

令和 6 年 9 月 26 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05459

研究課題名（和文）機能性評価系として腸管オルガノイドを用いた分岐鎖アミノ酸の新たな機能の解明

研究課題名（英文）Elucidation of new functions of branched-chain amino acids using intestinal organoids as a functional evaluation system

研究代表者

服部 一夫（Hattori, Kazuo）

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：10385495

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）：腸管オルガノイドを用いて、分岐鎖アミノ酸の中でもバリン(Val)の欠乏だけが、腸管幹細胞(ISC)の自己複製の抑制とアポトーシス亢進によりISCの数を減少させることを見出した。RNA-seqに基づくGene Ontology解析の結果、Val欠乏によるISCへのダメージは、小胞体ストレスの亢進とWnt/ β -カテニンシグナルの不活性化に起因することが示唆された。また、バリン欠乏食を与えたマウスの腸管では、腸管オルガノイドで認められた変化を反映していた。以上、腸管オルガノイドを用いることにより、Valの新たな機能を見出ただけでなく、ISCに対する機能性評価系としての有用性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、(1)分岐鎖アミノ酸の中で、Valの欠乏だけが腸管幹細胞数を減少するという興味深い現象を見出し、Valが幹細胞の維持に重要な役割を有すること、(2)幹細胞数の減少の要因として、小胞体ストレスの亢進とWnt/ β -カテニンシグナルの不活性化が関与していることを示唆した点である。さらに本研究では、Val欠乏食を与えたマウスの腸管での変化が、腸管オルガノイドで認められた変化と同様であることを示した。この結果は、腸管オルガノイドが腸管幹細胞の機能性評価系として有用であることを示し、腸管オルガノイドが動物に替わる実験系となりうる可能性を示唆した点が本研究の社会的な意義である。

研究成果の概要（英文）：Using intestinal organoids, we found that only valine (Val) deficiency among branched-chain amino acids reduced the number of intestinal stem cells (ISCs) by suppressing self-renewal and enhancing apoptosis. The RNA-seq-based Gene Ontology analysis suggested that the damage to ISCs caused by Val deficiency is due to increased endoplasmic reticulum stress and inactivation of Wnt/ β -catenin signaling. In addition, the changes observed in the intestinal organoids were reflected in the intestinal tract of mice fed a valine-deficient diet. In conclusion, these results reveal a new function of Val and suggest the usefulness of intestinal organoids as a functional evaluation system for ISCs.

研究分野：食品機能学

キーワード：腸管オルガノイド 腸管幹細胞 分岐鎖アミノ酸 バリン アポトーシス 小胞体ストレス wnt/ β -カテニン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

腸管は、体内への栄養素や水分の吸収、粘液分泌や抗菌物質の産生による有害物質の侵入阻止、腸管内容物を認識して消化液を分泌するなど、多様な機能を併せ持っている器官である。このような多様な機能は、一つの幹細胞から生じる腸管上皮細胞（吸収上皮細胞、杯細胞、内分泌細胞、パネート細胞など）により担われている。これら腸管上皮細胞のほとんどは、腸管内腔に突出した絨毛と呼ばれる部分に存在しており、パネート細胞と幹細胞は腸管内腔の凹んだ部分である陰窩（クリプト）に存在している（Fig. 1）。幹細胞は一生涯を通じて自己複製し続けるとともに、全ての腸管上皮細胞への分化能を持つ細胞と定義されている。しかしながら、腸管機能を *in vitro* にて解析する実験系は限られており、これまで用いられてきた Caco-2 細胞など大腸がん由来株化細胞も必ずしも生体内の腸管上皮細胞の機能を発現していない。そのような中、2009 年に腸管幹細胞の三次元幹細胞培養系（オルガノイド培養系）が開発された（Sato et al. *Nature* 459, 262-5 (2009)）。この培養法で培養された腸管オルガノイド（Fig. 2）は、生体内と同様に幹細胞の自己複製と全ての腸管上皮細胞の産生が可能であり、まさにミニ腸管と呼べるものである。これにより、これまで困難であった *in vitro* での腸管幹細胞実験が可能となり、種々の因子が腸管上皮細胞に与える影響を解析できる道が開かれた。

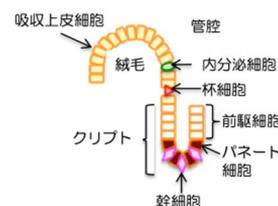


Fig. 1 小腸の構造と構成する細胞



Fig. 2 腸管オルガノイド

我々は、これまでに腸管オルガノイドを用いて、腸管幹細胞に対する必須アミノ酸の影響を報告してきた。その研究では、Met の欠乏が腸管オルガノイドの増殖を抑制すること、幹細胞を減少すること、腸管上皮細胞への分化を促進することを明らかにし、Met が幹細胞の維持や機能に重要な役割を果たすことを示した（*Biochem Biophys Res Commun* 488, 171-6 (2017)）。実は、この研究において、Val の欠乏が腸管オルガノイドの増殖を抑制することも見出ししていた。興味深いことに、Val の幹細胞に及ぼす影響としては、Val が造血幹細胞の増殖や維持に必要であること（*Science* 354 1152-5 (2016), *Nature* 541, 166-7 (2017)、Val の低減は造血幹細胞の増殖を抑制すること（*Exp Hematol* 63, 12-6 (2018)）などが報告されている。また、Val が属する BCAA においても、間葉系幹細胞の増殖を高める（*Nutrition* 78, 110935 (2020)）こと、BCAA の不適切なバランスが造血幹細胞の増殖や生存に負の影響を及ぼすこと（*Exp Hematol* 63, 12-6 (2018)）、がん幹細胞を抑制すること（*PLOS ONE* 8, e82346, (2013)）などが報告されている。このように、BCAA は幹細胞に影響を及ぼすという情報が蓄積し始めている。しかし、腸管幹細胞に対しては、BCAA の影響は明らかにされていない。そこで、腸管を担う細胞の起点となる幹細胞の機能に対して、BCAA のような食品成分がどのような影響を及ぼすのかについて検討することとした。また、現在の動物実験の環境は、3R (Replacement: 代替法への置換、Reduction: 使用動物数の削減、Refinement: 苦痛の軽減) が求められていることから、*in vitro* 系である腸管オルガノイドに対する BCAA の影響が、*in vivo* (動物) においても同様であるならば、腸管オルガノイドが動物に替わる *in vitro* 機能性評価系となる可能性が期待される。そのため、各 BCAA 欠乏食を与えたマウスの腸管における変化を調べ、腸管オルガノイドでの変化と比較検討することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、

- (1) 各 BCAA が腸管の幹細胞にどのような影響を及ぼすのかを明らかにする
- (2) 各 BCAA が幹細胞に及ぼす変化のメカニズムを明らかにする
- (3) 腸管オルガノイドを用いた *in vitro* 系での結果が、マウスの腸管においても同様の結果が得られるかを検証し、腸管オルガノイドを用いた機能性評価系の有用性を検討することである。

3. 研究の方法

腸管オルガノイドを培養する培地には各アミノ酸が含まれているため、培地中にアミノ酸を添加しても明確な差が得られない可能性が考えられたため、本研究では、腸管オルガノイドを各 BCAA (Val, Leu, Ile) 欠乏培地で培養した。その後、腸管オルガノイドの増殖、幹細胞自身や幹細胞からの分化に対する影響などを評価した。次に、そのアミノ酸がなぜそのような影響を及ぼすのかを RNA-sequence analysis などを用いて、そのメカニズムを解析した。最後に、マウスに各 BCAA 欠乏食を与えた後、腸管における変化を解析し、腸管オルガノイドという *in vitro* 系で得られた結果が、*in vivo* 系でも同様であるか否かを調べ、腸管オルガノイドの機能性評価系としての有用性を検証した。具体的な研究方法は以下に示す。

(1) 腸管幹細胞に対する各 BCAA の影響

C57BL/6 マウスあるいは Lgr5-EGFP マウス (幹細胞マーカーの Lgr5 が発現する細胞が EGFP という蛍光タンパク質で標識されたマウス) から回収した腸管 (空腸) のクリプトをマトリゲルに包埋し、オルガノイド培養を行った。培養から 3 日目に各 BCAA 欠乏培地で 24 時間培養後、腸管オルガノイドの形成効率、腸管オルガノイドの増殖活性の評価 (抗 Ki67 抗体を用いた蛍光免疫染色後に定量化)、幹細胞数の測定 (共焦点レーザー顕微鏡下で Lgr5-positive な細胞数をカウント)、アポトーシスの検出 (抗 Cleaved Caspase3 抗体を用いた蛍光免疫染色)、分化に対する影響評価 (幹細胞や腸管上皮細胞 (内分泌細胞、パネート細胞、杯細胞、吸収上皮細胞) に対するマーカーの mRNA 発現量の経時的変化を qPCR にて測定)、分化細胞数の測定 (各分化細胞のマーカーに対する蛍光免疫染色後、共焦点レーザー顕微鏡下で定量化) などを行った。

(2) 各 BCAA が腸管幹細胞に及ぼした変化のメカニズムの解析

(1) で認められた影響がどのようにして起きているのか、そのメカニズムを解析した。具体的には、各 BCAA 欠乏培地で培養した腸管オルガノイドの RNA-sequencing analysis、リアルタイム PCR、ウエスタンブロットティングなどにより、認められた変化の鍵となる因子や経路を検討した。

(3) 腸管オルガノイドを用いた機能性評価系の有用性の検証

各 BCAA を欠乏させた餌を C57BL/6 マウスに一定期間 (1, 2, 3 週間) 与えた後、腸管を回収し、クリプトや絨毛の変化 (H&E 染色)、増殖細胞割合の変化 (抗 PCNA 抗体による免疫染色)、幹細胞マーカー Lgr5 の mRNA レベルの変化 (リアルタイム PCR)、各分化細胞数の変化 (各分化細胞マーカーに対する抗体を用いた蛍光免疫染色後に定量化) を調べた。

4. 研究成果

(1) 腸管幹細胞に対する各 BCAA 欠乏の影響

各 BCAA 欠乏培地で腸管オルガノイドを培養した結果、Val 欠乏のみが形成効率を有意に低下した (Fig. 3)。さらに、オルガノイドの増殖活性を調べた結果、Val 欠乏のみが有意に低下していた (Fig. 4)。この低下後に、Val を含む培地で 3 時間培養すると、増殖活性はコントロールと同様のレベルに回復した。また、幹細胞マーカである Lgr5

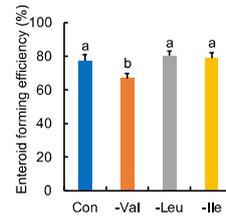


Fig. 3 各BCAA欠乏培地で培養した腸管オルガノイドの形成効率

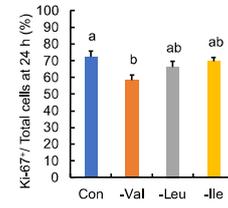


Fig. 4 各BCAA欠乏培地で培養した腸管オルガノイドの増殖活性

の mRNA レベルを経時的に調べたところ、Leu 欠乏や Ile 欠乏に変化は認められなかったが、Val 欠乏 15 時間目から有意に低下していた。さらに、Val 欠乏 16 時間目以降、幹細胞割合が有意に減少した (Fig. 5)。次いで、幹細胞のアポトーシスを測定した結果、24 時間の Val 欠乏にのみアポトーシスの増加が確認された (Fig. 6)。これらのことから、BCAA のうち Val の欠乏だけが、腸管オルガノイドの増殖に関わる幹細胞にアポトーシスを誘導することで幹細胞割合を減少することが示された。次に、分岐鎖アミノ酸が幹細胞からの分化に及ぼす影響を調べた。その結果、9 時間の Val 欠乏により MUC2 (杯細胞マーカー) の mRNA 量が増加したのに対し、9~24 時間のロイシン欠乏で MUC2、Lyz (パネート細胞マーカー)、ChgA (内分泌細胞マーカー) が増加し、9~24 時間のイソロイシン欠乏では MUC2、ChgA が増加した。蛍光免疫染色の結果、イソロイシン欠乏においては、ChgA 陽性細胞数の有意な増加も認められた (Fig. 7)。これらの結果は、個々の分岐鎖アミノ酸が腸管上皮細胞に異なる影響を及ぼしていることを示した。以上より、バリンは主に腸管幹細胞の維持に重要であり、ロイシンおよびイソロイシンはバリンよりも腸管上皮細胞の分化に大きく関与することが示唆された。

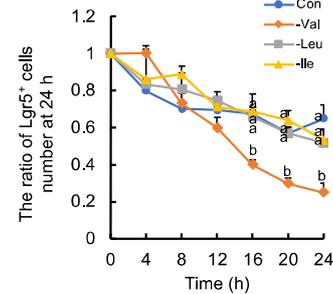


Fig. 5 各BCAA欠乏培地で培養した幹細胞割合の変化

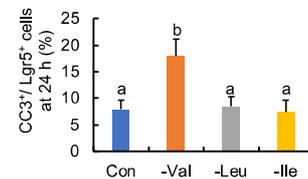


Fig. 6 各BCAA欠乏培地で培養した幹細胞中のアポトーシスの割合

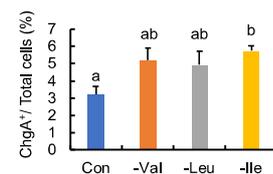


Fig. 7 幹細胞からの分化に及ぼす各BCAA欠乏培地の影響

(2) 各 BCAA が腸管幹細胞に及ぼした変化のメカニズムの解析

BCAA 欠乏により生じた上述の変化のメカニズムを RNA-seq analysis により解析した。各 BCAA 群における発現変動遺伝子 (DEGs) を反映させたヒートマップは、Val 欠乏群のみ特徴的な変動パターンを示した (Fig. 8)。また、各 BCAA に特異的にアップレギュレートされた DEGs 数は、Val 欠乏群 569、Leu 欠乏群 101、Ile 欠乏群 51 であり、ダウンレギュレートされた DEGs 数は、Val 欠乏群 165、Leu 欠乏群 33、Ile 欠乏群 12 であった。このことから、Val 欠乏群が最も遺伝子発現の変動が顕著であったことを示した。さらに、各 BCAA 群における DEGs のエンリッチメント解析を行った結果、共通してアップレギュレートされたのは、酸化ストレス、小胞体ストレス応答、アポトーシスプロセスであり、ダウンレギュレートされたのは細胞周期、アポトーシスプロセスであった。また、各 BCAA 間で比較すると、Val 欠乏特異的に小胞体

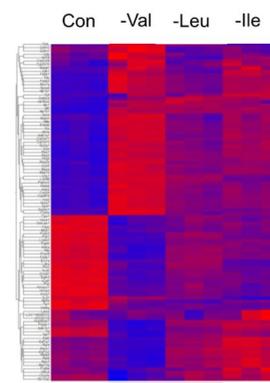


Fig. 8 各BCAA欠乏培地で培養した腸管オルガノイドのヒートマップ

小胞体

ストレス応答に関連する ATF と CHOP が有意に増加し、Wnt/ β -カテニンシグナル応答に関連する因子が有意に減少していた。また、Val 欠乏群において、アポトーシスに関連した因子の変動が多かった。以上より、Val 欠乏による幹細胞への影響は、小胞体ストレスに起因する Wnt/ β -カテニンシグナルの不活性化とアポトーシスの誘導により生じていることが示唆された。

(3) 腸管オルガノイドを用いた機能性評価系の有用性の検証

腸管オルガノイドを用いた機能性評価系の有用性を実証するために、各BCAA欠乏餌をC57BL/6マウスに与えた後、腸管を回収し、これまでの腸管オルガノイドで認められた変化が生体内においても反映されているかを検討した。なお、Ile欠乏食群は1週間を過ぎた後に死亡したため、3週間欠乏時のValおよびLeu欠

乏食の結果を示す。その結果、Val欠乏だけが幹細胞マーカであるLgr5 の mRNAレベルの低下 (Fig. 9) を誘導した。さらに、Val欠乏は絨毛の高さ (Fig. 10A) やクリプトの深さ (Fig. 10B) も低下していた。また、クリプト

における増殖細胞割合の低下 (Fig. 11)、クリプトにおけるアポトーシス細胞割合の増加 (Fig. 12) も確認され、腸管オルガノイドと同様の挙動を示した。分化細胞に関しては、Ile欠乏が内分泌細胞マーカであるChgA mRNAレベルを低下したが、内分泌細胞数に影響は認められなかった。また、すべてのBCAA欠乏群において杯細胞数が減少しており、腸管オルガノイド (内分泌細胞数の増加、杯細胞数は変化なし) と異なる挙動を示した。したがって、腸管オルガノイドを用いた機能性評価は、分化細胞においては生体内での結果を十分に反映していなかったが、幹細胞においては生体内と腸管オルガノイドの結果が同様であり、動物に替わる幹細胞の機能性評価系として応用できる可能性が示唆された。

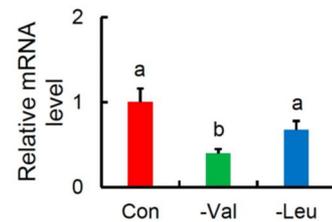


Fig. 9 各BCAA欠乏食を摂取したマウス腸管のLgr5 mRNAレベル

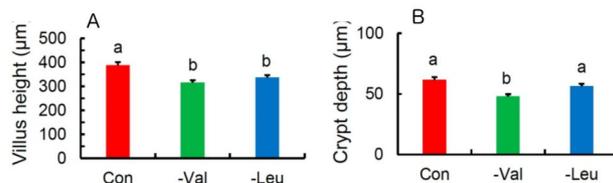


Fig. 10 各BCAA欠乏食を摂取したマウス腸管の絨毛の高さとクリプトの深さ

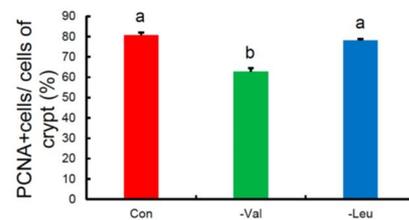


Fig. 11 各BCAA欠乏食を摂取したマウス腸管クリプトにおける増殖細胞割合

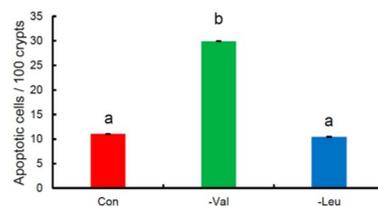


Fig. 12 各BCAA欠乏食を摂取したマウス腸管クリプトにおけるアポトーシス細胞割合

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鳥海 太一、松澤 由季、清水 誠、岩槻 健、小西 良子、只石 幹、服部 一夫
2. 発表標題 TNF- により初期炎症を誘導した腸管オルガノイドを用いたカフェ酸およびその類似化合物の抗炎症作用の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 香西 歩、岩槻 健、清水 誠、小西 良子、只石 幹、服部 一夫
2. 発表標題 分岐鎖アミノ酸が腸管上皮細胞に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 田島 由梨花、香西 歩、東 侑里、岩槻 健、美谷島 克宏、清水 誠、小西 良子、只石 幹、服部 一夫
2. 発表標題 バリン欠乏がマウスの腸管に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 神戸 理恵、清水 誠、岩槻 健、小西 良子、只石 幹、服部 一夫
2. 発表標題 腸管オルガノイドの単層培養法の確立とその利用法の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 香西 歩、岩槻 健、隈本 宗一郎、清水 誠、小西 良子、只石 幹、服部 一夫
2. 発表標題 分岐鎖アミノ酸が腸管上皮細胞に及ぼす影響：パリン欠乏が腸管幹細胞を減少させるメカニズムの解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024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