

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05900

研究課題名(和文) 健全な消化管発達の基盤となるウシ反芻胃の幹細胞ニッチの解明

研究課題名(英文) Investigation of stem cell niche in developing ruminal epithelial tissue

研究代表者

鈴木 裕 (Suzuki, Yutaka)

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ウシの栄養獲得の根幹を担う反芻胃は、固形飼料の採食や離乳に伴い急速に発達するが、その詳細なメカニズムは明らかではない。先行研究から反芻胃の上皮基底層に増殖細胞が局在することが明らかとなり、本研究では組織内微小環境(ニッチ)がその細胞機能を制御する可能性を検証した。レーザーマイクロダイセクション(LMD)により単離した上皮基底層をmRNA-Seq解析し、細胞外マトリックスや成長因子が基底細胞の増殖を制御する可能性が示唆された。これらの因子の作用は、培養細胞においても検証された。本研究から、反芻胃上皮基底層の微小環境を構成する一部の因子が、基底細胞の増殖を制御する可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は組織内微小環境という新しい視点を通じて、ウシの消化機能の中心的な役割をもつ反芻胃の成り立ちに迫る試みであった。LMDを使用した解像度の高い解析により、基底層に局在する増殖細胞を制御する因子を新たに見出した。この結果は、詳細が明らかではなかった反芻胃の発達機序の一端を明らかにする知見であったといえる。今後、短鎖脂肪酸と基底層微小環境の関係性をより詳細に明らかにできれば、反芻胃の発達を補助する物質の探索に応用することができ、ウシの効率的な栄養獲得を促進する技術開発シーズをもたらすことができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The rumen, which plays a fundamental role in the acquisition of nutrients by cattle, develops rapidly around the weaning period due to short-chain fatty acids derived from its contents and physical stimuli, but the detailed mechanisms of this development remain unclear. As previous studies have shown a specific distribution of proliferative cells in the basal layer of the rumen epithelium, we tested the possibility that the tissue microenvironment, namely the niche, regulates its cellular function. mRNA-Seq analysis of epithelial basal layers isolated by laser microdissection suggested that extracellular matrices and growth factors may regulate the proliferative potential of basal cells. The effect of these factors was also validated in cultured rumen epithelial cells. This study shows that some factors constituting the rumen epithelial niche may regulate basal cell proliferation.

研究分野：動物生理学

キーワード：ウシ 反芻胃 組織発達 細胞増殖 組織内微小環境

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ウシの栄養獲得の根幹を担う反芻胃(ルーメン)は、固形飼料の採食開始や離乳に伴って急速に発達する。反芻胃の発達を促進する主要な因子は、胃内容物に由来する短鎖脂肪酸(SCFA)や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、詳細な作用メカニズムは明らかではなかった。反芻胃と同じく重層扁平上皮であるヒトやマウスの皮膚や食道に関する近年の研究から、これらの組織では上皮深部の基底層に存在する組織幹細胞が組織の維持や修復における細胞供給源となっていることが明らかになっている。申請者はこれまでにウシの反芻胃上皮の基底層において、増殖活性を持つ細胞群が特異的に分布することを見出した。マーカー遺伝子の発現解析から、これらの細胞群(基底細胞)は幹細胞的な性質を持つ可能性があり、反芻胃の発達に関与することが予想された。

### 2. 研究の目的

組織幹細胞はそれを取り巻く周辺微小環境(ニッチ)により、その生存や増殖、分化が制御される。幹細胞ニッチは、周辺の細胞が産生する成長因子や膜タンパク質、細胞外マトリックスといった細胞外分子により構成されている。幹細胞の増殖を直接的に制御するのはニッチ因子であることを考慮すると、胃内腔から吸収されたSCFAは反芻胃上皮組織のニッチに何らかの作用を与え、上皮深部に存在する基底細胞の増殖・分化を制御するという作用機序を想定することができる。マウスの消化管における先行研究では、SCFAが小腸上皮において成長因子などの発現制御を行うことが報告されており、このニッチ因子を介した作用機序の仮説は支持される。本研究では、ルーメン上皮組織においてもこのようなニッチ環境が存在すると考え、遺伝子発現解析および細胞培養実験により検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) レーザーマイクロダイセクション(LMD)によるルーメン上皮層の分取

反芻胃の上皮基底層における細胞内シグナルの特徴を検討するとともに、基底層に隣接する上層(有棘層、顆粒層、角質層)が何らかの因子を介して基底層を制御している可能性を考慮し、LMDにより上皮層を分取するとともに、mRNA-Seq解析のためにRNA抽出方法を検討した。既報に記された方法を試行し、さらにRNA品質を向上させるために各工程の条件を見直した。抽出した組織RNAの品質はTapeStation 4200により測定したRNA integrity number(RIN)により判定した。

#### (2) 分取した上皮組織のmRNA-Seq解析

LMDで分取した上皮組織の各層から、NucleoSpin RNA Plus XS (Macherey-Nagel, Düren, Germany)を用いてtotal RNAを抽出した。抽出したtotal RNAからoligo-dTビーズによりmRNAを精製し、これをテンプレートとしてSMART-Seq HT kit (TakaraBio, Shiga, Japan)によりライブラリを調製した。Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, USA)により、150 bpペアエンド、6 G base/sampleの条件でmRNA-Seqを外部委託した。得られたシーケンシングデータは、fastpによるフィルタリングの後、STARによるアライメント、およびRSEMによるリード数の算出、およびEdgeRによる正規化を行い、DESeq2により発現変動遺伝子を検出した。さらに、GSEAによるエンリッチメント解析を行った。

#### (3) ルーメン上皮細胞の培養

0~3ヶ月齢の子牛から採取したルーメン上皮組織より、酵素処理法によりルーメン上皮細胞を単離し、凍結保存した。初代培養したルーメン上皮細胞において、LamininおよびTGF- $\beta$ が細胞増殖に及ぼす影響を検討した。Lamininについては計5種類のアイソフォームを用意し、それぞれをコーティングした培養容器(6 well plate)にルーメン上皮細胞を播種した。同時に、培地にTGF- $\beta$  阻害剤(A83-01)を添加する実験区を設けた。各実験区の細胞は播種後6時間または120時間で培養を止め、それぞれ接着細胞数の計測および上皮細胞コロニーの染色観察に供した。

### 4. 研究成果

#### (1) 分取したルーメン上皮層から抽出したRNAの品質

はじめに既報に記された方法を利用してLMDを行ったが、RNAの分解が見られたため(RIN < 4.0)各工程の見直しを行った。組織薄切後の固定方法や染色方法の見直し、およびRNA分解阻害剤の使用により、mRNA-Seqに使用可能な品質のRNAを安定的に抽出することが可能となった(平均RIN=6.2)。確立した方法によりルーメン上皮の基底層および上層を分取し、抽出したtotal RNAをmRNA-Seqに供した。

### (2) ルーメン上皮細胞の増殖機序の検討

mRNA-Seqの結果、ウシリファレンスゲノムに対する全体的なリードアライメント率は91.091%であり、発現遺伝子総数は27,607個であった。基底層と上層で発現レベルが有意に異なる遺伝子は4069個あり、そのうち2169個の遺伝子の発現量が基底層において有意に高く、1902個の遺伝子の発現量が上層において高かった。

G0 エンリッチメント解析の結果、基底層で濃縮された上位5個の分子機能は、有糸分裂細胞周期、有糸分裂細胞周期プロセス、細胞周期、細胞周期プロセス、DNA複製であった。また、上層で濃縮された上位5個の分子機能は、輸送、細胞の局在の確立、高分子局在化、有機物輸送、小胞輸送であった。

KEGG エンリッチメント解析の結果、基底層で濃縮された上位5個のパスウェイは、DNA複製、ECM受容体相互作用、細胞周期、細胞接着分子、塩基切除修復であった。さらに、細胞増殖シグナル経路のPI3K-Aktシグナル伝達経路、代謝経路のピルビン酸代謝も濃縮されていた。また、パスウェイとして有意な濃縮ではなかったが、TGF- $\beta$ 経路に関連する複数の遺伝子についても発現量に差が見られた。

### (3) 培養ルーメン上皮細胞における増殖制御因子の検討

mRNA-Seqにおいて上皮細胞の増殖を制御することが示唆されたLamininについて、検討した5種類のLamininアイソフォームの中で2種類が顕著にルーメン上皮細胞の接着を促進した。また、その効果は濃度依存的であった。さらに、ルーメン上皮細胞の増殖に対するTGF- $\beta$ の作用を検討するために、培養細胞をTGF- $\beta$ 阻害剤(A83-01)により処理したところ、無処理区と比較して顕著な増殖改善が見られた。これらの結果から、LamininおよびTGF- $\beta$ がルーメン上皮細胞の増殖を維持する因子である可能性が示唆された。

本研究では、はじめにLMD手法を改良し、ルーメン上皮から分取した組織片より安定的に高品質なRNAを抽出することが可能となった。分取した上皮組織をmRNA-Seq解析したところ、基底層に特徴的な発現遺伝子や細胞機能が推定された。これには、LamininやTGF- $\beta$ 経路に関連する遺伝子が含まれていた。培養試験において、これらの因子がルーメン上皮細胞の増殖を直接的に調節することが示されたことから、ルーメン上皮基底層において増殖細胞を制御する組織内微小環境の一端が明らかとなった。

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 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木裕, 林英明, 芳賀聡, 小池聡, 小林泰男
2. 発表標題 子牛のルーメン組織発達における増殖細胞群の寄与
3. 学会等名 日本畜産学会第129回大会（一般発表）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木裕
2. 発表標題 ウシ反芻胃における幹細胞探索の試みと組織発達における役割
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）（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
研究分担者	芳賀 聡  (Haga Satoshi)  (90442748)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・主任研究員    (82111)	

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
---------	---------