

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460947

研究課題名(和文) 新たな治療法開発を目指す2型糖尿病性胃腸障害の分子基盤の解析

研究課題名(英文) Identification of molecules relating ICC disorder in murine diabetic gastroparesis

研究代表者

堀口 和秀 (Horiguchi, Kazuhide)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：20377451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性胃不全麻痺の原因として、胃腸運動の調節性細胞であるカハール介在細胞(ICC)の異常が示唆されてきている。本研究では、糖尿病におけるICC障害に関わる分子メカニズムを探索するため、2型糖尿病モデルマウスおよび野生型マウスの胃筋層からICCを単離して分子生物学的解析を行った。その結果、糖尿病ICCにおいて発現量の顕著に変化する候補遺伝子を新たに見いだすことができた。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have suggested that disorders of the regulatory cells of the gastrointestinal motility, interstitial cells of Cajal (ICC), cause diabetic gastroparesis. In this study we compared the gene expression of ICC in diabetic db/db mice with those of wild type mice. By using DNA microarray we found some candidate genes related to the transformation and signal transduction.

研究分野：微細形態学、消化器病学

キーワード：糖尿病性胃不全麻痺 カハール介在細胞 発現解析 マウス

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 長期にわたる糖尿病は様々な臓器に重大な障害をきたすが、胃不全麻痺を代表とする胃腸障害もその一つである。糖尿病性胃不全麻痺の病因は完全には明らかではなく、効果的な治療法の確立には至っていないのが現状である。この点について、近年の研究から、胃不全麻痺を含む糖尿病性胃腸障害の病因として、胃腸運動の調節性細胞であるカール介在細胞 (Interstitial cells of Cajal: ICC) の異常が注目されるようになった。

(2) ICC は腸筋層に存在する特殊な間質性細胞であり、近年の生理学的研究から胃腸蠕動運動のペースメーカー電位である緩徐波 (slow wave) を発生するペースメーカー細胞であることが示されている。また、これとは別に ICC には神経と筋の間に介在して刺激を伝達する neuromediator の役割を果たすサブタイプも存在する。このように、ICC は胃腸の運動調節に重要な役割を果たしているため、その異常や欠損は蠕動運動の消失による不全麻痺 (ペースメーカータイプ ICC の障害) や神経性調節の異常 (neuromediator タイプ ICC の障害) の原因となりうる。

(3) しかしながら、糖尿病における ICC 障害についてのメカニズムに関する現在の知識は限定的である。この点について、Horvath ら (2005) は 1 型糖尿病モデルマウス (NOD マウス) による実験から、糖尿病によるインスリン/インスリン様成長因子 1 の減少が平滑筋 (SMC) の萎縮を引き起こすことで、SMC で産生される膜結合型 KIT リガンド (別名 stem cell factor) が減少することを示した。その結果、上述の KIT シグナリングが阻害されることで ICC の維持が障害され ICC の減少につながるものと示唆した。しかし、この結果は 1 型糖尿病モデルマウスによるものであり、2 型糖尿病における ICC 減少も同様のメカニズムによるのかは不明である。

### 2. 研究の目的

(1) 以上の背景をふまえて、本研究では胃腸運動障害を伴う 2 型糖尿病疾患時における ICC 障害の分子メカニズムの解明をめざす。そのため、第一に糖尿病モデルマウスの胃幽門部筋層から ICC を単離し、サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション法及びマイクロアレイにより網羅的遺伝子発現解析を行い、胃腸運動不全の分子機構を探索する。

(2) 第二に、糖尿病モデルマウスの胃腸組織を用い、培養系あるいは in vivo において、同定された分子機構の発現と働きを調べるとともに、対象遺伝子の発現調節や薬理学的手法による対象分子の機能調節実験を行い、糖尿病性胃腸運動不全の改善を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) mRNA の調整: 糖尿病モデルマウス BKS.Cg-dock7<sup>+/+</sup>Lept<sup>rd</sup>/J (db/db マウス: 日本チャールズ・リバーより購入) および野生型マウス (いずれも 15 週齢) より胃幽門部を摘出し、粘膜を除去後、コラゲナーゼ処理による酵素分散法にて細胞の分散処理を行った。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 mast cell にも発現しているため、同時に mast cell 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。

(2) 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 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、db/db マウスおよび野生型マウス小腸の 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、この cDNA ライブラリーを用いて、マイクロアレイを行い、網羅的解析を実施・対象遺伝子の同定を行った。

### 4. 研究成果

(1) 15 週齢の db/db マウスおよび野生型マウスの胃腸筋層の全載伸展標本を用いた免疫組織学的解析の結果、ICC の分布を示す c-KIT 分子の発現は、db/db マウスにおいて有意に減少していることが示された (図 1)。この結果は Yamamoto ら (2008) の先行研究の結果と一致するものであった。

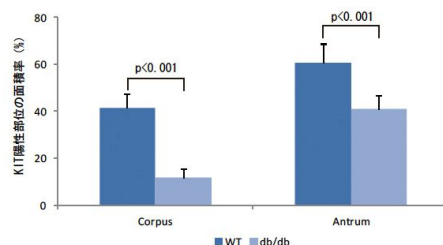
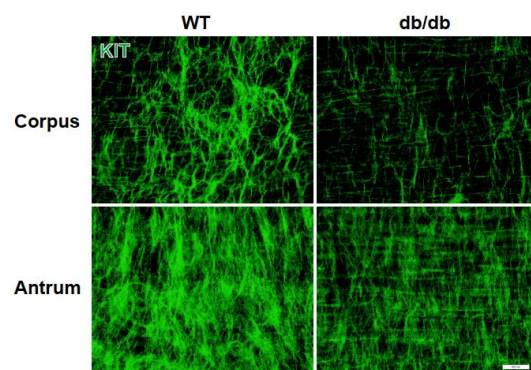


図 1. db/db および野生型マウス胃筋層における c-KIT 陽性細胞の分布 (上) と、c-KIT 陽性部位の面積率比較 (下)

(2) FACSセルソーターを用い、15週齢 db/db および野生型マウスそれぞれの胃幽門部から c-KIT<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>細胞として ICC の分取を行った。

その結果得られた KIT<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>細胞の、筋層全細胞に対する割合は、野生型マウスでは 1-2% ± 0.3、db/db では 0.2-0.4% ± 0.1 であった (図 2)。

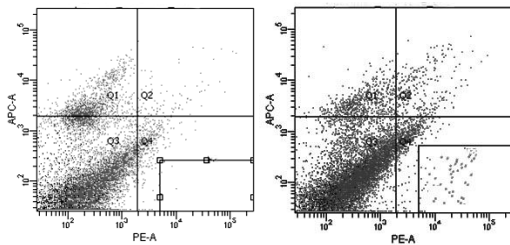


図 2 . db/db (左) および野生型マウス (右) における PE 標識 c-KIT 抗体、PerCP-Cy5-抗 CD45 抗体によるドットプロット解析。右下の枠内の細胞を c-KIT<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>の ICC として採取した。

(3) 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、db/db および野生型マウス胃幽門部 ICC の比較で、発現量の差が著しい遺伝子群を新たに見出すことができた。

形質転換に関わる遺伝子としては、Adamts3、Adamts13 などが候補遺伝子として db/db マウスにおいて高い発現量を示しているが、ADAMTS は、プロテアーゼファミリーであり、細胞外マトリックスの構成員であるアグリカン、プレビカン、プロコラーゲンの分解に関わっていることが分かっており、形態の変化に関与することが推測された。その他、carnosine dipeptidase 1 (metallopeptidase M20 family) (Cndp1)、Collagen, type XVI, alpha 1 (Col16a1)、zinc finger, matrin type 4 (Zmat4)、transcript variant 1 などが db/db において高い遺伝子発現を示していた (図 3)。

|   | Log10 ratio<br>db / WT |
|---|------------------------|
| a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 3 (Adamts3), transcript variant 1   | 3.69                   |
| a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 13 (Adamts13), transcript variant 1 | 3.02                   |
| carnosine dipeptidase 1 (metallopeptidase M20 family) (Cndp1)   | 4.11                   |
| Collagen, type XVI, alpha 1 (Col16a1)   | 3.38                   |
| zinc finger, matrin type 4 (Zmat4), transcript variant 1  | 1.62                   |

図 3 . 形質転換に関わる遺伝子

Signal transduction に関わる遺伝子として、GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1 (G3bp1)、ATPase, H+/K+ exchanging, gastric, alpha polypeptide (Atp4a)、transcript variant、ATPase, H+/K+ exchanging, beta polypeptide (Atp4b) などが db/db で高い発現量を示した (図 4)。これらはタンパク質の細胞内小器官への輸送、細胞内小器官の形成、転写調節などに関わっていることが知られており、糖尿病モデルマウス ICC の細胞内活性の変化が示唆される。

|  | Log10 ratio<br>db / WT |
|--|------------------------|
| GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1 (G3bp1)                   | 1.97                   |
| NEDD4 binding protein 2-like 2 (N4bp2l2)   | 1.9                    |
| ATPase, H+/K+ exchanging, gastric, alpha polypeptide (Atp4a), transcript variant 2 | 1.87                   |
| ATPase, H+/K+ exchanging, beta polypeptide (Atp4b)                                 | 1.60                   |
| phospholipase A2, group IB, pancreas (Pla2g1b)                                     | 0.99                   |
| glucagon (Gcg)   | 2.27                   |

図 4 . Signal transduction に関わる遺伝子

その他にも、myogenic factors subfamily myogenic differentiation 1 (Myod1) などが非常に高い発現を示しているが (図 5) 同分子は未分化細胞に発現することが知られており、ICC の形質転換の可能性を示唆している。

|   | Log10 ratio<br>db / WT |
|---|------------------------|
| myogenic factors subfamily myogenic differentiation 1 (Myod1) | 3.39                   |
| phosphorylase kinase alpha 2 (Phka2), transcript variant 1    | 2.19                   |
| サイトカイン interleukin 1 receptor-like 2 (Il1r2)                  | 4.03                   |
| interleukin 10 (Il10)   | 3.47                   |
| lipocalin 5 (Lcn5), transcript variant 1                      | 3.46                   |

図 5 . その他の遺伝子

さらに、db/db に比べて野生型マウスにおいて発現量の高い遺伝子は、図 6 のようなものが候補として得られた。

|  | Log10 ratio<br>db / WT |
|--|------------------------|
| gastric intrinsic factor (Gif)                       | -1.43                  |
| glycoprotein 2 (zymogen granule membrane) (Gp2)      | -2.16                  |
| ghrelin (Ghr1), transcript variant 1                 | -2.23                  |
| major urinary protein 1 (Mup1), transcript variant 3 | -2.27                  |
| glycoprotein 2 (zymogen granule membrane) (Gp2)      | -2.29                  |
| carboxypeptidase B1 (tissue) (Cpb1)                  | -2.32                  |
| chymotrypsin C (caldecrin) (Ctrc)                    | -2.34                  |
| vomer nasal 2, receptor 20 (Vmn2r20)                 | -2.40                  |

図 6 . 野生型において顕著に発現量の高い遺伝子

今回の研究において、糖尿病モデルマウス ICC において発現量が顕著に変化する遺伝子が多く見出された。これらの新規候補遺伝子の機能についてさらに検討することで、ICC の病態や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)

[雑誌論文](計1件)

Therapeutic action of 5-HT3 receptor antagonists targeting peritoneal macrophages in post-operative ileus. Maehara T, Matsumoto K, Horiguchi K, Kondo M, Iino S, Horie S, Murata T, Tsubone H, Shimada S, Ozaki H, Horie M. Br J Pharmacol. 2015;172(4):1136-47. doi: 10.1111/bph.13006. 査読有

[学会発表](計10件)

堀口里美、堀口和秀、橋本隆、飯野哲: TNBs 腸炎マウス筋層におけるカハール介在細胞回復過程の組織学的検討, 第121回日本解剖学会総会全国学術集会, 2016.3.30, ビックパレットふくしま(福島県・郡山市)

堀口里美、堀口和秀、飯野哲: マウス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解析, 日本解剖学会第75回中部支部学術集会 2015.10.4, 福井大学松岡キャンパス(福井県・永平寺町)

飯野 哲、堀口 和秀: 消化管間質を構成する細胞群の形態学的特性, 第57回日本平滑筋学会総会, 2015.8.28, 山口大学(山口県・宇部市)

堀口 里美、堀口 和秀、飯野 哲: マウス消化管における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120回日本解剖学会全国学術集会・第92回日本生理学会大会 合同大会, 2015.03.22, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

堀口 和秀、堀口 里美、日下部 守昭、尾崎 博、飯野 哲: 成体マウス消化管におけるテネイシンC産生細胞, 第120回日本解剖学会全国学術集会・第92回日本生理学会大会 合同大会, 2015.03.22, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

飯野 哲、堀口 和秀、堀口 里美: 消化管間質細胞におけるサイトクロビン発現, 第55回日本組織細胞化学会総会, 2014.09.27, 松本市中央公民館(長野県・松本市)

飯野 哲、堀口 和秀: マウス盲腸において c-Kit を発現する平滑筋細胞, 第56回日本平滑筋学会総会, 2014.08.7, 新横浜プリンスホテル(神奈川県・横浜市)

飯野 哲、堀口 和秀: c-Kit を発現する盲腸平滑筋細胞, 第70回日本顕微鏡学会総会, 2014.05.11, 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

飯野 哲、堀口 里美、堀口 和秀: 消化管における各種間質細胞でのサイトクロビン発現, 第70回日本顕微鏡学会総会, 2014.05.11, 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀口 和秀 (HORIGUCHI KAZUhide)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号: 20377451

(2) 研究分担者

堀口 里美 (HORIGUCHI SATOMI)

福井大学・医学部・学術研究員

研究者番号: 00595283