

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07500

研究課題名(和文) in vivoイメージングを組合せた腸上皮治癒過程での細胞脱分化機構解明

研究課題名(英文) in vivo imaging system to analyze the intestinal mucosal healing process through temporarily appearing immature epithelial cells

研究代表者

松本 有加 (Matsumoto, Yuka)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：50813672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、開腹下腸内腔操作により小腸上皮障害を作製し、創傷発生直後から任意の時点で解析可能な腸上皮障害マウスモデルを作製した。本モデルを解析し、治癒過程早期の短期間のみ創傷部に出現する上皮細胞を同定し、これが分化細胞マーカーを発現しない未分化な細胞であることを確認した。レーザーマイクロディセクション技術を用いて未分化細胞を選択的に回収しRNAを得た。また、abdominal imaging windowをマウス腹壁に装着し、生きたまま体外から小腸内腔観察を可能とする生体内イメージングマウスモデルと、これを腸上皮障害マウスモデルと組み合わせ、上皮障害部を体外から観察する技術の開発に着手した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した腸上皮傷害マウスモデルは、他の上皮傷害モデルで困難であった上皮傷害部に一過性、限局的に見られる細胞変容の追跡に適しており、今までに報告がない生体内イメージングによる創傷治癒過程の解析を可能とするものである。この上皮傷害モデルと、腸上皮の生体内イメージングを可能とする技術を組み合わせることにより、創傷治癒過程における細胞脱分化に関わる分子を同定し、その細胞動態を明らかにすることが可能となると思われる。この成果は、新しい腸組織再生促進戦略や、分化細胞から腸上皮幹細胞を作成する新技術開発につながることで期待される。

研究成果の概要(英文)： We established a new mouse model of the intestinal injury which enabled us to assess the change of epithelial cells during the mucosal healing process with exact reference to the recovery time after the onset of injury. By using this model, we confirmed that, at the early stage of mucosal healing, there emerged flat epithelial cells that did not express the markers of any differentiated cell types over the injured mucosa.

To investigate how those undifferentiated cells contribute to the epithelial reconstitution, we selectively collected those cells by the laser microdissection technique and analyzed mRNA expression. Furthermore, we started to set up an in vivo imaging system which allowed us to visualize the changes on the intestinal mucosa through an abdominal imaging window equipped on the mouse abdominal wall. We are now trying to trace the dynamic change of the epithelium during the mucosal healing, which would provide insight into regenerative mechanisms of the intestine.

研究分野：腸再生医療

キーワード：腸上皮傷害マウスモデル 腸上皮治癒 腸上皮細胞脱分化 in vivoイメージング

1. 研究開始当初の背景

組織傷害後の再生過程における分化細胞の脱分化現象は、腸組織を始め多種多様な組織・細胞で報告されているが、そのメカニズムの詳細は十分に解明されていない。その理由として、組織傷害作成後に別個体を任意の時点で解析するため、同一の細胞の変容過程を追跡できないことがあげられる。既報では、特定の分化細胞マーカーの蛍光標識等によって分化細胞からのリニエージトレーシングが可能なマウスを作成し、これに放射線照射や遺伝子操作により幹細胞を広範囲に傷害させる。一定期間後に蛍光標識を発現する上皮細胞が広く分布することから、成熟分化細胞が脱分化により幹細胞性を獲得し、これが上皮を再構築したと示している。しかし、実際に創傷治癒過程において分化細胞がどのような機序で細胞変容を経ているかを明らかにしていない。例えば、各種成熟分化細胞が細胞分化を逆行するよう各前駆細胞を経て脱分化するのか、または創傷治癒過程に特異的な細胞を経て幹細胞に変化するのか、またその細胞変化を励起する因子は不明である。

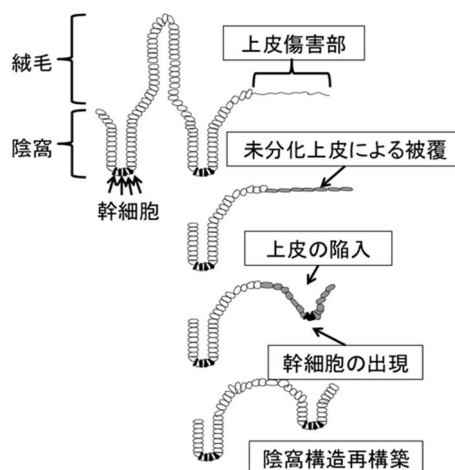
創傷治癒過程における分化細胞が多能性を獲得する機序の解明には、腸上皮傷害直後から始まる細胞変化の全過程を経時的に捉えることが必要であり、これにはどのような上皮傷害モデルを用いるかが重要である。既存のモデルでは傷害発症時点・領域を確実にコントロールできず、また傷害発生時から経時的に特定の細胞を追跡できない。これに対し申請者のグループが報告した機械的上皮剥離モデルでは、傷害発症時点が明確で発症からの経時的観察を可能とし、傷害部辺縁から扁平な細胞が遊走し傷害部を被覆することが確認された(Genes Dev. 2014)。さらに詳細な解析により、傷害部を覆う細胞は上皮細胞を示す Ecadherin を発現するが、腸上皮の成熟分化細胞である吸収上皮細胞、杯細胞、内分泌細胞の各マーカー、Slase、Muc2、chromogranin A が全て陰性であり、かつ腸上皮幹細胞マーカーの Lgr5 も陰性だった。上皮傷害部は数週間後には正常上皮構造を再構築しており、この事実から損傷部辺縁の分化細胞が幹細胞ではない未分化な細胞(以下、“被覆未分化細胞”)を経て幹細胞への脱分化し、その結果、上皮欠損部を修復することが推察された。すなわち分化細胞から被覆未分化細胞への変容、さらに幹細胞に脱分化するまでの詳細な解析が、創傷治癒過程における多能性幹細胞への脱分化機序の解明に寄ると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、創傷治癒過程における上皮細胞の変容を生体内イメージングで捉え、創傷治癒過程で起こる分化細胞から幹細胞への脱分化に特異的な因子を同定することを目的とした。

脱分化や創傷治癒急性期における細胞の挙動は極めて限局的かつ短時間で起こるため、主に *in vitro* で二次元的に研究されてきた。しかし腸上皮の構造は、分化細胞を含み管腔内へ突出する絨毛と幹細胞を含み陥入する陰窩からなる三次元構造である。創傷治癒過程における細胞動態の理解を深めるためには、創傷部を覆った上皮細胞が、いかに陥入構造を形成するかを三次元的に解析することが必要である(右図)。

そのため、本研究では、創傷治癒急性期の細胞動態を *in vivo* イメージングで捕捉するための新しい腸上皮障害マウスモデルを作製し、創傷部に出現する被覆未分化細胞の特異的な因子を網羅的遺伝子解析により同定する。同定したマーカー遺伝子と、腸上皮幹細胞マーカーの Lgr5 を異なる蛍光色素で標識した遺伝子改変マウスを作製する。この遺伝子改変マウスに腸上皮障害を作製し、創傷治癒過程の早期からの *in vivo* イメージングにより、未分化細胞から幹細胞への変容を捉え、その過程に特異的な因子の同定を目指す。



3. 研究の方法

上記を目的とし、以下の方法での研究を計画し、実施した。

(1) 小腸上皮障害マウスモデルの作製

すでに申請者らは、全麻酔下にマウスを開腹し、任意の大腸領域に一期的に上皮を剥離し、その後も生存し続けることが可能な手術技術を確立した(未発表)。この技術では、対象となる大腸領域を挟むように、その口側と肛門側から挿入した2本のカニュレを介した溶液灌流によって、粘膜上皮を一期的に剥離する。本研究においては、既存の遺伝子改変マウスの利便性、術

操作の容易性から小腸を解析することとし、カニューレサイズ、溶液濃度・量・投与速度等を小腸に最適化させる。

(2) レーザーマイクロダイセクションの確立

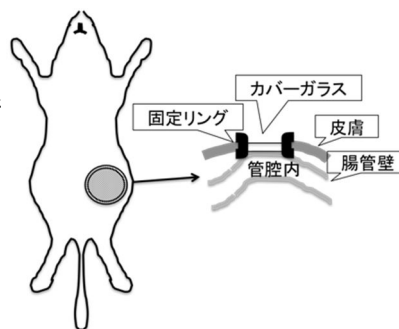
組織切片上に認められた被覆未分化細胞のみを選択的に採集するために、レーザーマイクロダイセクションを採用した。まず、マウスの正常小腸上皮組織切片を用いて、組織固定方法、組織切片の作製、切片の前処理方法、ダイセクション操作、回収組織からの RNA 抽出などの条件検討を行い、品質の保たれた RNA を獲得するプロトコルを確立する。

(3) 被覆未分化細胞の採集

(1) で作製した組織切片に含まれる被覆未分化細胞を、レーザーマイクロダイセクションを用いて選択的に採集する。回収した RNA を用いて PCR を行い、目的の細胞の RNA を得られていることを確認する。さらに、この後の網羅的遺伝子発現解析に向けて RNA を回収する。

(4) in vivo イメージングマウスモデルの作製

(1)-(3) に並行して、右図のようにマウスの腹壁に小腸を体外から観察可能な abdominal imaging window(AIW) を装着させる。AIW を介し、二光子顕微鏡による腸上皮観察技術を安定化させる。



4. 研究成果

本研究期間において、以下の成果を得た。

開腹下に小腸内腔にアプローチする方法を用いて小腸上皮傷害マウスモデルを作製し、さらに閉腹した後一定時間生存することを確認した。上皮傷害作製直後から数日間の任意の複数の時点で解析し、作製した組織切片の免疫染色の結果、24時間後の時点で剥離部位周辺に、各腸上皮分化細胞の分子マーカーがいずれも発現しない被覆未分化細胞を確認した。

レーザーマイクロダイセクション技術により、上皮傷害部に出現する被覆未分化細胞を採集し、回収組織から RNA を抽出した。得られた RNA を用いて PCR を行ない、いずれの分化細胞マーカーが発現していなかった。このことから、目的の被覆未分化細胞を選択的に収集できていることが確認された。一つの上皮障害部に出現する被覆未分化細胞が非常に少ないため、網羅的遺伝子発現解析に十分な量の RNA を回収するため、繰り返し組織回収・RNA 抽出操作を行なった。

小腸上皮の in vivo イメージングに向けて、AIW を介して小腸内腔観察が可能な装着方法、また AIW 装着マウスがこれを脱落させることなく健常な状態で生存する管理・飼養方法の検証と、前述の小腸上皮障害マウスモデルと in vivo イメージング技術を組み合わせ、上皮障害部を体外から観察する技術の開発に着手した。

ここまで得られた成果をもとに、引き続き本研究を継続し、網羅的遺伝子発現解析により被覆未分化細胞のマーカー遺伝子を同定し、この遺伝子改変を行なったマウスを作製して in vivo イメージングを行ない、創傷治癒急性期における上皮再生の動態解析を達成することを目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	中村 哲也 (Nakamura Tetsuya) (70265809)	順天堂大学・大学院医学研究科・特任教授 (32620)	

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