

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15743

研究課題名(和文) 上皮傷害関連リプログラムにおける分子機序の解明

研究課題名(英文) Identification of molecular mechanisms in the wound associated reprogramming of intestinal epithelial cells

研究代表者

油井 史郎 (Yui, Shiro)

東京医科歯科大学・統合研究機構・講師

研究者番号：00383886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、傷害に際して成体の腸上皮細胞の特性が大きく変化し、腸の効率的な再生を担うことを明らかにした。この運命転換は、成体の成熟型上皮細胞が発生段階の未熟上皮細胞に一過性にリプログラムされる「胎児化」であり、分子レベルでは細胞外基質依存性の転写因子YAP/TAZの活性上昇に基づく現象であった。腸の再生機構の詳細をより深く理解するために、発生過程を数理モデルや移植システムにより解析し、胎児の腸を構成する上皮細胞に、等しく組織幹細胞に成熟する能力があることを明らかにした。一連の結果は、個体内でも突出した腸上皮の再生能力を、その分子機構や発生過程との対比から明らかにする重要な成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、腸という個体内でも突出した再生能力を備えた臓器の特性を明らかにする学術的に重要な研究である。組織の再生における胎児化の機構や、その過程における細胞外基質の役割を当該研究領域で初めて明らかにした研究成果である。すでに腸管における同様の機構に関する報告だけでなく、神経組織や肝組織の再生にも類似した機構があることが報告されるなど、組織再生に関わる基礎研究の重要なテーマとなっている。本研究は、細胞に若返る能力があるというメッセージを有しており、このメッセージは広く社会的な反響を惹起するものであると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this project, we identified the dynamic fate change of intestinal epithelial cells upon tissue injury, which secures the effective regenerative process of intestine. This fate change can be referred as fetalization, in which mature adult intestinal epithelial cells are temporally reprogrammed into fetal-type epithelial cells. Importantly, this project definitely offered the molecular basis of fetalization in the activation of transcriptional factors YAP/TAZ in extracellular matrix dependent manner. In order to understand the regenerative response in more details, we also analyzed the developmental process of intestine using mathematical modeling as well as transplantation assay, and identified the equal potential of all different fetal epithelial progenitors to mature adult stem cells. All these results clearly provide the scheme to understand the outstanding regenerative capacity of intestine from its molecular mechanisms in line with developmental process.

研究分野：消化器内科学

キーワード：腸上皮再生機構 腸上皮オルガノイド I型コラーゲン 胎児腸上皮細胞 数理モデル 上皮移植モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々の腸管は人体の中で最も長い臓器であるが、その内腔は、実にテニスコート 1.5 面分の上皮で隙間なく覆われている。そこにある膨大な量の腸上皮細胞は、傷害などを受けた際に、非常に早く回復する高い再生能力を有している。この腸上皮の再生の過程が、転写因子 YAP/TAZ の欠損によって完全に阻害されることが報告 (Cai *et al*, 2012) されて以降、再生を担う転写因子 YAP/TAZ の理解が重要であると考えられるようになった。しかしながら、その詳しい動態、具体的には、傷害の何によって転写因子 YAP/TAZ の活性が誘導されるのかについては全く未解明であった。また転写因子 YAP/TAZ に関しては、その活性の上昇が成体の体性幹細胞の働きに重要であることが想定されてきたが、再生時に腸上皮幹細胞マーカーである Lgr5 の発現が低下するという逆説的な実験結果が相次いで報告されるに伴い、YAP/TAZ の活性が正常時の活性を大きく超える再生時に、その高い活性上昇の結果として上皮細胞にどのような形質が誘導されるのかという点が、腸再生理解における重要事項であった。

2. 研究の目的

申請者は、上記の科学的問いに対して、プラナリアなどの原始的な生物において、脱分化という細胞が幼若化する現象が、効率的な組織再生に寄与する現象に着目した。何故ならば、進化論上最も進んだ生物である哺乳類の体の中にあっても、腸は免疫系・神経系などの最先端の組織と異なる原始的な組織であると考えたからである。そこで、本研究申請に先立ち、マウスの発生段階の腸上皮細胞に特異的に発現し、成体腸上皮には通常発現しない分子群を網羅的に同定し (Fordham R, Yui S *et al*, *Cell Stem Cell*, 2013)、それらの発現をマウス腸炎モデル再生フェーズにある上皮細胞で確認した。驚くべきことに、発生段階の腸上皮に特異的に発現する分子群 (Ly6 ファミリー-遺伝子群、Annexin ファミリー-遺伝子群や Tacstd2) が再生フェーズにある腸上皮に強く発現し、マイクロアレイで抽出された再生腸上皮の転写プロファイルが、胎生期由来培養腸上皮細胞の転写プロファイルに著しく類似していることが明らかとなった。この結果は腸上皮再生時に成体上皮が胎生期上皮様にリプログラムされること (= 上皮傷害関連リプログラム) を示している。本研究では、一步踏み込んで、上皮傷害関連リプログラムのメカニズムを解明して、腸の効率的な再生機構を深く理解することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、I 型コラーゲン内に腸の上皮細胞を包埋し、Wnt 存在下に培養することで得られる球状オルガノイド (Yui S, Nakamura T, Watanabe M *et al*, *Nature Medicine*, 2012) を利用し、I 型コラーゲンが腸上皮に与える影響を直接的かつ明快地解析した。またマウス潰瘍性大腸炎モデルであるデキストラン硫酸ナトリウムによる急性腸炎 (DSS 腸炎) を利用し、腸管間質に沈着するコラーゲンの影響を評価・解析するために、コラーゲン下流の Signal 伝達に関わる FAK や Src の阻害剤を投与し、腸再生反応の変化を解析した。転写因子 YAP/TAZ の関わりについては、Tamoxifen 投与にて腸上皮特異的に YAP/TAZ 遺伝子の欠損を誘導可能な遺伝子改変マウス (VillinCreERT2; YAP^{fl/fl}TAZ^{fl/fl} マウス) (Azzolin *et al*, 2013) や、Doxycyclin 投与により活性型 YAP を腸上皮特異的に強制発現できる YAP^{tg} マウス (Camargo *et al*, 2007) を利用し、これらにおけるキストラン硫酸ナトリウムによる急性腸炎や、これらマウスに由来するオルガノイドを利用した In Vitro 実験を行った。

4. 研究成果

本研究ではまず、腸管の傷害時に間質に沈着する I 型コラーゲンが FAK/Src を活性化し、これが転写因子である YAP/TAZ の活性を誘導するという上皮傷害関連リプログラムの分子機序を明らかにすることができた。また高い YAP/TAZ の活性が、成体の成熟型腸上皮細胞を、胎児型の未熟前駆細胞に形質転換することを明らかにすることができた。これは、腸上皮の有する高い再生能力の分子基盤を、特定の細胞外基質と結びつけて理解するとともに、腸上皮の再生の基盤に腸発生の過程が組み込まれているということも示唆する画期的な成果である。すなわち、欠損を補うために上皮細胞が増殖に転じ、かつ十分に増えたのちに成体組織幹細胞を含む正常の上皮構造が復元する再生の過程が、増大する組織に合わせて上皮細胞が増加し、定常状態に至ったのちに組織幹細胞に成熟する発生の過程の関連を明らかにした重要な研究である。

本研究では次に、発生における細胞動態の詳細を解析し、成体組織幹細胞への成熟能力が、爆発的増殖能力を有する胎生期末熟上皮細胞全てに等しく見られることを確認した。成体の組織幹細胞が発生の過程でどのように供給されるかに関する新しい理解であり、発生生物学上の画期的な成果であるとともに、再生過程における細胞動態も示唆する先見性のある結果である。この成果は 2019 年の Nature に Letter として掲載されるなど極めて高い評価を受けている。

これら一連の成果は、組織の再生における胎児化の機構や、細胞外基質の役割を当該研究領域で初めて明らかにした研究成果であるとともに、組織再生における細胞動態に関する新しい理解のあり方を示唆する内容である。傷害組織の迅速な再生を促す治療法の開発や、炎症性発癌の

機序の解明などの新しい医学研究・医療開発へ応用されうる重要な成果であると考えている。

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sho Anzai, Ami Kawamoto, Shiro Yui, Shigeru Oshima, Mamoru Watanabe, Ryuichi Okamoto et al	4. 巻 524
2. 論文標題 TGF- promotes fetal gene expression and cell migration velocity in a wound repair model of untransformed intestinal epithelial cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 533-541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.108	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 Ryuichi Okamoto, Hiromichi Shimizu, Hady Yuki Sugihara, Shiro Yui, Mamoru Watanabe et al	4. 巻 13
2. 論文標題 Organoid-based regenerative medicine for inflammatory bowel disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regen Ther.	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.11.004	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 Jordi Guiu, Edouard Hannezo, Shiro Yui, S, Benjamin D Simons, Kim B Jensen et al	4. 巻 570
2. 論文標題 Tracing the origin of adult intestinal stem cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 107-111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41586-019-1212-5	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 Ami Kawamoto, Sayaka Nagata, Sho Anzai, Junichi Takahashi, Mao Kawai, Minami Hama, Daichi Nogawa, Kohei Yamamoto, Reiko Kuno, Kohei Suzuki, Hiromichi Shimizu, Yui Hiraguri, Shiro Yui, Shigeru Ohshima, Kiichiro Tsuchiya, Tetsuya Nakamura, Kazuo Ohtsuka, Masanobu Kitagawa, Ryuichi Okamoto, Mamoru Watanabe	4. 巻 13(4)
2. 論文標題 Ubiquitin D is up-regulated by synergy of Notch signalling and TNF- in the inflamed intestinal epithelia of IBD patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Crohn and Colitis	6. 最初と最後の頁 495-509
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjy180	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 Kohei Suzuki, Tatsuro Murano, Hironichi Shimizu, Go Ito, Toru Nakata, Ami Kawamoto, Junichi Takahashi, Minami Hama, Sayaka Nagata, Yui Hiraguri, Shiro Yui, Kiichiro Tsuchiya, Tetsuya Nakamura, Mamoru Watanabe, Ryuichi Okamoto et al	4. 巻 53(9)
2. 論文標題 Single cell analysis of Crohn's disease patient-derived small intestinal organoids reveals disease activity-dependent modification of stem cell properties	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1035-1047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-018-1437-3	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8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Sakurako Kobayashi, Ryuichi Okamoto, Mamoru Watanabe, Takanori Takebe, Shiro Yui et al
2. 発表標題 Conceptual basis of lineage shift between intestinal epithelium and hepatocytes.
3. 学会等名 Keystone Symposia, Tissue Organoids as Models of Host Physiology and Pathophysiology of Disease (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shiro Yui
2. 発表標題 Regenerative medicine in treatment of IBD
3. 学会等名 APDW 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shiro Yui, Mamoru Watanabe.
2. 発表標題 Stem Cells in Gut, Who are They and How They Work, What Can We Count on Them.
3. 学会等名 AOCC2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 油井史郎、中村哲也、渡辺 守
2. 発表標題 腸管炎症による間質線維化が誘導する上皮幹細胞の胎児型形質転換.
3. 学会等名 第105回 日本消化器病学会総
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 油井 史郎、岡 本隆一、土屋 輝一郎、中村 哲也、渡辺 守
2. 発表標題 YAP/TAZ依存性の胎児化誘導を介した間質リモデリングの上皮再生促進機構
3. 学会等名 第4回G-PLUS
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 油井 史郎
2. 発表標題 Broad progression of research in intestinal epithelial biology—From primary culture to epithelial regeneration
3. 学会等名 東京医科歯科大学湯島若手塾
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 油井 史郎
2. 発表標題 成体由来・高可塑性腸上皮オルガノイドのリプログラミング法開発
3. 学会等名 再生医療実現拠点ネットワークプログラム（幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム）平成30 年度事業内交流会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 油井 史郎
2. 発表標題 4.日本の消化器内科医が主導する世界のオルガノイド研究～IBDの病態解明から再生医療へ～
3. 学会等名 東京西部消化器先端医療勉強会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----