者
 堀口 和秀 (HORIGUCHI KAZUHIDE)
 福井大学・医学部・講師
 研究者番号：20377451

研究成果の概要（和文）：本研究では、消化管運動の調節性細胞であるカハール介在細胞（ICC）の、トリニトロベンゼンスルホン酸誘起腸炎疾患モデルマウスの種々の病態時における遺伝子発現について解析した。網羅的遺伝子解析の結果、細胞増殖因子や転写制御因子など、特に炎症からの回復期の ICC において著明に発現量が変化する遺伝子が同定された。これにより、ICC の障害からの回復に関わる分子機構について新たに示唆することができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the gene expression of interstitial cells of Cajal, which are thought to be the regulatory cells of gut motility, in trinitrobenzene sulfonic acid-induced experimental colitis of mice. By DNA microarray we found some candidate genes related to ICC recovery including cell growth factors and transcription factors. These results may lead to the development of new therapeutic strategy for motility disorder of gut.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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（ICC）、腸炎、トリニトロベンゼンスルホン酸、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

(1) 蠕動運動をはじめとする消化管運動は、筋層を構成する平滑筋細胞の調和のとれた運動によって実現される。その調節機構としては、外来性の交感副交感神経に加えて壁内

神経叢（腸管神経系）が第一に挙げられるが、さらにカハール介在細胞（Interstitial cells of Cajal; ICC）と呼ばれる特殊な間質性細胞の役割が重要である。

(2) これまで、腸運動障害を伴う炎症性腸疾患のモデル動物において ICC が減少することが報告されている。トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBs) による腸炎モデルマウスでは、急性期において ICC が減少してその細胞性ネットワークが崩壊し腸自動能が低下するが、回復期では腸自動能の回復とともに ICC 数と ICC ネットワーク構造が回復する可塑性を有することが示唆されている。しかしながら、腸運動障害を伴う腸炎疾患における ICC の障害と回復は現象としては明らかに認められるものの、その基盤となる分子機構については全く分かっていないのが現状である。

(3) 上に述べた ICC の減少と回復は、生体組織中に ICC のいわば幹細胞が存在し、回復期にはこれから新たに ICC が分化してくる可能性がある。最近米ネバダ大の Lorincz らが生後マウスの胃筋層において、未分化な状態でとどまり、特定の条件下で ICC へと分化しうる細胞を見出し、これを「putative progenitor of ICC」として記載した。これは ICC の再生の問題において重要な細胞と考えられるが、その細胞の本態は不明である。

2. 研究の目的

以上の背景をふまえて、本研究では腸運動障害を伴う腸炎疾患時における ICC の障害と可塑性に関わる細胞と分子メカニズムの解明を目指す。そのため、腸炎疾患モデル動物の種々の病態時における ICC が発現する分子を解析する。具体的には TNBs 誘起腸炎疾患マウスを作成し、その病変腸管の筋層より ICC 特異的分子である KIT をマーカーとし、セルソーターを用いて ICC を単離して、サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション

法およびマイクロアレイにより網羅的遺伝子解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 動物と TNBs 誘起腸炎マウス作製: 今回の研究では、腸炎疾患モデルとして TNBs 投与マウスを用いた。7週齢の雄 BALB/c マウスを用い、24時間絶食後、エーテル麻酔下に PE-20 カテーテルを肛門から 4cm 近位部に挿入し、100 μ l の 50%エタノール 50%生理食塩水に溶解した TNBs 2mg を注入した。対照群には TNBs を除き 50%エタノール 50%生理食塩水 100 μ l のみを注入した。

(2) 形態学的解析: TNBs 投与による ICC の変化を調べるため、薬剤投与 2日後 (急性期) および 7日後 (慢性期) の薬剤投与部における KIT 発現細胞を免疫染色により解析した。摘出結腸をザンボン液にて固定後に凍結切片を作製し、免疫染色を行った。抗 KIT 抗体 (800 倍希釈) にて反応させた後、Alexa Fluor-488 標識二次抗体 (1000 倍希釈) と Cy3 標識抗 α -平滑筋アクチン (SMA) 抗体 (1000 倍希釈) 混合液で反応を行い、DAPI にて核染色を行った後、封入剤で封入し、Leica TCS SP2 共焦点顕微鏡にて観察、撮影を行った。

(3) mRNA の調整: TNBs 投与 2日後、5日後、およびコントロールとして未処理マウスから薬剤投与部 (コントロールではそれに相当する肛門より 4cm 近位部) の結腸を摘出し、コラゲナーゼ処理による酵素分散法にて細胞を分取し、ICC を標識するため PE-抗 c-KIT 抗体で染色を行った。また c-KIT はマスト細胞にも発現しているため、同時にマスト細胞マーカーである PerCP-Cy5-抗 CD45 抗体で反応させて mast cell を除去し、ICC のみを FACS

セルソーターにて識別・細胞分取を行ない、分取した ICC から mRNA を調整した。

(4) サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション法およびマイクロアレイによる病態時・回復期 ICC の網羅的遺伝子解析：それぞれの単離 ICC からの mRNA より cDNA を合成後、サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション法により、TNBs 投与 2 日と 5 日、および 2 日と正常コントロールの ICC からの mRNA との差次的遺伝子のライブラリーをそれぞれ作製した。同ライブラリーから TA クローニング後、マイクロアレイ化を行なった。更に上記の cDNA から作製したプローブを用いて、炎症時、および回復期 ICC に発現する遺伝子のスクリーニングを行ない、特異的遺伝子クローンを特定した。また同時にマイクロアレイにより網羅的解析を実施した。得られた候補遺伝子のうち、発現量の多い遺伝子クローンについて、シーケンスにより塩基配列を解読し、BLAST search を用いて相同性検索を行うことで対象遺伝子の同定を行った。

4. 研究成果

(1) KIT 免疫染色：TNBs 投与後の ICC の変化について KIT 免疫染色により検討を行った。その結果、従来の報告通り TNBs 投与 2 日目において投与部結腸筋層の KIT 発現細胞の著しい減少と、7 日目における回復が確認された (図 1)。

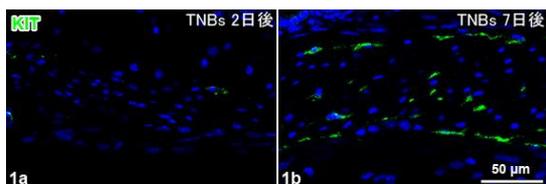


図 1. TNBs 投与後の結腸筋層における KIT 発現細胞の変化

(2) 病態時・回復期 ICC の網羅的遺伝子解析：上の結果をふまえ、病態時を TNBs 投与 2 日、回復期を 5 日目とし、それぞれの筋層からセルソーターにより KIT 発現細胞を単離した。その結果得られた KIT⁺CD45⁻細胞の、筋層全細胞数に対する割合は、未処置コントロール群では 1.2%±0.3、TNBs 投与 2 日目では 0.2%±0.1、5 日目では 0.9%±0.2 であった。この結果は、TNBs 投与 2 日目で ICC が顕著に減少し、以後回復するという結果とも一致した。

単離後の細胞から抽出した RNA は agilent バイオアナライザ 2100 の解析の結果から、高品質のものであることが確認できたため、マイクロアレイ解析を進めた。

マイクロアレイによる解析の結果、コントロールと TNBs 投与 2 日目、および TNBs 投与 2 日目と 5 日目の比較でそれぞれ発現量の差が著しい遺伝子群を新たに見出すことが出来た。細胞増殖因子は、回復期である TNBs 5 日目において発現量が増加するものも多く見出された (図 2)。

図2. 細胞増殖因子	Log10 ratio	
	TNBs.D5/ TNBs.D2	Control/ TNBs.D2
ankyrin repeat domain 1 (Ankrd1)	2.33	-0.07
complement factor D (Cfd)	4.84	2.59
exonuclease 1 (Exo1)	2.26	0.59
homeobox A11 (Hoxa11)	2.85	3.37
kinase insert domain protein receptor (Kdr)	2.19	0.40
phospholipase A2, group IB (Pla2g1b)	3.26	1.18
prepronociceptin (Pnoc), transcript variant 1	3.98	1.24
regenerating islet-derived 3 beta (Reg3b)	3.53	-4.16
thrombospondin, type 1, domain 1 (Thsd1)	2.12	0.2
tryptophan hydroxylase 1 (Tph1), transcript variant 1	3.86	0.42

一方、転写制御因子については、コントロール群と TNBs 2 日目との比較では発現量に差が無く、2 日目と 5 日目の比較で 5 日目において顕著に発現量が減少している遺伝子が多く見出された (図 3)。

図3. 転写制御因子	Log10 ratio	
	D5/ D2	Control/ D2
Ets2 repressor factor (Erf)	-2.65	0.02
dihydrouridine synthase 4-like (S. cerevisiae) (Dus4l)	-2.17	-0.05
lamin B1 (Lmnb1)	-1.23	0.03
lysyl oxidase-like 2 (Loxl2)	-2.24	0.06
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 10 (Map3k10)	-4.49	-0.87
phosphodiesterase 9A (Pde9a), transcript variant 1	-2.11	0.10
ring finger protein 25 (Rnf25)	-2.55	0.13
sympkin (Sympk)	-2.92	-0.01

その他に、インスリン様成長因子 1 などの成長因子や、細胞骨格関連遺伝子、Ca²⁺/K⁺チャネル、TLR シグナル関連遺伝子、TNF receptor といった遺伝子の発現量に顕著な差が見出され、これらはコントロール群と TNBs 2 日目との比較では発現量に差が無く、2 日目と 5 日目の比較で 5 日目において発現量が増加していた (図 4)。

図4. その他	Log10 ratio	
	D5/D2	Control/D2
成長因子		
insulin-like growth factor 1 (Igf1)	3.46	0.32
islet-derived family, member 4	4.67	0.48
細胞骨格		
myotubularin related protein 3 (Mtmr3)	2.24	0.02
MAP6 domain containing 1 (Map6d1)	2.21	0.08
Ca²⁺/K⁺チャネル		
inositol 1,4,5-triphosphate receptor 3	3.26	0.1
potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 1 (Kcnq1)	3.64	0.04
TLRシグナル		
interferon regulatory factor 3 (Irf3)	1.56	0.06
interleukin 1 beta (Il1b)	2.02	-0.36
interleukin 33 (Il33)	2.63	0.03
thymic stromal lymphopoietin (Tslp)	2.64	-0.27
TNF receptor		
TNF receptor-associated factor 2 (Traf2)	2.48	0.24

今回の研究において、特に TNBs 投与 5 日目において発現量が顕著に増加する遺伝子が多く見出された。これらの遺伝子の中には、ICC の増殖、可塑性に関わる遺伝子と、2 日目に障害を受けた ICC の機能回復により発現量が増加する遺伝子とがあるものと考えられる。これらの内、特に細胞増殖因子や転写制御因子には、前者の ICC の増殖、可塑性に関わる遺伝子が含まれることが推察される。これら、腸炎疾患からの回復期における ICC の可塑性に関わる新規候補遺伝子の機能について今後さらに検討することで、ICC の可塑性の分子メカニズムの解明につなげていきたいと考えている。

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)

[学会発表] (7 件)

① 堀口里美、堀口和秀、飯野 哲：消化管筋層のカハール介在細胞と線維芽細胞におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の発現 第 118 回 日本解剖学会総会 2013.3.30 香川

② S Iino, K Horiguchi, S Horiguchi Interstitial cells of Cajal in c-Kit signal deficient W-sash mutant mice, The 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2012.8.28, 京都

③ K Horiguchi, S Iino, Connexin43 expression by interstitial cells of Cajal in the submucosal layer of the guinea-pig proximal colon, The 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2012.8.28, 京都

④ 堀口和秀、堀口里美、飯野 哲：マウス消化管各部位における平滑筋とカハール介在細胞の発生に関する免疫組織化学的解析 第 54 回日本平滑筋学会総会 2012.8.3, 東京

⑤ 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, 2012.03.27, 甲府市

⑥ 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学会総会・学術集会, 2011.09.24, 金沢市

⑦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，
2011.08.04, 東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀口 和秀 (HORIGUCHI KAZUhide)

福井大学・医学部・講師

研究者番号：20377451

(2)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