

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15958

研究課題名(和文) 組織幹細胞から見たウシ反芻胃の発達メカニズムの解明

研究課題名(英文) Exploration of tissue stem cells in bovine rumen epithelial and its role in tissue development

研究代表者

鈴木 裕 (Yutaka, Suzuki)

北海道大学・農学研究院・助教

研究者番号：10793846

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)：ウシの栄養獲得の要であるルーメン(反芻胃)は離乳前後の時期から急速に発達するが、どのような細胞群が組織発達に関わるのかといったミクロなメカニズムは明らかではなかった。動物組織の発達や維持においては、組織幹細胞による分化細胞の供給が重要な役割を担っていることから、本研究ではルーメン上皮組織における組織幹細胞の探索と組織発達への関与を検討した。結果として、ルーメン上皮基底層に幹細胞マーカーおよび細胞増殖マーカーを発現する細胞群を見出した。また、細胞増殖活性は離乳前の時期に高いことが明らかになった。従って、この時期に始まる組織幹細胞の増殖活性化により組織発達が引き起こされることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は組織幹細胞という新しい視点を通じてウシの消化機能の根底を担うルーメン組織の成り立ちに迫る初の試みであった。ウシ消化管におけるこのような細胞群の特定は、栄養獲得に重要な消化管の成り立ちに迫る知見であると同時に、研究が開始の途についた非モデル生物における組織幹細胞研究に貢献するものであったと言える。また、作製したルーメン幹細胞の培養技術は、飼料開発における機能性・毒性のプレスクリーニングに容易に応用ができると考えられ、開発過程を効率化する新たな手段として期待される。In vitro実験技術の進展は動物実験の削減につながり、アニマルウェルフェアを考慮した畜産技術の開発への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：The rumen develops rapidly around weaning period in calves, which is induced by short-chain fatty acid and physical stimuli by feed particles in lumen. However, precise mechanism of ruminal development remains unclear. The present study aimed to explore tissue stem cells in the rumen, and also investigate their proliferative ability during the growth of calves. The result showed that the cell population expressing stemness marker of stratified squamous epithelium were specifically observed in stratum basale. Some of these cells expressed cell proliferation markers. The proportion of proliferative cells was higher in suckling calves, compared to weaned calves. To summarize, our data suggested the presence of tissue stem cells in the bovine rumen and its potential contribution to tissue development around weaning period.

研究分野：動物生理学

キーワード：ウシ ルーメン 組織発達 組織幹細胞

1. 研究開始当初の背景

飼料供給の不安定化や畜産による環境負荷への懸念から、動物生産の更なる効率化が求められている。その中で、個体成長への影響が大きい幼齢期に着目した飼育技術の改良へ注目が集まっている。ウシの栄養獲得の根幹を担うルーメン(反芻胃)は、離乳前後の時期に急速に発達し、その後の個体成長に大きな役割を果たす。ルーメン組織の成長を促進する主要な因子は胃内容物に由来する揮発性脂肪酸および物理的刺激であることは以前から報告されていた。しかし、これらの発達促進因子の標的細胞や作用経路といった詳細なルーメン組織の発達メカニズムは明らかではなかった。

一般に動物組織の成長や機能維持では組織幹細胞が細胞の供給源として重要な役割を担っている。従来は再生再生能力が低いと考えられていた成体組織を含め、様々な組織において組織幹細胞が存在することが明らかにされている。申請者は予備研究において、一部の組織幹細胞マーカーがルーメン上皮組織において発現していることを明らかにしており、ウシのルーメンにおいても組織幹細胞が組織発達に関与していると推察される。

2. 研究の目的

ウシのルーメンの発達機序の解明は、元来は人類と食料を競合しない反芻草食動物の栄養獲得機構の成り立ちに迫るとともに、個体成長に重要な幼齢期のパフォーマンスをより高精度に制御する飼育技術の開発に資すると考えられる。本研究では未解明であったウシのルーメン組織の発達機序における組織幹細胞に役割を解明することを目的とした。はじめに、ルーメン上皮組織における組織幹細胞の探索を行った。次に、これらの組織幹細胞(あるいはその候補となる細胞群)が増殖活性を持つのか、またウシの成長に応じて増殖活性に変化があるのかを検討した。さらに、組織幹細胞マーカーの解析から得られた情報を用い、ルーメン上皮細胞の培養技術の確立、改良を行った。これにより、発達過程のルーメンの組織幹細胞がどのような因子やメカニズムで増殖し、組織の発達や分化に寄与するのか明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) ルーメン幹細胞の探索

予備研究にてルーメン上皮組織における遺伝子発現が確認された上皮幹細胞マーカーについて、蛍光免疫染色法により上皮組織内におけるマーカー発現細胞の局在を検討した。また、週齢の異なる成長段階の動物(4週齢, 13週齢および40週齢のホルスタイン種牛)から得た組織サンプルを同じく解析し、マーカー発現細胞の存在量や分布に変化があるのか検討した。

(2) ルーメン上皮細胞の増殖機序の検討

4週齢, 13週齢および40週齢のウシから採取したルーメン上皮組織(1と同じサンプル)について細胞増殖マーカーの免疫染色を行った。さらに、顕微鏡下で基底層の全細胞数に対するマーカー発現細胞数の割合を求めた。また、qPCR法で測定した遺伝子発現量間の相関解析から、基底層細胞の細胞増殖をサポートする因子を検討した。

(3) 組織幹細胞の培養系の構築と最適化

幹細胞マーカーの発現解析から明らかになったシグナル物質を用いて、細胞増殖活性を保持したまま2次元培養が可能となる培養系の作製を行った。具体的には、各シグナル物質やその阻害剤、および培養容器のコーティングについて多種類の条件を設定し、離乳前後の週齢の子ウシから採取したルーメン上皮細胞の生着と、その後の増殖活性をHoechst染色による細胞内DNA量の定量によりモニターした。

4. 研究成果

(1) ルーメン幹細胞の探索

ルーメン上皮組織の免疫染色による解析の結果、重層扁平上皮組織であるルーメン上皮の基底層において、TP63、SOX2およびIntegrinを発現する細胞が多数存在していた。これらの中で、特にIntegrin発現細胞は基底層に特異的に局在していた。一方で、週齢の違いによりこれらのマーカータンパク質の発現や局在に顕著な差異は見られなかった。以上より、ルーメン上皮基底層において重層扁平上皮組織幹細胞マーカーを発現する細胞群が存在することがはじめて明らかになった。

(2) ルーメン上皮細胞の増殖機序の検討

免疫染色の結果、ルーメン上皮基底層においてKI67発現細胞が局在することが明らかになった。また、その存在割合は13週齢と40週齢と比較して4週齢において有意に高かった。遺伝子発現量の相関解析の結果、各種のLaminin遺伝子と増殖細胞マーカーの間には有意な正の相関がみられた。このことから、離乳前の時期の基底層における活発な細胞増殖により、ルーメンの

組織発達が促進される可能性が示唆された。また、この増殖活性は組織中の Laminin により促進されることが示唆された。

(3) 組織幹細胞の培養系の構築と最適化

検討した物質および培養条件の中で、Laminin の培養容器へのコーティングがルーメン上皮細胞の生着および増殖を強く促進することが明らかになった。また、その効果には Laminin アイソフォーム間で差があることが明らかになった。したがって、ルーメン上皮基底膜に存在すると考えられる Laminin が、Integrin との結合を介して基底細胞の増殖を促進することが示唆された。

本研究から、まずルーメン上皮組織において組織幹細胞であると予想される細胞群が存在し、上皮基底層に特異的に分布することが明らかになった。これらの細胞群の一部は増殖活性を持ち、特に離乳前の若いウシにおいて多数存在することが明らかになった。これらの結果から、離乳前の時期に始まる組織幹細胞の増殖活性化によりルーメン上皮の発達が引き起こされることが示唆された。また、上皮組織における Laminin の発現量は細胞増殖活性と強く相関しており、培養試験においてもルーメン上皮細胞の増殖を促進した。したがって、組織幹細胞を含むと考えられる基底細胞の増殖は Laminin - Integrin 経路によりサポートされていることが示唆された。本研究により、未解明であったルーメン組織の急速な発達を引き起こすメカニズムの一端が明らかになった。

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 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yutaka Suzuki, Rie Mizutani, Satoshi Koike and Yasuo Kobayashi
2. 発表標題 Exploration of undifferentiated cells in bovine rumen epithelial tissue
3. 学会等名 International Symposium on Ruminant Physiology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rie Mizutani, Satoshi Koike, Yasuo Kobayashi and Yutaka Suzuki
2. 発表標題 The rumen basal layer cells express esophageal undifferentiated cell markers
3. 学会等名 The 12th China-Japan-Korea Joint Symposium on Rumen Metabolism and Physiology (国際学会)
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
---------	---------