

特集 Neurogastroenterology の幕開け

3 腸管平滑筋運動におけるカハールの 介在細胞と壁内神経

鳥橋 茂子*

Key words : カハールの介在細胞, ペースメーカー, 腸管神経, 緩徐波, 平滑筋

要旨

神経解剖学者カハールが記載したといわれる腸管筋層固有の細胞は現在、カハールの介在細胞(ICC)と一般に呼ばれている。ICCは癌原遺伝子 *c-kit* を発現し、その産物 c-Kit レセプター依存性に分化、増殖する。そして *c-kit* を指標として形態学的、生理学的研究が進展した。ICCには少なくとも2種類の機能および形態の異なるタイプが存在する。一つは消化管平滑筋に特徴的な律動的自動運動のペースメーカーであり、また他のグループは平滑筋と神経との間に介在して神経からの神経伝達の調節に関与している。ICCはその発生過程でも腸管神経と深く関わり、神経は c-Kit レセプターのリガンドを産生している。

する神経細胞と考えて報告した(図1)¹⁾。実際には彼の記載した細胞は神経細胞ではなかった。また現在、形態学的に同定されるカハールの介在細胞とカハールの報告した細胞とは異なるものであると主張する研究者もいる。しかし約1世紀も前に消化管壁内に特異な細胞の存在することを発見し、これに研究者の注意を惹起したカハールの業績をたたえて、現在多くの研究者は消化管平滑筋層に存在して平滑筋運動に重要な役割をもつ細胞群をカハールの介在細胞(interstitial cells of Cajal; ICC)と呼んでいる。

I. カハールの介在細胞とは

約100年近く前に、高名な神経解剖学者カハール(Santiago Ramón y Cajal; 1852-1934)は鍍銀法とメチレンブルー法を駆使して自律神経の終末構造を研究し、消化管神経叢の近傍に特異な細胞を見出している。彼は当時神経を特異的に染めるこれらの方法で染色された細胞を自律神経と効果器の間に介在

II. 癌原遺伝子 *c-kit* の発現

ICCは長い間、メチレンブルー法やZIO法(zinc iodide-osmium tetroxide method)によって同定されていた。ところが前田らによって癌原遺伝子 *c-kit* を発現する細胞が腸管の平滑筋層に多数分布することが発表されると、*c-kit* はICCに対する重要な研究手段となった²⁾。

c-kit はそれまでメラノサイト、赤血球や生殖細胞の前駆細胞、肥満細胞に発現が知られていた。*c-kit* の遺伝子産物である c-Kit

*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
(〒466-8550 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町65)

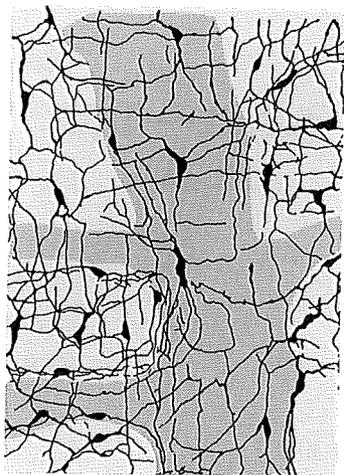


図1 カハールの介在細胞

カハールがメチレンブルー法により、ウサギの腸管の膜片標本で観察した介在細胞。これらは長い突起をもつ多極型の細胞で、互いに突起により連絡してネットワークを形成している。このネットワークは薄く染まっている神経叢を覆うように分布している。現在このような細胞のネットワークは抗 c-Kit レセプター抗体の免疫染色で染め出すことができる。

レセプターはレセプター型のチロシンキナーゼで、リガンドであるステムセルファクターが結合すると活性化されて発現細胞の増殖や分化を誘導する(図2)。消化管の筋層で *c-kit* を発現している細胞が ICC であることが証明されると、*c-kit* は ICC の選択的なマーカーとして使われるようになった(図3)。そして c-Kit レセプターの機能障害は ICC の分化や増殖を抑制し、その結果 ICC の機能を研究するうえでもたいへん役に立つことになった。

マウスやラットでは *c-kit* をマッピングする *W* 遺伝子座のミュータントが知られている。完全に *W* 遺伝子を欠損すると致死となるが、さまざまな変異型が存在し、障害の程度にも種々のレベルがある。ヒトでも限局性白斑症としてやはり *W* 遺伝子異常が報告されている。さらに前田らの用いた抗 c-Kit

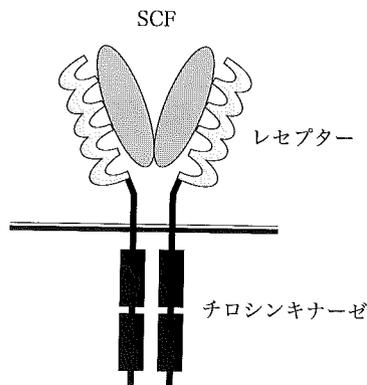


図2 c-Kit レセプターの構造模式図

c-Kit レセプターは 976 アミノ酸からなる分子量約 140 kD のレセプター型のチロシンキナーゼで、細胞内にキナーゼドメインを 2 か所もっている。細胞外には 5 個のイムノグロブリン様繰り返し構造からなるレセプター部分が存在する。ここにリガンドであるステムセルファクター(SCF)が二量体を形成して結合する。その結果 c-Kit レセプターもホモ二量体となってチロシンリン酸化が起こり、そのシグナルは MAP キナーゼを介して核へと伝達される。*W* 遺伝子座の変異すなわち *c-kit* のミュータントとして、マウスでは膜貫通部の欠落、チロシンキナーゼ領域の点突然変異など多数存在し、その結果、機能障害の程度もさまざまである。

レセプター抗体は中和抗体として実験的に c-Kit レセプターの機能を抑制することができる^{2),3)}。これらの好条件が重なって、最近の約 10 年間に *c-kit* を利用して ICC の研究は飛躍的に前進した。しかしこれまでのところ、c-Kit レセプターが ICC の機能に直接関わるという報告はない。

III. ペースメーカー機構

初めて *c-kit* を用いて明らかにされた ICC の機能は腸管運動のペースメーカーというものであった。消化管の平滑筋はほかの平滑筋とは異なる生理学的な性質をもっている。すなわち、神経をブロックしても消失しない律動的な自動運動能をもつことである。さらに

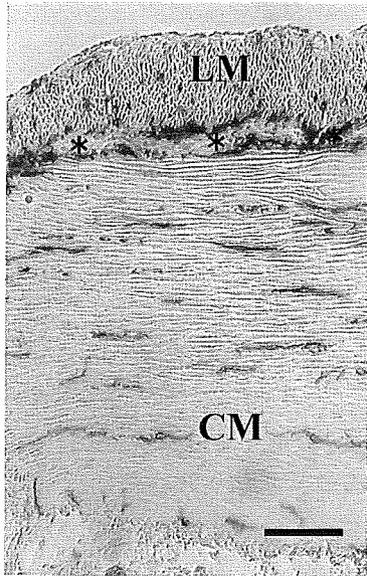


図3 ヒト胃におけるカハールの介在細胞の分布

凍結切片の免疫染色により抗c-Kitレセプター抗体陽性細胞，すなわちカハールの介在細胞(ICC)の分布が示されている。このように胃ではICCは筋層間神経叢(*)の周囲に非常に多い。これらはペースメーカーとして機能している。また平滑筋層内(LM:外縦走筋, CM:内輪走筋)のICCは周囲の平滑筋とほぼ平行に走行している。したがって，外縦走筋層では点状に，また内輪走筋層では細長く見える。これらのICCは神経伝達の調節を行っている。分布や形態，そして機能の違いから少なくとも2種類のICCが存在すると考えられている。スケールバーは50 μm を示す。

消化管平滑筋からは自動運動と同調する平滑筋細胞の膜電位変動が記録される。この周期的な膜電位変動は緩徐波(slow waves)と呼ばれ，消化管平滑筋の示す特徴の一つである(図4)。この律動的な自動能および緩徐波は平滑筋細胞自体がもつ性質であるとする説と，平滑筋層に存在するペースメーカー細胞が歩調取りとしてリズムを発生し，これを平滑筋細胞に伝播して緩徐波と律動的な収縮運動を引き起こすという説とがあった。

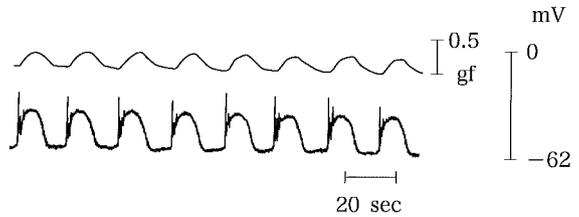


図4 平滑筋の律動収縮と膜電位変動の同時記録

イヌ胃体部の内輪走筋より記録された律動収縮(上段)は同時に細胞内微小電極法で記録された平滑筋細胞の細胞膜電位変動(下段)と同調している。規則的な平滑筋の膜電位変動は，急な脱分極とそれに続く緩やかな脱分極相(緩徐波)から成り立っている。その緩徐波は平滑筋層内のペースメーカー細胞が駆動し，平滑筋へと伝播される。[Szurszewski, J. H.: Electrical basis for gastrointestinal motility. Johnson, L. R. (ed.): Physiology of the Gastrointestinal Tract. 1435-1466, Raven Press, New York, 1981²¹⁾]

前田らの抗c-Kitレセプター抗体による機能障害実験やc-kitの突然変異の一つであるW/W^vミュータントマウスにおける消化管運動の障害はいずれも平滑筋が固有にもつ自動運動能とさらに緩徐波がなくなって，壁内神経は正常でも平滑筋の運動が障害されていた^{2),4)-6)}。そして，はなはだしい場合は麻痺性の腸閉塞を発症した。

前述のようにc-Kitレセプターシグナル系が障害されると，ICCの正常な発生や増殖が障害されてその結果ICCが減少，ないしは消失してしまう。ICCの消失とともに平滑筋の自動能，律動的自動運動能と緩徐波が消失したということはICCがリズムを発生している，つまりペースメーカー細胞であることを強く示唆した。その後c-kitによる研究はICCがペースメーカー細胞として機能していることを示す実験結果を多数もたらした。c-Kitレセプターを指標として単離したマウスのICCから直接緩徐波に類似した膜電位変動が記録された^{7),8)}。またモルモット胃の筋層内に分布する，c-Kitレセプター

の免疫活性陽性細胞すなわち ICC が歩調取り電位を発生して平滑筋へ伝播する⁹⁾。従来形態学的な特徴から ICCこそペースメーカーではないかと推測されていたものが、生理学的にも肯定されるようになり、一般に受け入れられるようになってきた¹⁰⁾。

現在 ICC がどのようにリズムを発生し平滑筋細胞へと伝播するか、さらに神経がどのようにペースメーカーをコントロールしているかという点に研究の中心が移ってきている。これまでにいくつかのモデルが提唱されているが胃や腸といった部位による違い、動物種による違いもあってまだ不明の点が多い。

ICC におけるリズム発生機構には細胞内小器官としてミトコンドリア、カルシウムストアとしての小胞体、そのカルシウム放出チャネルである IP₃レセプター、そして膜電位変動を惹起するイオンチャネルとしてカルシウム作動性クロライドチャネル^{7),11)}、非選択的陽イオンチャネル等が関わっているという報告がある¹²⁾。とくに IP₃レセプターの欠損マウスでは ICC は正常に分布していても緩徐波は計測されない¹³⁾。また非選択的陽イオンチャネルの一つ TRP 4 (transient receptor potential like channel type 4) が ICC のカベオラに多数集合していることが報告されて、これらが律動的膜電位変動に関わることが示唆されている¹⁴⁾。

また ICC はお互いにギャップ結合で電氣的に連結し、さらに ICC と平滑筋細胞との間にもギャップ結合が存在することから、ICC の膜電位変動はこれらのギャップ結合を通して ICC のネットワーク間、そして平滑筋細胞へと伝播されることが考えられる¹⁵⁾。

IV. 神経伝達の調節

ICC は消化管の平滑筋層に多数分布するが、すべてが均一な細胞集団ではなく、形態学的には少なくとも 2 種類に分けられる。そのうちの 1 種類はペースメーカーとして機能していると認められるようになったが、他の 1 種類はどのような機能をもっているのだろうか。

ところで、マウスの胃底部には平滑筋層に平滑筋細胞と混在する紡錘形の ICC が多数分布しているが、ここからは平滑筋層の緩徐波が計測されず、またペースメーカーとして機能している ICC も存在しない。したがってこれらの紡錘形の ICC はペースメーカー以外の機能をもっているはずである。同様の ICC は結腸の平滑筋層内部や小腸の深部筋層神経叢の近傍にも分布している。これらの ICC の機能は *c-kit* ミュータントマウス *W/W_v* の解析から明らかになった。

W/W_v マウスでは上述のように *c-Kit* レセプターの機能が抑制されているため、紡錘形の ICC は正常に分化できずに欠損している。正常なマウスとミュータントマウスの胃底部を生理学的に比較検討したところ、紡錘形の ICC が欠如しているミュータントマウスの胃底部では一酸化窒素 (NO) 作動性神経の神経伝達効率が著しく低下していた¹⁶⁾。調べたところ、平滑筋の NO に対する弛緩効果や神経叢に分布する NO 作動性神経は正常なマウスと異なることはなかった。したがって、紡錘形の ICC は壁内神経と平滑筋の間に介在して神経伝達の効率を増大させるように機能していることが考えられた。

形態学的には以前からこの種類の ICC が平滑筋層内を走行する神経線維束に伴行する

ように配置し、神経伝達の場合である膨隆部 (varicosity) を取り囲むように近接することが知られていた。さらに生理学的には NO 作動性神経の効率化だけではなく、アセチルコリン作動性神経の伝達調節にも ICC が関与していることが報告されている。

このほか、紡錘形の ICC は表に示される

表 ICC に発現が報告されているレセプターと神経伝達調節機能

〈免疫組織学的報告〉	
Neurokinin 1	
Somatostatin 2 A	
P 2 X ₂ , P 2 X ₅	
〈メッセンジャー RNA の報告〉	
VIP type 1	
Neurokinin 3	
Muscarinic type 1, Muscarinic type 2	
〈その他生理学的報告〉	
NO	

ようなさまざまな神経伝達物質に対するレセプターをもっていることが明らかになった。かつてカハールが推測したように、ICC は神経とその効果器である平滑筋細胞との間に介在して神経伝達に関わることがわかってきた¹⁷⁾。今後どのようなメカニズムで神経伝達の調節が生じるのか解明されることを期待する。

V. 発生における壁内神経との関係

ICC と壁内神経は機能的に密接な関連があることがわかってきたが、ICC はその発生過程でも壁内神経とは深い関係がある。マウスの腸管で ICC がどのように分化してくるかを調べたところ、胎生 12 日頃から将来平滑筋細胞が分化するあたりに、c-Kit レセプターを発現する未分化間葉系細胞が認められた。これらの c-Kit レセプター発現細胞

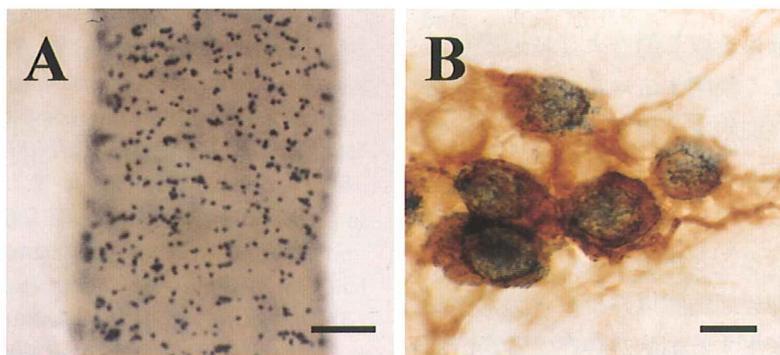


図5 ステムセルファクターを産生する壁内神経

ステムセルファクターのプロモーターにレポーター遺伝子として *lacZ* を挿入したトランスジェニックマウスでは、ステムセルファクターを産生する細胞の核にベーターガラクトシダーゼの活性が検出される。そのトランスジェニックマウスの腸管を検索したところ、ベーターガラクトシダーゼは神経細胞から検出された。つまり、壁内神経がステムセルファクターを産生していることが示された。

- A: 胎生 15.5 日のマウス小腸。ベーターガラクトシダーゼの活性は点状に見られる。これらは壁内神経細胞の核である。スケールバーは 50 μm を示す。
- B: 生後 7 日のマウス小腸の膜片標本。ベーターガラクトシダーゼの活性は神経を特異的に染める MAP 2 の免疫活性 (褐色) を示す細胞の核にあることがわかる。スケールバーは 10 μm を示す。

は、胎生の後期 18 日頃になると将来平滑筋細胞へ分化するものと ICC へと分化するものが分かれて、ICC になる細胞群のみ c-Kit レセプターの発現を継承する。一方、平滑筋細胞へと分化する細胞群は c-Kit レセプターの発現を止め、収縮蛋白を発現するようになる¹⁸⁾。

c-Kit レセプターは前述のように、リガンドであるステムセルファクターが結合することで活性化される。そのリガンド産生細胞についてはステムセルファクターのプロモーター部位に *lacZ* を結合したトランスジェニックマウスの解析により明らかにされた。これによると壁内神経細胞の多くがステムセルファクターを産生していた(図 5)¹⁹⁾。ステムセルファクターを産生する神経細胞の数も胎生後期から出生直後、つまり *c-kit* を発現する前駆細胞から ICC と平滑筋細胞がそれぞれ分化する時期にピークに達することも明らかになった。このことはまた筋層間神経叢の周囲に ICC がとくに多く集合していることや、神経線維束を取り囲むように近接していることをうまく説明する。しかし、予想に反して壁内神経細胞を欠損するミュータントマウスでも、ICC は少なくとも出生直後には正常に分布し、ペースメーカーとしての機能も果たしていることが示された²⁰⁾。

おそらく、神経節細胞以外にもステムセルファクターを産生する細胞が存在するか、あるいは ICC の発生過程で *c-kit* シグナル系を代償する経路が存在するものと思われる。いずれにせよ、正常マウスでは壁内神経細胞から産生されるステムセルファクターが ICC の分化に関与することは十分に考えられる。このように機能、そして発生においても両者は密接な関係がある。

文 献

- 1) Cajal, S. R. : Histologie du système nerveux de l'homme des vertébrés. 2 ; 942. Maloine, Paris, 1911
- 2) Maeda, H., Yamagata, A., Nishikawa, S., et al. : Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. Development 116 ; 369-375, 1992
- 3) Torihashi, S., Ward, S. M., Nishikawa, S., et al. : *c-kit*-dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract. Cell Tissue Res. 280 ; 97-111, 1995
- 4) Torihashi, S., Nishi, K., Tokutomi, Y., et al. : Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of Cajal to a smooth muscle phenotype. Gastroenterology 117 ; 140-148, 1999
- 5) Ward, S. M., Burns, A. J., Torihashi, S., et al. : Mutation of the proto-oncogene *c-kit* blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. J. Physiol. 480 ; 91-97, 1994
- 6) Huizinga, J. D., Thuneberg, L., Kluppel, M., et al. : *W/kit* gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. Nature 373 ; 347-349, 1995
- 7) Tokutomi, N., Maeda, H., Tokutomi, Y., et al. : Rhythmic Cl⁻ current and physiological roles of the intestinal c-kit-positive cells. Pflugers Arch. 431 ; 169-177, 1995
- 8) Thomsen, L., Robinson, T. L., Lee, J. C., et al. : Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current. Nat. Med. 4 ; 848-851, 1998
- 9) Dickens, E. J., Hirst, G. D. and Tomita, T. : Identification of rhythmically active cells in guinea-pig stomach. J. Physiol. 514 ; 515-531, 1999
- 10) Thuneberg, L. : Review : One hundred years of interstitial cells of Cajal. Microsc. Res. Tech. 47 ; 223-238, 1999
- 11) Huizinga, J. D., Zhu, Y., Ye, J., et al. : High-conductance chloride channels generate pacemaker currents in interstitial cells of Cajal. Gastroenterology 5 ; 1627-1636, 2002
- 12) Koh, S. D., Jun, J. Y., Kim, T. W., et al. : A

- Ca²⁺-inhibited non-selective cation conductance contributes to pacemaker currents in mouse interstitial cell of Cajal. *J. Physiol.* 540 ; 803-814, 2002
- 13) Suzuki, H., Takano, H., Yamamoto, Y., et al. ; Properties of gastric smooth muscles obtained from mice which lack inositol trisphosphate receptor. *J. Physiol.* 525 ; 105-111, 2000
- 14) Torihashi, S., Fujimoto, T., Trost, C., et al. : Calcium oscillation linked to pacemaking of interstitial cells of Cajal : requirement of calcium influx and localization of TRP 4 in caveolae. *J. Biol. Chem.* 277 ; 19191-19197, 2002
- 15) Daniel, E. E. and Wang, Y. F. : Gap junctions in intestinal smooth muscle and interstitial cells of Cajal. *Microsc. Res. Tech.* 47 ; 309-320, 1999
- 16) Burns, A. J., Lomax, A. E., Torihashi, S., et al. : Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 ; 12008-12013, 1996
- 17) Ward, S. M. and Sanders, K. M. : Interstitial cells of Cajal : primary targets of enteric motor innervation. *Anat. Rec.* 1 ; 125-135, 2001
- 18) Torihashi, S., Ward, S. M. and Sanders, K. M. : Development of c-Kit-positive cells and the onset of electrical rhythmicity in murine small intestine. *Gastroenterology* 112 ; 144-155, 1997
- 19) Torihashi, S., Yoshida, H., Nishikawa, S., et al. : Enteric neurons express Steel factor-lacZ transgene in the murine gastrointestinal tract. *Brain. Res.* 738 ; 323-328, 1996
- 20) Ward, S. M., Ordog, T., Bayguinov, J. R., et al. : Development of interstitial cells of Cajal and pacemaking in mice lacking enteric nerves. *Gastroenterology* 117 ; 584-594,

1999

- 21) Szurszewski, J. H. : Electrical basis for gastrointestinal Motility. Johnson, L. R. (ed.) : *Physiology of the Gastrointestinal Tract.* 1435-1466. Raven Press, New York, 1981

Summary

Interstitial Cells of Cajal and Enteric Neurons in the Gastrointestinal Tract

Shigeko Torihashi*

Interstitial cells of Cajal (ICC) were named after the famous neuroscientist Cajal SR. Recently it was found that ICC expressed proto-oncogene *c-kit*, needed for the growth and development of these cell. After that *c-kit* has become a good tool for both morphological and physiological studies of ICC. There are two types of ICC. One works as a pacemaker for the spontaneous contraction of smooth muscles in the gastrointestinal tract. These cells generate a pacemaker current and propagate to the smooth muscle through gap junctions to raise slow waves, and produce rhythmic contractions. The other ICC group is considered to be the neuro-modulators intercalated between enteric neurons and smooth muscles. These cells amplify nitrinergic and cholinergic neurotransmissions. Those ICC have several receptors of neurotransmitters such as neurokinin 1, somatostatin 2 A, etc. In relation to the development of ICC, enteric neurons also show an close relationship to ICC in producing stem cell factors, a ligand for c-Kit.

Key words : interstitial cells of Cajal, pacemaker, enteric nerve, slow wave, smooth muscle

**Department of Anatomy and Molecular Cell Biology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi 466-8550, Japan*