

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06929

研究課題名(和文) 腸上皮幹細胞が備える環境応答プログラムとその生理的意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms underlying intestinal stem cell responses to environmental stimuli and their physiological significance

研究代表者

今城 正道 (Imajo, Masamichi)

北海道大学・化学反応創成研究拠点・特任准教授

研究者番号：00633934

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)：腸上皮幹細胞の機能は様々な環境刺激に応じて変化し、それにより腸管恒常性が維持される。本研究で我々は、幹細胞の環境応答においてERK MAPキナーゼの活性動態が重要な意義を持つことを示した。腸上皮にある種の病原体が感染すると分泌系細胞への分化が促進される。その際、Notch活性の低下がERKのパルス状活性の頻度を上昇させ、それによりAtoh1を誘導することで分化を促進することを示した。また、腫瘍形成においてもERKの活性動態が変化し、そのことが腫瘍特異的な性質の一因となっていた。以上の結果は、ERK活性の動態の変化が環境応答や腫瘍形成における幹細胞の機能制御に重要な役割を果たすことを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、腸上皮幹細胞が腸内環境の変化に応じて機能を変化させ、組織恒常性を維持する機構の一端が明らかになった。特に、これまで細胞増殖に中心的な役割を果たすと考えられていたERKが幹細胞の分化方向の制御にも重要な役割を果たすことを示した。また、ERKの活性化状態の変化が腸腫瘍特異的な性質にも関与していることが明らかになった。これらの研究成果の背景には、最新の生体イメージング法によりERKの活性を生きたマウス組織やオルガノイド内で経時的に単一細胞レベルで観察可能になったことがある。この技術は他の組織や分子にも応用可能であり、今後の組織幹細胞研究においてますます重要な手法になると期待される。

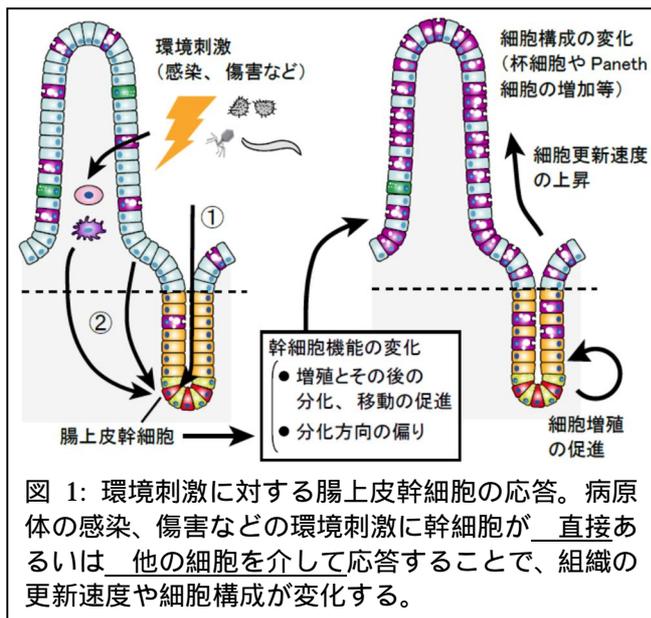
研究成果の概要(英文)：Functions of intestinal stem cells (ISCs) are modulated in response to environmental perturbations to maintain tissue homeostasis. In this study, we showed that changes in ERK MAP kinase activity dynamics regulate ISC responses to environmental stimuli. After infection with certain pathogens, Notch signaling inhibition promotes differentiation of ISCs into secretory lineages. We found that Notch signaling inhibition promotes pulse-like activation of ERK and induces expression of Atoh1, a master regulator of secretory differentiation, thereby promoting the differentiation. In addition, we also showed that ERK activity dynamics are changed during intestinal tumorigenesis, which underlies tumor-specific dependency on EGFR signaling. Our results indicate that ERK activity dynamics are dramatically changed depending on the intrinsic tissue status and the environmental stimuli, which plays a critical role in controlling ISC functions in both normal homeostasis and tumorigenesis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：腸上皮幹細胞 オルガノイド 環境刺激 ERK MAP kinase

1. 研究開始当初の背景

腸上皮は人体で最も細胞の新陳代謝が速い組織であり、幹細胞を起点とする活発な自己更新により、絶えず細胞が置き換えられている。これまでの研究で、正常な腸管における組織更新の機構については多くのことが解明されてきた。一方で、腸上皮は体外環境に接した組織であり、細菌やウイルスの感染、腸管内容物による物理化学的傷害など、環境に起因する刺激が、腸上皮の更新過程に影響を与えることが報告されている。例えば、ある種の病原体（寄生虫や細菌等）が感染すると、幹細胞による腸上皮の更新が加速され (Cliffe et al., *Science* (2005))、また幹/前駆細胞の分化方向も粘液を分泌する杯細胞へと偏ることで、病原体の排除や補足が促進される (Marillier et al, *BMC Immunol.* (2008))。これらの現象は、環境刺激に応じて幹細胞の機能が調節され、それにより腸上皮の恒常性が維持されることを示している (図 1 参照)。従って、腸上皮幹細胞は環境刺激にตอบสนองする仕組みを備えていると考えられるが、この仕組みについては未解明の部分が多く残されている。また、この幹細胞の環境応答機構の異常は様々な腸疾患に関係する可能性があるが、その点もよく分かっていない。そこで本研究では、「腸上皮幹細胞がどのような機構で環境刺激にตอบสนองするのか？また、その異常が炎症性腸疾患や大腸癌などの腸疾患とどのように関係するのか？」という腸生物学における 2 つの重要な課題に取り組んだ。



2. 研究の目的

本研究は、腸内環境に由来する様々な刺激に応じて腸上皮幹細胞の機能がどのように調節され、それがどのように腸上皮の恒常性に寄与するのかを解明することを目的とした。また、この腸上皮幹細胞の環境応答機構と腸疾患との関係についても検討した。これらの解析により、「環境要因の変化が幹細胞機能にどのように影響を及ぼすのか？」という成体幹細胞研究における重要な課題に、多くの知見をもたらすことを目指した。

3. 研究の方法

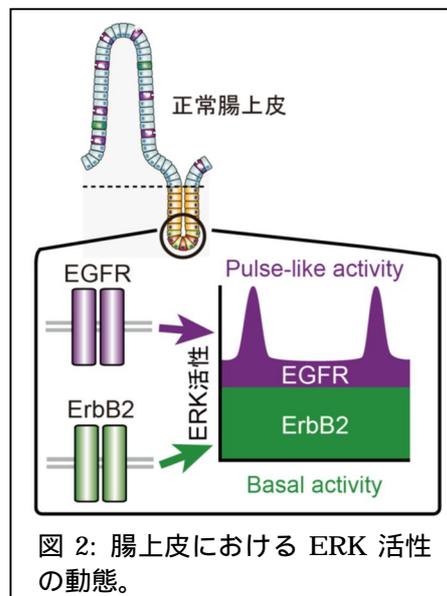
腸上皮幹細胞において GFP を発現するマウス (*Lgr5-eGFP*) およびそのマウスから作製した腸オルガノイドに、細菌毒素や腸管の免疫応答に関わる各種サイトカイン、腸上皮に損傷を与える薬剤等を投与し、幹細胞の増殖や系決定・分化に与える影響を解析した。腸腫瘍の解析には、大腸癌モデルマウス (*Apc* 変異マウス) を用いた。また、環境刺激が幹細胞の遺伝子発現プロファイルに与える影響を解析するために、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。発現が変化した遺伝子群をもとに、*in silico* で活性が変化した転写因子やシグナル伝達経路の予測を行った。特に活性の変化が予測された転写因子である *Atoh1* について、ChIP-sequence 解析によりゲノム上の結合部位の変化を解析した。また、上流のシグナル伝達分子の活性変動を解析するため、FRET バイオセンサーを用いた、生体イメージングにより、ERK などの種々のシグナル伝達分子の活性を生きたマウスおよびオルガノイド内で経時的に測定した。特に重要と考えられたいくつかの分子について、RNAi によるノックダウンや過剰発現、阻害剤の投与などにより、機能を解析した。

4. 研究成果

(1) 分泌系細胞分化における ERK MAP キナーゼの活性動態の解明

腸上皮にある種の病原体が感染すると幹細胞から分泌系細胞への分化が促進され、それにより粘液や抗菌性ペプチドなどの分泌量が増加することが知られている。この環境刺激依存的な分泌系細胞分化の機構を解明するため、生体イメージング法により種々のシグナル伝達分子の活性を経時的に観察した。その結果、分泌系細胞分化の過程において、細胞増殖の主要な制御因

子の一つである ERK MAP キナーゼの活性動態が変化することを見出した。まず、正常なマウス腸上皮および腸オルガノイドの観察により、ERK の活性は一定の基底状活性 (basal activity) とパルス状の一過的な活性 (pulse-like activity) により構成されることが分かった。腸幹細胞から分泌系細胞への分化が促進される際には Notch の活性が低下することが知られているが、この Notch 活性の低下により ERK のパルス状の活性化の頻度が上昇することが明らかになった。次に、この ERK 活性の変化を誘導する上流の増殖因子受容体を探索した結果、パルス状の活性化については EGFR が、基底状活性については ErbB2 が担っていることが示された。従って、腸上皮においては、これら 2 種類の受容体が 2 つの異なる ERK 活性の動態を制御しており、分泌系細胞分化の過程では EGFR 機能が亢進することでパルス状活性の頻度が上昇すると考えられる (図 2 参照)。



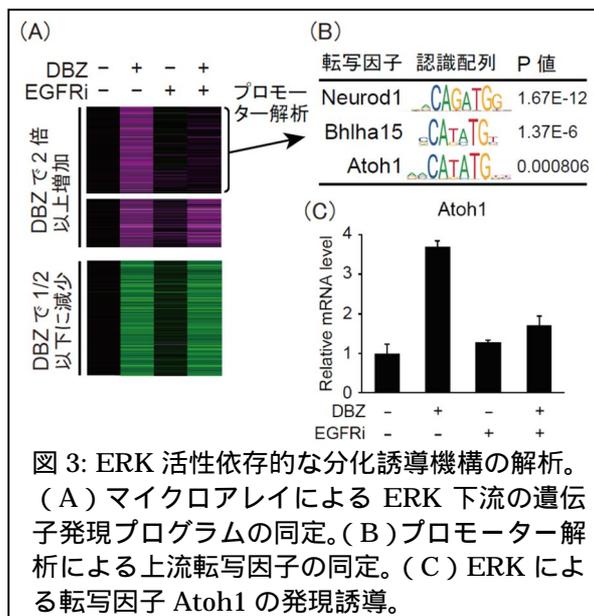
(2) 分泌系細胞分化における ERK の役割の解明

上記のように分泌系細胞分化の過程において、ERK の活性動態が顕著に変化することが明らかになったことから、ERK 活性が細胞の分化に必要かどうか検討した。ERK の上流の活性化因子である MEK に特異的な阻害剤を用いた実験により、腸オルガノイドにおいて、ERK の阻害は杯細胞やパネート細胞など、分泌系細胞への分化を抑制することが明らかになった。MEK 阻害剤と同様に EGFR 阻害剤を投与した場合にも、同様に分化が抑制された。EGFR 阻害剤は、ERK のパルス状活性を抑制するものの、基底状活性には影響しなかったことから、ERK のパルス状の活性化の亢進が分泌系細胞分化に必要なこととされる。

次に、マウスの腸上皮においても同様の現象が起きるか検討した。その結果、EGFR 阻害剤の投与により、杯細胞の数が顕著に減少することが示された。以上の結果は、EGFR による ERK のパルス状活性の頻度の上昇が腸上皮幹細胞の分泌系細胞分化に必要なことを示している。

(3) ERK 依存的な分化誘導機構の解明

上記の結果は、ERK が分泌系細胞分化を促進することを示している。そこで次に、この ERK 依存的な分化促進機構について詳細に解析した。まず、ERK によって発現が変化する遺伝子をマイクロアレイにより網羅的に同定した。その結果、Notch 阻害による分泌系分化誘導時に発現が上昇する遺伝子のうち、およそ 60% の遺伝子の発現がパルス状の ERK 活性に依存する (EGFR 依存的) ことが示された (図 3A 参照)。次に、これら ERK 依存的に発現が上昇した遺伝子のプロモーター解析を行った結果、Neurod1 や Bhlha15, Atoh1 など分泌系分化に必要な転写因子の認識配列が高頻度に濃縮されていることが分かった (図 3B)。このうち、Atoh1 は初期の前駆細胞において、分泌系細胞への分化を誘導するマスターレギュレーターとして働くことが知られている。そこで、Atoh1 の発現を調べた結果、分泌系細胞への分化誘導時に、Atoh1 の発現がパルス状の ERK 活性依存的に上昇することが分かった (図 3C)。以上の結果は、パルス状の ERK 活性が Atoh1 の発現を誘導することで、分泌系細胞分化に関連する遺伝子の発現を誘導することを示唆している。



(4) ERK による Atoh1 の機能制御

上記 3 の結果から、ERK が Atoh1 を介して分化を誘導することが示唆された。そこで次に、ERK による Atoh1 の制御機構を解析した。そのために、Atoh1 のクロマチン免疫沈降 (ChIP) -sequence 解析を行い、腸上皮細胞におけるゲノム上の Atoh1 結合部位を同定した。この解析の結果、分化を誘導した際、ゲノム全体に渡って約 12000 の Atoh1 結合部位を同定した (図 4A, B)。これらの結合部位の約 70% が転写開始点から 1 kb 以内のプロモーター領域に分布していた

(図 4C)。この Atoh1 結合部位の数は、パルス状の ERK 活性の阻害によって、500 以下にまで顕著に減少した(図 4B)。この結果は、ERK 活性が Atoh1 のゲノム上の標的部位への結合に必要であることを示している。また以前の研究で、Atoh1 の発現は Atoh1 自身によって促進されることが報告されており、今回の解析で ERK の阻害により Atoh1 の Atoh1 遺伝子プロモーターへの結合が抑制されることが分かった。従って、ERK の活性は Atoh1 による自己誘導を阻害することで、Atoh1 の発現を抑制し、ひいては他の Atoh1 標的遺伝子の発現を抑制すると考えられる。

(5) ERK による腸上皮幹細胞の分泌系細胞への分化の制御機構

上記 1 - 4 の結果から、環境刺激による腸上皮幹細胞の分泌系細胞分化の際に、ERK の活性動態の変化が果たす役割が明らかになった。以前の研究では、分泌系細胞分化の際には、Notch 経路の活性が低下し、それにより Atoh1 の発現が誘導され、分化が起きると考えられていた。この経路に加えて、本研究によりもう一つの分化促進経路の存在が示唆された。すなわち、Notch 活性の低下により EGFR 機能が亢進し、それにより ERK のパルス状活性化の頻度が上昇する。この ERK のパルス状活性化が Atoh1 の機能と発現を増強することで、分化を促進するという経路である(図 5 参照)。一般に ERK は細胞増殖の促進に機能することが知られているが、本研究により外環境の変化に応じた幹細胞の分化誘導時にも、ERK の活性動態の変化が重要な意義を持つことが明らかになった。

(6) 腸腫瘍形成における ERK 活性動態の変化

ここまでの研究で、ERK 活性動態の変化が外環境の変化による腸上皮幹細胞の機能制御に重要な役割を果たすことが明らかになった。そこで次に、ERK 活性動態の異常が腸疾患に果たす役割を解析した。そのために、大腸癌モデル(Apc 変異)マウスを用いて、腫瘍細胞における ERK 活性の動態を経時的に解析した。その結果、分泌系分化の際と同様に ERK のパルス状活性化の頻度が上昇していることが明らかになった。この ERK のパルス状活性化の増加は Wnt 経路の恒常的な活性化により、EGFR 制御因子の発現が変化し、それによって EGFR 機能が亢進することで引き起こされていた。重要なことに、腫瘍細胞では EGFR の機能亢進によって、基底状活性も EGFR 依存性に変化しており、その結果 EGFR 阻害によって正常細胞よりも顕著に ERK 活性が低下することが示された。この結果は、腫瘍細胞が正常細胞よりも高い EGFR 依存性を示す一因になっていると考えられる。すなわち、正常細胞では EGFR を阻害しても ErbB2 依存的な基底状の ERK 活性が残るため、細胞は生存し、増殖するが、腫瘍細胞では基底状活性も顕著に低下するため、細胞増殖の停止や細胞死が誘導されると考えられる。この成果は、臨床的に抗がん剤として用いられる EGFR 阻害剤の腫瘍特異性を説明するものである。

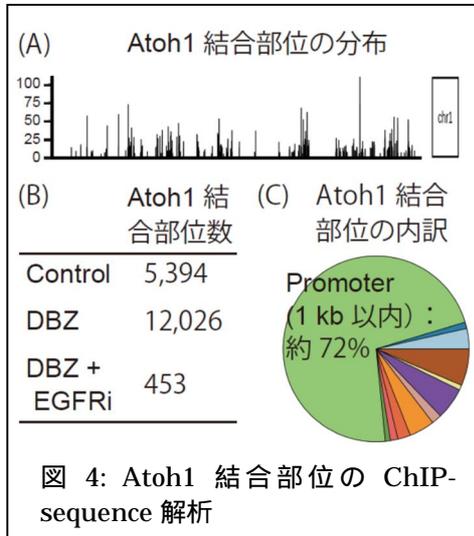


図 4: Atoh1 結合部位の ChIP-sequence 解析

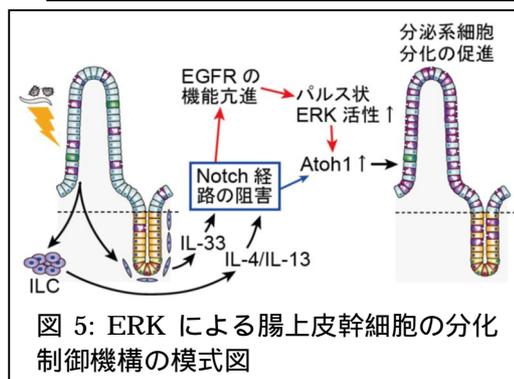


図 5: ERK による腸上皮幹細胞の分化制御機構の模式図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Akira Hirota, Shaikha AlMusawi, Abdolrahman S. Nateri, Paloma Ordonez-Moran*, Masamichi Imajo*	4. 巻 -
2. 論文標題 Biomaterials for intestinal organoid technology and personalized disease modelling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 今城 正道, 松田 道行	4. 巻 69
2. 論文標題 タンパク質・核酸の分子修飾 II. 細胞質/オルガネラでの分子修飾 リン酸化（セリン/スレオニン/チロシン）	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 430-431
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 今城正道, 牟田優, 松田道行	4. 巻 91
2. 論文標題 生体内におけるERK MAPキナーゼ活性の動態と生理的意義	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 546-550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910546	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 Masamichi Imajo	4. 巻 Intestinal Stem Cells
2. 論文標題 Hemagglutinating Virus of Japan Envelope (HVJ-E)-Guided Gene Transfer to the Intestinal Epithelium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 285-291
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0747-3_19	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 Masamichi Imajo	4. 巻 Retinoid and Rexinoid Signal.
2. 論文標題 Analysis of Retinoic Acid Receptor Signaling in Colorectal Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 85-93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-9585-1_6	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 Yu Muta, Michiyuki Matsuda, Masamichi Imajo*	4. 巻 11
2. 論文標題 Divergent Dynamics and Functions of ERK MAP Kinase Signaling in Development, Homeostasis and Cancer: Lessons from Fluorescent Bioimaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11040513	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 Yu Muta, Michiyuki Matsuda, Masamichi Imajo*	4. 巻 5
2. 論文標題 Dynamic ERK signaling regulation in intestinal tumorigenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol. Cell. Oncol.	6. 最初と最後の頁 e1506684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/23723556.2018.1506684	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 Yu Muta, Yoshihisa Fujita, Kenta Sumiyama, Atsuro Sakurai, Makoto M. Taketo, Tsutomu Chiba, Hiroshi Seno, Kazuhiro Aoki, Michiyuki Matsuda, Masamichi Imajo*	4. 巻 9
2. 論文標題 Composite regulation of ERK activity dynamics underlying tumour-specific traits in the intestine	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Commun.	6. 最初と最後の頁 2174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-04527-8	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 今城正道、牟田優、松田道行
2. 発表標題 生体イメージングによる腸上皮細胞ダイバーシティの制御機構の解析
3. 学会等名 細胞社会ダイバーシティの統合的解明と制御 第4回公開シンポジウム 1細胞解析と数理モデリングの融合がもたらす細胞社会ダイバーシティの理解
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今城正道
2. 発表標題 分子活性のゆらぎによる腸上皮細胞ダイバーシティの制御
3. 学会等名 新学術領域「細胞ダイバース」 第3回若手ワークショップ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masamichi Imajo, Yu Muta, Michiyuki Matsuda
2. 発表標題 Dynamic regulation of ERK signaling in intestinal homeostasis and cancer
3. 学会等名 Establishing International Research Network of Mathematical Oncology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masamichi Imajo, Yu Muta, Michiyuki Matsuda
2. 発表標題 Alterations of ERK activity dynamics underlying tumor-specific traits in the intestinal epithelium
3. 学会等名 The 38th Sapporo International Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今城正道、牟田優、松田道行
2. 発表標題 Composite regulation of ERK activity dynamics underlying tumor-specific traits in the intestine
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会 第51回日本発生生物学会 合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今城 正道, 牟田 優, 松田 道行
2. 発表標題 腸上皮における細胞増殖シグナルの動態とその生理的意義
3. 学会等名 文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究(研究領域提案型)細胞社会ダイバーシティーの統合的解明と制御 第3回公開シンポジウム「1細胞統合解析を駆使した組織内ダイバーシティー解明への挑戦」(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学ホームページ上での研究成果紹介 https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2018-07-04-3</p> <p>メディアにおける研究成果紹介 日本経済新聞 (https://www.nikkei.com/article/DGXLRS484413_U8A700C1000000/) QLifePro (http://www.qlifepro.com/news/20180709/successful-visualization-of-cell-growth-signal.html)</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

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