

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2013

課題番号：24689054

研究課題名(和文) 腸管上皮細胞に発現するLGR5のスプライシングバリエントの解析

研究課題名(英文) LGR5 splicing variant in intestinal epithelial cells

研究代表者

西村 潤一 (Nishimura, Junichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20379209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 6,400,000円、(間接経費) 1,920,000円

研究成果の概要(和文)：手術検体より採取した上皮細胞を解析すると、回腸、上行結腸、横行結腸、S状結腸、直腸にLGR5のスプライシングバリエントが発現していることが分かった。これらのクローニングされたバリエントをHEK293細胞に導入すると、バリエントでは増殖能の低下を認めた。さらにWntシグナルはバリエントにおいて活性化されていることが示された。また、in situ hybridizationを用いて局在を解析した結果、バリエントはCBCよりも上方に発現していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：LGR5 splicing variants were expressed in the epithelium of ileum, ascending colon, transverse colon, sigmoid colon, and rectum. HEK293 cells which were overexpressed total LGR5 or splicing variant LGR5 grows slowly in splicing variant overexpressed cells. Wnt signal was activated in splicing variant overexpressed cells. Splicing variant LGR5s were expressed in the upper of CBC using in situ hybridization assay.

研究分野：消化器外科・下部

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：LGR5 スプライシングバリエント 腸管上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)腸管上皮に存在する細胞群

腸管上皮細胞は体内において細胞分裂速度の速い細胞のひとつとして知られている。小腸腸管上皮は吸収上皮細胞、胚細胞、内分泌細胞、パネート細胞が存在する。ディフェンシンなどの抗菌ペプチドを分泌するパネート細胞は陰窩底部に局在しその部位に20-25日間とどまる。吸収上皮細胞は水分・塩分の吸収する機能を持ち、胚細胞は粘液の分泌により腸上皮を保護する作用がある。内分泌細胞は消化管ホルモンの産生に携わり、腸管蠕動運動や他のホルモン分泌を調整している。この3種類の細胞は分化とともに陰窩から絨毛に沿って移動し、絨毛の頂点付近でアポトーシスによる脱落することが知られている。腸管上皮細胞の幹細胞を含む未分化細胞は陰窩に局在し、増殖とともに分化細胞を産生する。このように腸管上皮細胞は陰窩に存在する幹細胞を頂点としたヒエラルキーが明確な細胞群である。

(2)腸管上皮細胞の幹細胞

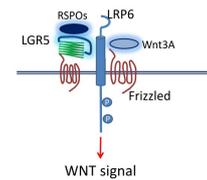
腸管上皮細胞の局在部位については1950年代から議論されている。陰窩底から4番目の細胞が3Hの取り込みと保持が高頻度に認められることから、この+4 positionにいる細胞が幹細胞であると考えられている(+4細胞説)。幹細胞は細胞回転が非常に遅いと考えられるようになり+4細胞説は支持されてきた。その後腸管上皮に限らず幹細胞を同定する研究は幹細胞マーカーを検出することに重点が置かれるようになった。神経幹細胞のマーカーであるMusashi-1や1-インテグリンが腸管上皮幹細胞に発現していることが報告された。また、Bmi1-CreER×Rosa26LacZマウスは+4細胞に発現し、陰窩底や絨毛の上皮細胞に移動していることが報告された(Sangiorgi, E Nature Genet 2008)。その他pPTEN、pAKT、sFRP5、Sox4、Dcamk11などが+4細胞に発現していることが報告されている。これらの結果は+4細胞説を支持する内容である。

1970年代にはパネート細胞には含まれた陰窩基底にある細胞(Crypt base columnar cell: CBC細胞)が幹細胞であると提唱された。また、BarkerらはCBC細胞のみに発現していると考えられたLgr5に注目し、Lgr5のノックインマウス(Lgr5-GFP-IRES-CreER)が作成された。Rosa26LacZマウスと交配しタモキシフェンを投与した結果、Lgr5陽性細胞とその子孫細胞をLazにより可視化することに成功した(Barker N. Nature 2007)。この標識した細胞の経時的・組織化学的な解析

により4種類の上皮細胞に分化するとともに、CBC細胞は永続的に自己複製していることが示された。これらのことはLgr5陽性のCBC細胞が腸管上皮幹細胞であることを示唆している。SatoらはLgr5-GFP陽性細胞を回収しEGF、BMPを阻害するNoggin、R-spondin1の環境下で培養することで単一細胞からのオルガノイドを形成することに成功している(Sato T. Nature 2009)。また、Lgr5-GFP陽性細胞の遺伝子発現を解析すると、Ascl2、Olfm4、Tnfrsf19などの遺伝子もCBC特異的に発現していることが分かった。Ascl2はLgr5の転写制御に関与しており、Ascl2ノックアウトマウスは陰窩の腸管上皮幹細胞が消失していることが報告された。これらのことはLgr5を発現している細胞は幹細胞であることを示唆している。このように腸管上皮幹細胞には2種類あるのではないかと考えられているが、In vivo lineage tracingは標的遺伝子非発現細胞が幹細胞でないと否定できるわけではないことは注意すべきである。

(3)LGR5に関する最近の研究

LGR5に関しては上述のように幹細胞のマーカーであると考えられ、tracingの技術などにより研究が進んできた。LGR5タンパクの構造7回膜貫通型TM domainを有したorphan受容体であり、その構造はFSH、LH、TSHなどのホルモンに対するレセプターとよく似ている。腸管上皮幹細胞の維持には近傍に存在するPaneth細胞からのWnt3を介したWntシグナルが必須であることが示された(Sato, Nature 2011)。最近まで、LGR5のレセプターに対するリガンドは不明であったが、wntシグナルと関連があるR-spondinがLGR5に結合するとFrizzled-LRP6複合体との会合を介して下流の典型的なwntシグナル伝達が引き起こされることが示された(右図、Carmon, PNAS 2011, Lau, Nature 2011)。このようにLGR5は幹細胞のマーカーとしてだけでなく、Wntシグナル伝達に重要であることが判明した。



(4)当科におけるこれまでの研究

当科において大腸癌の切除検体を用いて癌部におけるLgr5の発現と予後の解析を行った。Lgr5の発現は癌部において上昇し、c-mycの発現と制の関連を示し、高発現群はリンパ節転移、肝転移が多かった。また、Lgr5の高発現は生存率とは関連がなかったが無病生存率が低かった(Takahashi H.

Ann Surg Oncol 2011)。この研究の過程で Lgr5 の mRNA の PCR を施行した結果、Lgr5 の 全長よりも短いバンドが増幅されていることが分かった。この PCR 産物をシーケンスで塩基配列を解析した結果、Lgr5 のエクソン 5 が欠損した配列やエクソン 5-8 が欠損した配列が確認された。この splicing variant はヒト腸管においてもタンパクに翻訳されていることが Western blot により確認された。LGR7 の splicing variant は LGR7 に競合することによりシグナルを抑制することが知られていることから、今回検出した LGR5 splicing variant も LGR5 からのシグナルに影響を及ぼす可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

ヒト LGR5 splicing variant の生理的意義について、分子生物学的に解析することを目的とする。

3. 研究の方法

Lgr5 splicing variant の発現解析ならびに機能解析

消化器手術症例から摘出した腸管を用いて、各腸管における LGR5 splicing variant の発現を mRNA を用いた qPCR で比較する。また、クローニングし発現ベクターを作製する。現在下図の通り LGR5 の LRR (Leucin Rich Repeat) 部位の PCR にて splicing variant が存在することが分かっている。

(対象) 当科にて待機的手術を施行する 20 歳以上の消化器癌症例を対象とする。切除された検体より、胃全摘の症例から胃、十二指腸を、膵頭十二指腸切除術を施行する症例から空腸を、右半結腸切除術を施行する症例から回腸および上行結腸を、左半結腸切除術を施行する症例から横行結腸、下行結腸を、S 状結腸切除を施行する症例から S 状結腸、低位前方切除術を施行する症例から直腸を、各々非癌部を採取する。

(方法) 採取した検体を 20mMEDTA/PBS に室温で 20 分浸透することにより腸管上皮細胞を陰窩も含めて分離する。Trizol を用いて RNA を抽出後、RT-PCR により cDNA を作製する。exon4 と exon9 の各部位でプライマーを作製し PCR により増幅し、電気泳動で増幅された DNA 長により splicing variant の発現状況を確認する。また、各 splicing variant と full length form をクローニングし、各 splicing variant と full length form の発現ベクターを作成し、Lipofectamine を用いて HEK293 に導入することにより過剰発現系を確立する。また、同様に Lentivirus による恒常的過剰発現系を確立する。MTT

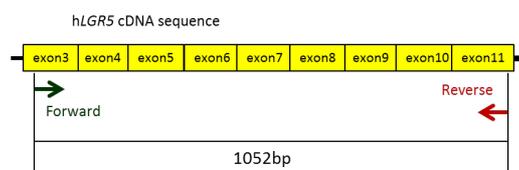
試験により過剰発現した細胞での細胞増殖能を Rspodin1 の添加の有無、Wnt3A の添加の有無で比較する。また、PI により DNA を標識し FACS を用いて細胞周期の比較を行う。

4. 研究成果

Lgr5 スプライシングバリエントの発現解析ならびに機能解析

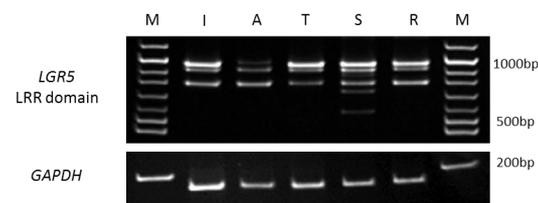
回腸、上行結腸、横行結腸、S 状結腸、直腸より検体を採取し、上皮のみを EDTA を用い

Primer Design



て分離した。下図のようにプライマーを設計し、各検体の cDNA を解析した。

Electrophoresis (5% polyacryl amide)



I: ileum, A: ascending colon, T: transverse colon
S: Sigmoid colon, R: rectum, M: marker

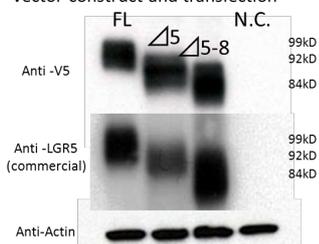
結果、全長のバンドよりも短いバンドを多数認めた(下図)。

これらのスプライシングバリエントと考えられるバンドを抽出しシーケンスにより exon5 欠損, exon5-8 欠損などが確認された。また、Western blotting 法により各スプライシングバリエントのタンパクが存在することを確認した。

そこで以降の実験は exon5 欠損, exon5-8 欠損の 2 種類のスプライシングバリエントに注目して解析を行った。各バリエントをクローニングし、HEK293 に導入することで過剰発現株を樹立した。樹立した細胞株は western blotting 法により発現を確認した(下図)。

Western Blotting

Over-expression in cell strain (HEK293)
Vector construct and transfection

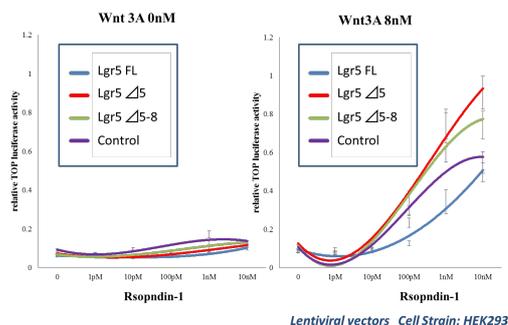


これらの細胞の増殖能を解析すると、バリエントを導入した細胞株で増殖能は低下し、全長の LGR5 を導入した細胞株で増殖能の上昇を認めた。

LGR5 スプライシングバリエントの Wnt シグ

ナルに対する生理的意義

HEK293 細胞に全長 LGR5、exon5 欠損 LGR5、exon5-8 欠損 LGR5 を過剰発現させた。TOP flash ベクターを導入後に Wnt3A、Rspodin1 を各濃度で添加し、ルシフェラーゼを用いて Wnt シグナルの活性化を解析した（下図）。



結果、Wnt3A、Rspodin1 の濃度依存的に活性化を認め、また、Rspodin1 が低濃度である場合には全長 LGR5 において活性化が強く、高濃度ではスプライシングバリエーションにおいて活性が強いという結果であった。この Wnt シグナルの活性化は細胞増殖に関連すると考えられ、Rspodin1 の生理的濃度がどの程度であるのか解析が必要である。

LGR5 スプライシングバリエーションの局在について

欠損したバリエーションを検出する方法がないために、総 LGR5、全長 LGR5 を検出することにより、引き算で LGR5 スプライシングバリエーションの局在を解析することとした。in situ hybridization により総 LGR5、全長 LGR5 を染色した。結果、総 LGR5 は CBC 領域のみならず +4 position、またそのやや上方にまで染色される上皮細胞を認めた。対して全長 LGR5 は CBC が染色された。これらのことから LGR5 スプライシングバリエーションは腸管上皮幹細胞ではなく、増殖期にある上皮細胞に発現していると考えられた。

また、全長 LGR5、各バリエーションを導入した HEK293 細胞を Rspodin1、Wnt3A で刺激し、その後膜タンパクを抽出し、V5 タグで導入した LGR5 タンパクを精製、ショットガン解析により LGR5 と共合しているタンパクの解析を行った。また、全長 LGR5、各バリエーション LGR5 を比較することで LGR5 に特異的に共合するタンパクを解析した。全長 LGR5 に結合し、各バリエーションに結合しないタンパクとしてタンパク X が抽出された。このタンパクは LGR5 の機能に深くかかわるものと考えられ、今後の解析が必要と考えられた。

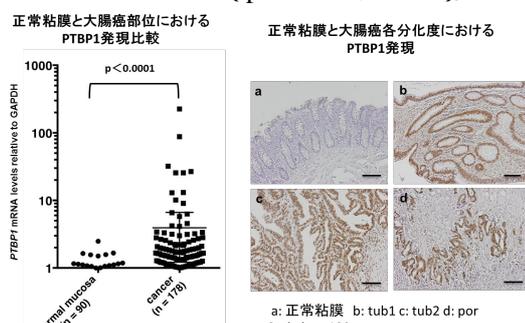
以上の結果により LGR5 にはタンパクに翻訳されるスプライシングバリエーションが存在し、この欠損により機能が大幅に変化すると考えられる。これらのバリエーションを解析することで LGR5 の機能解析が進むものと考えられる。これらの結果を現在 *らぶん* 投稿中である。

スプライシングバリエーションを左右させる PTBP1 の解析

LGR5 の解析を行う過程において、選択的ス

プライシングに関わる pyrimidine tract binding protein 1 (PTBP1) に注目して解析を行った。

当院で大腸癌に対して切除術を施行した症例の手術検体を用いた。手術検体を抗 PTBP1 抗体を用いて染色した。PKM1 と PKM2 が区別できる RT-PCR を使用することで、PKM1、PKM2 の発現を解析した。大腸癌細胞株は HCT116、DLD1、HT29、SW480 を用いた。siPTBP1 を用いることにより PTBP1 の発現を抑制した。PTBP1 発現抑制状態における細胞増殖能を解析した。PTBP1 発現量により 2 群に分けた検体で CD44v8-10 の発現量を比較した。PTBP1 の発現量により手術症例を 2 群に分けて、2 群間で予後を比較した。【結果】正常粘膜に比して癌組織で PTBP1 の mRNA は有意に発現上昇していた ($p < 0.0001$ 、下図)。



正常粘膜と癌組織で正常粘膜では PKM1 も発現しているのに比して癌組織ではほとんどが PKM2 にシフトしていると考えられた。この PKM2 へのシフトは siPTBP1 により発現抑制することで改善した。PTBP1 の mRNA の発現量で 2 群に分け、CD44v8-10 の mRNA 発現量を比較した結果 PTBP1 の発現が高い症例では CD44v8-10 へのシフトが起こっていた。また、siPTBP1 により大腸癌細胞株の増殖能を低下させ、浸潤能を低下させた。手術検体の PTBP1 の mRNA 発現量はリンパ節転移と相関があり、また生存率、無再発生存率ともに高発現群で予後不良であった。

大腸癌における PTBP1 は癌代謝に関わる PKM2、転移や浸潤に関わる CD44v8-10 の選択的スプライシングを制御する key molecule であり、実際の手術症例の予後とも相関した。PTBP1 の機能解析を進めることにより大腸癌の浸潤、転移のメカニズムが解明されるものと期待される。また、LGR5 のスプライシングバリエーションにも深くかかわるものと考えられ、上皮細胞における PTBP1 の解析を行う予定である。また、PTBP1 に関する論文を現在投稿中である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

浜部敦史、山本浩文、西村潤一、太田勝也、高橋秀和、植村守、原口直紹、竹政伊知朗、水島恒和、池田正孝、関本貢嗣、石井秀始、土岐祐一郎、森正樹。Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor5 (LGR5)のヒト腸管における発現解析。第 23 回日本消化器癌発生学会総会(徳島、2012/11)

西村潤一、高橋秀和、原口直紹、植村守、畑泰司、竹政伊知朗、水島恒和、山本浩文、土岐祐一郎、森正樹。PTBP1 は大腸癌において、CD44、PKM のバリエーションをコントロールする。第 114 回日本外科学会的学術集会(京都、2014/4)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村潤一(Nishimura Junichi)
大阪大学医学系研究科・助教
研究者番号：20379209

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：