

令和元年5月31日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08586

研究課題名(和文) 腸上皮細胞の寿命を制御する分子基盤の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of intestinal epithelial cellular life-span

研究代表者

小谷 武徳 (Kotani, Taenori)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：40455960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：成熟した腸上皮細胞の寿命は短い(3～4日)ことが知られているが、この細胞の寿命制御が腸上皮の恒常性維持に重要であると考えられている。本研究において研究代表者は、短鎖脂肪酸やリゾホスファチジン酸がマウス小腸上皮細胞の寿命を制御することを見出した。また、細胞内においてはMek-ErkシグナルやTsc2-mTORC1シグナルが腸上皮細胞の寿命を制御する重要なシグナル伝達経路であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、最終分化した細胞の一生を観察する組織として非常に優れている腸管をモデルとして、腸上皮細胞の寿命決定の分子基盤について解明を進めた。本研究の成果は、腸上皮細胞の寿命制御機構の全容解明に寄与出来るだけでなく、腸上皮細胞の寿命制御の破綻に起因する腸炎発症機構の理解についても寄与出来ることが想定され、クローン病や潰瘍性大腸炎を始めとする慢性炎症性腸疾患の治療法や診断法の開発において有力な情報を提供できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The life-span of matured intestinal epithelial cells (IECs) is short (3-4 days), and its regulation is thought to be important for homeostasis of the intestinal epithelium. In this study, we found that short chain fatty acids and lysophosphatidic acids regulated the life-span of IECs in the mouse small intestine. We also found that Mek-Erk signaling and Tsc2-mTORC1 signaling played a key role in regulation of life-span of IECs.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：細胞寿命 腸上皮細胞 腸内容物 リゾホスファチジン酸 常在細菌 短鎖脂肪酸 神経新生

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

個々の組織を形成する細胞は、それぞれ固有の寿命（最終分化を遂げた成熟した細胞が死滅するまでの期間）をもつことが知られているが、細胞ごとに異なる寿命制御の機構について、これまでほとんど明らかにされていない。そこで研究代表者は最終分化後からの増殖、移動、死の過程を容易に観察することの出来る腸上皮細胞をモデルとして、細胞寿命の制御機構について解析を進めてきた。腸上皮細胞は、腸絨毛下端のクリプト（陰窩）に存在する幹細胞より増殖・分化した後、腸絨毛の頭頂部へと移動し、細胞死などにより腸絨毛先端より遊離して死滅することが知られている（図）。この最終分化後から細胞死までの期間はヒトやマウスにおいて約3～4日と言われているが、この極めて短い細胞寿命が、どのようにして制御されているか、その分子機構についてはほとんど何も分かっていない。さらに、腸上皮細胞の寿命が何故このように短くあるべきかの生物学的意義も十分に明らかにされていない。一方で、この細胞寿命の制御が生体にとって重要であることを支持する根拠として、腸上皮細胞の細胞死が抑制されたノックアウトマウスが腸炎を発症することが挙げられる (Gunther et al, Nature, 2011)。そのため腸上皮細胞の寿命制御機構の解明は腸炎発症機構の理解や腸炎の治療法・診断法の確立に寄与することが期待される。

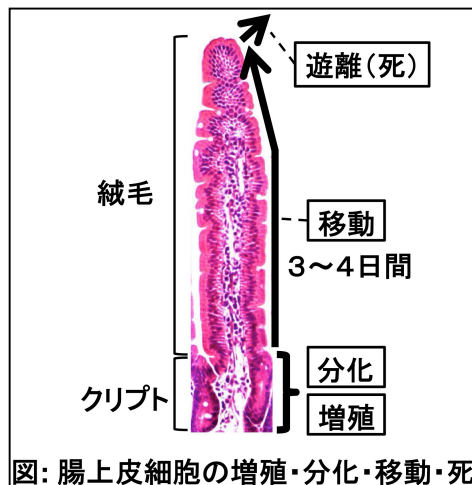


図: 腸上皮細胞の増殖・分化・移動・死

本研究の開始当初までに研究代表者はグラム陽性細菌が腸上皮細胞の入れ替わりを促進し、その結果として腸上皮細胞の寿命を短命化させることを見出してきた。また、腸内細菌は腸上皮細胞内の mTORC1 シグナルの活性化の指標となる S6 タンパク質のリン酸化や、RAS-MAPK シグナルの活性化の指標となる Erk1/2 のリン酸化、さらには STAT3 のリン酸化レベルを亢進させることも見出してきた。一方で、腸内細菌は食物繊維を代謝することにより短鎖脂肪酸 (Acetate, Butyrate, Propionate など) を産出することが知られるが、この短鎖脂肪酸が腸上皮細胞の増殖と移動を促進させることにより新旧細胞の入れ替わりを速める結果、腸上皮細胞の短命化を促進している可能性も見出していた。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果を基盤とした内容についてさらに検討を進めると共に、腸上皮細胞の寿命制御に関する細胞外因子及び細胞内のシグナル分子について同定を進めることで、これまで明らかにされていない腸上皮細胞の寿命制御機構の分子基盤について解明することを研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 腸上皮細胞の寿命制御における短鎖脂肪酸の作用機構

研究代表者はマウスを用いた実験から、腸内細菌が腸上皮細胞の入れ替わりを促進することで腸上皮細胞を短命化することを見出していた。また、腸内細菌は腸上皮細胞内の Erk1/2 のリン酸化を亢進させることも見出してきた。一方で、マウス小腸から単離したクリプトから形成される培養腸オルガノイドの成育促進は *in vivo* での腸上皮細胞の増殖と移動の促進を反映している可能性が考えられているが (Sato et al, Nature, 2009)、腸内細菌の代謝産物である短鎖脂肪酸の培養液中への添加により腸オルガノイドの成育が促進されることを研究代表者は見出していた。そこで、腸オルガノイド培養液中に短鎖脂肪酸を添加すると腸オルガノイドの Erk1/2 のリン酸化を亢進させるか否かについてウエスタンブロット法による評価を行った。また、細胞内シグナル伝達において一般的に Erk1/2 の上流に位置する Mek1/2 の阻害剤 (U0126) を短鎖脂肪酸と共に腸オルガノイド培養液中に添加し、Mek-Erk シグナルが短鎖脂肪酸による腸オルガノイドの成長促進に重要なシグナルであるか否かについて評価した。

#### (2) 腸上皮細胞の寿命制御における mTORC1 シグナルの役割

腸上皮細胞特異的に mTORC1 が過剰に活性化した腸上皮細胞特異的 Tsc2 コンディショナルノックアウト (CKO) マウスの小腸切片について免疫組織化学染色法により、腸上皮細胞の増殖、分化、アポトーシスなどについて評価した。また、Tsc2 CKO マウス小腸から単離培養した腸オルガノイドについて観察を行った。さらに、Tsc2 CKO マウス由来腸オルガノイドの培養液中に mTORC1 活性の阻害剤であるラパマイシンを添加し、腸オルガノイドの成長における mTORC1 の機能について評価を行った。同様の実験を Tsc2 CKO マウス大腸についても開始した。

#### (3) 腸上皮細胞の寿命を制御する腸内細菌に依存しない細胞外因子の同定

無菌環境下で飼育した無菌マウスや抗生剤 (アンピシリン、バンコマイシン、ネオマイシン、メトロニダゾールを混合) を経口投与することによって常在菌を無くしたマウスの腸の内容物

を回収し、処理（熱処理やクロマトグラフィーなど）を行った後に腸オルガノイドの成長に与える影響を調べた。また、腸上皮細胞の成長を強く促進する画分について質量分析を行った。

一方で、腸オルガノイドの培養液中に様々な物質（増殖因子やリゾリン脂質など）を添加し、腸上皮細胞の成長を強く促進する分子の探索を行った。リゾホスファチジン酸（LPA）については腸オルガノイドの成長、腸上皮細胞の分化を有意に促進させたので、腸オルガノイドへのLPAの作用機序について解析を進めた。

#### （4）成体マウス脳の脳室下帯における神経新生の常在細菌による制御

上記3-（3）で用いた無菌マウスや抗生剤投与マウスから脳を回収し、免疫組織化学染色法により脳室下帯における神経新生について解析した。

### 4. 研究成果

#### （1）腸上皮細胞の寿命制御における短鎖脂肪酸の作用機構

マウス小腸から単離培養した腸オルガノイド培養液中に短鎖脂肪酸を添加すると、Erk1/2のリン酸化が腸オルガノイドにおいて亢進することを見出した。そこで、Erk1/2の上流にあたるMek1/2の阻害剤を腸オルガノイド培養液中に添加したところ、短鎖脂肪酸依存的な腸オルガノイドの成長が抑制された。このことから、短鎖脂肪酸刺激によって惹起されるMek-Erkシグナルの活性化が腸オルガノイドの成長を促進させることが明らかとなった。腸オルガノイドの成育促進は*in vivo*での腸上皮細胞の増殖と移動の促進を反映していると考えられていることから、腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸は腸上皮細胞のMek-Erkシグナルを活性化することによって、腸上皮細胞の増殖を促進し、その結果として腸上皮細胞の入れ替わりを促進（短命化）させている可能性が考えられた。

#### （2）腸上皮細胞の寿命制御におけるmTORC1シグナルの役割

腸上皮細胞特異的Tsc2 CKOマウスについて解析を進め、Tsc2 CKOマウスの小腸では腸上皮細胞の増殖とアポトーシスが促進することによって、腸上皮細胞の入れ替わりが促進（短命化）していることが明らかとなった。また腸オルガノイドの成長はEGFを必要とするが、Tsc2 CKOマウス由来の腸オルガノイドはEGFを添加していない培地でも成長し、その成長はmTORC1の阻害剤ラパマイシンによって打ち消されることも見出した。これらのことから、Tsc2によって負に制御されるmTORC1の活性はマウス小腸の腸上皮細胞を短命化させるシグナルであることが明らかとなった。さらに、小腸の各細胞について免疫組織化学染色を行ったところTsc2 CKOマウスでは腸上皮細胞の一つであるPaneth細胞の位置異常が認められたことから、mTORC1シグナルはPaneth細胞の位置の制御にも重要なシグナルであることが示唆された。

一方で、Tsc2 CKOマウスの大腸についても観察を進め、mTORC1シグナルが小腸とは異なるシグナルを介して大腸の腸上皮細胞の寿命を制御している可能性を見出し、現在解析を継続している。

#### （3）腸上皮細胞の寿命を制御する腸内細菌に依存しない細胞外因子の同定

腸上皮細胞の寿命制御を行う腸内細菌に依存しない細胞外因子を同定するために、無菌環境下で飼育した無菌マウスや抗生剤を経口投与することによって常在菌を無くしたマウスの腸の内容物を回収した。プロテアーゼ活性を低下させる目的で熱処理した腸内容物を、各種クロマトグラフィーの組み合わせによって分画し、腸オルガノイドの成長を強く促進させる画分を得た。この腸オルガノイドの成長を強く促進させる画分には*in vivo*において腸上皮細胞の寿命を短命化させる因子が濃縮されている可能性が高いため、この画分について質量分析を行った。しかし、現段階においてはこの画分中に多種類の物質が含まれており、腸上皮細胞の寿命を短命化させる因子の同定までには至っていない。今後はさらに分画の過程を増やし、腸上皮細胞の寿命を短命化させる因子の精製を進めて行く必要がある。

一方で腸オルガノイドの培養液中に様々な物質（増殖因子やリゾリン脂質など）を添加したところ、LPAが腸オルガノイドの成長、腸上皮細胞の分化を有意に促進させることが明らかになった。また、LPAは短鎖脂肪酸と同様にMek-Erkシグナルの活性化を介して腸オルガノイドの成長を促進させることを明らかにした。

#### （4）成体マウス脳の脳室下帯における神経新生の常在細菌による制御

本研究の開始当初は予想をしていなかったが、上記4-（3）の研究を進める過程においてマウス脳についても観察を行ったところ、常在細菌が成体マウス脳の脳室下帯における神経新生を促進させていることを明らかにした。具体的には、無菌マウスや抗生剤を経口投与したマウスの脳室下帯において神経前駆細胞の増殖が抑制されていることを明らかにした。また、脳室下帯で新生する神経細胞は嗅球に供給されることが知られているが、新しく生まれた神経細胞の嗅球への供給が抗生剤の投与により減少することも明らかにした。さらに、抗生剤の中でもアンピシリンに感受性のある常在細菌がマウス脳室下帯における神経前駆細胞の増殖を促進させていることも示した。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文] (計 5 件)

- ① Konno T, Kotani T, Setiawan J, Nishigaito Y, Sawada N, Imada S, Saito Y, Murata Y, Matozaki T  
Role of lysophosphatidic acid in proliferation and differentiation of intestinal epithelial cells.  
Plos One、査読有、14 巻、2019、e0215255 DOI: 10.1371/journal.pone.0215255
- ② Sun C, Murata Y, Imada S, Konno T, Kotani T, Saito Y, Yamada H, Matozaki T  
Role of Csk in intestinal epithelial barrier function and protection against colitis Biochem.  
Biophys. Res. Commun.、査読有、504 巻、2018、109-114  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.03.064
- ③ Setiawan J, Kotani T, Konno T, Saito Y, Murata Y, Noda T, Matozaki T  
Regulation of Small Intestinal Epithelial Homeostasis by Tsc2-mTORC1 Signaling.  
Kobe J. Med. Sci.、査読有、64 巻、2018、E200-E209  
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/journal/contents/64/E200.pdf>
- ④ Sawada N, Kotani T, Konno T, Setiawan J, Nishigaito Y, Saito Y, Murata Y, Nibu K, Matozaki T  
Regulation by commensal bacteria of neurogenesis in the subventricular zone of adult mouse brain.  
Biochem. Biophys. Res. Commun.、査読有、498 巻、2018、824-829  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.03.064
- ⑤ Park JH, Kotani T, Konno T, Setiawan J, Kitamura Y, Imada S, Usui Y, Hatano N, Shinohara M, Saito Y, Murata Y, Matozaki T  
Promotion of intestinal epithelial cell turnover by commensal bacteria: role of short-chain fatty acids.  
Plos One、査読有、11 巻、2016、e0156334  
DOI: 10.1371/journal.pone.0156334

### [学会発表] (計 8 件)

- ① Takenori Kotani  
Role of Tsc2-mTORC1 signaling in homeostasis of intestinal epithelium and its relation to inflammation and cancer  
American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2019、2019 年
- ② Takashi Matozaki  
Role of the tyrosine phosphorylation signal in homeostasis of intestinal epithelium and its relation to inflammation and cancer  
ICPP13(プロテインホスファターゼ)、2018 年
- ③ Takenori Kotani  
Regulation of intestinal immunity by the microvillus-specific protein tyrosine phosphatase SAP-1 and its substrate CEACAM20  
Europhosphatase 2017: Phosphatases in cell fates and decisions、2017 年
- ④ 小谷 武徳  
腸上皮の恒常性における Tsc2-mTORC1 シグナルの役割  
第 77 回日本癌学会学術総会、2017 年
- ⑤ 小谷 武徳  
Role of mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) in regulation of intestinal epithelial homeostasis  
第 8 回日本プロテインホスファターゼ研究会 学術集会、2017 年
- ⑥ Jajar Setiawan  
Role of Tsc2-mTORC1 signaling in regulation of intestinal epithelial homeostasis  
2017 年度生命科学系学会合同年次大会(第 40 回日本分子生物学会・第 90 回日本生化学会)、2017 年
- ⑦ 金野 祐  
腸内容物による腸上皮細胞のターンオーバー制御  
第 16 回生体機能研究会、2017 年
- ⑧ Tasuku Konno  
Short chain fatty acids regulate the turnover of intestinal epithelial cells  
第 89 回日本生化学会大会、2017 年

〔その他〕

ホームページ等

神戸大学大学院医学研究科 生化学・分子生物学講座 シグナル統合学分野

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/tougou/signal/Home.html>

※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。