

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05553

研究課題名（和文）硫酸化糖鎖を介した細胞外マトリクスによる消化管機能調節機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of intestinal function by extracellular matrix via glycosaminoglycan

研究代表者

矢部 富雄 (Yabe, Tomio)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：70356260

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：消化管を構成する上皮細胞によって生成される細胞外マトリクス（ECM）の機能として、硫酸化糖鎖を介した消化管の機能調節が予想された。そこで、マウス由来腸管オルガノイドを作成し、非吸収性食品成分であるペクチンを指標として、機能調節の分子機構の解明を試みた。その結果、三次元培養した腸管オルガノイドのみならず、ハイスループットを志向した二次元腸管オルガノイドの構築には成功したものの、硫酸化糖鎖の関与する分子機構の解明には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品成分の機能性を評価する際に、今後は動物愛護の観点から動物実験を十分に実施できなくなることが予想されるが、本研究課題において構築した二次元腸管オルガノイドを用いた機能性評価法は、*in vitro*と*in vivo*の要素を合わせ持つことから、将来の食品科学分野における機能性評価法として非常に有用である。

研究成果の概要（英文）：The extracellular matrix (ECM) produced by the intestinal epithelial cells is expected to regulate the function of the gastrointestinal tract through glycosaminoglycans. Therefore, we prepared mouse-derived intestinal organoids and attempted to elucidate the molecular mechanism of functional regulation using pectin, a non-absorbable food component. As a result, we succeeded in constructing not only three-dimensional cultured intestinal organoids but also two-dimensional high-throughput intestinal organoids, but were not able to elucidate the molecular mechanism involving glycosaminoglycans.

研究分野：食品科学

キーワード：細胞外マトリクス 腸管オルガノイド グリコサミノグリカン 食物繊維

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

「細胞外マトリクス (ECM)」は、動物の細胞外空間を充填する物質であると同時に、骨格の役割や細胞接着における足場の役割、細胞増殖因子などを保持・提供する役割などを担うことが知られている。ECM 構成分子には、コラーゲン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニンなどがあり、このうちプロテオグリカンは、硫酸化糖鎖が結合した特殊な糖タンパク質である (図 1)。我々は、発見から約 30 年にわたって不明であった「食物繊維の摂取により誘導される腸管絨毛の形態変化」の分子機構が、ECM 中のヘパラン硫酸 (HS) 糖鎖というプロテオグリカン糖鎖の構造変化を介して起こることを最近報告した (Nishida *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78**, 635-643, 2014; Nishida *et al.*, *Glycoconj. J.*, **32**, 153-159, 2015)。

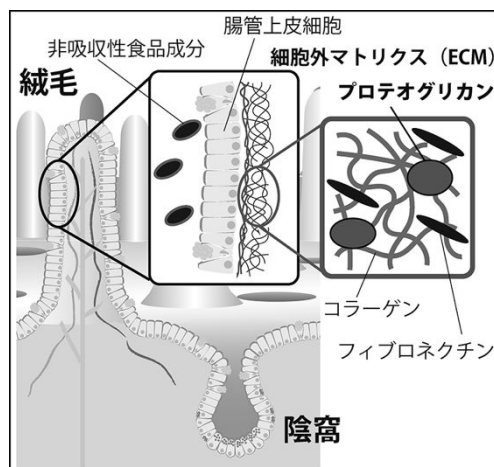


図 1 ECM 中のプロテオグリカン

細胞表面や ECM に存在する HS 糖鎖は、分子内のさまざまな位置に硫酸基が付加された多様なヘテロ構造をもつ糖鎖として、生体内の必要に応じて適宜性合成されている。そして、細胞増殖因子や細胞接着因子などの機能分子の中には、この HS 糖鎖の特定の硫酸化構造に結合し、生物学的活性を示すものがある (Lindahl *et al.*, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **276**, 105-159, 2009)。しかしながら、消化管機能を維持調節するために必要な ECM の機能として、HS 糖鎖がどのように関与しているのは不明である。

HS 糖鎖の生合成に関与する酵素は 30 以上に及び、幾千パターンもの複雑な硫酸化構造の創出によって生物の多様性を支えていると考えられている。ECM を介した消化管調節機構が、HS 糖鎖の硫酸化構造の変化を利用しているのか、またそのしくみは、消化管を構成する細胞間のコミュニケーションにどのようなメリットをもたらす分子機構なのかを明らかにしたい。

### 2. 研究の目的

「消化管」の形成と機能維持において、上皮細胞の基底膜を構成する「細胞外マトリクス (ECM)」の寄与は大きいと考えられるものの、その分子機構はいまだ不明である。我々はこれまでに、食品成分による小腸絨毛形態変化の作用機序を研究する過程で、食物繊維のような非吸収性食品成分によって、ECM に含まれる硫酸化糖鎖の構造が変化することを見出している。この発見は、消化管の機能を調節する分子機構に、ECM 中の硫酸化糖鎖が介在することを意味する。そこで本研究課題では、ECM が硫酸化糖鎖を介して消化管機能を維持するしくみを解明するため、生体モデルとしての擬似腸である「腸管オルガノイド」を作成し、これを用いて機能調節の分子機構を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 単純モデルを用いた細胞外マトリクス (ECM) を介する細胞間コミュニケーションの解明  
腸管上皮モデル細胞の Caco-2 細胞に食物繊維のペクチンが作用すると、細胞表面ヘパラン硫酸 HS 糖鎖構造が変化することにより、基底膜の HS 糖鎖に特異的に結合していた増殖因子 Wnt3a は、HS 糖鎖と結合できなくなり放出される。すなわち、Wnt3a の ECM 外への放出は HS 糖鎖の硫酸化構造によりコントロールされており、HS 糖鎖硫酸化構造の変化が Wnt3a を用いた細胞間コミュニケーションを調節していると推測される。

そこで、ペクチン応答に必須の領域として我々が同定したフィブロネクチン内の RGD 領域と、その部位に結合する  $\alpha_5\beta_1$  インテグリンに着目した。当初は、 $\alpha_5\beta_1$  両サブユニット遺伝子の発現プラスミドを構築し、Caco-2 細胞にトランスフェクションすることで、ペクチン応答性を強化した細胞を作成して人工 ECM (単純モデル) を構築しようとしたものの、技術的に困難を極めたため、計画を変更し、siRNA によるフィブロネクチンのノックダウンによって、ペクチン応答に関与するフィブロネクチンの必要性について検討することとした。

siRNA によるノックダウンは Accell siRNA (ホライゾン・ディスクバリー) を使用した。Accell siRNA はトランスフェクション試薬を使わずに細胞へ導入できる siRNA であり、トランスフェクション試薬を使わないことでトランスフェクション試薬による細胞毒性を回避することが出来る。さらに、特殊な化学修飾が施されたヌクレオチドを Accell siRNA Delivery Media と混ぜて細胞を培養することで、目的の遺伝子の発現をノックダウンすることができる。

(2) 腸再構成モデルを用いた ECM を介する細胞間コミュニケーションの解明

生理的な消化管を再現する腸再構成モデルとしてマウス腸管オルガノイドを構築した (図 2)。

オルガノイドは、パネート細胞、ゴブレット細胞、内分泌細胞、吸収上皮細胞という 4 種類の上皮細胞と幹細胞からなる複雑な構造体を形成するとともに、陰窩と絨毛からなる消化管上皮構造を *in vitro* で再現するものである。これにより、より生体内の状態に近い ECM 環境を再現できると考えられ、生体内における ECM の役割を検証できるようになる。

マウス腸管オルガノイドを作成するためにマウスから腸管幹細胞を摘出する動物実験は、岐阜大学動物実験取扱規定に基づき、動物実験計画書を岐阜大学動物実験委員会に提出し、審査を受けて承認された。マウスは、日本エスエルシー株式会社より購入した C57BL/6 雄マウス (8 週齢) を使用した。腸管オルガノイドの作成は、Sato らの方法に従った (Sato *et al.*, *Nature*, **459**, 262-265, 2009; Sato *et al.*, *Gastroenterology*, **141**, 1762-1772, 2011)。具体的には、十二指腸と空腸を含む近位小腸 15 cm から陰窩を単離し、マトリゲル (コーニング) に包埋して成長因子 (EGF, Noggin, R-spondin-1) を含む培地で 37 日にて培養し、腸管オルガノイドを作成した。なお、1 個のマトリゲル中には 10~20 個のオルガノイドを含むように調製した。

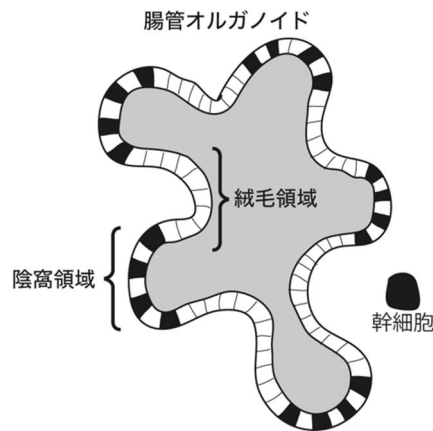


図 2 マウス腸管オルガノイドの構築

食物繊維などの非吸収性食品成分を注入したオルガノイドにおける遺伝子発現の変化を解析した。具体的には、食物繊維のペクチンを腸管内腔に相当する腸管オルガノイドの内腔に注入して培養し、その後オルガノイドから mRNA を抽出した。また、オルガノイド 1 個あたりの出芽数と断面積の測定のため、顕微鏡によって写真撮影を行った後、NIH ImageJ ソフトウェアを用いて分析した。さらに、作成した腸管オルガノイドが正常に分化した状態であるのかを確認するため、オルガノイドをパラホルムアルデヒドで固定した後、4 種類の上皮細胞の分化マーカーをそれぞれ用いて (内分泌細胞: Chromogranin A; 杯細胞: MUC2; パネート細胞: Lysozyme; 栄養吸収上皮細胞: Villin-1, Sucrase-Isomaltase), 免疫細胞染色を行った。

### (3) 二次元腸管オルガノイドの構築

ハイスループット分析を実現可能とする二次元腸管オルガノイドを構築するため、一度構築した三次元モデルを平面に培養することで、小腸を構成する上皮細胞群は維持したまま、同時にタイトジャンクションの正常な形成により小腸機能を有している状態を確認して使用した。具体的には、小腸上皮細胞に構造特異的に作用することが確認されているペクチンを用いて、一定の濃度で培地に溶解して二次元腸管オルガノイドに添加し、各遺伝子発現の変化量を調査した。

## 4. 研究成果

### (1) 単純モデルを用いた細胞外マトリクス (ECM) を介する細胞間コミュニケーションの解明

当初の予定では人工 ECM 系の構築のために腸管上皮モデル細胞の Caco-2 細胞への遺伝子発現プラスミドの導入を予定していたが、試行錯誤の結果、Caco-2 細胞への遺伝子導入効率が非常に低く、この手法による目的達成は技術的に難しいと判断した。そこで、siRNA による主要な ECM タンパク質のフィブロネクチンのノックダウンを試みた。しかしながら、ウェスタンブロットによる確認の結果、フィブロネクチンの発現量の低下は確認されなかった。

### (2) 腸再構成モデルを用いた ECM を介する細胞間コミュニケーションの解明

8 週齢の C57BL/6 雄マウスから作成した腸管オルガノイドにおいて、蛍光染色によって栄養吸収上皮細胞の分化マーカーである Villin-1 を観察したところ、微絨毛が局在するオルガノイド内腔が染色された (図 3A)。また、パネート細胞の分化マーカーである Lysozyme を観察したところ、陰窩に相当する出芽内の複数の細胞が染色された (図 3B)。さらに、他の分化マーカーについても同様に確認され、作成した腸管オルガノイドが 4 種類の上皮細胞を含むことを確認した。そこで、摂取したペクチンが腸管を通過する際に小腸絨毛を構成する上皮細胞に接触する状態を再現するため、マイクロインジェクション法を用いて、各種ペクチンをオルガノイド内腔に注入した。図 3C・D に示す通り、摂取した食物と接触することのない小腸陰窩に相当するオルガノイドの出芽部分は、注入したペクチン・フェノールレッド混合液と接触していないのに対して、小腸絨毛に相当する部分のオルガノイド内腔に面した細胞は、内腔に注入した溶液のフェノールレッドの色調が外液より濃く観察され、注入した溶液と接触している様子を観察することが出来た (図 3D)。

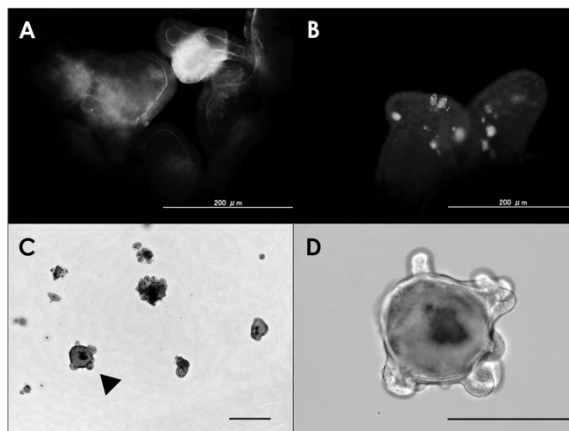


図 3 腸管オルガノイド

そこで、ペクチンを注入してから 24 時間後、48 時間後、72 時間後のオルガノイドの状態を顕微鏡により観察した(図 4)。その結果、ペクチンを注入したオルガノイドが、正常に成長し、腸幹細胞の分裂・増殖に由来するオルガノイドの出芽の経時的な増加が観察された。

マウス腸管オルガノイドでは、成長に伴って、腸幹細胞とそれから生じた一過性の増殖細胞、さらに分化したパネート細胞とで構成される出芽部位が形成される(Sato *et al.*, *Science*, **340**, 1190-1194, 2013)。この部位は、腸管においては小腸陰窩に相当するが、腸管オルガノイドでは表裏が反対になっているために、オルガノイドの表面に出芽した突起として形成される。この出芽部位内の増殖細胞はさらに分化することで様々な上皮細胞が作られ、押し出されて腸管の絨毛に相当するオルガノイドの内腔壁を構成するようになる。腸管絨毛の頂端に達した上皮細胞が剥離してその寿命を終えるのと同様に、腸管オルガノイドにおいても、内腔壁を構成する上皮細胞は一定期間の後に剥離し、寿命を終えた上皮細胞は内腔にどんどんたまっていくことになる(Sato *et al.*, *Science*, **340**, 1190-1194, 2013)。腸管オルガノイドの成長は、幹細胞の分裂速度や増殖細胞から上皮細胞への分化速度に依存することとなるが、内腔に注入した食品成分が上皮細胞へ直接的な影響を及ぼすとすれば、その情報は内腔の上皮細胞を介して幹細胞に伝えられ、腸管オルガノイドの成長に影響を与えられられる。

そこで、腸管オルガノイド内腔へペクチンを注入した後の 24 時間、48 時間、72 時間を経過した時点でのオルガノイドの断面積と出芽数を測定し、それぞれ注入直後と比較してその増加率として数値化した(図 5)。その結果、シトラスペクチンを注入した際のオルガノイド当たりの出芽増加数は、対照として PBS 溶液を注入したものと比較していずれの時間においても有意な差は認められなかった(図 5A)。しかしながら、断面積増加率を比較すると、PBS 溶液を注入したものと比較して、統計的に有意な差は認められなかったものの、ペクチンの内腔への注入から 48 時間以降の断面積増加率が大きくなる傾向が示唆された(図 5B)。これは、小腸上皮細胞様モデルの Caco-2 細胞のアピカルにペクチンを添加した際に、バソラテラルから成長因子が放出され、それにより未分化細胞の細胞増殖が促進するという過去の報告(Nishida *et al.*, *Glycoconj. J.*, **32**, 153-159, 2015)に相当するものと考えられる。

### (3) 二次元腸管オルガノイドの構築

二次元腸管オルガノイドのモノレイヤーの形成状態を経上皮電気抵抗値(TEER)を用いて測定したところ、播種後 45 時間で最高に達し、その後は徐々に抵抗値が減少した。そこで、一度構築した三次元モデルを平面に培養した 45 時間後にペクチンを添加し、1 時間刺激後の遺伝子発現量を測定した。その結果、小腸分化マーカーであるスクラーゼ・イソマルターゼの発現促進が確認されたものの(図 6)、ECM を構成するプロテオグリカンとして重要なヘパラン硫酸の生合成に関与する、ヘパラン硫酸 6 位硫酸基脱硫酸化酵素(Sulf2)、ヘパラン硫酸 6 位硫酸基転移酵素(6-OST-1)、ヘパラン硫酸 3 位硫酸基転移酵素(3-OST-1)の発現上昇は確認されなかった(図 6)。

今後は、ECM の硫酸化糖鎖の構造変化が機能調節に関与しているかについて、直接糖鎖構造を調査することが課題であると考えられる。

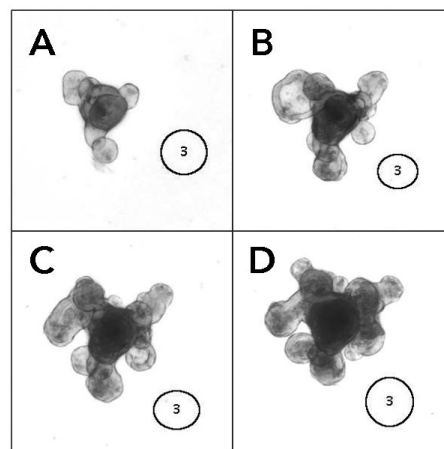


図 4 ペクチン注入後の経時変化

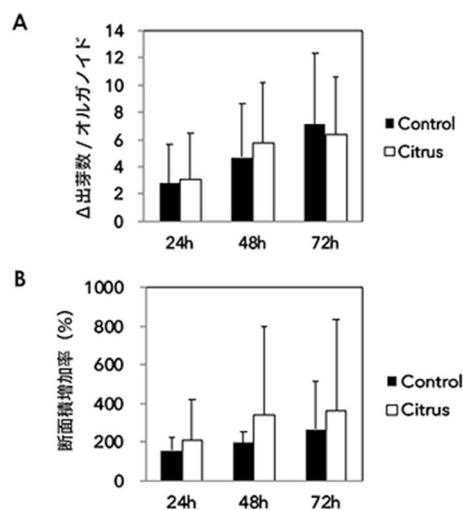


図 5 ペクチン注入後の形態変化

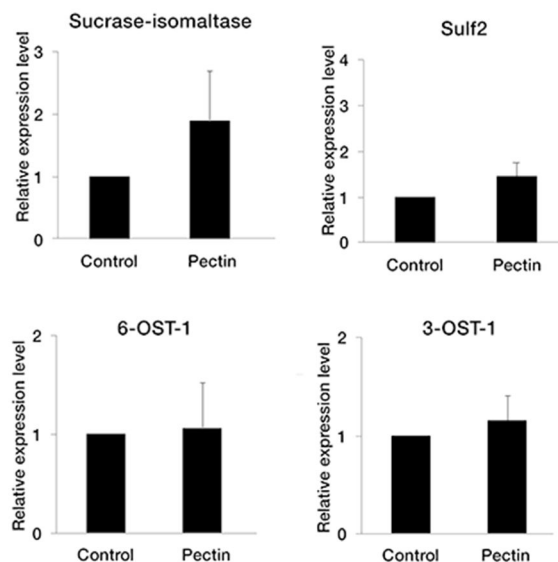


図 6 二次元腸管オルガノイドのペクチン応答

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomio Yabe, Ritsuko Hosoda-Yabe and Kenichi Ito
2. 発表標題 Evaluation of the effect of salmon nasal cartilage-derived proteoglycan on intestinal epithelial cells by mouse enteroid
3. 学会等名 11th International Conference on Proteoglycans (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢部富雄
2. 発表標題 食物繊維から腸管へのメッセージ～多糖類に秘められた化学情報～
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------