

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15759

研究課題名（和文）炎症性腸疾患における異なる組織幹細胞機能の制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Regulation of intestinal stem cells in inflammatory bowel disease

研究代表者

片野 敬仁（Katano, Takahito）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：50768372

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）：粘膜傷害時における腸管幹細胞の挙動を探索することを目的し、バックアップ幹細胞としてのBmi1陽性幹細胞の機能制御メカニズムを転写因子KLF4の機能から解明することを主眼とした。小腸上皮でKLF4は正常時においてはBmi1+細胞を静的状態に維持し、杯細胞分化を制御していた。オルガノイドをもちいて、放射線傷害時における粘膜再生の過程を再現し、Bmi1陽性細胞特異的にKLF4をノックアウトすると、放射線性傷害後の粘膜再生が遅延することが示された。KLF4は正常時および放射線粘膜傷害において、小腸粘膜上皮の恒常性維持・杯細胞分化を制御していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、転写因子KLF4が消化管幹細胞機能を制御し、組織恒常性維持・粘膜傷害時の再生に関与していることを明らかにした。KLF4はとくに組織恒常性維持においては杯細胞分化を制御していることが示唆され、炎症時の消化管バリア機能の制御においても重要な役割を持つことが示唆される。また、オルガノイドを用いて、放射線照射後の粘膜傷害後の生体内の再生の過程を、ex-vivoで再現することを可能とし、これは正常時のみならず粘膜傷害時の小腸上皮の幹細胞機能制御機構の解明のために有用な研究モデルとなる。

研究成果の概要（英文）：Kruppel-like factor 4 (KLF4) is a zinc-finger transcription factor, expressed in villus cells of the intestinal epithelium, that promotes cellular differentiation and tissue homeostasis. The aim of this study was to investigate how KLF4 contributes to crypt regeneration originated from BMI1+ intestinal stem cell (ISC) lineage during homeostasis. KLF4 is positively correlated with goblet cell differentiation in BMI1+ ISC derived lineage. Irradiate to single sorted BMI1-YFP+ cell derived organoid model reconstitute in vivo response following -irradiation. These results suggest that KLF4 regulates goblet cell differentiation during homeostasis and plays a radio-protective role.

研究分野：消化器内科

キーワード：幹細胞 KLF

## 1. 研究開始当初の背景

腸管上皮は、組織恒常性維持のうえで、増殖、分化、移動、およびアポトーシスなどの多数の生物学的プロセスをもとに、3~4日ごとに再生を繰り返す組織である。これまでの研究により、Wnt、Notch、BMP および Hedgehog を含む複数のシグナル伝達経路が調節ネットワークの重要な構成要素を形成し、腸管幹細胞 (Intestinal Stem Cell; ISC) が存在する腸陰窩に収束することが示されている。最近の研究では、表現するマーカーに基づいて異なる性質の ISC の存在が示されている。ISC は、Lgr5 を発現する腺底部の細胞に存在し、組織恒常性維持の間に多分化能性幹細胞としての機能を活発的・動的に発揮する ISC (active ISC) の集団と、Bmi1、LRIG1、mTERT、HOPX、および DCLK1 などの様々なマーカーを発現し、恒常性維持の間にほとんど分裂しないものの、傷害による active ISC の枯渇後の再生源として役立つ、休止または予備の ISC (quiescent ISC または reserve ISC) に分類される。正常状態のみならず炎症性腸疾患や放射線粘膜傷害において、この異なる ISC がどのように制御されているのか、未解明な点が多いのが現状である。

## 2. 研究の目的

近年、zinc finger 転写因子である Krüppel-like factor 5 (KLF5) が Lgr5 発現 active ISC の増殖を調節する上で重要な役割を果たすことや、細胞系譜解析から腺底部に存在する Lgr5 陽性細胞が腸管上皮幹細胞 (active ISC) であることが報告されているが、Lgr5 陽性幹細胞が除去された場合にも他の細胞が幹細胞 (reserve ISC) として働くこととされており、Bmi1-CreER;Rosa26eYFP マウスを用いた細胞系譜実験により腺底部+4 細胞に発現する Bmi1 陽性細胞が Lgr5 陽性幹細胞傷害時のバックアップとして働く quiescent ISC であることが明らかにされている。また、放射線傷害時の腸管上皮組織恒常性維持における Bmi1 陽性幹細胞のバックアップ機能が KLF4 により制御されることも報告されている。

これらの研究に基づいて、KLF ファミリーが傷害後の腸上皮の増殖・再生反応の重要な細胞内メディエーターであることに注目し、細胞系譜解析を用いて正常時および病的状態における異なる種類の腸管幹細胞 (active ISC と quiescent または reserve ISC) とくに reserve ISC としての Bmi1 陽性幹細胞の機能制御機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

KLF4 の Bmi1 陽性細胞における機能を、タモキシフェン投与により Bmi1 陽性細胞由来の細胞を eYFP で標識可能な Bmi1-Cre<sup>ER</sup>;Rosa26<sup>eYFP</sup> (*Bmi1<sup>Ctrl</sup>*) と、Bmi1 陽性細胞特異的に Klf4 をノックアウト可能な Bmi1-Cre<sup>ER</sup>;Rosa26<sup>eYFP</sup>;Klf4<sup>fl/fl</sup> (*Bmi1<sup>ΔKlf4</sup>*) マウスを用いて検討した。タモキシフェンは 225mg/kg で腹腔内投与を行った。小腸上皮オルガノイドでの検討では、タモキシフェン投与後の *Bmi1<sup>Ctrl</sup>*、*Bmi1<sup>ΔKlf4</sup>* マウスの小腸陰窩から Bmi1-eYFP 陽性細胞を FACS にてシングルセルソーティングを行い、単一の eYFP 陽性細胞から小腸上皮オルガノイドを樹立し検討を行った。

## 4. 研究成果

・ KLF4 は絨毛の終末分化した細胞とともに小腸の陰窩内の杯細胞に発現している。

正常の組織恒常性維持における KLF4 の機能を確認するために、蛍光免疫染色を用いて、小腸上皮内の KLF4 発現細胞の局在を確認した。KLF4 陽性細胞は腸管上皮の絨毛の終末分化した細胞にみられるとともに、陰窩の+4 細胞を含む細胞にも KLF4 陽性細胞が観察された。杯細胞マーカー (MUC2)、内分泌細胞マーカー (chromogranin A)、パネート細胞マーカー (lysozyme) との多重免疫染色において、KLF4 陽性細胞の 74.1±4.0% は MUC2 陽性であり、MUC2、chromogranin A、lysozyme 陽性細胞における KLF4 陽性率はそれぞれ 79.0±2.0%、3.3±1.7%、0.7±0.7% であり、KLF4 は主に小腸上皮の陰窩内において杯細胞に発現していた。

・ KLF4 は Bmi1 陽性幹細胞からの杯細胞分化と細胞増殖を制御している。

*Bmi1<sup>Ctrl</sup>* と *Bmi1<sup>ΔKlf4</sup>* を用いて、タモキシフェン投与により Bmi1 陽性細胞の子孫細胞を eYFP により標識し、細胞系譜を解析した。それぞれのマウスにおいて、タモキシフェン投与後 2 日、3 日、7 日後の近位小腸の陰窩内における eYFP 細胞 (*Bmi1* 陽性細胞とその子孫細胞) を解析したところ、eYFP 陽性細胞の数は経時的に増加を認めた。タモキシフェン投与 3 日後の eYFP 陽性細胞の数は *Bmi1<sup>ΔKlf4</sup>* マウスにおいて *Bmi1<sup>Ctrl</sup>* よりも有意に多かった。タモキシフェン投与 3 日目、7 日目で陰窩内の eYFP 陽性細胞における KLF4 陽性細胞の数は有意に少なかった。eYFP 陽性細胞における *Bmi1<sup>Ctrl</sup>* での MUC2 陽性細胞の数はタモキシフェン投与 7 日目で *Bmi1<sup>ΔKlf4</sup>* マウスより優位に多く見られた。これらの結果から、組織恒常性維持において、Bmi1 陽性細胞特異的な Klf4 の deletion により、Bmi1 陽性 ISC 由来の細胞増殖が促進し、Bmi1 陽性 ISC からの杯細胞分化が抑制されることが示唆された。

タモキシフェン投与 7 日目での *Bmi1*<sup>Ctrl</sup> と *Bmi1*<sup>ΔKlf4</sup> マウスにおける *Bmi1*-eYFP 陽性細胞における MUC2 と KLF4 のサブポピュレーションを見ると、*Bmi1*<sup>ΔKlf4</sup> では *Bmi1*<sup>Ctrl</sup> に比べて KLF4 陽性率が低下するとともに MUC2 陽性細胞が低下しており、spearman correlation での解析において KLF4 と MUC2 の間に正の相関が認められた。

・ *Bmi1* 陽性 ISC からの腸管上皮オルガノイドによる検討

タモキシフェン投与 2 日目の *Bmi1*<sup>Ctrl</sup> マウスおよび *Bmi1*<sup>ΔKlf4</sup> マウスの小腸から FACS にて単一の *Bmi1*-YFP 陽性細胞をソーティングし、それから樹立したオルガノイドにおける杯細胞分化と KLF4 発現を検討した。

*Bmi1*<sup>Ctrl</sup> マウスの *Bmi1*-eYFP 由来の腸管上皮 organoid では杯細胞分化を認め、MUC2 陽性細胞の約 70%に KLF4 発現をみとめたが、*Bmi1*<sup>ΔKlf4</sup> マウスの *Bmi1*-eYFP 由来の腸管上皮オルガノイドにおいては杯細胞分化が見られず、*Bmi1*<sup>Ctrl</sup> 由来に比べ、*Bmi1* 特異的に KLF4 をノックアウトした eYFP 細胞由来のオルガノイドでは KLF4・MUC2 陽性細胞ともに有意に低いという結果であった。

*Bmi1* 陽性 ISC 由来のオルガノイドに放射線を照射し、放射線粘膜傷害を模倣する ex-vivo モデルを樹立した。*Bmi1*<sup>Ctrl</sup> マウス小腸から樹立したオルガノイドに 10Gy で照射すると、生体内と同様に照射後 24-48 時間はオルガノイドが消退し、48-72 時間以降に再度オルガノイドを再生するのが観察され、生体内の放射線粘膜傷害後の再生過程を反映した過程を再現できた。*Bmi1*<sup>ΔKlf4</sup> マウス由来のオルガノイドでは、放射線照射後の再生率が *Bmi1*<sup>Ctrl</sup> 由来に比べて優位に低かった。

これらの結果から KLF4 は組織恒常性維持のみならず、放射線傷害後の粘膜再生を制御していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Katano Takahito, Bialkowska Agnieszka B., Yang Vincent W.	4. 巻 13
2. 論文標題 KLF4 Regulates Goblet Cell Differentiation in BMI1+ Reserve Intestinal Stem Cell Lineage during Homeostasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Stem Cells	6. 最初と最後の頁 424 ~ 431
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15283/ijsc20048	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 Orzechowska Emilia J., Katano Takahito, Bialkowska Agnieszka B., Yang Vincent W.	4. 巻 10
2. 論文標題 Interplay among p21Waf1/Cip1, MUSASHI-1 and Kruppel-like factor 4 in activation of Bmi1-CreER reserve intestinal stem cells after gamma radiation-induced injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-75171-w	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 Marutani Yuka, Mizoshita Tsutomu, Sugiyama Tomoya, Togawa Shozo, Katano Takahito, Yamada Tomonori, Hirata Yoshikazu, Kimura Yoshihide, Miyaki Tomokatsu, Inoue Yusuke, Suzuki Erina, Sasaki Makoto, Kataoka Hiromi	4. 巻 39
2. 論文標題 Efficacies of first and second tumor necrosis factor inhibitors in refractory ulcerative colitis patients in real-world practice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Indian Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 565 ~ 575
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12664-020-01092-1	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takahito Katano, Chang-Kyung Kim, Emilia J. Orzechowska, Agnieszka B. Bialkowska, Vincent W. Yang
2. 発表標題 KRUPPEL-LIKE FACTOR 4 REGULATES BMI1+ INTESTINAL RESERVE STEM CELLS DURING HOMEOSTASIS AND INJURY
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahito Katano, Emilia J. Orzechowska, Agnieszka B. Bialkowska, Vincent W. Yang
2. 発表標題 KRUPPEL-LIKE FACTOR 4 MODULATES GOBLET CELL DIFFERENTIATION AND PLAYS A RADIO-PROTECTIVE ROLE IN THE BMI1+ INTESTINAL RESERVE STEM CELL LINEAGE
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------	---------