

令和元年6月14日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26114004

研究課題名(和文)腸上皮組織における細胞競合の役割

研究課題名(英文)Role of the cell competition in the intestinal epithelial tissue

研究代表者

西田 栄介(Eisuke, Nishida)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・センター長

研究者番号：60143369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 81,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス腸上皮組織において細胞競合の役割を解明するために、生きたままマウス腸上皮組織に遺伝子導入する方法を開発した。マウス腸上皮組織のオルガノイド培養法を用いた実験から、腸上皮組織における細胞脱落にかかわる候補遺伝子を見出し、上記遺伝子導入法を用いることで生体内での機能を解析した。さらに、腸上皮組織の幹細胞の遺伝子発現プロファイルの老化に伴う変化を解析し、細胞競合関連遺伝子の発現が老化に伴い変化することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸上皮組織における細胞競合にかかわる因子のin vivoにおける機能解析、並びに、その老化に伴う機能変化について解析した。ヒトにおいて小腸上皮は細胞増殖の最も活発な組織の一つであるにもかかわらず、がんの発症の非常にまれな臓器であり、その恒常性維持機構の全貌解明はがん研究においても非常に重要な一歩となる。さらに、我々が開発した腸上皮組織への遺伝子導入技術は、スイス連邦工科大学ローザンヌ校や北海道大学との共同研究につながるなど国際的に注目を集めた。

研究成果の概要(英文)：To analyze the role of cell competition in the intestine epithelial tissue in mouse, we developed a method for gene transfer into the intestinal epithelial tissue in vivo. Through genetic manipulation in the intestine organoid, we identified candidate genes, which were involved in cell shedding from intestinal epithelia, and we analyzed the roles of these genes in the homeostasis of the intestinal epithelial tissue. Additionally, we performed transcriptome analysis of intestinal stem cells during aging and found that the expression of genes related to cell competition was changed as animals aged

研究分野：分子生物学

キーワード：上皮組織 オルガノイド培養法 遺伝子導入法 シグナル伝達 遺伝子ノックダウン

## 1. 研究開始当初の背景

本研究「腸上皮組織における細胞競合の役割」では、腸上皮組織における細胞の脱落を中心に解析を行い、腸上皮組織の恒常性維持機構における細胞競合の役割の解明を目指す。細胞脱落は非脱落細胞と脱落細胞との細胞競合によって運命付けられていると捉えることができる。その細胞競合の分子機構を腸上皮への遺伝子導入法(in vivo)と腸管上皮幹細胞培養法および腸上皮のモデル培養細胞系(in vitro)を駆使した解析を行うことによって、細胞競合の新たな生理的役割を明らかにすることを目指す。

細胞競合は、同種の細胞間で相対的に適応度の高い細胞(勝者)が、低い細胞(敗者)を積極的に排除するシステムである。細胞競合のメカニズムの研究は2000年代初頭のショウジョウバエ遺伝的モザイク法の確立以降大きく進展している。しかし、細胞競合の生体内での発生過程や恒常性維持における生理的役割については、まだ研究が緒についたところである。ショウジョウバエにおいては、本領域計画班員の倉永が、ショウジョウバエの変態過程において、幼虫表皮細胞と成虫表皮細胞の境界で細胞競合が起こり、幼虫表皮細胞が細胞死によって組織から除かれ、成虫表皮細胞に置き換わっていくことを明らかにした。哺乳類においては、2013年、マウス発生初期の胚盤葉上層における優良細胞の選別に細胞競合が関与していることが報告された。

腸上皮組織は、数日のうちに細胞が入れ替わる非常にターンオーバーの早い組織の一つであり、優れた恒常性維持機構を持っている。腸上皮組織は、幹細胞からの分化した細胞による細胞の供給と細胞の脱落とのバランスによって維持されており、不必要となった細胞の除去を必要としている組織の一つである。腸上皮組織の幹細胞研究は非常に活発に行われているのに対して、細胞の脱落の研究は遅れており、その分子メカニズムについてはまだまだ多くが明らかになっていない。小腸上皮組織における細胞の脱落は、主に絨毛の先端で起こる。生理的に機能が劣った細胞が腸上皮層から脱落する過程で、周囲の細胞がそれらの適応度の低い細胞の存在を認識し、アクチン・ミオシンリングによって積極的に排除することが明らかになってきた。これは、脱落細胞の決定は周囲の細胞との相互作用によって決定づけられる細胞非自律的なプロセスであることを示唆しており、細胞競合の条件を満たしている。また、腸上皮層内で脱落しつつある細胞の多くで caspase-3 が活性化されていないことや、多くの細胞死関連遺伝子の機能欠損個体で腸管での形成異常が見られないことから、脱落は細胞死非依存性に起こり、脱落した細胞は anoikis によって細胞死に至ることが分かってきた。さらに、腸上皮組織における細胞の脱落は、ショウジョウバエにおいて細胞競合への関与が示されている TNF- $\alpha$  により亢進されることも報告されている。また、腸上皮組織の形態は栄養状態によって劇的に変化することや、老化に伴って恒常性が破綻していくことが知られている。

## 2. 研究の目的

細胞競合の分子機構の解明は多くの研究者によって行われている。しかし、細胞競合の生体内での発生過程や恒常性維持における生理的役割の解明が重要な課題であるにもかかわらず、そのような視点に立った研究は少ない。腸上皮組織において、分化した細胞の中から不要になった細胞が選択され脱落する。このプロセスは、脱落細胞とその周囲の細胞の相互作用によって生じる細胞間の競合と捉えることができ、生体内で生理的に起こる細胞競合現象を解明するのに適したモデルシステムである。しかし、腸上皮組織における細胞競合の分子メカニズム並びに生理的意義については明らかになっていない。そこで本研究では、腸上皮組織における細胞競合の分子機構の解明を目指すものである。2種類の細胞競合を対象とする。一つは、分化細胞における細胞競合、細胞脱落のシステムであり、もう一つは、腸上皮組織幹細胞の維持にかかわる細胞競合である。前者については、腸上皮組織における細胞脱落を有機するシグナル伝達機構と腸上皮層からの脱落メカニズムの二つの分子メカニズムを明らかにすることを目指す。後者については、栄養状態の変化や老化に伴い細胞競合にかかわる候補遺伝子の発現や機能の変容を解析することで、細胞競合の生理的役割の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

我々は、腸上皮組織において簡易に遺伝子を導入、あるいは、遺伝子ノックダウンする手法を独自に開発した。本方法は、複数の遺伝子の導入並びに複数の遺伝子のノックダウンを同時に行うことが可能である。この方法の開発により腸上皮組織での遺伝子操作を生きたままのマウ

スに対して行うことが可能になった。腸管上皮幹細胞培養法および腸上皮組織のモデル培養細胞系 (in vitro) にて腸上皮組織における細胞競合に関与する因子の同定を行う。さらに、それら因子の生体内での生理作用について開発した in vivo における腸上皮組織への遺伝子導入法を用いて行う。腸上皮組織の恒常性維持において、栄養状態や老化による変化が大きな影響を与えることが知られている。そこで、解析した細胞競合の分子機構の知見に基づき、栄養状態や老化(時間の変化)が、腸上皮組織の恒常性維持機構に及ぼす影響を細胞競合の果たす役割に着目し解析する。

#### 4. 研究成果

本研究を施行する基盤技術となるマウス腸上皮組織に簡便に遺伝子を導入する方法を開発した。その方法を用い、まず、哺乳類腸上皮組織の分化過程の解析し、Hippo 経路のエフェクター YAP/TAZ のパートナーとして、幹細胞・前駆細胞では転写因子 TEAD、杯細胞では転写因子 KLF4 が、働くことを発見した。このことにより、Hippo 経路の空間的な機能差異を生み出す新たな仕組みを解明した (Imajo et al., *Nature Cell Biol.* 17, 7-19 (2015).)。この方法は、スイス連邦工科大学ローザンヌ校(Ordóñez-Morán et al., *Cancer cell* 28, 815-829 (2015).)との共同研究に発展した。この in vivo の腸上皮組織への遺伝子導入法の改良と共に、個体から単離した腸上皮を用いたオルガノイドにおいて遺伝子導入する培養条件についても改良を行うことで腸上皮組織における細胞競合の役割解明の技術整備に成功した。そのことで、北海道大学との共同研究に発展した(Kon et al *Nature Cell Biol.* 19, 530-541 (2017).)。

分化細胞における細胞競合、細胞脱落のシステムの解明のために、細胞が腸上皮組織から脱落する過程での関与が推定される細胞骨格系タンパク質や関連タンパク質を、オルガノイドにおいてノックダウン並びにノックアウトの実験を行った。オルガノイドを用いた実験系においてオルガノイドの成長に関与する因子を見出し、その因子と腸上皮層からの細胞の脱落の関係についてマウス上皮組織における in vivo 遺伝子導入法を用いて解析した。

また、腸上皮組織幹細胞の維持にかかわる細胞競合の解明のために、時間の変化(老化)に伴い細胞競合にかかわる候補遺伝子の発現や機能がそのような影響を受けるかについて解析した。腸上皮組織の幹細胞の老化に伴う遺伝子発現プロファイル変化を RNA シークエンシングにより解析した結果、老化により発現が変動する遺伝子群に細胞競合関連因子があることが分かった。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件、全て査読あり)

- 1) Kon S, Ishibashi K, Katoh H, Kitamoto S, Shirai T, Tanaka S, Kajita M, Ishikawa S, Yamauchi H, Yako Y, Kamasaki T, Matsumoto T, Watanabe H, Egami R, Sasaki A, Nishikawa A, Kameda I, Maruyama T, Narumi R, Morita T, Sasaki Y, Enoki R, Honma S, Imamura H, Oshima M, Soga T, Miyazaki JI, Duchon MR, Nam JM, Onodera Y, Yoshioka S, Kikuta J, Ishii M, Imajo M, Nishida E, Fujioka Y, Ohba Y, Sato T, Fujita Y. Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. *Nature Cell Biol.* 19, 5, 530-541 (2017). doi: 10.1038/ncb3509
- 2) Imajo M, Ebisuya M, Nishida E. Dual role of YAP and TAZ in renewal of the intestinal epithelium. *Nature Cell Biol.* 17, 7-19 (2017). doi: 10.1038/ncb3084
- 3) Ordóñez-Morán P, Dafflon C, Imajo M, Nishida E, Huelsken J. HOXA5 counteracts stem cell traits by inhibiting Wnt signaling in colorectal cancer. *Cancer Cell* 28, 815-829 (2015). doi: 10.1016/j.ccell.2015.11.001

[学会発表](計2件)

- 1) 今城正道、西田栄介  
腸上皮の幹細胞依存的な更新における Hippo 経路の役割  
BMB2015  
神戸国際会議場 U

2015年12月3日

- 2) 西田栄介  
寿命と組織恒常性の制御機構  
第29回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会  
京都大学芝蘭会館  
2015年2月13日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等

<https://www.bdr.riken.jp/jp/research/labs/nishida-e/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。