

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：21401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15694

研究課題名(和文)ニワトリ腸管陰窩におけるパネート細胞および腸上皮細胞の生理機能解明

研究課題名(英文)Elucidation of the physiological functions of chicken's paneth cells and intestinal epithelial cells in the intestinal crypt

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：鶏のパネート細胞に関する報告はほとんどなく、その局在および生理機能についても不明である。そこで鶏腸管内におけるパネート細胞の局在をIHCで試みたが、既存のパネート細胞マーカーに対する抗体ではシグナルの弱さと自家蛍光の強さにより検出が困難であった。そこで自家蛍光の抑制法を模索すると同時にシングルセル解析を試み、シグナル強度の強いマーカーの探索を試みた。結果として自家蛍光の減衰は可能であったものの、完全に抑制することはできず、弱いシグナルに対して有効打とはなり得なかった。シングルセル解析では、クリプトの細胞の単離までは可能であったが、シングルセル化に課題があり、シーケンス解析までは至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸上皮細胞の一つであるパネート細胞は、腸管幹細胞に隣接しており、抗菌物質および成長因子を分泌することで腸幹細胞の保護および増殖・分化を制御している。近年では栄養素に対する応答への関与も示唆されている。しかし、鶏のパネート細胞に関する報告はほとんどなく、その局在および腸管細胞への関与についても不明である。鶏腸管内のパネート細胞の局在を明らかにし、生理学的役割を把握することで、栄養成分および病原体への応答機構が明らかとなり、生産性を高めた飼料、飼養手法の開発に繋がる。

研究成果の概要(英文)：There are few reports on chicken paneth cells, and their localization and physiological function are unknown. Therefore, I tried to localize paneth cells in the chicken intestine by IHC, but it was difficult to detect them with the existing antibodies against paneth cell markers due to the weak signal and the strength of autofluorescence. Based on the above, we searched for a method for suppressing autofluorescence, and tried single-cell analysis for searching markers with strong signal intensity.

As a result, although autofluorescence could be attenuated, it could not be completely suppressed and could not be effective against weak signals. In single-cell analysis, it was possible to isolate crypt-derived cells, but there was a problem in single cellization from the cell population.

研究分野：家畜栄養学

キーワード：鶏 腸上皮細胞 パネート細胞 腸管陰窩

## 1. 研究開始当初の背景

パネート細胞は腸管陰窩の腸幹細胞に隣接しており、EGF、Wnt およびその他のサイトカイン類または Lysozyme 等の抗菌タンパク質を分泌することで幹細胞の保護および増殖・分化を調節している。マウスやヒトなどの哺乳類ではパネート細胞の局在およびその機能について明らかになっているが、鶏においてはパネート細胞についての報告ほとんどない。近年、Wang ら<sup>①</sup>や Nash ら<sup>②</sup>が鶏腸管においてもパネートの存在の可能性と類似した遺伝子発現を示すことが報告されている。哺乳類と鶏の共通または類似した遺伝子をターゲットを利用することで、鶏におけるパネート細胞の局在を把握できる可能性が高い。鶏の腸管内パネート細胞の役割を把握することで、栄養成分および病原体への応答機構が明らかとなり、生産性を高めた飼料、飼養手法の開発に繋がる。

## 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、本研究では、鶏腸管におけるパネート細胞の局在を免疫組織化学染色(IHC)により明らかとするとともに、その生理学的な役割を明らかとすることを目的とした。しかし、研究の遂行中、ニワトリのパネート細胞の検出時に陽性だと判断されたシグナルが自家蛍光である可能性が浮上したため、自家蛍光の消失法の検討ならびに鶏パネート細胞マーカーの探索の為にシングルセル解析を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) パネート細胞マーカーをターゲットとした鶏腸管における IHC の検討

3週齢の鶏から腸管を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液に16時間、4℃で固定後、10-30%スクロース溶液に4℃下で浸漬した。浸漬後の腸管サンプルを OCT コンパウンドに包埋後、-80℃にて凍結した。8µm で薄切した切片を用いてパネート細胞マーカーである MPTX、MMP7 および Wnt6 をターゲットとした IHC を行った。

### (2) 自家蛍光の抑制

3週齢の鶏から腸管を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液に4℃、24時間浸漬後、70%エタノール中で保存し、脱水処理後にパラフィンブロックを調製した。4µm で薄切した切片を脱パラフィン処理した後、TrueVIEW®(Vector 社)および TrueBlack®(Biotium 社)のクエンチング試薬で自家蛍光をマスクした。

### (3) シングルセルの単離手法の確立

5ヶ月齢の鶏から回腸を採取し、氷冷 PBS で洗浄後、PBS 中で4℃下、一晚静置した。2.5mM EDTA 溶液中で振とう後、クリプトを回収した。回収したクリプトを TrypLE™ Select(ThermoFisher Scientific 社)で37℃、10分間処理し、0.04%BSA/PBS に懸濁した後、40µm ストレーナーに通した。10%FBS DMEM/F12 で洗浄し、再度細胞を懸濁し、生存率を測定した。細胞懸濁液を anti-EpCAM rabbit polyclonal antibody(ab231223, abcam 社)で標識し、Anti-Rabbit IgG MicroBeads(Miltenyi Biotec 社)と MACS® Manual Separators を用いて上皮細胞を単離した。得られた細胞懸濁液中の細胞生存率を確認後、Smart Aliquoter(SCSAS-CE064-05、NT サイエンス合同会社)を用いてシングルセル化を行った。

## 4. 研究成果

### (1) パネート細胞マーカーによる IHC

パネート細胞マーカーである MPTX をターゲットとして免疫化学染色を試みたところ、マウスの回腸では MPTX 陽性細胞が確認され、鶏のクリプトにおいても陽性細胞がみとめられたが数が極端に少なかった(図1)。次に、別のパネート細胞マーカーである MMP7 と MPTX の共染色を試みたが、上皮細胞ではなく、粘膜固有層において陽性細胞が認められた(図2)。パネート細胞は Wnt6 を分泌することが知られているため、Wnt6 をターゲットとした IHC を試みた。その結果、ほとん

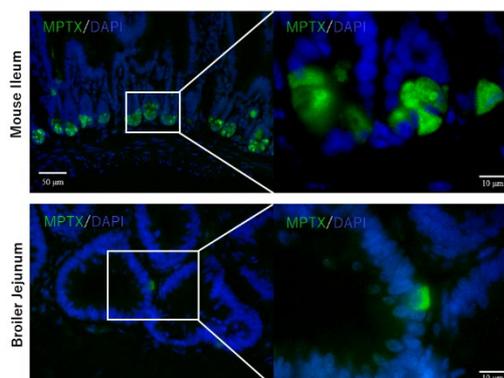


図1. MPTX をターゲットとした IHC

どが粘膜固有層において蛍光がみとめられ、いくつかの腸上皮で陽性細胞が認められた(図3)。しかし、陽性細胞数の少なさ、シグナル強度の低さから、自家蛍光である可能性が捨て切れず、パネート細胞であると断定までは至らなかった。鶏の腸上皮においてパネート細胞マーカーである PNLIP、CLPS、LYZ、LYZ2、MMP7、CD24、TSPAN1、GUCA2A の発現が認められているが<sup>①</sup>、これまでの試験

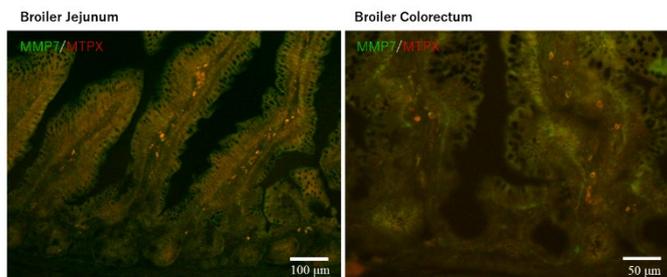


図2. MMP7・MPTXをターゲットとしたIHC

では、どの抗体も鶏では使用できなかった。また、本研究で使用した以外のパネート細胞マーカーは、そもそも鶏で使用可能である抗体が存在しない、または哺乳類でも使用できる抗体が存在しないため、In situ hybridization(ISH)等の他のツールによる検出法を確立する必要がある。また、凍結切片では切片の厚さを薄くすることが難しいため、細胞の重なりを防ぐことができず、シグナル検出の妨げとなった。今後、パラフィン切片による薄切により細胞の重なりを防ぎつつ、なる。今後、FISHを行う際にも自家蛍光が検出の妨げとなる。

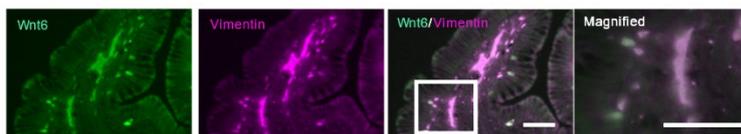


図3. Wnt6をターゲットとしたIHC

存在しないため、In situ hybridization(ISH)等の他のツールによる検出法を確立する必要がある。また、凍結切片では切片の厚さを薄くすることが難しいため、細胞の重なりを防ぐことができず、シグナル検出の妨げとなった。今後、パラフィン切片による薄切により細胞の重なりを防ぎつつ、なる。今後、FISHを行う際にも自家蛍光が検出の妨げとなる。そこで、次の試験としてクエンチング試薬を用いて鶏腸管切片における自家蛍光の抑制を試みた。

### (2) 自家蛍光の抑制

鶏腸管陰窩部における特に図4の黒矢印で示した赤血球の自家蛍光が強く、TrueVIEW®単独では自家蛍光の消滅が困難であった。そこで、TrueBlack®と併用することで完全ではないものの、緑色および赤色蛍光の観察下において、ほぼ自家蛍光を消滅させることが可能となった(図4、白矢印)。ただし、シグナルの弱いターゲットは消滅させきれない自家蛍光との区別が困難となるため、増感やシグナルの強いターゲットへの切り替えが必要となる。

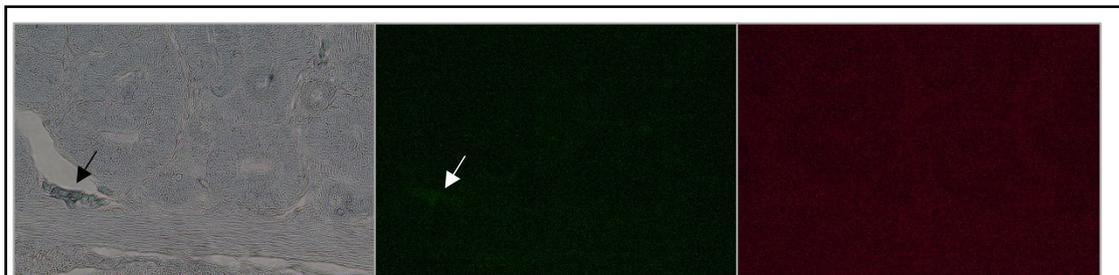


図4. クエンチング試薬による自家蛍光の消滅

### (3) シングルセル化

鶏パネートのマーカーの探索のため、シングルセル解析によるマーカー探索を試みた。MACS® Manual Separators 後の細胞懸濁液中の細胞生存率は約60%であった。その後、Smart Aliquoter を用いてシングルセル化を試みたところ、1well 当たり2~3細胞の混入が確認された(図3、黒矢印)。そこでピペットでの回収を試みたが、時間経過に伴う接着性の上昇、細胞死が確認されたため、シングルセル化が困難であった。本手法により陰窩部の上皮細胞の回収を行うことが可能であったが、シングルセル化の部分が課題となった。

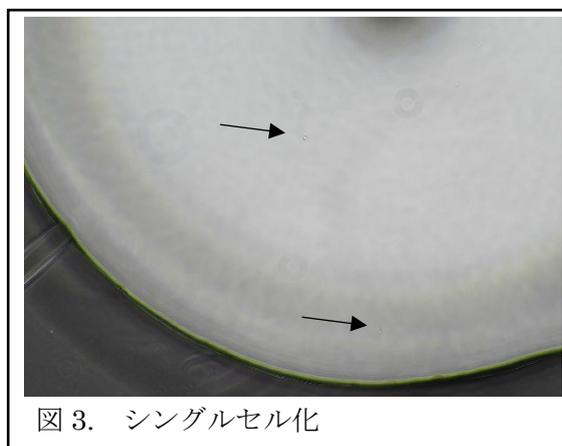


図3. シングルセル化

### <引用文献>

① Wang *et al.*, Poultr Sci., 95:1634-1635. doi: 10.3382/ps/pew079.

② Nash *et al.*, *Commun Biol* 4, 337 (2021). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01901-z>.

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 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤謙, 中村啓哉, 森桃花, 佐藤勝祥, 渡邊潤, 横尾正樹
2. 発表標題 肉用鶏と卵用鶏の腸管における Wntシグナル伝達経路関連遺伝子発現量の比較
3. 学会等名 日本家禽学会2021年度秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤 謙
2. 発表標題 鶏腸管におけるWntシグナル伝達経路関連遺伝子の発現パターン
3. 学会等名 日本畜産学会第129回大会 パラレルシンポジウム II (招待講演)
4. 発表年 2021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
---------	---------