

令和 3 年 4 月 15 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07475

研究課題名(和文)トランスジェニックカエルを用いた消化管上皮幹細胞特異的遺伝子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification of genes specific to the intestinal epithelial stem cells and their functional analysis by making use of transgenic frogs

研究代表者

長谷部 孝 (Hasebe, Takashi)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70329027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ツメガエルの消化管上皮では、変態期に甲状腺ホルモン(TH)の作用により、幼生型細胞の一部が成体型幹細胞へと脱分化し、増殖・分化を経て成体型上皮を形成する。本研究では、幹細胞特異的な遺伝子の同定やその機能解析により、幹細胞制御機構の解明を目的とした。幹細胞特異的にGFPを発現するトランスジェニックカエルにより、TH受容体(TR) αサブタイプが同細胞で発現することを見出した。また、幹細胞制御にはヒアルロン酸/CD44シグナルが重要な役割を担っていることもわかった。さらに、幹細胞直下の間葉系細胞で転写因子Foxl1が発現することを突き止め、同細胞の幹細胞ニッチ形成への関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カエルの消化管をモデルとした本研究の成果により、組織幹細胞の制御機構(幹細胞がどのようにできるか、幹細胞がどのような仕組みで分化するかなど)の一端を明らかにすることができた。両生類独自の機構と脊椎動物共通の機構が存在すると考えられるが、いずれも幹細胞研究の発展には大きく貢献すると考えられる。また、哺乳類消化管の幹細胞制御機構と類似する点も多いことから、カエルを用いて得られた結果を再生医療などへ応用することも、将来的には可能になると考えている。

研究成果の概要(英文)：In the small intestine of *Xenopus laevis* during metamorphosis, which is caused by thyroid hormone (TH), most of the larval epithelial cells are removed by apoptosis whereas some of them dedifferentiate into the adult epithelial stem cells (SC), which actively proliferate and differentiate into the adult epithelial cells. To clarify the mechanisms of the stem cell regulation, identification and functional analysis of SC-specific genes were conducted. We found by using the transgenic tadpoles expressing GFP specifically in the SCs that TH receptor (TR) alpha subtype is expressed in the SCs. In addition, we demonstrated that hyaluronan/CD44 signaling plays an important role for the stem cell regulation. Furthermore, we identified that winged-helix transcription factor Foxl1 is expressed in the connective tissue cells just beneath the SCs, suggesting the involvement of these cells in the stem cell niche formation.

研究分野：比較内分泌学、発生生物学

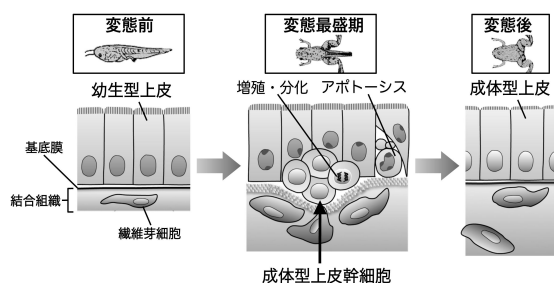
キーワード：消化管 組織幹細胞 両生類 甲状腺ホルモン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

消化管は動物の生涯にわたり、食物の消化及び栄養素の吸収を担う重要な器官であり、その恒常性は厳密な制御機構によって維持されていると考えられている。特に上皮細胞は、摂取した飲食物や消化液などの刺激に曝されるため、ダメージを受けやすい。そのため哺乳類成体の小腸では、上皮細胞は 5-7 日毎に新しい細胞に入れ替わる。この細胞再生系の要となる上皮幹細胞が同定されて以来、幹細胞制御に関与する因子やその役割が明らかになりつつある。しかし、上皮幹細胞の起源となる細胞(予定幹細胞)や幹細胞発生の分子機構に関しては、明らかにされていないことが多かった。

無尾両生類は個体発生の過程で、甲状腺ホルモンの作用により草食の幼生から肉食の成体へと変態する。この食性の変化に備えて、消化管は劇的に再構築される。小腸上皮では幼生型細胞がアポトーシスにより除去され、新たに出現する幹細胞の増殖と分化によって成体型上皮が形成される(図 1)。そして、この時期に哺乳類の小腸上皮に類似の細胞再生系を獲得する。これまでに我々は、成体型幹細胞は幼生型上皮の脱分化により生じ、この幹細胞の発生過程では上皮と結合組織の組織間相互作用が不可欠であること示す知見を得た。また、成体型上皮幹細胞で特異的に発現する遺伝子の同定と発現解析を進めてきた。これらの遺伝子の多くは哺乳類の幹細胞でも発現することが知られており、脊椎動物共通の幹細胞制御機構の存在が予想された。しかし、哺乳類も含め脊椎動物小腸の上皮幹細胞のみを用いた網羅的解析は行われておらず、未同定の幹細胞特異的遺伝子が多数存在することが考えられた。



(図 1) アフリカツメガエル変態期の消化管再構築

2. 研究の目的

本研究では、無尾両生類アフリカツメガエルの変態をモデルとして、(1)消化管の成体型上皮幹細胞に特異的に発現する遺伝子の同定および(2)それらの機能解析を行うことで、幹細胞制御の分子機構を解明することを目的とした。(1)では、出発材料として純化した成体型幹細胞を用い、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行うことを、(2)では、トランスジェネシスによる機能解析をそれぞれ計画した。

3. 研究の方法

以下の項目番号は「2. 研究の目的」のものと対応する。

(1)消化管上皮幹細胞特異的遺伝子の同定

(1)- 消化管上皮幹細胞の純化

変態最盛期に出現する上皮幹細胞で特異的に発現することが知られる Ror2 (膜タンパク質) に対する抗体を結合させた磁気ビーズによる幹細胞の純化、あるいは、Ror2 発現細胞で GFP を発現する Tg を用い、フローサイトメトリーによる純化を試みる。

(1)- トランスクリプトーム解析と発現変動・発現分布の解析

純化した幹細胞を解析する前に、基礎的な情報を得るために変態各期(変態前、変態最盛期、変態後)の小腸全体から抽出した RNA を用いてトランスクリプトーム解析を行うことで、変態期に発現変動する遺伝子群の全体像を把握する。続いて、純化した幹細胞を用いて同様に解析することで、幹細胞特異的な遺伝子を同定する。同定した遺伝子について、発現変動を定量的 PCR により、発現分布を in situ hybridization によりそれぞれ解析する。

(2) 幹細胞特異的な遺伝子の機能解析

(2)- Tg カエルの作製

(1)で同定した遺伝子を過剰に発現する Tg カエルを作製する。TetON と Cre/lox システムによる発現誘導系を利用し、目的遺伝子を発現させることができるコンストラクトを作製し、受精卵に

導入する。

(2)- 目的遺伝子の機能解析

成体型幹細胞が出現する前の前変態期の幼生に目的遺伝子を発現させ、幹細胞マーカー遺伝子の発現解析や、形態学的/免疫組織化学的な解析を行い、幹細胞発生における同遺伝子の役割を明らかにする。

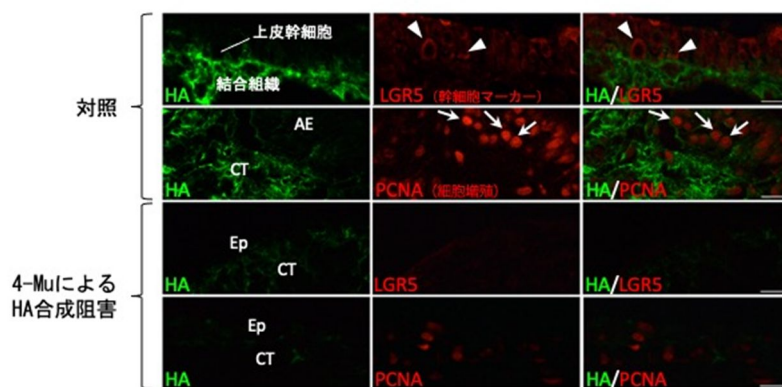
4. 研究成果

以下の項目番号は「2. 研究の目的」のものと対応する。

(1)では、消化管全体から抽出した RNA を用いてトランスクリプトーム解析を行い、変態期に発現が変動する遺伝子の全体像を解析した（未発表）。幹細胞の純化については、はじめに磁気ビーズを試みたが純度を上げることが困難であったため、トランスクリプトーム解析には至っていない。現在はフローサイトメトリによる純化を試みている。Ror2 発現細胞で GFP を発現する Tg は F1 を得ることができなかったが、F0 を解析したところ、GFP 陽性細胞で TH 受容体 (TR) のサブタイプが特異的に発現していることがわかった。

(2)では、TetON により Cre の発現を誘導する Cre ドライバーの DNA コンストラクト、Cre が作用することで目的遺伝子を発現するようになる Cre レスポンダーの DNA コンストラクトをそれぞれ作製したが、幹細胞特異的な遺伝子の同定に至っておらず、Cre レスポンダー-Tg は作製していない。Cre ドライバー-Tg は F0 を得たが、F1 を得ることができなかったため、Tg ラインの確立には至っていない。現在は、再度 F0 の作製に専心しており、F1 Tg を得られる確率を上げるため、トランスジェネシスの方法を改良したり、維持する F0 の個体数を増やす、などの対策を試みている。

その他、幹細胞制御機構の解明に向けて、変態最盛期に消化管で発現が高まる CD44 に着目し、機能解析を行なった。まず、CD44 が成体型幹細胞および周辺の結合組織で発現していることを明らかにした。CD44 は結合組織に含まれるヒアルロン酸 (HA) を主なりガンドとするため、HA の組織分布を解析したところ、変態最盛期に幹細胞直下で HA が急増することを見出した。そこで、4-Mu 投与による HA 合成阻害実験を行い、TH により活性化する HA/CD44 経路が、幹細胞の出現や増殖に必須であることを培養下で明らかにした (図 2)。



(図 2) HA 合成阻害により、幹細胞マーカーの発現及び細胞増殖が低下する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hasebe T, Fujimoto K, Ishizuya-Oka A	4. 巻 10
2. 論文標題 Thyroid hormone-induced expression of Foxl1 in subepithelial fibroblasts correlates with adult stem cell development during <i>Xenopus</i> intestinal remodeling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20715
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-77817-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hasebe Takashi, Fujimoto Kenta, Buchholz Daniel R., Ishizuya-Oka Atsuko	4. 巻 292
2. 論文標題 Stem cell development involves divergent thyroid hormone receptor subtype expression and epigenetic modifications in the <i>Xenopus</i> metamorphosing intestine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 113441 ~ 113441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygcen.2020.113441	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Fujimoto Kenta, Hasebe Takashi, Kajita Mitsuko, Ishizuya-Oka Atsuko	4. 巻 228
2. 論文標題 Expression of hyaluronan synthases upregulated by thyroid hormone is involved in intestinal stem cell development during <i>Xenopus laevis</i> metamorphosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development Genes and Evolution	6. 最初と最後の頁 267 ~ 273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00427-018-0623-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hasebe T, Fujimoto K, Kajita M, Ishizuya-Oka A	4. 巻 35
2. 論文標題 Essential roles of thyroid hormone-regulated hyaluronan/CD44 signaling in adult stem cell development during <i>Xenopus laevis</i> intestinal remodeling	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 2175-2183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.2671	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷部孝、藤本健太、岡敦子
2. 発表標題 アフリカツメガエルの消化管再構築におけるHippo経路の役割
3. 学会等名 第91回 日本動物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷部孝、藤本健太、岡敦子
2. 発表標題 アフリカツメガエルの消化管再構築におけるHippo関連遺伝子のホメオログ特異的な発現変動
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷部孝、藤本健太、Daniel R. Buchholz、岡敦子
2. 発表標題 アフリカツメガエル変態期の消化管再構築における甲状腺ホルモン受容体サブタイプの発現とエピジェネティックな変化
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷部孝、藤本健太、岡敦子
2. 発表標題 アフリカツメガエル変態期の消化管再構築におけるHippo関連遺伝子の発現解析
3. 学会等名 第89回日本動物学会札幌大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷部孝、藤本健太、梶田満子、岡敦子
2. 発表標題 アフリカツメガエル小腸上皮の幹細胞制御におけるヒアルロン酸/CD44シグナルの役割
3. 学会等名 日本動物学会第88回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fujimoto K, Hasebe T, Kajita M, Ishizuya-Oka A
2. 発表標題 Implicated role of hyaluronan signaling in adult epithelial development during intestinal remodeling in <i>Xenopus leavis</i>
3. 学会等名 Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (50th)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤本健太、長谷部孝、梶田満子、岡敦子
2. 発表標題 アフリカツメガエル小腸におけるヒアルロン酸シグナルの幹細胞ニッチ形成に果たす役割
3. 学会等名 日本解剖学会総会・全国学術集会（第123回）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Takashi HASEBE https://hasebet.wixsite.com/takashihasebe</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	ブホルツ ダニエル (Buchholz Daniel)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国		University of Cincinnati	