

令和 5 年 5 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07358

研究課題名(和文) 腸上皮細胞の寿命制御に関わる分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis of the regulation of intestinal cellular lifespan

研究代表者

小谷 武徳 (Kotani, Takenori)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：40455960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腸上皮細胞はLgr5 陽性腸幹細胞から継続的に再生されるが、成熟した腸上皮細胞の寿命は比較的短く、その適切な制御は腸の恒常性を維持する上で重要であると考えられている。本研究では、受容体型プロテインキナーゼの下流分子であるmTORC1やRas が 腸幹細胞の維持に重要なWnt シグナル伝達経路を阻害し、Lgr5 陽性腸幹細胞の数を減少させることを見出した。これらの成果から、mTORC1およびRasとWntシグナル伝達経路の間のクロストークが、腸上皮細胞の恒常性を制御しており、腸疾患の発症とその治療にとっても重要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸上皮細胞の寿命制御メカニズムについて理解することを目的とした本研究の成果は、学術的に未解決な問題である「細胞寿命の制御機構の解明」に寄与する。一方で近年、食の欧米化に伴って我が国でも増加傾向のある炎症性腸疾患や大腸がんなどの発症機構の理解にも本研究の成果は寄与する。そのため本研究の成果はこれらの腸疾患の診断法や治療法を開発する上で有力な情報を提供することが想定される。

研究成果の概要(英文)：Intestinal epithelial cells (IECs) are continuously regenerated from Lgr5-positive intestinal stem cells (ISCs). The life-span of matured IECs is relatively short, and its proper regulation is important for maintaining homeostasis of intestine. In this study, we found that the downstream molecules of receptor protein kinases such as mTORC1 and Ras inhibited Wnt signaling pathway which was important for maintaining the stemness of ISCs, and reduced the number of Lgr5-positive ISCs. We believe that cross-talk between mTORC1 or Ras and Wnt signaling pathway is important not only for proper regulation of IEC homeostasis but for the development of intestinal diseases and potentially for their therapy.

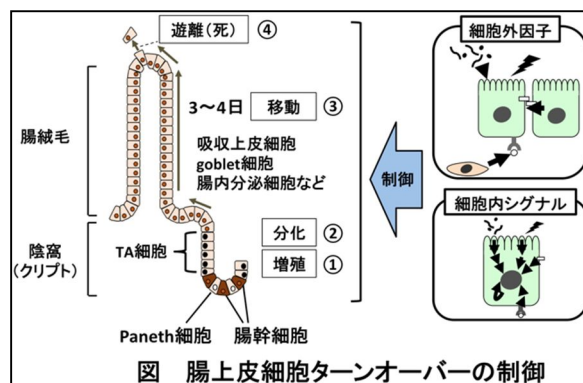
研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：腸上皮細胞 細胞寿命 mTORC1 Tsc2 Ras CD47

### 1. 研究開始当初の背景

個々の組織を構成する細胞は、それぞれ固有の寿命(最終分化を遂げた成熟細胞が死滅するまでの期間)をもつことが知られている。ヒトやマウスの成体において最も寿命が短い細胞の代表は腸上皮細胞であり、最終分化後から死までの期間は3~4日程度である。一方、最も寿命の長い細胞は神経細胞であり、ヒトの場合は個体の寿命と同程度の数十年の寿命を持つ。その他の細胞では、皮膚ケラチノサイトで約1ヶ月、赤血球で約4ヶ月の寿命をもつことなどもヒトの場合知られる。しかし、この多様な細胞の寿命決定のメカニズムについては、教科書的にも記述がなく、生物学上の未解決な問題である。また細胞の寿命は、その細胞が構成する組織・臓器の恒常性の維持や機能を発揮する上で、生物学的な必然性に基づき定まっているはずであるが、その必然性さえも解明されていない。その主な原因の一つとしては、各細胞の生涯を観察することの難しさが挙げられる。

そこで研究代表者は、まずは細胞の生涯を比較的容易に観察することの出来るマウスの小腸上皮細胞をモデルとした解析を進めてきている。ヒトやマウスの小腸においては、古い腸上皮細胞が新しい細胞に入れ替わるターンオーバーが常に起きており、上でも述べた様に腸上皮細胞は3~4日で寿命を迎える(図)。腸上皮細胞のターンオーバーは、腸絨毛下端のクリプトに存在する腸幹細胞より分化した一過性増殖細胞(TA細胞)として増殖、さらに成熟した数種類の腸上皮細胞(吸収上皮細胞やgoblet細胞、Paneth細胞、腸内分泌細胞など)に分化、Paneth細胞以外の腸上皮細胞は腸絨毛の頭頂部へと移動、



細胞死により腸絨毛先端より遊離して死滅するという過程により起こるが(図)、どのような分子機序を介してこの腸上皮細胞の寿命が制御されているのかについては十分に明らかにされていない。研究代表者は本研究開始当初までに「Ras-MAPK」や「Srcファミリー」や「mTORC1」を介した細胞内シグナルが小腸上皮細胞の寿命を制御するシグナルとして機能することを明らかにしてきたが(Yamashita, 責任著者 Kotani et al., PLoS One, 2014; Imada, Kotani et al., Mol. Cell. Biol., 2016; Setiawan, Kotani et al., Kobe J Med Sci, 2019) これらの細胞内シグナルがどのようにして腸上皮細胞の寿命を制御しているのかについて不明な点が残っている。さらに、腸絨毛先端に存在する古くなった腸上皮細胞はなんらかの自律的な「老化シグナル」により細胞を死に至らしめている可能性があるが、この「老化シグナル」自体やそれがどのように細胞寿命を制御するかについても明らかでない。

一方で、ターンオーバーによる腸上皮細胞の寿命制御が生体にとって重要である根拠として、腸絨毛先端で起こる腸上皮細胞の細胞死が抑制された Caspase-8 ノックアウトマウスは腸炎を発症することが挙げられる(Gunther et al, Nature, 2011)。また、家族性大腸腺腫症の原因遺伝子 Apc を腸上皮細胞において欠損したマウスでは、腸上皮細胞の移動速度の低下が腸絨毛において認められており(Andreu et al, Development, 2005) 腸上皮細胞のターンオーバーによる寿命制御機構の解明は腸炎やがんの発症機構の理解や、それらの治療法・診断法の確立に寄与することが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究開始前までに得られている研究代表者独自の研究成果を基盤として腸上皮細胞の寿命制御に関わる分子基盤の解明を目的とする。また、腸上皮細胞の寿命制御に関わる分子の異常が腸炎やがんといった腸疾患の病態に関わるかについても明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス大腸の腸上皮細胞の寿命制御における mTORC1 シグナルの役割

mTORC1 の負の制御因子である Tsc2 を腸上皮細胞において特異的に欠損させた腸上皮細胞特異的 Tsc2 コンディショナルノックアウトマウス(Tsc2 CKO マウス)に、BrdU を投与することで腸上皮細胞をラベルし、免疫組織化学的な解析によって Tsc2 欠損と大腸上皮細胞の寿命の関係を調べた。また、生化学的解析により Tsc2 欠損によって変動する大腸上皮細胞内のシグナルについて調べた。さらに腸幹細胞特異的に蛍光タンパク質 GFP を発現する Lgr5-GFP マウスと Tsc2 CKO マウスを交配することによって得たマウスや、Wnt ターゲット遺伝子を対象とした qPCR 法によって Tsc2 欠損が大腸の腸幹細胞や Wnt シグナルに与える影響を調べた。さらに、大腸上皮細胞のオルガノイド培養における Tsc2 欠損の影響を調べた。一方で、Tsc2 欠損と大腸炎の関係性を調べるために、Tsc2 CKO マウスにデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導性腸炎モデル実

験を行なった。

#### (2) 腸上皮細胞の恒常性制御における Ras シグナルの役割

腸上皮細胞特異的に活性化型 K-Ras を発現させたマウス (IEC-RasDA マウス) の小腸及び大腸について免疫組織化学的な解析を行い、K-Ras 活性と腸上皮細胞の増殖・分化及び寿命の関係性を調べた。さらに、小腸の腸オルガノイド培養における K-Ras 活性化の影響を調べた。また、Lgr5-GFP マウスと IEC-RasDA マウスを交配することによって得たマウスや、Wnt ターゲット遺伝子を対象とした qPCR 法によって K-Ras 活性が腸幹細胞や Wnt シグナルに与える影響を調べた。

#### (3) 腸上皮細胞の寿命制御における膜型分子 CD47 の役割

膜型分子 CD47 は赤血球の寿命を制御する可能性が示唆されている。そこで、腸上皮細胞の寿命制御における CD47 の生理機能について明らかにすることを目的として腸上皮細胞特異的 CD47 コンディショナルノックアウトマウス (CD47 CKO マウス) の小腸及び大腸について免疫組織化学的な解析を行なった。また、大腸上皮細胞のオルガノイド培養における CD47 欠損の影響を調べた。さらに、腸上皮細胞の幹細胞性維持に重要な Wnt シグナルへの CD47 欠損の影響を qPCR 法により調べた。

一方でこれらの実験と並行して、大腸がんモデルマウスである Apc Min/+マウスと CD47 CKO マウスを交配によって得られたマウスを用い、腸での腺腫形成と CD47 の関係性についても解析を進めた。

### 4. 研究成果

#### (1) マウス大腸の腸上皮細胞の寿命制御における mTORC1 シグナルの役割

mTORC1 の負の制御因子 Tsc2 を腸上皮細胞において特異的に欠損させた Tsc2 CKO マウスを用いた解析を進めたところ、大腸上皮細胞での Tsc2 欠損は mTORC1 の活性を上昇させ、大腸上皮細胞の増殖を亢進させることを明らかにした。一方で、大腸上皮細胞における Tsc2 欠損は Akt や Gsk3 のリン酸化も減少させると同時に Wnt ターゲット遺伝子の発現を減少させ、Lgr5 陽性腸幹細胞の数も減少させた。大腸上皮細胞のオルガノイド培養における Tsc2 欠損の影響を調べたところ、Tsc2 CKO マウス由来の大腸オルガノイドは成長の促進が認められた。最後に Tsc2 CKO マウスに DSS 誘導性腸炎モデル実験を行なったところ、コントロールマウスに比べ Tsc2 CKO マウスでは腸炎が重篤化することを見出した。以上のことから、大腸上皮細胞における mTORC1 活性は Wnt シグナルを低下させることで幹細胞数を減少させる一方で大腸上皮細胞の増殖を亢進させることでターンオーバー (入れ替わり) を促進し (つまり mTORC1 活性は大腸上皮細胞を短命化させる) それにより大腸の恒常性を維持している可能性が考えられた。以上の成果については Scientific Reports 誌にて公表した。

#### (2) 腸上皮細胞の恒常性制御における Ras シグナルの役割

腸上皮細胞特異的に活性化型 K-Ras を発現させた IEC-RasDA マウスの小腸及び大腸について解析を進めたところ、腸上皮細胞の増殖が亢進しており、腸上皮の hyperplasia を認められた。また IEC-RasDA マウスにおいては粘液を産生する goblet 細胞の数が顕著に増加しているのに対し、抗菌ペプチドなどを産生する Paneth 細胞の数は顕著に減少していた。IEC-RasDA マウス由来の腸オルガノイドについてはコントロールマウスに比べて成長が促進していた。しかしその一方で、IEC-RasDA マウスのクリプトにおいては Wnt ターゲット遺伝子の発現が減少しており、Lgr5 陽性腸幹細胞の数も減少していた。以上のことから、腸上皮細胞における K-Ras 活性は腸上皮細胞の増殖や goblet 細胞への分化を促進させるのに対し、Wnt シグナルに対しては抑制的に機能し、それにより腸上皮細胞の恒常性を適切に制御していると考えられた。以上の成果については Plos One 誌にて公表した。

#### (3) 腸上皮細胞の寿命制御における膜型分子 CD47 の役割

腸上皮細胞特異的に CD47 を欠損させた CD47 CKO マウスの小腸及び大腸について解析を進めた。その結果、小腸においては CD47 欠損の影響を見出せなかったが、CD47 CKO マウスの大腸においては腸上皮細胞の増殖が亢進していることや、大腸上皮細胞が短命化している可能性を見出した。CD47 CKO マウス由来大腸オルガノイドを培養し、観察したところ、CD47 CKO マウス由来大腸オルガノイドはコントロールマウス由来大腸オルガノイドと比べて生存率の増加が認められることを明らかにした。このことから CD47 CKO マウスの大腸における腸上皮細胞の短命化は、大腸の腸上皮細胞が腸管内腔側へと移動し、そこで抜け落ちるというターンオーバーが促進しているために起きている可能性が高いと考えられた。

これらの実験と並行して、腸での腺腫形成と CD47 の関係性について解析を進めるために家族性大腸腺腫症の原因遺伝子 Apc に変異のある Apc Min/+マウスと CD47 CKO マウスを交配によって得られたマウスについて解析を開始した。その結果、CD47 の有無は Apc Min/+マウスにおける腺腫の形成や個体の寿命に影響を与えていなさそうだという予備的な実験結果を得ている。

## 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 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kotani Takenori, Ihara Noriko, Okamoto Saki, Setiawan Jajar, Konno Tasuku, Saito Yasuyuki, Murata Yoji, Matozaki Takashi	4. 巻 16
2. 論文標題 Role of Ras in regulation of intestinal epithelial cell homeostasis and crosstalk with Wnt signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0256774
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0256774	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 該当する

1. 著者名 Kotani Takenori, Setiawan Jajar, Konno Tasuku, Ihara Noriko, Okamoto Saki, Saito Yasuyuki, Murata Yoji, Noda Tetsuo, Matozaki Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Regulation of colonic epithelial cell homeostasis by mTORC1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-70655-1	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 該当する

1. 著者名 Matozaki Takashi, Kotani Takenori, Murata Yoji, Saito Yasuyuki	4. 巻 112
2. 論文標題 Roles of Src family kinase, Ras, and mTOR signaling in intestinal epithelial homeostasis and tumorigenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 16～21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14702	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小谷 武徳
2. 発表標題 Srcファミリーキナーゼ、Ras、mTORC1シグナルによる腸上皮細胞の恒常性制御
3. 学会等名 第5回 徳島大学統合的がん創薬クラスター合同オンラインミーティング
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小谷 武徳、高井 智子、齊藤 泰之、村田 陽二、的崎 尚
2. 発表標題 マクロファージによる生細胞貪食を制御する分子基盤の解明
3. 学会等名 第10回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小谷 武徳、井原 紀子、ジャジャル セティアワン、岡本 沙樹、齊藤 泰之、村田 陽二、的崎 尚
2. 発表標題 腸上皮細胞の増殖・分化制御におけるK-Ras活性の役割
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小谷 武徳、岡本 沙樹、村田 陽二、齊藤 泰之、的崎 尚
2. 発表標題 Srcファミリー-raf、Ras、mTORC1シグナルによる腸上皮細胞の恒常性制御
3. 学会等名 第19回生体機能研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小谷 武徳、井原 紀子、ジャジャル セティアワン、岡本 沙樹、齊藤 泰之、村田 陽二、的崎 尚
2. 発表標題 腸上皮細胞の増殖・分化制御におけるK-Ras活性の役割
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takenori Kotani, Saki Okamoto, Yoji Murata, Yasuyuki Saito, Takashi Matozaki
2. 発表標題 Roles of Shp2-Ras, Src family kinases, and mTOR signaling in intestinal epithelial homeostasis
3. 学会等名 14th International Conference on Protein Phosphatase (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

神戸大学大学院医学研究科 生化学・分子生物学講座 生体シグナル制御学部門 <a href="https://www.med.kobe-u.ac.jp/tougou/signal/Home.html">https://www.med.kobe-u.ac.jp/tougou/signal/Home.html</a>
---

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		
インドネシア	ガジャマダ大学		