

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：21401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06032・19K21169

研究課題名(和文) 肉用鶏と採卵鶏の比較によるパネート細胞の機能解明と腸管幹細胞成長因子の同定

研究課題名(英文) Identification of intestinal stem cell related growth factors and paneth cell function on the chicken

研究代表者

伊藤 謙 (Ito, Ken)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：30818604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリの腸管ではWnt3とWnt3aが発現が認められず、マウスのパネート細胞で確認されているMmp7、CD24、EphB3、Lysozymeの発現が認められたことから、ニワトリのパネート細胞はWnt3の分泌を行っていない可能性が示唆された。また、Wnt3の代替のWntとしてWnt2bに着目し、細胞の局在を調査したところ、マウスでは筋線維芽細胞からWnt2bが分泌されるどころ、ニワトリではパネート細胞以外の腸上皮細胞から分泌される可能性が示唆された。肉用鶏と採卵鶏の間にWntシグナル制御の違いは認められなかったが、マウスとは違う機構の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管上皮細胞の研究では、腸陰窩(クリプト)に存在するパネート細胞が着目されている。パネート細胞は抗菌物質であるLysozymeや、成長因子であるWnt3aやEGFを分泌し、Lgr5陽性細胞を保護すると同時に細胞周期を調整する。さらに栄養状態とパネート細胞の関連が明らかとなっている。パネート細胞が摂取した食物のカロリーを感知し、幹細胞の増殖や分化を制御することが明らかとなっている。これまでニワトリはパネート細胞を持たない動物として挙げられていたが、近年ニワトリでもパネート細胞が存在することが報告されている。ニワトリでも栄養状態とパネート細胞の機能を明らかにすることで、生産性の向上が可能となる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, Wnt3 and Wnt3a were not expressed in the chicken intestine, and expression of Mmp7, CD24, EphB3, and Lysozyme, which was confirmed in Paneth cells of mice, was observed. These results suggested that chicken's Paneth cells don't secrete Wnt3 and Wnt3a.

In addition, focusing on Wnt2b as an alternative Wnt3 and investigating cellular localization. It is known that Wnt2b was secreted from myofibroblasts in mice intestine. However, in the present study, it is suggested that Wnt2b is secreted from intestinal epithelial cells other than Paneth cells in the chicken's intestine. No difference in the Wnt signaling regulation was observed between the broiler and hens, but there is the existence of a mechanism different from that in the mouse.

研究分野：家畜飼料学

キーワード：腸上皮細胞 パネート細胞 Wntシグナル ニワトリ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小腸の腸管上皮細胞は吸収上皮細胞、杯細胞、内分泌細胞およびパネート細胞の4種類の分化した細胞と腸管幹細胞である Lgr5 陽性幹細胞から構成されている (Schuijers and Clevers, 2012.)。近年、腸管上皮細胞の研究では、腸陰窩 (クリプト) に存在するパネート細胞が着目されている。パネート細胞は抗菌物質である Lysozyme や、成長因子である Wnt3a や EGF を分泌し、Lgr5 陽性細胞を保護すると同時に細胞周期を調整する。さらに栄養状態とパネート細胞の関連が明らかとなっている。パネート細胞が摂取した食物のカロリーを感知し、制限給餌の状態では幹細胞の細胞分化を抑制する。逆に飽食環境下では栄養素吸収細胞等への分化を促進する (Yilmaz *et al.*, 2012.)。これまでニワトリはパネート細胞を持たない動物として挙げられていたが、近年ニワトリでもパネート細胞が存在することが報告されている (Wang *et al.*, 2016.)。ニワトリでも栄養状態とパネート細胞の機能を明らかにすることで、ニワトリの生産性の向上が可能となる。

マウスやラット等のパネート細胞を持つ動物の特徴として、腸管上皮細胞の三次元培養法である腸管オルガノイドの培養の際に、培地中に Wnt3a の添加を必要としないことが挙げられる。実際、パネート細胞の存在が明らかになったニワトリでも Wnt3a の添加無しで腸管オルガノイドの培養が可能であったとの報告がされている (Pierzchalska *et al.*, 2012.)。これまでに、ニワトリ腸管オルガノイド培養において Wnt3a が必要か否か調査するために、Wnt3a 添加した培地と Wnt3a 無添加の培地で培養を試みたところ、Wnt3a 無添加区では培養3日目以降で腸管オルガノイドが減少し、培養4日目以降で死滅した。しかし、Wnt3a 添加区では、7日目以上の培養が可能であった (図1)。

先行研究と本研究の相違点は、先行研究では肉用鶏を用いており、本研究では採卵鶏を用いている点であった。また、パネート細胞の存在が確認されたニワトリは採卵鶏ではなく肉用鶏であり、同定方法は Lysozyme に対する免疫染色のみで Wnt3a や EGF などの成長因子については調査されていない。

以上から、採卵鶏ではパネート細胞からの Wnt3a 分泌量が少ない、または全く分泌されていないことが予想された。そこで、採卵鶏の腸管内で Wnt3a が分泌されているか否か明らかにするために、腸管上皮細胞 (粘膜上皮) と腸管上皮細胞を支える基底膜からそれぞれから総 RNA を抽出し、PCR を行った。その結果、ニワトリの腸管では Wnt3 や Wnt3a は分泌されないことが示唆され (図2)、肉用鶏と採卵鶏ではパネート細胞の機能が異なり、他のタイプの Wnt が分泌されているか、代替の成長因子の存在が予想された。

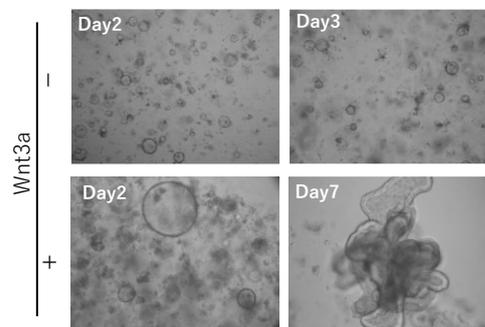


図1. Wnt3a 添加有無での培養

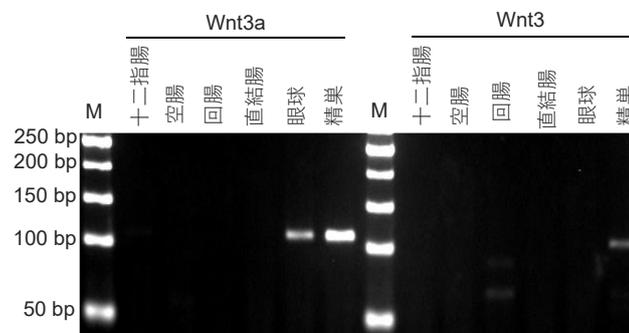


図2. ニワトリ腸管における Wnt3 および Wnt3a の発現

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、本研究ではマウスのパネート細胞マーカーを参考に鶏パネート細胞マーカーの同定を試みると同時に、Wnt3a に代替される Wnt の探索を行うことを目的とした。また、同定した Wnt3a に代替される Wnt を合成し、腸管オルガノイドに用いることで同定した Wnt の腸管幹細胞への作用を調査することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 6ヶ月齢の単冠白色レグホン種の雄から腸管を採取し、十二指腸、空腸、回腸、直結腸から Total RNA を抽出し、マウスのパネート細胞マーカーとされている Mmp7、CD24、EphB3、Lysozyme をターゲットとしたプライマーを設計し、PCR を行った後、アガロース電気泳動によりバンドの確認を行った。

(2) バンドが確認されたマーカータンパク質に対する抗体を用いて蛍光免疫組織染色 (IHC) を行い、パネート細胞の局在の確認を行った。

(3) 代替となる Wnt として Wnt2b が報告されており、筋線維芽細胞から Wnt2b が分泌されることが報告されている。Wnt2b の発現を確認すると共に発現量の定量を RT-qPCR により明らかにし、IHC により Wnt2b 分泌細胞の同定を行った。また、Wnt シグナルに関与する R-spondins、Noggin についても同様に RT-qPCR を試みと同時に肉用鶏と採卵鶏との比較を行った。

(4) ニワトリ Wnt2b、R-spondin2、Noggin を発現する一過性発現細胞を作成し、腸管オルガノイド培養へ用いることを試みた。具体的には Chicken Wnt2b、R-spondin、Noggin の DNA を合成後、pCAGGS ベクターにライゲーションし、HEK293T 細胞へ PEI によりトランスフェクションを行った。上清へのリコンビナントタンパク質の分泌を Westernblot により確認を行った。

4. 研究成果

(1) パネート細胞マーカーをターゲットとした PCR を行った結果、Mmp7、CD24、EphB3、Lysozyme の発現が十二指腸、空腸、回腸、直結腸の全ての腸管で確認された(図 3)。

(2) 次に、EphB3 を除くすべてのパネート細胞マーカーに対する抗体を用いて蛍光免疫組織染色を行った。その結果、CD24 は染色されず、Lysozyme は腸上皮細胞全体が染色された。Mmp7 はシグナルが微弱なものの、陽性を示す腸上皮細胞が認められた。

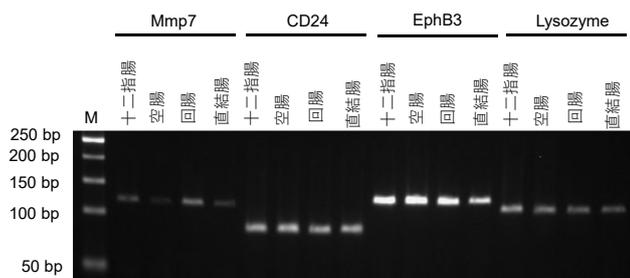


図 3. ニワトリ腸管におけるパネート細胞マーカー発現

(3) Wnt2b、R-spondin1、R-spondin2、R-spondin3、Noggin をターゲットとし、RT-qPCR を行った結果、肉用鶏と採卵鶏の間に有意な差は認められなかった(図 4)。肉用鶏と採卵鶏よりも腸管の発達が著しく早いですが、本研究で調査した遺伝子が腸管発達に関与した可能性は低いと考えられた。

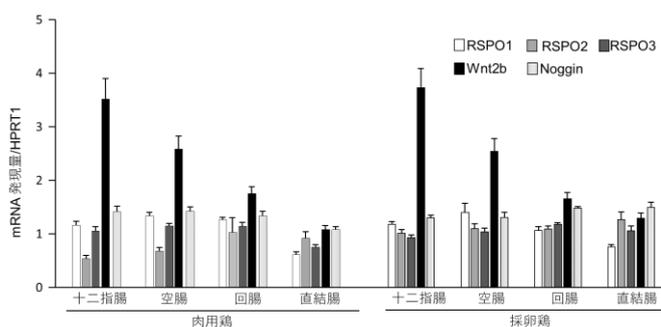


図 4. 腸管における Wnt2b、RSPOs および Noggin の発現量比較

Wnt2b は筋線維芽細胞から分泌されているため、Wnt2b と筋線維芽細胞マーカーである α -SMA と共染色を行った。その結果、Wnt2b 陽性細胞は α -SMA 陽性細胞と局在は一致しなかった。また、Wnt2b とパネート細胞マーカーである Mmp7 の共染色を行ったが、両者は一致しなかった(図 5)。以上から、ニワトリ腸管における Wnt2b 分泌は筋線維芽細胞ではなく、パネート細胞以外の腸上皮細胞から分泌される可能性が示唆された。

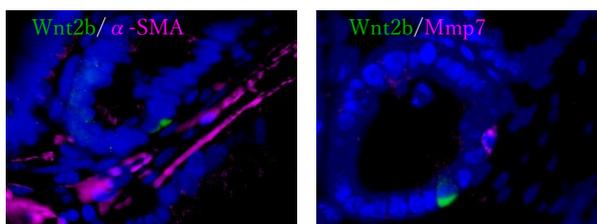


図 5. Wnt2 分泌細胞の局在

(4) Chicken Wnt2b、R-spondin、Noggin のリコンビナントタンパク質の作出を試みたが、トランスフェクション後の HEK293T 細胞培養上清中からリコンビナントタンパク質は検出されなかった。

本研究では、肉用鶏と採卵鶏の間に Wnt シグナル制御の違いは認められなかったが、ニワトリの腸管はマウスとは異なる Wnt 制御が行われており、主に Wnt2b により制御されている可能性が示唆された。また、Chicken Wnt2b のリコンビナントタンパク質の合成時には本研究とは異なるトランスフェクション法とプラスミドを検討する必要があることが示唆された。

<引用文献>

- ① Schuijers and Clevers, EMBO J, 31: 2685-2696. 2012.
- ② Yilmaz *et al.*, Nature, 28: 490-495. 2012.
- ③ Wang *et al.*, Poult Sci, 95: 1631-1635. 2016.
- ④ Pierzchalska *et al.*, Biotechniques, 52: 307-315. 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤謙、佐藤勝祥、渡邊潤、横尾正樹、藤盛和子、西向めぐみ
2. 発表標題 ニワトリ腸管におけるWntシグナルの制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
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
--	---------------------------	-----------------------	----