

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460964

研究課題名(和文) 腸炎疾患におけるカハール介在細胞の再生分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) The plasticity mechanism and gene expression of interstitial cells of Cajal (ICC) with inflammatory stimulations in colitis

研究代表者

堀口 里美 (HORIGUCHI, SATOMI)

福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員

研究者番号：00595283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

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病態時における遺伝子発現について解析した。TNBS腸炎の炎症回復過程における筋層の組織修復には平滑筋細胞など種々の細胞の増殖が関与、具体的には、炎症によるカハール介在細胞ネットワークの破綻からの回復の一部は、同細胞の増殖によることが示唆された。ま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に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. We suggested that the proliferation of ICC and smooth muscle cells is involved in the recovery of organs on muscularis inflammation. By 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.

研究分野：消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患 消化管運動 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) 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を材料と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  $\mu$ 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。対照群としては TNBs を除き 50%エタノール 50%生理食塩水 100  $\mu$ l のみを注入した。

BrdU 投与：上述と同様 TNBs あるいは Vehicle 投与後 3 日目～7 日目まで、5 日間連続で自

由飲水により BrdU (0.8mg/ml in tap water) を投与した。

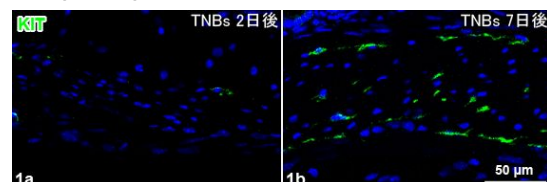
(2) 形態学的解析：コントロールマウスおよび TNBs 投与マウスの大腸を摘出し、投与部を中心に定法に基づき 4%パラフォルムアルデヒド(凍結切片用)で固定処理を行った。凍結包埋後凍結切片を作成し、スライドガラスに貼り付けて免疫染色を行った。一部のサンプルは冷アセトンで固定後粘膜を剥離し、筋層全載伸展標本を作成した。標本を PBS にて洗浄し、非特異反応防止のため 1%ウシ血漿アルブミン加 PBS にて溶解した 5%正常口バ血清液で室温、20 分間反応させた後、一次抗体希釈液にて 4、2 時間反応させた。PBS にて洗浄後、蛍光標識二次抗体 + DAPI (1000 倍希釈) 混合液にて室温、2 時間反応させた。封入剤で封入し、LeicaTCS 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、粘膜を剥離し、筋層から 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：筋層からの 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筋層からの 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。(下図)



(2)ki67 免疫染色により、TNBS 投与 5 日目において筋層に増殖細胞が認められた。各種細胞マーカーを用いた二重染色により、平滑筋、カハール介在細胞、線維芽細胞、白血球が増殖を示すことが明らかとなった。一方、神経細胞に増殖は認められなかった。また、ki67 と c-KIT 二重免疫染色による解析の結果、TNBS 投与後 4 日～6 日で筋層の c-KIT 発現細胞に ki67 陽性反応を示す細胞核が見いだされた。BrdU 投与実験でも、炎症回復過程において c-KIT 発現細胞が増殖を示すことが示された。全載伸展標本により、この BrdU を取り込む c-KIT 陽性細胞が形態学的にカハール介在細胞の特徴を示すことも明らかとなった(図 1)。

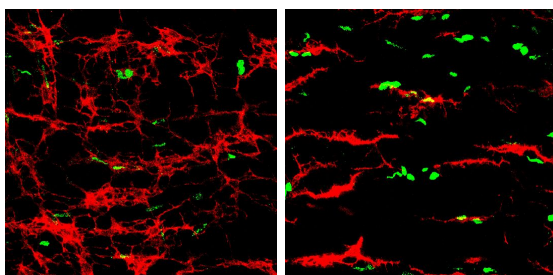


図 1 . TNBS または Vehicle 投与後 7 日目における c-KIT 発現 (赤) と抗 BrdU 抗体 (緑) による免疫染色 (全載伸展標本) (左: 筋層間神経叢、右: 輪走筋層)

(2) 病態時・回復期筋層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 RNA を抽出を行い、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 TNBs5 日目において発現量が増加するものが多く見出された(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 1B (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 I, 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 TNBs2 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

本研究から、TNBS 腸炎の炎症回復過程における筋層の組織修復には平滑筋細胞など種々の細胞の増殖が関与することが示唆された。また、c-KIT 免疫染色による解析により、炎症によるカハール介在細胞ネットワークの破綻からの回復の少なくとも一部は、同細胞の増殖によることが示唆された。

また、本研究の主たる目的の病変腸管における分子発現動態に関しては、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変化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](計 9 件)

堀口里美、堀口和秀、飯野哲: 胎生期マウス消化管筋層の c-KIT 受容体型チロシンキナーゼの発現解析, 第 122 回日本解剖学会総会全国学術集会, 2017.03.30, 長崎大学(長崎県・長崎市)

堀口和秀、河原真代、杉本京平、堀口里美、橋本隆、飯野哲: TNBS 腸炎モデルマウスにおける消化管筋層の傷害と回復過程, 第 122 回日本解剖学会総会全国学術集会, 2017.03.30, 長崎大学(長崎県・長崎市)

橋本隆、堀口和秀、堀口里美、飯野哲: マウス消化管における転写因子 Gli1 の局在解析, 第 122 回日本解剖学会総会全国学術集会, 2017.03.30, 長崎大学(長崎県・長崎市)

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, 2016.03.30, 長崎大学(長崎県・長崎市)

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グロビン発現，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）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀口 里美 (HORIGUCHI, SATOMI)

福井大学・学術研究院医学系部門・

特別研究員

研究者番号：00595283

### (2) 研究分担者

堀口 和秀 (HORIGUCHI, KAZUHIDE)

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

研究者番号：20377451

### (3) 連携研究者

飯野 哲 (IINO, SATOSHI)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：40242854