

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590953

研究課題名(和文)腸幹細胞動員における神経系シグナルの関与の検討：幹細胞分化可視化マウスを用いて

研究課題名(英文)Examination of neuroregulation in intestinal epithelium using stem cell differentiation-visualizing mice

研究代表者

比舎 弘子 (HISHA, Hiroko)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：90151422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：Vasoactive intestinal peptide (VIP)は副交感神経より分泌される神経伝達物質である。VIP陽性神経細胞が、小腸上皮幹細胞近辺の間葉系細胞直下に存在している事、さらに、小腸上皮幹細胞のニッチ細胞であるパネート細胞がVIPの受容体(VPAC1R)を持つ事が、免疫組織学的解析で明らかになった。小腸クリプトのゲル内3次元培養系にVIPを加えたところ、オルガノイドの形成が濃度依存性に抑制された。VPAC1R欠損マウスでは小腸上皮が肥厚するとの報告がある事から、VIPはパネート細胞を介して、小腸上皮幹細胞の増殖・分化を抑制的に制御している機能的抑制因子であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Vasoactive intestinal peptide (VIP), a neurotransmitter, is released by the parasympathetic neurons in the small intestine. Epithelial stem cells (ESCs) reside at the epithelial layer of crypts in the small intestine and are directly intermingled with Paneth cells which provide a suitable environment for the ESCs.

In the present study, VIP-positive neurons were detected approximately under subepithelial mesenchymal cells. It was also found that VIP receptors (VPAC1R) were expressed on Paneth cells but not on the ESCs. When VIP was added to a three-dimensional organoid culture system of intestinal crypts, the formation of organoids was inhibited in a dose-dependent manner. It was previously reported that VPAC1R-knockout mice had the hyper-proliferative intestinal epithelium. From the result reported and the present findings, it is conceivable that VIP is a physiological neuroregulatory factor which regulates negatively the proliferation/differentiation of ESCs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：小腸 上皮幹細胞 パネート細胞 神経伝達物質 VIP 神経線維 オルガノイド

## 1. 研究開始当初の背景

造血系においては、造血支持細胞(骨芽細胞や傍血管ニッチ細胞) 近傍に神経線維が存在し、神経系シグナルが造血幹細胞の分化・成熟および移動を制御しているとの報告があり、他の臓器の幹細胞でも同様の神経系制御機構が存在する可能性がある。

消化管には消化、吸収、排泄機能があり、それらは神経やホルモンにより厳密に統御されている。腸管神経系は、交感神経と副交感神経からなる外来性の自律神経系と内在性神経網から構成されており、これらの神経末端からは、ノルアドレナリンやアセチルコリンなどの伝達物質の他に近年注目されている非アドレナリン性非コリン性伝達物質 [Vasoactive intestinal peptide (VIP、血管作動性腸管ペプチド) や Substance P などの神経ペプチド等] が分泌される。腸管粘膜固有層内には、VIP や Substance P 含有神経線維が分布しており、粘膜固有層内の神経線維は、樹状細胞、マクロファージやパイエル板に対しても神経支配を及ぼしているとの事例が近年多数見られる。

さらに、神経による小腸上皮幹細胞制御を示唆する実験が報告されている。たとえば、ラット腸管筋層内の神経遮断により小腸上皮の増殖速度が亢進する (Zucoloto S et al. Cell Tissue Kinet 1988)、ヒト粘膜下層と小腸上皮細胞の共培養系において粘膜下層神経叢に電気的刺激を与えると上皮細胞の増殖が抑制される (Toumi F et al. Neurogastroenterol Motil 2003)、VIP の受容体 (VPAC1R) 欠損マウスでは小腸上皮の肥厚が見られる (Fabricius D et al. Pancreas 2011) との論文がある。この様に、自律神経による小腸上皮幹細胞の増殖制御を示唆する実験はあるものの、こうした観点からの研究はほとんど行われていない。

## 2. 研究の目的

小腸上皮幹細胞の分化・成熟過程に自律神経支配が及んでいるか検討する。具体的には、自律神経が小腸上皮幹細胞に直接作用する、自律神経が小腸上皮幹細胞近傍の間葉系細胞にまず作用して幹細胞を間接的に制御する、あるいは、神経伝達物質による遠隔操作により小腸上皮幹細胞の分化・成熟が制御されている3つの可能性が考えられる。これらの可能性を検討するために、(1)小腸上皮幹細胞が存在するクリプト底部の粘膜固有層内に神経細胞や神経線維が存在し、粘膜固有層内間葉系細胞あるいは幹細胞と連携しているか組織学的に検討する。(2)自律神経より分泌される神経伝達物質により、小腸上皮幹細胞の分化・成熟に変化が見られるか解析するために、小腸クリプトのゲル内3次元培養系に神経伝達物質等を加え、小腸オルガノイド形成過程におけるそれらの物質の影響を解析する。

## 3. 研究の方法

### (1)小腸切片の免疫染色

C57BL/6 マウスや Lgr5-GFP-IRES-CreERT2 (Lgr5-GFP) マウスの小腸を 4%パラフォルムアルデヒド固定し、パラフィン切片や凍結切片を作成した。神経細胞のマーカー ( $\alpha$ -III tubulin、S-100、VIP、VPAC1R 等) やパネート細胞のマーカー (lysozyme) で染色して蛍光顕微鏡で観察した。また、これらの抗体を用いて DAB 染色も行った。

### (2)小腸クリプトのゲル内3次元培養

上記マウス的小腸よりクリプトを分離し、佐藤らの方法 (Sato T et al. Nature 2009) により、サイトカイン存在下マトリゲル内で3次元培養し、オルガノイドを形成させた。この系に Substance P や VIP を加えて小腸オルガノイド形成過程におけるそれらの物質の影響を検討した。

また、培養2週間後オルガノイドをマトリゲルから回収して凍結切片を作成し、上記抗体で染色して蛍光顕微鏡にて観察した。

## 4. 研究成果

### (1)小腸上皮幹細胞および粘膜固有層内間葉系細胞と神経線維との連携の組織学的検討

小腸上皮幹細胞のマーカーとして Lgr5 分子が知られているが、この分子を検出できる高感度の抗体はまだ得られていない。小腸上皮幹細胞はクリプト底部に存在し、パネート細胞に接着した状態で存在する。従って、パネート細胞を検出すれば、小腸上皮幹細胞の位置を間接的ではあるが推定できる。神経細胞のマーカー ( $\alpha$ -III tubulin や S-100) とパネート細胞のマーカー (lysozyme) とで、マウス小腸パラフィン切片と凍結切片をそれぞれ二重染色して蛍光顕微鏡で観察したところ、クリプト直下の間葉系細胞近傍に神経細胞や神経繊維が認められた。この結果は、神経線維が小腸上皮幹細胞に直接接触せずに間葉系細胞を介して、あるいは神経伝達物質を介して、上皮細胞の分化や成熟を制御している可能性を示唆している。

小腸上皮細胞や粘膜固有層内間葉系細胞におけるアドレナリン受容体やアセチルコリン受容体の発現についても顕微鏡で検討したが、特異的に染まる細胞は検出できなかった。

### (2)小腸オルガノイド形成過程における神経伝達物質の影響

マウス小腸クリプトのゲル内培養系に神経伝達物質 (VIP や Substance P) を加えて培養し、小腸オルガノイドの形成に対するそれらの物質の影響を解析したところ、VIP では濃度依存的に小腸オルガノイド形成が抑制され、1 nM 添加でオルガノイド数は無添加群の半分近くまで減少した。

VIP 添加によりオルガノイド構成細胞の分化系譜に変化が起るかをオルガノイド切片の免疫染色により検討した。VIP 添加によりオルガノイド総数は減少するが、オルガノイド内のパネート細胞や杯細胞数には変化がなく、分化系譜の振り分けには直接影響がないと思われた。従って、VIP は小腸上皮幹細胞に作用し、その増殖や分化を抑制していると考えられる。

上皮様形態を持つ CHO-K1 細胞株に対して VIP は抑制作用を示さない事から、上記のオルガノイド形成抑制は、単なる細胞毒性によるのではなく、オルガノイド形成過程に特異的な抑制現象であると推察された。

一方、Substance P では、オルガノイド形成に対する抑制や刺激作用は見られなかった。

(3) 小腸や小腸オルガノイドにおける VIP とその受容体の組織学的解析

小腸上皮幹細胞を組織学的により厳密に特定するため、Lgr5-GFP マウスを使用した。このマウスでは、小腸上皮幹細胞のマーカーである Lgr5 分子の発現に伴い GFP 蛍光タンパクも発現するので、GFP を指標にして小腸上皮幹細胞を特定できる。このマウスの小腸切片の免疫組織染色結果から、VIP 陽性神経細胞が、GFP 陽性である Lgr5 細胞(小腸上皮幹細胞)近辺の間葉系細胞の直下に存在している事が明らかになった。さらに、VIP の受容体(VPAC1R)を持つのは Lgr5 細胞ではなく、パネート細胞である事も判明した。

Lgr5-GFP マウス小腸から分離したクリプトや、クリプト培養によって得られた小腸オルガノイドの免疫組織染色結果からもパネート細胞が VPAC1R を持つ事が確認された。パネート細胞は、小腸上皮幹細胞のニッチ細胞としての機能を持っている事から、小腸内の神経細胞は、VIP を分泌し、パネート細胞を介して小腸上皮細胞の増殖や分化を制御している可能性が示唆された。

VIP は、副交感神経より分泌される神経伝達物質であり、ムチンや胃酸、インスリンなどの分泌を制御している事が知られている。VIP の受容体(VPAC1R)の mRNA は、小腸において前脳の 10 倍以上高発現している事(Karacay B et al. J Mol Neuro 2001)、また、VPAC1R 欠損マウスでは小腸上皮の肥厚が見られるとの報告(Fabricius D et al. Pancreas 2011)がある。これらの知見と本研究結果から、VIP はパネート細胞を介して、小腸上皮幹細胞の分化・成熟を抑制的に制御している重要な神経伝達物質であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Hiroko Hisha, Toshihiro Tanaka, Shohei

Kanno, Yoko Tokuyama, Yoshihiro Komai, Shuichi Ohe, Hirotsugu Yanai, Taichi Omachi, and Hiroo Ueno:

Establishment of a Novel Lingual Organoid Culture System: Generation of Organoids Having Mature Keratinized Epithelium from Adult Epithelial Stem Cells

Scientific Reports, 3:3224, 2013

(DOI:10.1038/srep03224) 査読: 有

[学会発表](計5件)

比舎 弘子、田中 敏宏、菅野 渉平、徳山 陽子、駒井 資弘、大江 秀一、矢内 洋次、大町 太一、石垣 和彦、田中 聖道、厚海 奈穂、吉田 真子、熊野 恵城、上野 博夫：  
舌上皮細胞3次元培養システムの確立：舌上皮幹細胞からのオルガノイド形成  
第103回日本病理学会総会  
2014年4月26日 広島(ANAクラウンプラザホテル広島)

田中 敏宏、駒井 資弘、矢内 洋次、大江 秀一、大町 太一、厚海 奈穂、菅野 渉平、吉田 真子、比舎 弘子、熊野 恵城、岡崎 和一、上野 博夫：

舌糸状乳頭角化上皮細胞の維持・再生を担う舌上皮幹細胞の同定  
第72回日本癌学会  
2013年10月3日 横浜(パシフィコ横浜)

田中 敏宏、駒井 資弘、徳山 陽子、大町 太一、矢内 洋次、大江 秀一、厚海 奈穂、菅野 渉平、比舎 弘子、岡崎 和一、上野 博夫：

舌糸状乳頭角化上皮細胞の維持・再生を担う舌上皮幹細胞の同定  
第102回日本病理学会総会  
2013年6月6日 札幌(ロイトン札幌)

比舎 弘子、上野 博夫：

Neuroregulation of Intestinal Epithelium by Neurotransmitters

第41回日本免疫学会総会

2012年12月5日 神戸(神戸国際展示場)

神田 晃、大江 秀一、矢内 洋次、田中 敏宏、駒井 資弘、大町 太一、徳山 陽子、西田 真子、山本 真理、榎 政彦、比舎 弘子、上野 博夫：

フローサイトメトリーによる多色細胞系譜マウスを背景に持つ遺伝子改変マウスの解析

第22回日本サイトメトリー学会

2012年6月29日 大阪(千里ライフサイエンスセンター)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

比舍 弘子 (HISHA, Hiroko)  
関西医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90151422

### (2) 研究分担者

保坂 直樹 (HOSAKA, Naoki)  
関西医科大学・医学部・講師  
研究者番号：30388459

槇 政彦 (MAKI, Masahiko)  
関西医科大学・医学部・講師  
研究者番号：80297001

神田 晃 (KANDA, Akira)  
関西医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70375244