

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07976

研究課題名(和文) DLK1による小腸発生段階における間質上皮crosstalkの解明

研究課題名(英文) Stromal epithelial crosstalk during small intestinal development by DLK1.

研究代表者

南 由佳(小林由佳)(Minami, Yuka)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：80724658

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)：本計画では、胎児期および成体期マウスの小腸にて上皮細胞とのcrosstalkに影響している遺伝子を探しだすため、細胞膜表面ないし分泌されるものに着目して解析した。Wntシグナル、Notchシグナルにおいて、発現量が変動しているものが多く観察した。特にNotchリガンドであるDLK1が胎児期から成体にかけて時系列で、小腸における発現量を解析したところ出生後に急激に発現が消失していた。DLK1がその分化抑制機能に寄与しているか確認するため、DLK-KOマウスの解析siRNAでDLK1をKDした胎児小腸間質細胞と共培養にて解析にて分化に抑制的なことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、胎児の小腸上皮分化に際して、間質由来のDLK1が抑制的に働いていることを発見することができた。早産児等に発生する小児壊死性腸炎などの胎児期小児期小腸疾患においては、小腸の成熟遅延が重症化と関連していることがわかっている。DLK1の抑制が、発生段階に腸管上皮の成熟を促進できることがわかり、DLK1シグナルが治療標的になる可能性が示唆された。本研究の成果は、将来の小児小腸疾患の新規治療法開発につながり得るもので学術的、社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this project, we analyzed genes secreted from the plasma membrane to find genes affecting crosstalk with epithelial cells in the small intestine of fetal and adult mice. In particular, the expression of the Notch ligand DLK1 in the small intestine was analyzed chronologically from fetus to adult, and its expression level was rapidly decreased after birth. DLK1 was shown to be inhibitory to differentiation in co-cultures with DLK1 KD.

研究分野：消化器内科

キーワード：小腸 胎児 DLK1

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

消化管上皮においては、成体において Lgr5 陽性細胞が幹細胞として同定され、各種、遺伝子改変マウスによる lineage trace(細胞子孫追跡実験)等の実験が多く施行され、詳細に解析がなされ、近年、間質による微小環境の維持が成体における幹細胞の分化小腸上皮の恒常性維持に重要なことが示されている。しかしながら、本当の発生段階である胎児期においては、十分に研究が進んでいるとは言えない。マウスにおいて、Lgr5 陽性細胞が出現するのは E16.5 以降の発生段階であるとされるが、小腸上皮自体は E14.5 より観察される。このことは、小腸上皮の発生初期においては、Lgr5 陽性細胞以外の幹細胞が存在すること、成体とは異なる微小環境が形成されていることを示唆している。そして、わずか 2 日という短期間で急速に変化し Lgr5 陽性細胞を持つ大人の小腸上皮へと成熟していく。このことから、E14.5 胎児期の小腸間質には、成体期とはことなるシグナル活性因子が存在し、小腸上皮と crosstalk することで上皮細胞の成熟に影響しているものと考えた。そこで、胎児期特有のシグナル活性を解析することで、小腸上皮を成熟させる因子を見つけることが出来れば、小腸疾患の治療法開発に役立つと管下駄、Notch リガンドの一つである、Dlk1 が成体期に比べマウス E14.5 の小腸間質にて、大量に発現していることを発見した。Notch シグナルは、脳や心臓など胎児期の臓器発生に重要なことが知られており、細胞膜表面ないし、分泌される蛋白であることから、上皮細胞に何等かの影響を与えているものと考え、研究対象として解析することとした。

2. 研究の目的

胎児期小腸間質由来の膜表面・分泌 Notch リガンドである、Dlk1 が小腸発生段階において小腸上皮の発生・成熟に与える影響を解析し、胎児期小腸間質シグナルを標的とした小腸疾患の再生治療法の開発に有用な研究基盤の確立ことを目的とした。

3. 研究の方法

・マウス胎児および成体、小腸間質細胞の網羅的解析

マウスの胎児期 E14,5 および成体期マウスの小腸より、間質初代培養細胞を採取した。培養液を、血清非添加培地に交換後、RNA を回収し RNAseq による網羅的な発現解析を行った。

・マウス胎児小腸オルガノイド、間質細胞の培養系を確立

オルガノイド培養技術は、近年、多用されるようになった、正常細胞の 3 次元初代培養を可能とする培養法である。小腸オルガノイドの培養においては、in vitro にて幹細胞、分化細胞がそれぞれ出現し、分化過程を再現できることが知られている。さらに、胎児期の小腸オルガノイド培養には少数ながら報告があり、成体期の小腸オルガノイドでは、ほとんどが budding 構造(金平糖様の突起形成)を呈するに対して、胎児期のものでは spheroid 構造(突起のない球形)となるものが一定の割合で混在し、培養期間の経過とともに徐々に budding 構造の割合が増して行くことが報告されている。このことは、in vitro でも胎児由来小腸オルガノイドが成熟して行く過程を捉えているものと考えられ、本研究では、小腸上皮の発生・成熟の観察を必要であったため、胎児期のオルガノイドを採取し、胎児由来の間質初代培養細胞と共培養を施行した。

・Dlk1 ノックアウトマウスにおける小腸上皮分化の解析

Dlk1 が小腸上皮の発生・成熟に、どのような影響を及ぼしているか検証するため、Dlk1 のノックアウトマウスの解析を行った。DLK1 のノックアウトマウスでの解析は、肺胞上皮の分化や胎盤形成に影響することが、すでに報告されている。本研究にて、胎児小腸の解析を行った。

4. 研究成果

・マウス胎児および成体、小腸間質細胞の網羅的解析

マウスの胎児期 E14,5 および成体期マウスの小腸より、間質初代培養細胞を採取した。培養液を、血清非添加培地に交換後、RNA を回収し RNAseq による網羅的な発現解析を行った。その後、上皮細胞との crosstalk に影響している遺伝子を探しだすため、細胞膜表面ないし分泌されるものに注目して解析を進めた。まず、臓器の形態形成に影響すると知られている、Wnt、Notch、BMP/Tgf、EGF、FGF、HGF、Hedgehog シグナルに関与し、胎児期と成体期において発現量に差があるものを確認したところ、Wnt シグナル、Notch シグナルにおいて、発現量変動しているものが多く観察できた。続いて、RNAseq における個別の read 数(発現量)を解析したところ、Notch リガンドである Dlk1 が、胎児期での read 数が多い、一方、成体期においては少なく、最も機能的な差が予想される遺伝子であることが確認できた。

・マウス胎児小腸オルガノイド、間質細胞の培養系を確立

マウスにて、qPCR とウェスタンブロットにて、胎児期から成体にかけて時系列で、小腸における発現量を解析したところ出生後に急激に発現が消失していることが観察された。そこで、児由来の小腸オルガノイドを採取培養し、胎児および成体由来の小腸間質細胞と共培養する実験系の確率を行い成功した。その実験系を用いることで、腸粘膜の分化成熟に与える影響の解析を行

った。その結果、胎児由来の小腸間質細胞と共培養した場合においては、オルガノイドの形態が球形を維持し続けることが分かった。一方、単独で培養した場合は、培養期間が過ぎるにつれて、成体由来の小腸オルガノイドと同じように、buddingした形態へと変化していくことがわかった。このことは、培養系においても、上皮単独では時間の経過とともに、分化成熟方向へと性質が変化していることを示唆している腸管の分化発生に重要とされる Wnt シグナルである。まず、胎児期の小腸間質に由来する Wnt シグナルを解析するため、293 細胞に、Wnt ルシフェラーゼレポーターを安定発現させ、胎児期および成体期の間質細胞と共培養する実験系を確立した。共培養系の実験結果は、胎児由来の小腸間質細胞は特異的な分化抑制シグナルを有していることが示唆された。続いて DLK1 がその分化抑制機能に寄与しているか確認するため、siRNA で DLK1 を KD した胎児小腸間質細胞と共培養したところ、その現象がキャンセルされた。続いて、成体マウス由来の間質細胞と胎児由来小腸オルガノイドの共培養を行いさらに、リコンビナント DLK1 を添加することで、オルガノイドの形態に変化がないか観察した。結果は、時間とともに budding するオルガノイドの減少が観察され、分化傾向が抑制されていることが示唆された。Lysozyme 陽性のパネート細胞、UEA1 陽性の粘液細胞の消失も観察され分化の抑制傾向があることが確認された。

・Dlk ノックアウトマウスにおける小腸上皮分化の解析

まず、正常マウスの小腸において、E14.5、P0、成体でタイムコースを取り、免疫染色により DLK1 の発現パターンの変化を観察した。結果は、P14.5 では腸管において Villi の形成が始まっているが、Villi の中心に位置する間質細胞に発現があることが確認できた。P0 においては、間質細胞での発現部位は同じであるが、上皮細胞にも発現が確認された。マウスの成体においては、間質細胞での発現は消失し、上皮細胞でのみ発現が確認され、胎児と成体では、発現細胞に変化があることが確認できた。それぞれのタイムコースで間質細胞の初代培養を採取しウェスタンプロットにて発現解析を行ったところ、免疫染色と同じように間質細胞での DLK1 の発現は徐々に減少消失していることが確認できた。そこで、DLK1-KO マウスの胎児小腸を採取して形態の違いと増殖能を Ki67 染色で評価したところ、KO マウスでは、WT マウスに比べ Villi の伸長が見られ、Ki67 陽性細胞が底部に限局していることが、確認された。また、Alcian Blue 陽性細胞の増加とパネート細胞の増加も確認され、KO マウスでは、小腸上皮の分化が促進されていることが判明した。

これら本研究の成果から、胎児小腸間質における DLK1 が小腸上皮の分化抑制に影響していることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi Hiroki, Gieniec Krystyna A., Lannagan Tamsin R.M. et. al.	4. 巻 162
2. 論文標題 The Origin and Contribution of Cancer-Associated Fibroblasts in Colorectal Carcinogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 890 ~ 906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2021.11.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Arai Junya, Niikura Ryota, Hayakawa Yoku, Suzuki Nobumi, Hirata Yoshihiro, Ushiku Tetsuo, Fujishiro Mitsuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Clinicopathological Features of Gastric Cancer with Autoimmune Gastritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 884 ~ 884
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10040884	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Arai Junya, Suzuki Nobumi, Niikura Ryota, Ooki Daisuke, Kawahara Takuya, Honda Tetsuro, Hasatani Kenkei, Yoshida Naohiro, Nishida Tsutomu, Sumiyoshi Tetsuya, Kiyotoki Shu, Ikeya Takashi, Arai Masahiro, Ishibashi Rei, Aoki Tomonori, Tsuji Yosuke, Yamamichi Nobutake, Hayakawa Yoku, Fujishiro Mitsuhiro	4. 巻 67
2. 論文標題 Chemoprevention for Colorectal Cancers: Are Chemopreventive Effects Different Between Left and Right Sided Colorectal Cancers?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences	6. 最初と最後の頁 5227 ~ 5238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-022-07431-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Arai Junya, Aoki Tomonori, Hayakawa Yoku, Niikura Ryota, Ishibashi Rei, Suzuki Nobumi, Tsuji Yosuke, Yamada Atsuo, Ushiku Tetsuo, Fujishiro Mitsuhiro	4. 巻 38
2. 論文標題 Risk and preventive factors of early onset colorectal neoplasms: endoscopic and histological database analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 259 ~ 268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.16045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 M Ichinose, N Suzuki, T Wang, JA Wright, TRM Lannagan, L Vrbanac, H Kobayashi, KA Gieniec, JQ Ng, Y Hayakawa, P Garca-Gallastegui, EM Monsalve, SR Bauer, J Laborda, JJ GarciaRamiz, G Ibarretxe, DL Worthley, SL Woods	4. 巻 320(4)
2. 論文標題 Stromal DLK1 promotes proliferation and inhibits differentiation of the intestinal epithelium during development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol	6. 最初と最後の頁 506-520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpgi.00445.2020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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	鈴木 伸三 (Suzuki Nobumi) (30723746)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	早河 翼 (Hayakawa Yoku) (60777655)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	

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