

ICC の発生

^a 名古屋大学大学院医学系研究科機能形態学講座
分子細胞学分野
鳥橋 茂子

Keywords: カハールの介在細胞, 発生,
c-KIT, Stem cell Factor (SCF), ES 細胞.

^a 〒466-8850

愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 65

電話: 052-744-2001

FAX: 052-744-2012

e-mail: storiha@med.nagoya-u.ac.jp

1. ICC とレセプターc-KIT

ICCの研究が飛躍的に進歩したのはこの細胞が癌原遺伝子c-kitの産物レセプター型チロシンキナーゼc-KITを発現していることが明らかにされた1992年以後である。それまで電子顕微鏡下、あるいはメチレンブルー法やZIO法にたよっていた形態学的な研究はc-KITをマーカーとしてICCを同定できるようになると共に、その機能の解析にc-KITが貢献した。レセプターc-KITは、分子量約145kDで細胞外に5つの免疫グロブリン様ドメインを持つ。リガンドはStem cell factor (SCF)またはSteel factor (SLF)と呼ばれ、これが結合するとc-KITは二量体を形成して細胞内でのチロシンリン酸化が起こる(図1)。ICCを含む、c-KIT発現細胞の多くはSCFとc-KITの結合によって細胞の分化や増殖をコントロールしている。従って、c-kitのミュータントやSCFをコードする遺伝子steelの異常は共にc-KIT発現細胞の分化、増殖に異常をきたすことになる。また、SCFの結合部位を認識する抗c-KIT抗体はSCFと競合するために中和抗体としてc-KITの機能をブロックすることができる。

ミュータントマウスやラット、中和抗体処理を行ったマウスではICCの多くは(すべてではない)分化増殖できずにICCを欠損した消化管をもつことになる。従ってこれらの動物を用いてICCの機能解析が行われている。一方、ICC以外のc-KIT発現細胞である赤血球芽細胞、肥満

細胞、色素細胞、生殖芽細胞については c-KIT に関して主に発生学的な観点から研究が進められているのに対し、ICC については c-KIT を利用した発生学的な研究はあまり多くはない。

2. ICC の起源

ICC の多くは c-KIT に依存して分化増殖するので、c-KIT の発現を胎生期にさかのぼって調べると、ICC の起源が推測される。マウスでは免疫染色の結果から胎生 12 日ごろから c-KIT の免疫活性が腸管に出現する。mRNA の発現はそれより早く、胎生 11 日には認められている¹⁾。胎生 12、13 日に小腸での発現を見ると、c-KIT の免疫活性は腸管周囲の間葉系細胞にみられる。この時期まだ平滑筋や ICC は分化しておらず、未分化な間葉系細胞の集積に免疫活性が検出される。しかし、腸管の神経節細胞(およびグリア)に分化する神経堤由来の細胞は c-KIT を発現していない。これは神経堤細胞のマーカーである RET 蛋白と c-KIT の二重染色からもあきらかである(図 2)。また、Young らは、神経堤細胞が移動してくる前の腸管を器官培養したり、またこれを腎皮膜下に移植したところ、神経節は欠損するが ICC は分化したことを報告している^{2,3)}。これら一連の結果から ICC の起源は、腸管の間葉系細胞であって、神経堤細胞ではないことが明らかとなった。これはマウスに限らず、鳥類の消化管の c-kit の分布を in situ

hybridizationで解析した結果からも支持された⁴⁾。

3. ICCと平滑筋の分化

腸管壁の間葉系細胞からは様々な組織が分化するが、胎生13日頃の小腸でc-KITを発現しているのは将来神経節となる神経堤細胞を取り囲んだあたりから外側の間葉系細胞である。この領域からはICCや平滑筋、特に外縦走筋が分化する(図2)。将来ICCに分化する細胞だけではなく、将来外縦走筋に分化する間葉系細胞がc-KITを発現しているということはICCと平滑筋細胞がc-KITを発現する共通の前駆細胞から分化することを示唆している。実際、ICCのマーカであるc-KITと平滑筋のマーカであるdesminやmyosin、平滑筋特異的actinとの発現パターンを調べると、胎生15日から17日にかけてc-KIT陽性細胞の一部が平滑筋マーカを発現し、両者が共存している時期がある(図3)。将来外縦走筋細胞に分化する細胞は胎生15日から17日にかけてc-KITとdesminを共に発現し、やがて胎生18日になるとc-KITは消失してdesminだけを発現するようになる。一方、将来ICCになる細胞はdesminの発現をとめc-KITだけをその後も発現しつづける。胎生18日を境にして平滑筋細胞とICCは独立した細胞系へと分化する(図4)⁵⁾。免疫組織化学で調べられた蛋白の発現結果は、mRNAの発現をin situ hybridizationで解析した報告でも裏付けられた⁶⁾。それによるとc-kitとsmooth muscle

myosin heavy chain (SMMHC)のmRNA発現を比較したところ、胎生 14.5 日から 18 日にかけて、やはりc-kitと SMMHCを共に発現する前駆細胞から平滑筋細胞とICCがそれぞれ分化する。そして平滑筋に分化する細胞ではc-kitの発現が減少し、SMMHCが増加する。逆にICCに分化する細胞ではSMMHCの発現が減少し、c-kitだけが残る。その結果、胎生 18 日でそれぞれ別の細胞に分化することを示している。さらに外縦走筋だけでなく、内輪走筋にかんしても同様の過程をたどると報告している。ICCと平滑筋細胞が共通のc-KIT発現前駆細胞から分化することは消化管平滑筋層の発生学的な特徴である。これまでICCが平滑筋細胞と微細構造上いくつかの類似点をもつことが指摘されてきたがこれは両者が近い細胞系譜を持つことで理解される。おそらく、消化管という古い器官が進化の過程で固有の律動運動を獲得するなかで、ペースメーカー細胞として機能する特殊な平滑筋というかたちでICCが平滑筋細胞から分かれたのではないだろうか。しかしc-kitミュータント動物で平滑筋細胞の分化異常は今のところ認められていない。従って、c-KITを発現する前駆細胞の増殖や平滑筋細胞の分化にはc-KITシグナルは関与しないと思われる。

4. ICC の分化・増殖と c-KIT

ICCはその前駆細胞の段階から継続して

c-KITを発現しつづける。そしてc-kitミュータント動物やc-KITをブロックしたマウスではICCの多くが欠損することは前述の通りであるが、c-KITシグナルがICCの分化を誘導するのか、増殖を起こすのかについて意見が分かれている。マウスの出生直後から中和抗体を投与してc-KITをブロックするとICCは減少する。出生時すでに筋層間神経叢のレベルに分布するc-KIT陽性細胞すなわちICC-MPは分化し始めている。c-KITをブロックしたところ、筋層間神経叢のレベルにapoptosisは生じていなかったが、通常では観察されない型の細胞が出現した。このレベルに分布するc-KIT陽性細胞すなわちICC-MPは徐々に減少するが、わずかに活性を保った細胞はICC同様電子密度の高い細胞質を備えているが平滑筋のようにミオフィラメントも持っていた(図5)。外形は紡錘形で形態的にはICCと平滑筋細胞との中間形(hybrid)を示していた⁷⁾。ミュータントマウスでも一部残存するICC-MPは通常観察されない細長い外見を示していた(図6)。これらの観察結果はc-KITがブロックされるとICCに平滑筋への形質転換が生じることを示唆している。また出生時深部筋神経叢のレベルに分布するICCつまりICC-DMPは通常まだ未分化な状態で存在しているが、生後急速に分化する。c-KITのブロックでICC-DMPは出生後も未分化状態を維持した。これらの結果はc-KITがICCの分化に関することを示唆する。Wardらはマウス胎児期の腸管を器官培養しこれに中和抗体を投与してc-KITを

抑制したところ、ICCの形成が抑えられて、ICCを欠損した腸管組織が形成されたと報告している。すなわち胎児期の腸管においても、ICCの分化はc-KITに依存していることを示している^{8,9)}。

一方、腸管でのc-KIT発現を抑制されたトランスジェニックマウス W^{banded} を用いた結果ではICC-MPは生後5日までは形態、分布密度ともにコントロールとは差がなく、正常に発生するが、それ以後数が減少する⁶⁾。従って報告者KlüppelらはICC-MPはその分化過程ではc-KITを必要としないが、生後の増殖過程で不可欠なものと結論している。 W^{lacZ} マウスによるICCの発生研究も胎生期のICCに関してc-KITシグナルは必要ないと述べている¹⁰⁾。これらの報告が正しいとすると、胎生期にICCがどのようなメカニズムでc-KITを発現している前駆細胞から平滑筋とは異なる細胞系へと分化するののかについての研究が全く振り出しに戻る事になる。いずれにしてもc-KITがICCの分化に関わるのか、増殖に必須なのか(あるいは両方に必要なのか)については、ICCの細胞内におけるc-KITシグナルの詳細について解析する必要がある。

5. c-KITのリガンド SCF 産生細胞

リガンドSCFの発現細胞については、まだ種々の説がある。免疫組織化学によると平滑筋組織が産生しているという¹¹⁾。一方 mRNA の発現を in situ

hybridization やRT-PCRで解析したものでは、上皮を含めた広範な組織からシグナルが検出されている^{1,12)}。また、SCFのpromoterにlacZを挿入したトランスジェニックマウスの解析からは腸管では神経節細胞、中でもNO作動性神経が主としてSCFを産生している(図7)^{13,14)}。神経がSCFを産生していることでICC-MPが筋層間神経節近辺に分布することが説明できる。なぜなら、SCFは産生されて膜表面に出された後、プロテアーゼによって分泌蛋白として細胞表面から遊離する。しかし膜結合状態にあるSCFの方がより強い活性を持つことが報告されているので、c-KITシグナルはSCF産生細胞とc-KIT発現細胞が隣接するときに強い効果を示す。しかし神経節を欠損するミュータントマウスでも少なくとも出生直後ではICC-MPは正常に発生していることが示された^{15,16)}。同様に、神経堤細胞が移動してくる前の胎児腸管を器官培養、または腎皮膜に移植すると無神経節腸管となるが、その中にICCが正常に分化することは前述したとおりである。従って、神経節細胞がSCFを産生しているとしても、これ以外にも産生細胞がICCのすぐ近傍に分布していることが想定される。また、SCFが欠損してc-KITシグナルが抑制されても、ある程度これを補足する系が存在するのかもしれない。WuらはICC-MPはもっぱら神経節細胞由来のSCFに依存し、平滑筋層に混在しているICC(ICC-IM)は平滑筋が産生するSCFに依存すると推測している¹⁾。

ICCの発生に関して、c-KITシグナルは重要な誘導因子であるが、すべてのICCがc-KITに依存しているわけではない。c-kitのミュータント動物でICCの多くは消失しているが、一部のICCは影響を受けずにミュータント動物でも存在している。マウスでは小腸のICC-DMP、胃の幽門部のICC-MPが正常に発生してくる¹⁷⁾。また、ヒト小腸のICC-DMPはc-KITをほとんど発現していない¹⁸⁾。従ってこれらICCの一部はc-KITに代わるシグナル系に依存して分化・増殖している可能性がある。

6. マウス ES 細胞を用いた腸管様構造の形成と ICC

胚性幹細胞(ES細胞)は成体および胎児の様々な組織や細胞に分化しうる多分化能を持っている。マウスのES細胞からは肝臓や膵臓のインシュリン産生細胞などの内胚葉由来の細胞や組織、さらに三胚葉由来の組織で構成される腸管に類似した器官も形成される¹⁹⁾。その腸管様構造は上皮層、固有層に相当する結合組織層そして平滑筋層から成り、平滑筋層にはICCが分布していた(図8、9)。血管などの脈管は欠くが、神経節細胞に相当する神経細胞はごく少数認められた。石川らは腸管様構造からマウスの腸管と同様、律動的な自動運動や、平滑筋層のICCから発生する周期的な細胞内カルシウム変動を記録した²⁰⁾。これによると筋層内のICCはICC-MPに相当する。また腸管様構造の発生過程はマウス胚における腸管の器

官形成過程を踏襲していた²¹⁾。そして内胚葉や腸管の発生過程で必要とされる転写因子が腸管様構造でも類似の発現パターンを示す(投稿中)。従ってこれは腸管の器官形成やICCを含む構成細胞の*in vitro*発生モデルとして大変有用である。この腸管様構造の中でICCはやはりc-KITを発現する前駆細胞から分化するが、筋層の平滑筋は明瞭な内輪走筋と外縦走筋の二層には分かれていないものが多かった。そしてICCはマウス腸管のICC-MPにみられる二次元方向に広がる規則的な配列によるネットワークは形成せずに平滑筋の中に無秩序に散在していた。従って平滑筋層の立体構築とICCの分布は密接な関連があるように思われる。また神経節細胞の分布が少ない腸管様構造のなかで、神経伝達を調節する機能をもつICC-IMに相当するものが存在するかどうかICCのサブクラスの分化についても発生学的に重要な知見を与えるだろう。この腸管様構造は*in vitro*の発生モデルとして今後のICCに関する新しい研究材料として期待される。

引用文献

- 1) Wu, J.J., Rothman, T.P. and Gershon, M.D., : J Neurosci Res, 59, 384-401 (2000)

- 2) Young, H.M., Ciampoli, D., Southwell, B.R. and Newgreen, D.F., : Dev Biol, 180, 97-107 (1996)

- 3) Hearn, C.J., Young, H.M., Ciampoli, D., Lomax, A.E. and Newgreen, D., : Dev Dyn, 214, 239-247 (1999)

- 4) Lecoin, L., Gabella, G. and Le Douarin, N., : Development, 122, 725-733 (1996)

- 5) Torihashi, S., Ward, S.M. and Sanders, K.M., : Gastroenterology, 112, 144-155 (1997)

- 6) Klüppel, M., Huizinga, J.D., Malysz, J. and Bernstein, A., : Dev Dyn,

211, 60-71 (1998)

7) Torihashi, S., Nishi, K., Tokutomi, Y., Nishi, T., Ward, S. and

Sanders, K.M., : Gastroenterology, 117, 140-148 (1999)

8) Ward, S.M. and Sanders, K.M., : American Journal of Physiology

Gastrointestinal and Liver Physiology, 3, 602-611 (2001)

9) Ward, S.M., Harney, S.C., Bayguinov, J.R., McLaren, G.J. and Sanders,

K.M., : J Physiol, 505, 241-258 (1997)

10) Bernex, F., de Sepulveda, P., Kress, C., Elbaz, C., Delouis, C. and

Panthier, J.J., : Development, 122, 3023-3033 (1996)

11) Lammie, A., Drobnjak, M., Gerald, W., Saad, A., Cote, R. and

Cordon-Cardo, C., : J Histochem Cytochem, 42, 1417-1425 (1994)

12) Shimizu, M., Minakuchi, K., Tsuda, A., Hiroi, T., Tanaka, N.,

Koga, J. and Kiyono, H., : Exp Cell Res, 266, 311-322 (2001)

13) Torihashi, S., Yoshida, H., Nishikawa, S., Kunisada, T. and Sanders, K.M., : Brain Res, 738, 323-328 (1996)

14) Young, H.M., Torihashi, S., Ciampoli, D. and Sanders, K.M., : Gastroenterology, 115, 898-908 (1998)

15) Ward, S.M., Ordog, T., Bayguinov, J.R., Horowitz, B., Epperson, A., Shen, L., Westphal, H. and Sanders, K.M., : Gastroenterology, 117, 584-594 (1999)

16) Horisawa, M., Watanabe, Y. and Torihashi, S., : J Pediatr Surg, 33, 1209-1214 (1998)

17) Sanders, K.M., : Gastroenterology, 111, 492-515 (1996)

18) Torihashi, S., Horisawa, M. and Watanabe, Y., : J Auton Nerv Syst, 75,

38-50 (1999)

19) Yamada, T., Yoshikawa, M., Takaki, M., Torihashi, S., Kato, Y.,

Nakajima, Y., Ishizaka, S. and Tsunoda, Y., : Stem Cells, 20, 41-49 (2002)

20) Ishikawa, T., Nakayama, S., Nakagawa, T., Horiguchi, K., Misawa,

H., Kadowaki, M., Nakao, A., Inoue, S., Komuro, T. and Takaki, M., :

American Journal of Physiology Cell Physiology, 286, C1344-C1352 (2004)

21) Kuwahara, M., Ogaeri, T., Matsuura, R., Kogo, H., Fujimoto, T.

and Torihashi, S., : Neurogastroenterol Motil, Suppl.1, 14-18 (2004)

図の説明

図 1

c-KIT レセプターとリガンド SCF (Stem cell factor) の構造
c-KIT レセプターは細胞内に二つのリン酸化ドメインを持つ。細胞膜の外側には免疫グロブリン様構造が5つ繰り返され、ここに二量体を形成したリガンド SCF が結合するとレセプターの方も二量体となってリン酸化が生じ、シグナルが伝達される。自然発生的なレセプターおよびリガンドのミュータントマウスやラットが知られている。多くはリン酸化部位に障害が起こり、シグナルが減弱あるいは消失する。

図 2

胎生 13 日マウス小腸の免疫組織化学

c-KIT陽性細胞(赤)は小腸壁外周部に分布している。一方、神経節となる神経堤由来の細胞はRET蛋白(緑)を発現し、やや内側の部分に分布している。両者は決して重複しない。これにより、c-KIT陽性細胞と神経節細胞は由来が異なることが示された。(文献 5 より許可を得て転載)

図 3

胎生 13 日から生後 10 日におけるマウス小腸のc-KIT(赤)およびデスミン(緑)の免疫組織化学

(A) 胎生 13 日の小腸ではc-KIT発現細胞は小腸壁の外周部に認められる。まだデスミンの免疫活性はみられな

い。(B) 胎生 15 日になると内輪筋層はデスミンのみを発現しているが、その外側および外縦走筋層ではc-KITとデスミンが共存している。(C) さらに胎生 18 日になるとc-KITの発現は内輪走筋のすぐ外側に限局し、外縦走筋層にはデスミンの発現が残った。(D) 生後 10 日の小腸では外縦走筋、内輪走筋は平滑筋として分化し、デスミンの発現が顕著である。また両筋層の間にはc-KITを発現するICCが密に分布している。c-KITとデスミンの発現によりICCと平滑筋の分化過程が理解できる。スケールバーはB, Cで共通。(文献 5 より許可を得て転載)

図 4

ICCと平滑筋の分化モデル

共通のc-KIT発現前駆細胞からICCと平滑筋がそれぞれ胎生後期に分化する。ICCはc-KITの発現を継続するが平滑筋はその発現を止めて、筋特異蛋白の合成を始める。両細胞が独立した細胞系譜となるのが胎生 18 日頃である。

図 5

ICCから平滑筋細胞への形質転換

中和抗体を投与して出生直後のマウス小腸ICCのc-KITを抑制したところ、特殊な細胞が出現した。これらは外縦走筋(LM)と内輪走筋(CM)の間に位置し、細胞質の電子

密度が高い点でICCと共通するが、細胞内にミオフィラメント(矢頭)、細胞膜にカベオレ(矢印)を多量に持つ点で平滑筋胞に類似するハイブリッド型の細胞であった。この細胞の出現から、c-KITはICCの分化に必要であることが推測された。(文献7より許可を得て転載)

図 6

リガンドのミュータントマウスに見られるICC

c-KITシグナルが抑制されている sl/sl_d マウスの小腸はICC-MPを欠損するが、ごく一部に残存したc-KIT陽性ICCは平滑筋のような細長い細胞形を示していた(矢印)。

図 7

β ガラクトシダーゼ組織化学で検出された胎生15日(トランスジェニックマウス SLF-lacZ)のSCF産生細胞

(A)胃に分布する一部の神経節細胞がSCFを産生していた。(B)小腸筋層の膜片標本でMAP2との二重標識から神経節細胞がSCFを産生していることが証明された。しかし神経節細胞の中にはSCFを産生していないものもある(星印)。

図 8

腸管様構造の組織構成

上皮層には杯細胞(星印)が明瞭に認められる。その外

側を結合組織層と筋層が取り巻き、最外層は漿膜で覆われている。(文献 21 より許可を得て転載)

図 9

腸管様構造に分布するICC

筋層にはよく分化した平滑筋細胞にまじって、ICCが分布している。ICCは細胞電子密度が高く、細胞膜には多数カベオレ(矢印)が認められる。微細構造はマウス腸管のICCと類似しているが、ICC-MPのように二次元的に広がるネットワークは見られなかった。(文献 19 より許可を得て転載)