

消化管および心臓発生過程における C-kit シグナルの局在

浅野(星野) 安信¹⁾・入江 宏²⁾

1) 帝京大学医療技術学部スポーツ医療学科 2) 帝京短期大学ライフケア学科

【抄録】

チロシンキナーゼ型受容体である C-kit タンパクは、消化管運動のペースメーカー細胞のカハール介在細胞 (ICC) や、消化管間葉系腫瘍の一つの GIST で局在していることが知られている。そこで、我々は、消化管および同様の自動能を持つ心臓形成過程において C-kit の局在についてマウスおよびヒト流産の胎児例を用いて検討した。その結果、C-kit の局在は、マウス胚消化管において、12 日目以降の筋層に弱陽性に認められ、妊娠後期から消化管のアウエルバッハ神経叢の周囲に限局して陽性所見が見られた。一方で、12、15 日のマウス胚心臓においては、心筋細胞に比較的広範に陽性であったが、新生児マウスにおいては陽性細胞が減少した。また、7 週齢ヒト胎児およびヒト新生児においてもマウス胚と同様の結果を示した。これらの結果から、C-kit シグナルは消化管形成において、自動能の形成に関与している可能性が示唆されたが、心臓の刺激伝導系においては、明らかな相関はみられなかった。次に、C-kit 陽性細胞についての性状を明らかにするために、幹細胞マーカーの一つである Nucleostemin (NS) の局在を検討した。その結果、NS の局在は、C-kit の局在と同様に肝臓や心臓や GIST に、C-kit 陽性細胞の一部の細胞核において陽性が認められた。これらの結果から、少なくとも C-kit 陽性細胞には、いくつかのサブポピュレーションが存在する可能性が示唆できた。

【キーワード】 C-Kit, 消化器, 循環器, 発生

I. 緒言

消化器系の組織は、鍍銀法やメチレンブルー染色で染めることにより消化管筋層内の筋間神経叢に壁内神経と近接したネットワークを形成している細胞群を識別することが可能である。それらの細胞は、自律神経系の終末部と平滑筋組織の間に介在するため interstitial cells として記載され、発見者の名前から Interstitial cells of Cajal (ICCs ; カハールの介在細胞または間質細胞) と名付けられた¹⁾。その後、消化管の平滑筋は、生理学的に神経をブロックした後においても、自発的な自動収縮運動を示したことから、平滑筋層内には緩徐波を発生するペースメーカーが存在する事が示唆され、これらに関与している細胞は ICCs であり、C-kit タンパクの局在が陽性であることなどが報告された^{2,3)}。

C-kit 遺伝子はレセプター型チロシンキナーゼであり、C-kit に結合するリガンドとして stem cell factor (SCF) や mast cell growth factor などが

知られている。C-kit はリガンド結合ドメインである 5 個のイムノグロブリン様の繰り返し配列を持つ細胞外ドメインと、細胞膜貫通ドメイン、傍細胞膜ドメイン、そしてチロシンキナーゼ活性を持つ細胞内ドメインから構成されており、SCF との結合により二量体が形成され、チロシンキナーゼの活性化を引き起こし、メラノサイト、赤芽球、生殖細胞などの細胞の分化、増殖、未分維持機構などに関与することが知られている⁴⁾。一般的に、幹細胞は自己以外の種類の細胞に分化する能力 (分化能) と、細胞分裂を経て自己と同一の分化能をもつ娘細胞を生み出す自己複製能をあわせもつ細胞として定義される。このような幹細胞には、多くの遺伝子が関与しており、C-kit, nucleostemin (NS), nanog, oct3/4 などとも有名である⁵⁾。

一方で、消化管に発生する間葉系腫瘍は平滑筋腫瘍、神経性腫瘍および、gastrointestinal stromal tumors (GIST : 消化管間質性腫瘍) などが挙げられる。GIST の主要な発生部位は、一般

的に胃 (50 ~ 70%) であり, 次いで小腸 (20 ~ 30%), 大腸および直腸 (10% 未満), そして食道 (5% 未満) となっている⁶⁾。興味深い事に, GIST はそのほとんどが C-kit を発現していることから, ICCs を起源とする腫瘍と考えられている。しかしながら, GIST の起源となる細胞は, ICCs である説が有力であるが, 詳細な発生機序など未だに不明な点が多い。

そこで, 本研究において我々は, マウス胚およびヒト胚を用いて正常消化管形成における C-kit 局在について比較検討を行った。次に, 消化管と類似した自動能を持つ心臓発生過程における C-kit の関与の可能性を検討するために免疫組織化学を行った。さらに心臓および消化管発生過程における C-kit 陽性細胞性状を詳細に検討するため, 組織幹細胞マーカーの一つである NS の局在についての観察および, 電子顕微鏡による超微形態の観察も行った。

II. 方法

1. 材料

12 日, 15 日, 18 日マウス胚, 新生児, 成熟マウスおよび病院内で子宮内胎児死亡と診断され, 法的に問題の無い 10 週齢, 12 週齢のヒト流産胎児標本を用いた。

2. 組織学的解析

サンプルはパラフィンブロックを作製し, ミ

クロームによる薄切後, スライド標本を作製した。染色は, 一般染色として, HE 染色, EVG 染色を行い, タンパク質局在解析として C-kit 抗体および NS 抗体を用いて免疫組織化学を行った。また, GIST については POP 法による免疫電顕を併せて行い, 超微形態の観察を行った。

3. 倫理的配慮

本実験は帝京大学の医学系倫理委員会による承認を受け (No.09-109), 動物実験倫理規定に準拠し実験を遂行した。また, 本実験は, 利益相反に該当しない。

III. 結果

マウス消化管形成過程における消化管運動のペースメーカー細胞の ICCs の発生を観察するために, C-kit の局在について抗 C-kit 抗体を用いて免疫組織化学を行った。はじめに, マウス胚消化管において C-kit の局在は, 15 日目の筋層に弱陽性に認められた (Figure 1A, B)。その後, 胚発生の後期から消化管のアウエルバッハ神経叢の周囲に限局して陽性所見が見られ, 新生児マウスにおいてもその局在が観察された (Figure 1C, D)。

次に, 消化管形成において, C-kit シグナルが自動能の形成に関与している可能性が示唆されたため, 我々は, 心臓の刺激伝導系においても同様の機構が認められるか検討した。そこで,

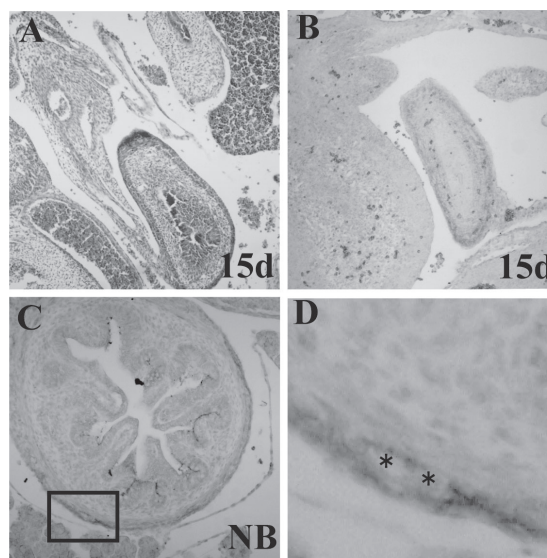


Figure 1. 消化管の発生過程における C-kit タンパクの局在 (A, B) 15 日胚マウス消化管 (C, D) 新生児マウス (A) H-E 染色 (B-D) C-kit 抗体による免疫組織化学

マウス胚心臓形成過程において C-kit の局在について抗 C-kit 抗体を用いて免疫組織化学を行った。その結果、12 日のマウス胚心臓においては、心筋細胞に比較的広範に陽性であったが、15 日および新生児マウスにおいてはほとんど C-kit 陽性細胞がほとんど認められなかった (Figure 2A-C)。

さらに、消化管および心臓形成過程における C-kit シグナルについて、マウス胚のみではなく 10、12 週齢ヒト胎児および新生児の標本を用いて比較検討した。その結果、子宮内死亡胎児のヒト 10 週齢胚では、消化管におけるマウ

スの 15 日胚と同様に一部の細胞に C-kit 陽性細胞が観察できた (Figure 3A)。また、肺硝子膜症で死亡した新生児の消化管において、C-kit 陽性細胞が ICCs とその線維において観察された (Figure 3B)。一方で、心臓においては、12 週齢では心筋細胞に散在的に陽性細胞が認められるが、新生児の心臓では刺激伝導系の左脚と周囲の心筋において C-kit 陽性細胞が限局して観察された (Figure 3C-F)。これらの結果から、消化管形成において、マウス胚およびヒト胚において、C-kit 陽性細胞が ICC とその線維に限局した発現を示したが、C-kit シグナルが自動能の形成に関

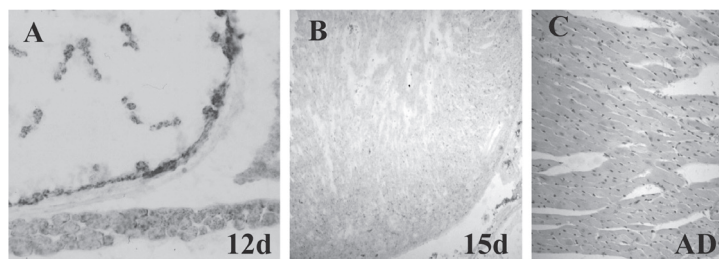


Figure 2. 心臓の発生過程における C-kit タンパクの局在 (A) 12 日胚 (B) 15 日胚 (C) 成熟マウス

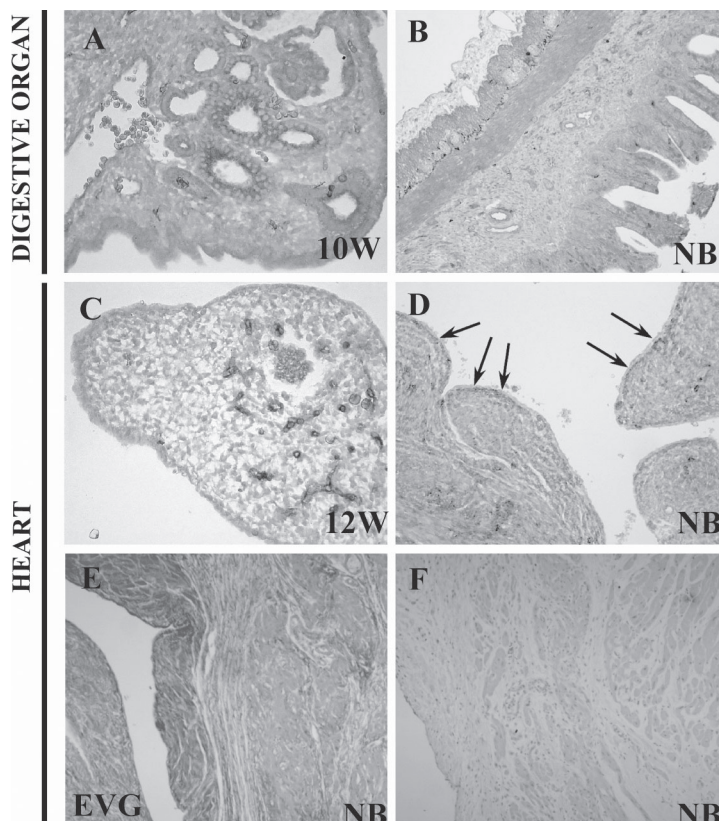


Figure 3. ヒト胚における心臓の発生過程の C-kit タンパクの局在 (A, B) 消化管, (C-F) 心臓 (A) 10 週齢, (C) 12 週齢, (B, D-F) 新生児 (D) 刺激伝導系の左脚と周囲の心筋における C-kit 陽性細胞 (矢印), (F) EVG 染色

与している可能性が示唆された。

また、12日および18日マウス胚の各臓器におけるC-kitの局在を検索したところ、12日胚の胎盤の栄養膜で強く陽性反応が認められたが、その後、18日胚の胎盤では陽性細胞数の減少が認められた (Figure 4A, B)。また、脳、神経管、肝臓、歯の原基においても陽性の所見を示した (data not shown)。

これまでの結果から、心筋細胞は、発生が進むと増殖能が低下し、未分化マーカーであるC-kit陽性細胞数の減少を示した。また、消化管形成においても、C-kit陽性細胞の局在は、平滑

筋近傍領域からアウエルバッハの神経叢のICCsへと限局していった。一方で、カハール細胞は、その後、がん化し、細胞増殖が活発になるとGISTとなることが知られている。そこで、我々は、C-kitの反応性と未分化維持機構との関連を検討するために各種の組織幹細胞において局在しているNucleostemin (NS)に着目し、消化管および心臓形成過程におけるC-kit陽性細胞の性状について免疫組織化学による検討を行った。

その結果、NSの局在は、ヒト胎児の肝臓や心臓において、C-kit陽性細胞の一部の細胞核で陽性であった (Figure 5A-D)。また、C-kit陽性細

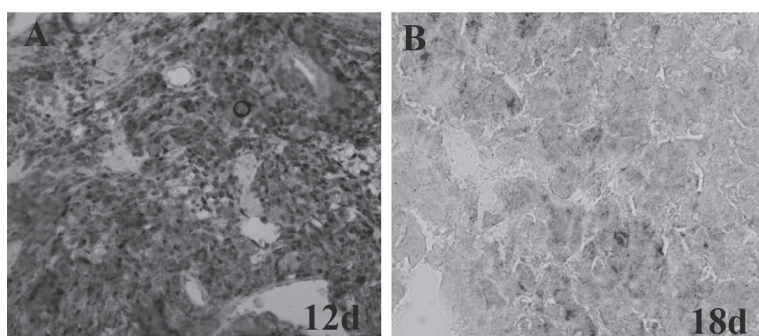


Figure 4. 胎盤の発生過程におけるC-kitタンパクの局在

12日胚胎盤において強く陽性反応が認められ、発生後期の18日胚では陽性細胞数の減少が認められた。

(A) 12日胚, (B) 18日胚

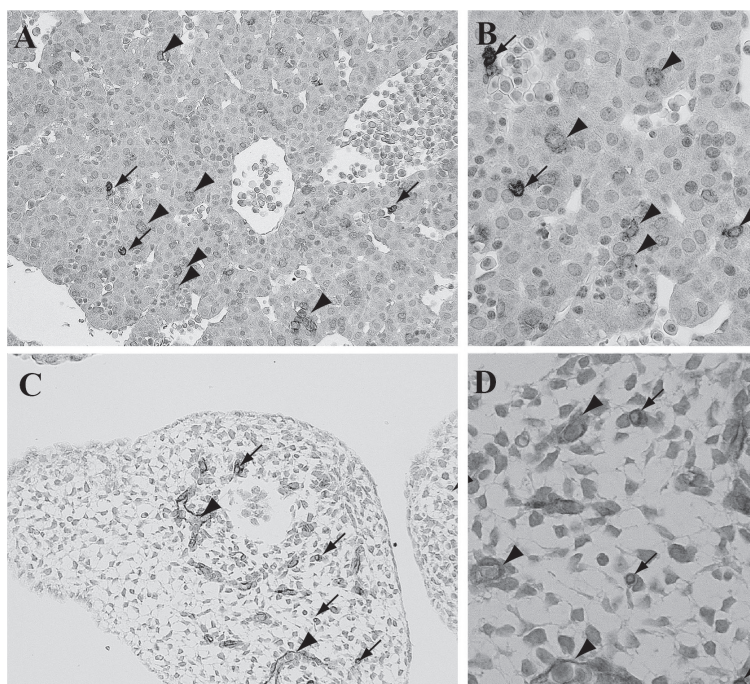


Figure 5. ヒト胚肝臓および心臓におけるC-kitおよびNSの局在

(A) 肝臓 (低倍率), (B) 肝臓 (高倍率), (C) 心臓, (D) 心臓 (高倍率), C-kit陽性細胞 (矢頭), C-kitおよびNS共陽性細胞 (矢印)

胞が多く含まれる GIST においては、NS 陽性細胞は GIST の組織内で、比較的限定的な領域に数個程度ずつ観察でき、一部は C-kit および NS の共陽性反応が見られた (Figure 6A-D)。これらの結果から、マウス心臓形成および消化管形成において示される C-kit 陽性細胞は、さらにいくつかのポピュレーションによって分類できる可能性が示唆できた。

そこで、NS 陽性細胞について、さらに詳細に形態による解析を行うために、電子顕微鏡による免疫電顕を行い、超微形態を観察した。その結果、核小体に陽性反応を持つ NS 陽性細胞の検出できなかったが、細胞質内で陽性反応を持つ C-kit 陽性細胞は、不規則な核を持つ細胞で、

核小体を持ち、細胞質内の核周囲に分画された状態で方向性のある Fiber 状の構造を持つ特徴が観察された。また、上皮細胞の特徴である接着装置が未発達であり、細胞質内に小腔を有していた (Figure 7)。

IV. 考察

C-kit タンパクは、成熟マウスおよびヒト新生児の消化管において、発生に伴い ICCs とその線維に局限した。一方で、心臓形成過程においては、初期は心筋細胞に広汎に陽性細胞が認められ、その後、刺激伝導系と周囲の心筋細胞に局限された。これらのことから C-kit タンパクは、

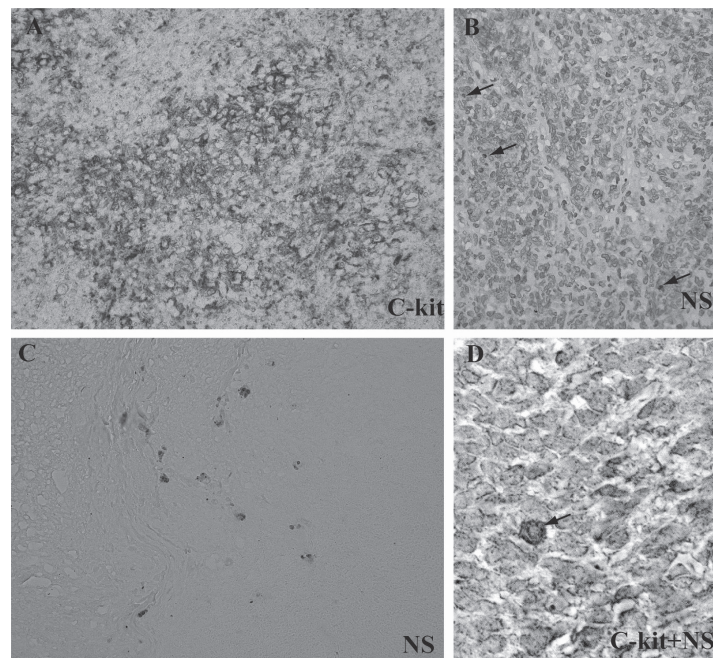


Figure 6. GIST における C-kit および NS の局在

(A) C-kit タンパク質の局在。細胞質に C-kit タンパク質が観察できた。(B-C) NS タンパク質の局在。核小体に NS タンパク質の局在が観察できた (矢印)。(D) C-kit と NS のタンパク質の局在。C-kit と NS の二重陽性細胞が観察できた (矢印)。

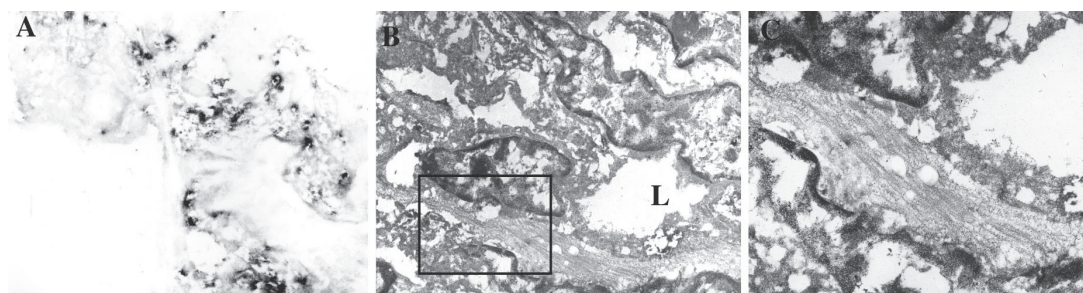


Figure 7. 免疫電顕による GIST における NS の局在

(A-B) 低倍率 (C) 高倍率 L: 小腔

組織幹細胞などから心筋細胞や消化管の平滑筋あるいは神経細胞などへの分化の方向が決まる時期に関与する成長因子として機能している可能性が示唆された。また、心臓では胎生期に心筋での発現が見られるものの新生児以降は見られず、脳の伝導路の構成に伴い不要な神経細胞が消失するのに似て伝導系の構築に伴い C-kit の発現が消退する可能性が示唆できた。加えて、GIST 超微形態学的特徴は、シュワノーマ（神経鞘腫）の特徴と類似していたことより、これらの C-kit 陽性細胞には、少なくとも NS タンパクの局在の有無によって増殖制御や幹細胞性の特性を示すいくつかのサブポピュレーションが存在する事が示唆できた。

【文献】

- 1) Cajal, S.R. (1911) *Historie du systeme nerveux de l' homme et des vertebres*. Paris: Maloine. 2, pp. 942.
- 2) Szurszewski, J. H. (1981) Electrical basis for gastrointestinal Motility. *In Physiology of the Gastrointestinal Tract*. New Youk: Johnson L.R. Raven Press. pp. 1435-1466.
- 3) Huizinga, J. D., Thuneberg, L., Kluppel, M. et. al. (1995) W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 373. pp. 347-349.
- 4) Maeda, H., Yamagata, A., Nishikawa, S., et. al. (1992) Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development* 116. pp. 369-375.
- 5) Miettinen, M. & Lasota, J. (2006) Gastrointestinal stromal tumors pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol*. 23. pp. 70-83.
- 6) Mu-Shui Dai, Xiao-Xin Sun, & Hua Lu (2008) Expression of Nucleostemin Activates p53 and Induces Cell Cycle Arrest via Inhibition of MDM2. *Mol Cell Biol*. 28. pp. 4365-4376.

【謝辞】

論文発表の場を与えて下さった帝京短期大学紀要編集員の皆様、帝京短期大学・ライフケア学科柔道整復専攻柔道整復コース諸先生に感謝致します。

Localization of C-kit signal in the digestive organ and cardiac development

Anshin ASANO-HOSHINO¹⁾ • Hiroshi IRIE²⁾

1) Faculty of Medical Technology, Teikyo University 2) Department of Life Care, Teikyo Junior College

【abstract】

【Purpose】 C-kit protein (KIT), a tyrosine kinase type receptor, is localized in Cajal intervening cells (ICC), a pacemaker cell for gastrointestinal motility, and GIST, one of gastrointestinal mesenchymal tumors.

【Methods】 Therefore, we observed the localization of C-kit and one of the stem cell markers, Nucleostemin (NS), in the digestive tract and the cardiogenic development with the same automatic ability using mouse and human embryo by using immunohistochemistry and ultrastructure analysis.

【Results】 Localization of C-kit was weakly positive in the muscularis after the 12th day in the mouse embryonic digestive tract, and C-kit positive cells was observed around the Auerbach plexus in the digestive tract in the late stage embryo. On the other hand, the mouse embryonic heart on the 12th and 15th days was relatively widely positive for cardiomyocytes, but the number of positive cells decreased in the newborn mouse. Similar results were also observed in 7-week-old human and newborn embryos.

【Discussion/Conclusion】 These results suggested that the C-kit protein was involved in the formation of the automatic ability in the gastrointestinal tract formation, but no clear correlation was found in the cardiac conduction system. In addition, NS localization was positive in some cell nuclei of C-kit positive cells, suggesting that at least some C-kit positive cells may have several subpopulations.

【Key words】 c-kit, digestive organ, cardiac organ, development