

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07495

研究課題名(和文)非神経性アセチルコリンによる腸幹細胞の分化・増殖、維持機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of regulatory mechanism of non-neuronal acetylcholine as an endogenous regulator of proliferation, differentiation, and maintenance of intestinal stem cells

研究代表者

高橋 俊雄 (Takahashi, Toshio)

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・統合生体分子機能研究部・主席研究員

研究者番号：20390792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、5種類の代謝型ムスカリン性ACh受容体(M1-M5)のノックアウトマウス解析を行った結果、代謝型M3の下流域に、クリプト領域の細胞増殖及び組織形成と領域化に関する Ephrin-b/EphBシグナル伝達経路が関与していることを突き止めた。次に、腸幹細胞制御に対するチャンネル型ニコチン性ACh受容体(nAChRs)の役割を調べた結果、チャンネル型nAChRsのサブタイプ(2-4)を介して腸幹細胞の分化・増殖を促進していることを見出した。本研究により、ACh受容体を介した腸幹細胞の制御の一端が見えてきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経伝達物質としてのAChが“非神経系では正常な腸幹細胞の分化・増殖、維持に関与する新規シグナル分子である”という新たなパラダイムの提唱に繋がる。そして、AChは生物進化の初期段階から存在し、細胞間の情報伝達は低分子の化合物によって行われていたと考えられる。翻って、AChによる細胞の基本的性質(分化・増殖、維持)の制御メカニズムは、今でも様々な生物種に保存されている可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Non-neuronal ACh is predicted to function as a local cell signaling molecule. However, the physiological significance of non-neuronal ACh in the intestine remains unclear. Here, experiments using cultured crypt-villus organoids that lack nerve cell led us to suggest that endogenous ACh is synthesized in the intestinal epithelium to evoke growth and differentiation of the organoids through activation of muscarinic and nicotinic ACh receptors. Genetic ablation of M3 muscarinic receptors (M3R) showed enhanced proliferation and differentiation of Lgr5-positive stem cells (ISCs) through activation of Ephrin-b/EphB signaling pathway. Furthermore, we found that endogenous ACh binds to the 2-4 nicotinic ACh receptor subtype, and induces Wnt signaling, and eventually proliferation and differentiation of Lgr5-positive ISCs are enhanced. The characterization of these pathways may clarify the mechanisms underlying developmental processes in the crypt-villus unit.

研究分野：動物生理学

キーワード：細胞・組織 シグナル伝達 生理学 発生・分化 非神経性アセチルコリン オルガノイド 腸幹細胞

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。

1. 研究開始当初の背景

(1) 腸上皮細胞は腸管を内側を覆っている細胞で、摂取した食物の消化・吸収や、細菌に対するバリア機能などを担っている。これらの機能維持のために、腸上皮細胞は、常に陰窩（クリプト）に存在する腸幹細胞から新たに分化した細胞（吸収上皮細胞、腸内分泌細胞、杯細胞、パネート細胞）へと置き換わっている。従って、腸幹細胞の分化・増殖、維持が正常に行われることにより、小腸上皮の恒常性が維持されていると考えられる。

(2) 一方で、アセチルコリン（ACh）は、神経化学伝達のメカニズムの発見につながった物質であることから、哺乳類における神経伝達物質として広く認識されている。しかしながら、ACh は細菌類、菌類、植物を含むほぼすべての生物種に（¹Horiuchi et al. (2003) *Life Sci.* **72**, 1745-1756; ²Murata et al. (2015) *Plant Signal. Behav.* **10**, e1074367）、また哺乳類の様々な非神経性細胞及び組織にも存在し（³Kawashima and Fujii (2003) *Life Sci.* **74**, 675-696）、局所的な細胞間の情報伝達に関与するなど（⁴Kakinuma et al. (2009) *FEBS J.* **276**, 5111-5125）、様々な生理的役割を果たしていることが明らかになりつつある。すなわち、神経伝達物質としての ACh は、多様な役割のうちの一側面に過ぎない。腸においては、腸上皮組織に ACh が存在することが示唆されていたが（⁵Wessler and Kirkpatrick (2012) *Handb. Exp. Pharmacol.* **208**, 469-491）、非神経性コリン作動系の存在とその生理学的役割は明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

(1) 研究代表者は、神経伝達物質として知られるアセチルコリン（ACh）を腸上皮組織に見出し、これが腸幹細胞の分化・増殖、維持機構に重要な生理的役割を果たすことを、純化したクリプトを無血清で三次元培養する技術（腸オルガノイド技術）により見出している。本基盤研究では、ACh 受容体欠損マウスを用いた解析、及びマイクロダイアリシスと質量分析法を組み合わせた新技術による管腔内 ACh 量の変動測定等により、*in vivo* における腸幹細胞の分化・増殖、維持機構における非神経性 ACh の新規生理的役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 小腸からクリプトを単離し、単離したクリプトを腸オルガノイドまで成長させる。腸オルガノイドは、腸幹細胞から絶えず腸上皮細胞を生産し、三次元の組織構造体を形成し、維持している（図1）。しかしながら、腸幹細胞からは、神経細胞や免疫細胞は分化しない。10日間培養した腸オルガノイドは、クリプトレベルまで機械的に砕き、再培養が可能である。また、通常の培養細胞と同じく凍結保存も可能である。

(2) 代謝型 mAChRs を介した腸幹細胞制御については、ノックアウトマウス（M1-M5-KO マウス）を用いた解析を行う。各 mAChRs-KO マウスの腸における形態・組織学的研究、機能学的研究、生化学・薬理学的研究を行い、野生型の場合と比較検討する。RNA-Seq 法によるトランスクリプトーム比較解析を行い、その発現変動遺伝子が、代謝経路や制御系

などにどのような影響を与えているか解析する。得られた解析結果は定量 PCR 法を用いて再検証し、発現変動する遺伝子群を決定する。機能学的研究では、各 mAChRs-KO マウスから腸オルガノイドを作製し、腸オルガノイドの成長及び各々の細胞（腸幹細胞と4種類の腸上皮細胞）のマーカー遺伝子の発現変動を評価系として解析を行う。

(3) チャネル型 nAChRs を介した腸幹細胞制御については、選択的アゴニストであるニコチン、及び選択的アンタゴニストのメカミールアミンの薬理実験を行う。遺伝子発現変動については、ニコチン及びメカミールアミン投与後の nAChRs 下流域に働く遺伝子群を、RNA-Seq 法によるトランスクリプトーム比較解析を行う。得られた解析結果は定量 PCR 法を用いて再検証し、発現変動する遺伝子群を決定する。

(4) 細胞レベルの解析には、抗体染色及びフローサイトメトリー (FACS) を用いて、どの細胞がどのチャネル型 nAChRs サブタイプを介してシグナルを伝達し、腸幹細胞の分化・増殖に関わっているかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 研究代表者は、これまでに腸オルガノイド技術を用いて、腸上皮細胞内に ACh 産生系が存在すること、及び腸上皮細胞から放出される内因性 ACh が代謝型 mAChRs (M1, M2, M3) を介して腸幹細胞の幹細胞性の維持と分化抑制に関与することを明らかにしている⁶(Takahashi et al. *FEBS J.*

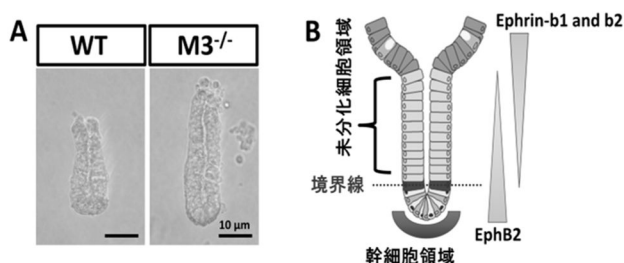


図 1 M3-KOマウスのクリプトサイズ。(A) WTマウスとの比較。(B) EphB2及びEphrin-b1,b2の濃度勾配変動の模式図。

(2014) **281**:4672-4690; ⁷Takahashi *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (2019) **59**:447-462; ⁸Takahashi *Methods Mol. Biol.* (2019) **1576**:145-155)。さらに、5種類の代謝型 mAChR サブタイプ (M1-M5) のノックアウトマウス (KO マウス) の解析過程で、(1) M3-KO マウスのクリプトサイズが野生型マウス (WT マウス) に比べて増大していること (図 1A)、(2) クリプト領域の細胞増殖及び組織形成と領域化に関与する EphB2 受容体とそのリガンドである Ephrin-b1,b2 の遺伝子発現が上昇していること、(3) Ephrin-b1,b2/EphB2 シグナリングの下流域で働く MAPK/ERK シグナル伝達経路が活性化されていることを見出した。このことは、M3-KO マウスのクリプトサイズの増大は、幹細胞と未分化細胞の増殖が促進されているとともに、

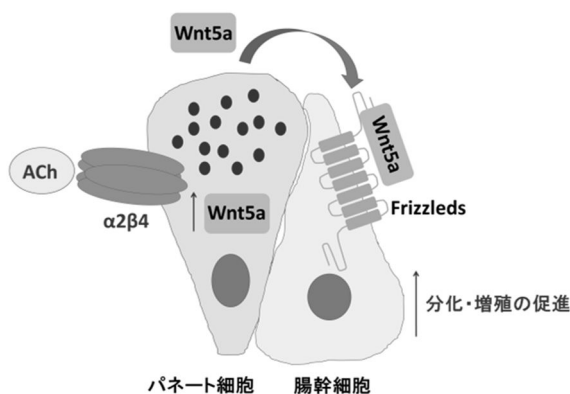


図 2 チャネル型 nAChR (α2/β4 サブタイプ) を介した内因性 ACh の腸幹細胞制御。

Ephrin-b/EphB ファミリー分子の濃度勾配が変動しているためであると考えられる (図 1 B) (投稿準備中)。すなわち、WT マウスでは M3→Ephrin-b/EphB→MAPK/ERK シグナルの協働によりクリプトの恒常性が維持されていると考えられる。

(2)次に、腸幹細胞制御に対するチャンネル型 nAChRs の役割を調べた結果、選択的アゴニストであるニコチンを作用させると、腸オルガノイドの成長及びマーカー遺伝子の発現に対して促進効果を示し、一方、選択的アンタゴニストのメカミールアミンを作用させると、逆に抑制効果を示すことを見出した。次に、ニコチン及びメカミールアミン投与後のチャンネル型 nAChRs シグナルの下流域に働く遺伝子群を、RNA-Seq 法によるトランスクリプトーム比較解析を行った結果、Wnt シグナルの 1 つである Wnt5a の発現が顕著に上昇することを突き止めた。薬理実験の結果から、Wnt5a はニコチンと同様、腸オルガノイドの成長及びマーカー遺伝子の発現を促進し、一方 Wnt の分泌阻害剤である IWP-2 で処理することにより、抑制効果を示すことを見出した。さらに、メカミールアミンの抑制効果は、Wnt5a によりレスキューされることを確認した。まとめると、両者のシグナル経路が互いに作用し合って、腸幹細胞の分化・増殖を促進していることが明らかとなった (⁹Takahashi et al. *Int. J. Mol. Sci.* (2018) **19**:E738)。また、抗体染色及びフローサイトメトリー (FACS) 解析の結果から、(1)チャンネル型 nAChRs サブタイプが $\alpha 2/\beta 4$ であること、(2) $\alpha 2/\beta 4$ サブタイプが腸幹細胞に隣接し、ニッチ細胞の役割を果たしているパネート細胞に局在していることを明らかにした。以上の結果から、パネート細胞に局在するチャンネル型 nAChR ($\alpha 2/\beta 4$ サブタイプ) に非神経性 ACh が結合すると、Wnt5a が放出され、傍分泌により腸幹細胞の分化・増殖が促進されているという結論に達した (図 2)。上記の成果により、ACh 受容体 (代謝型とチャンネル型 ACh 受容体) を介した腸幹細胞の制御の一端が見えてきた (図 3)。

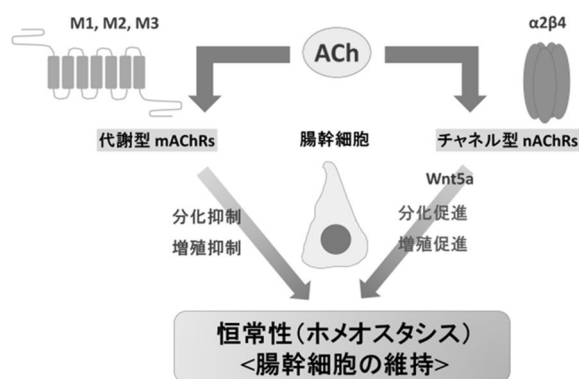


図 3 代謝型mAChRsとチャンネル型nAChRsによる腸幹細胞制御の拮抗的二重支配の想定図。

<引用文献>

1. Horiuchi Y, Kimura R, Kato N, Fujii T, Seki M, Endo T, Kato T and Kawashima K. Evolutional study on acetylcholine expression. *Life Sci.* **72**, 2003, 1745-1756.
2. Murata J, Watanabe T, Sugahara K, Yamagaki T and Takahashi T. High-resolution mass spectrometry for detecting acetylcholine in *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.* **10**, 2015, e1074367.
3. Kawashima K and Fujii T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci.* **74**, 2003, 675-696.
4. Kakinuma Y, Akiyama T and Sato T. Cholinoceptive and Cholinergic Properties of

Cardiomyocytes Involving an Amplification Mechanism for Vagal Efferent Effects in Sparsely Innervated Ventricular Myocardium. *FEBS J.* **276**, 2009, 5111-5125.

5. Wessler IK and Kirkpatrick CJ. Activation of Muscarinic Receptors by Non-Neuronal Acetylcholine. *Handb. Exp. Pharmacol.* **208**, 2012, 469-491.

6. Takahashi T, Ohnishi H, Sugiura Y, Honda K, Suematsu M, Kawasaki T, Deguchi T, Orihashi K, Hippo Y, Watanabe T, Yamagaki T and Yuba S. Non-neuronal acetylcholine as an endogenous regulator of proliferation and differentiation of Lgr5-positive stem cells in mice. *FEBS J.* **281**, 2014, 4672-4690.

7. Takahashi T. Organoids for Drug Discovery and Personalized Medicine. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **59**, 2019, 447-462.

8. Takahashi T. New trends and perspectives in the function of non-neuronal acetylcholine in crypt-villus organoids in mice. *Methods Mol. Biol.* **1576**, 2019, 145-155.

9. Takahashi T, Shiraishi A and Murata J. The coordinated activities of nAChR and Wnt signaling regulate intestinal stem cell function in mice. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2018, E738.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 高橋俊雄	4. 巻 43
2. 論文標題 質量分析でアセチルコリンを " 可視化する " 技	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 比較内分泌学	6. 最初と最後の頁 141-142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.5983/nl2008isce.43.144	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 Matsuo R, Kobayashi S, Furuta A, Osugi T, Takahashi T, Satake H and Matsuo Y.	4. 巻 206
2. 論文標題 Distribution and physiological effect of enterin neuropeptides in the olfactory centers of the terrestrial slug <i>Limax</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Comp. Physiol. A	6. 最初と最後の頁 401-418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00359-020-01400-2	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 Mita M, Osugi T, Takahashi T, Watanabe T and Satake H.	4. 巻 290
2. 論文標題 Mechanism of gamete shedding in starfish: Involvement of acetylcholine in extracellular Ca ²⁺ -dependent contraction of gonadal walls	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gen. Comp. Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 113401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2020.113401	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 Toshio Takahashi	4. 巻 81
2. 論文標題 Roles of nAChR and Wnt signaling in intestinal stem cell function and inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. Immunopharmacol.	6. 最初と最後の頁 106260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2020.106260	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 Morishita F, Takahashi T, Watanabe T, Uto T, Ukena K, Furumitsu M and Horiguchi T.	4. 巻 456
2. 論文標題 Identification of neuropeptides in gastropod mollusks. - Classical and brand-new approaches	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IOP Conf. Ser.: Earth and Environ. Sci.	6. 最初と最後の頁 12001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1755-1315/456/1/012001	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 Takahashi T. and Shiraishi A.	4. 巻 21
2. 論文標題 Stem cell signaling pathways in the small intestine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.3390/ijms21062032	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 Takahashi T.	4. 巻 1576
2. 論文標題 New trends and perspectives in the function of non-neuronal acetylcholine in crypt-villus organoids in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 145-155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/7651_2016_1	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 Takahashi T.	4. 巻 59
2. 論文標題 Organoids for Drug Discovery and Personalized Medicine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.	6. 最初と最後の頁 447-462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021108	査読の有無 無
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 Toshio Takahashi, Akira Shiraishi, and Jun Murata	4. 巻 19
2. 論文標題 The coordinated activities of nAChR and Wnt signaling regulate intestinal stem cell function in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 E738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19030738	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 Toshio Takahashi	4. 巻 142
2. 論文標題 Visualization of acetylcholine distribution in intestinal tissue sections by tandem imaging mass spectrometry and its function in mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Neurochem.	6. 最初と最後の頁 203-204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1111/jnc.13925	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14件(うち招待講演 4件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Takahashi T, Shiraishi A, Murata J.
2. 発表標題 The coordinated activities of nAChR and Wnt signaling regulate intestinal stem cell function in mice
3. 学会等名 日本比較生理生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahashi T, Shiraishi A, Murata J.
2. 発表標題 The 2 4 nicotinic acetylcholine receptor controls intestinal stem cell proliferation and differentiation in mice
3. 学会等名 5th International Symposium on Non-neuronal Acetylcholine: from bench to bedside (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahashi T.
2. 発表標題 Structure and function of Hydra neuropeptides
3. 学会等名 The 10th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋俊雄
2. 発表標題 非神経性アセチルコリンが制御する組織幹細胞の分化・増殖、維持機構の解明
3. 学会等名 第3回NAIST-SUNBOR最先端融合セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋俊雄
2. 発表標題 非神経性アセチルコリンが制御する腸幹細胞の分化・増殖、維持機構の解明
3. 学会等名 星薬科大学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋俊雄
2. 発表標題 代謝型ムスカリン性ACh受容体を介した腸上皮幹細胞の恒常性維持機構
3. 学会等名 第4回NAIST-SUNBOR最先端融合セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋俊雄, 白石慧, 村田純
2. 発表標題 チャンネル型nAChRシグナルはWntシグナルを介して腸上皮幹細胞を制御する
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋俊雄, 白石慧, 村田純
2. 発表標題 チャンネル型ニコチン性アセチルコリン受容体を介した腸上皮幹細胞の制御
3. 学会等名 日本比較内分泌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋俊雄
2. 発表標題 Intestinal stem cell homeostasis via muscarinic acetylcholine receptors
3. 学会等名 日本比較生理生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三田, 大杉, 高橋, 宮崎, 佐竹
2. 発表標題 生殖巣に存在する内因性アセチルコリンの排卵誘起作用について
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上, 有藤, 高橋, 浮穴, 古満, 植木, 小原, 森下
2. 発表標題 軟体動物腹足類アメフラシ (Aplysia kurodai) の神経 ペプチド, AkFXXFamide, の発現と生理作用
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井, 松原, 白石, 川田, 高橋, 佐竹
2. 発表標題 カタコウレイボヤ卵胞のカ テブシンHアンチセンス RNA由来ペプチドの同定
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsuo R, Kobayashi S, Furuta A, Osugi T, Takahashi T, Satake H and Matsuo Y.
2. 発表標題 Distribution and physiological effect of enterin neuropeptides in the olfactory centers of the terrestrial slug Limax
3. 学会等名 日本比較生理生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋俊雄
2. 発表標題 Type 3 muscarinic receptors contribute to stem cell proliferation and differentiation in the murine small intestinal crypts by controlling the expression of ephrinB/EphB
3. 学会等名 日本発生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Toshio Takahashi	4. 発行年 2020年
2. 出版社 APPLE ACADEMIC PRESS	5. 総ページ数 24
3. 書名 Advances Invertebrate (Neuro)Endocrinology (Cnidarian peptide signaling molecules)	

1. 著者名 高橋俊雄	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Medical Science Digest	5. 総ページ数 3
3. 書名 ゲノム編集の最近の進歩（非神経性アセチルコリンによる腸幹細胞の分化・増殖、維持機構の解明）	

1. 著者名 高橋俊雄	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Precision Medicine	5. 総ページ数 4
3. 書名 ゲノム編集を用いた遺伝子治療（非神経細胞型アセチルコリン受容体を介した腸幹細胞の分化・増殖制御機構の解明）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>公益財団法人サントリー生命科学財団 http://www.sunbor.or.jp/</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
連携研究者	海野 年弘 (Unno Toshihiro) (90252121)	岐阜大学・応用生物科学部・教授 (13701)	
連携研究者	杉浦 悠毅 (Sugiura Yuki) (30590202)	慶應義塾大学・医学部・講師 (32612)	