

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350167

研究課題名(和文)小腸上皮の時期的・部位的分化機構の解明

研究課題名(英文)The study on the mechanism of time- and location-specific differentiation in the epithelium of small intestine

研究代表者

馬場 良子 (BABA, Ryoko)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：90271436

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)：小腸吸収上皮細胞は均質な細胞集団として捉えられがちであるが、私たちはこれまでに齧歯類を用いて、乳飲期と成熟期では異なる形態を示すことを報告している。そこで、時期・部位特異的吸収上皮細胞について形態学的解析を行い、その特徴が顕著な時期及び部位毎に小腸上皮における遺伝子発現を網羅的に解析した。また、小腸上皮から幹細胞を含む陰窩を単離、器官培養した結果、単離後の幹細胞から生じる細胞は本来の時期や部位の特徴を示すことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We have reported that the absorptive cells of small intestine differ by age and its location. However, variation of the cells was not well known. To elucidate the differentiation mechanism of the cells, we analyzed the epithelium of small intestine by using electron microscope, DNA microarray and organoid methods. During suckling period, the absorptive cells of upper part of small intestine had well-developed apical transcytic membrane system. The cells of lower part had well-developed apical endocytic membrane system including giant lysosome. On the other hand, in adult, the absorptive cells of small intestine had neither apical transcytic nor endocytic membrane system. In the microarray analysis, the expression level of time- and location-specific structure and function related genes tended to be higher. In the organoid analysis, the absorptive cells derived from isolated crypt had similar time- and location-dependent structure. Further investigation is needed to confirm our findings.

研究分野：組織学

キーワード：小腸 吸収上皮細胞 乳飲期 トランスサイトーシス エンドサイトーシス オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

私たちはこれまで小腸上皮の大部分を占める吸収上皮細胞について研究を行ってきた。その形態および機能は摂取する栄養が大きく変化する“出生”および“離乳”というタイミングでダイナミックに変化し、また、その変化が小腸の部位によって異なることを報告してきた(藤田ら, 顕微鏡, 2010, Kumagai N et al, Med Mol Morphol, 2011)。特に、出生から離乳までの期間に存在する吸収上皮細胞は成熟期とは形態学的に異なり、小腸の上部と下部でも顕著な差異を有することが明らかとなった。

小腸は生体において最も活発に細胞代謝が行われている組織の1つであり、3~5日ですべての上皮細胞が新しい細胞に置き換わる。この活発な細胞代謝は小腸陰窩内に存在する幹細胞によって支えられており、その研究の歴史は古い。しかし、小腸幹細胞については2つの説(Snippert H et al, Cell, 2010, Tian H et al, Nature, 2011)が論争されるなど、現在も脚光を浴び、新たな知見が得られている研究分野の1つでもある。小腸幹細胞からは主として4種類の細胞(吸収上皮細胞、杯細胞、内分泌細胞、パネート細胞)が分化することは教科書的にも知られている事実であり、各細胞が機能を果たすべき位置に配置されながらそれぞれの運命をたどる。小腸幹細胞からこれら4種類の細胞への分化等については数多くの研究が行われており、その機序等に関しては解明が進みつつあるものの、私たちが着目している時期や部位によって異なる吸収上皮細胞の存在については、網羅的な比較研究が行われておらず、その存在の認知度は低い。そのため、吸収上皮細胞は均質な細胞集団として捉えられ、成熟期の吸収上皮細胞への移行機序に関する報告も皆無である。

2. 研究の目的

私たちのこれまでの研究結果より、時期及び部位特異的吸収上皮細胞が存在し、その一部は食物アレルギー発症との関連も示唆されることから、これらの吸収上皮細胞の多様性と動態に関する詳細な情報を得ることは、食物アレルギーの発症予防にも役立つと考える。具体的には、以下を目的とする。

- (1) 時期および部位特異的な小腸吸収上皮細胞について、構造および機能を詳細に解明する。
- (2) (1)により得られた形態および機能情報を基に、時期的および部位的に特徴的な差異が現れている小腸を選び、マイクロアレイ解析により遺伝子発現を網羅的に解析する。

- (3) (2)により得られた遺伝子情報を基に、小腸吸収上皮細胞における細胞内輸送に関連するタンパク質の発現および局在について解析する。

3. 研究の方法

時期・部位特異的小腸吸収上皮細胞の形態学的解析

新生仔期、乳飲期、離乳期、成熟期 Wistar 系ラット、C57BL/6J 系マウスの幽門から回盲部を採取し、以下の検索を行った。

- ・小腸粘膜表面の形態、特に、絨毛および吸収上皮細胞の微絨毛の形態について走査型電子顕微鏡で観察を行う。
- ・HE染色等を行い、小腸の組織学的構築を観察する。
- ・吸収上皮細胞、特にエンドサイトーシスやトランスサイトーシスに参与する膜系について透過型電子顕微鏡で観察を行う。
- ・小腸管腔内に HRP を投与して1時間後の小腸吸収上皮細胞について、透過型電子顕微鏡で観察し、細胞頂部からのエンドサイトーシス機構、トランスサイトーシス機構の有無や発達の程度を検索する。

時期・部位特異的小腸吸収上皮細胞の遺伝子解析

形態学的解析で得られた結果を基に、トランスサイトーシス機構が最も発達した吸収上皮細胞の得られる上部小腸、エンドサイトーシス機構が最も発達した吸収上皮細胞の得られる下部小腸を選び、成熟期小腸のそれに相当する部位(小腸上部、小腸下部)と比較する。~の粘膜または、上皮よりそれぞれ RNA を採取し、発現している遺伝子をマイクロアレイ解析により網羅的に検索する。時期的な遺伝子発現についてはと、と、部位的な遺伝子発現についてはと、とをそれぞれ比較し、差異を検討する。

オルガノイドを用いた解析

生後7日齢および成熟期の C57BL/6J マウスより空腸および回腸を採取し、Sato らの方法によりオルガノイドを作製した。培養開始から1週間ごとにオルガノイドをサンプル化し、形態学的に解析した。

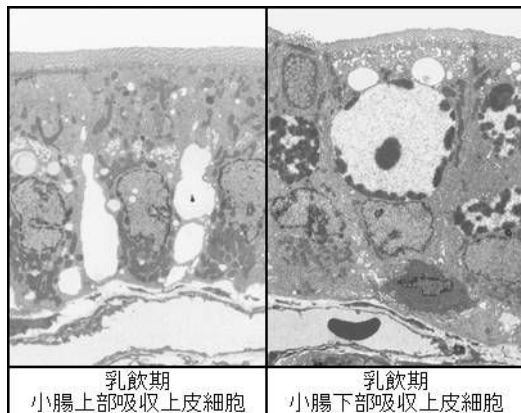
4. 研究成果

時期・部位特異的小腸吸収上皮細胞の形態学的解析

光学顕微鏡、走査型、透過型電子顕微鏡による観察の結果、離乳まで小腸の絨毛は継時的に発達した。また、離乳前、特に、生後14日齢の吸収上皮細胞において、小腸上部ではトランスサイトーシスに参与する膜系、小腸下部ではエンドサイトーシスに参与する膜系が発達していたが、それらの構造は離乳を境に減少した。

いずれの時期においても上部小腸と下部

小腸における絨毛の形態、吸収上皮細胞の形態に差異が認められた。



時期・部位特異的小腸吸収上皮細胞の遺伝子解析

形態学的解析結果を基に、吸収上皮細胞が特徴的な構造を示す時期および部位を選択し、それぞれの時期の粘膜、または上皮をサンプルとし、マイクロアレイ解析を行い、乳飲期と離乳後で発現パターンの異なる遺伝子について検索した。その結果、乳飲期空腸、回腸においては、それぞれの特徴的構造および機能と関連すると思われる遺伝子 (Rab family など) 発現の上昇が、成熟期においては機能的特徴と関連すると思われる遺伝子 (Sucrase-isomaltase など) 発現の上昇が認められた。その他に、時期によって、long non-coding RNA 等の発現上昇が認められることから、エピジェネティックな制御を受けている可能性も考えられた。

オルガノイドを用いた解析

本来はラット小腸上皮細胞 (IEC6) を使用する予定であったが、単離した陰窩上皮、または Lgr5 陽性幹細胞から、陰窩-絨毛様構造をもったオルガノイドを形成できる方法が公開された [Sato T and Clevers H. *Methods Mol Biol.* 945: 319-28 (2013)]. そこで、この方法を用い、生後7日齢および成熟期の C57BL/6J マウスより空腸および回腸を採取し、陰窩上皮を単離し、オルガノイドを作製した。

それぞれ培養開始から1週間ごとにオルガノイドをサンプル化し、形態学的に解析した結果、培養条件は同じであるにもかかわらず、単離された後の陰窩上皮から、部位および時間的な特徴を有する吸収上皮細胞が形成されることが分かった。

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13件)

Ishimatsu N, Miyamoto T, Ueno H, Hasegawa E, Kuma A, Fujimoto Y, Bando K, Nakamata J, Furuno Y, Serino R, Baba R,

Morimoto H, Doi Y, Tamura M, Otsuji Y: High glucose concentration-induced expression of pentraxin-3 in a rat model of continuous peritoneal dialysis. *Histol Histopathol.* 査読有 in press (2016)

Sakuma Y, Arita K, Baba R, Kumagai N, Fujita M:

Morphological study: Application to breastfeeding nursing, influence of supplemental feeding at the early neonatal stage -Application to breastfeeding nursing -. *Keimyung Journal of Nursing Science.* 査読有 in press (2016)

Miyagawa K, Oe S, Homma Y, Izumi H, Baba R, Harada M:

Lipid-induced endoplasmic reticulum stress impairs selective autophagy at the step of autophagosome-lysosome fusion in hepatocytes. *The American Journal of Pathology.* 査読有 in press (2016)

doi: 10.1016/j.ajpath.2016.03.003.

Takahashi H, Baba R, Ishimatsu N, Morimoto H, Fujita M:

Morphological analysis of small intestinal organoids. *The Journal of Physiological Sciences.* 査読無 65(Supplement 1): S164 (2015)

Teramachi J, Morimoto H, Okamura H, Haneji T:

Critical role of PKR in TNF- α -induced osteoclastogenesis. *The Journal of Physiological Sciences.* 査読無 65(Supplement 1): S186 (2015)

Ishimatsu N, Miyamoto T, Morimoto H, Nakamata J, Baba R, Otsuji Y, Tamura M:

Pentraxin3 expression in a rat model of peritoneal dialysis. *The Journal of Physiological Sciences.* 査読無 65(Supplement 1): S218 (2015)

Nguyen KH, Suzuki H, Ohbuchi T, Wakasugi T, Koizumi H, Hashida K, Baba R, Morimoto H, Doi Y:

Possible participation of acidic pH in bone resorption in middle ear cholesteatoma. *査読有 Laryngoscope.* 124(1):245-50 (2014)

doi: 10.1002/lary.23883.

Sakuma Y, Baba R, Arita K, Morimoto H, Fujita M:

Food allergens are transferred intact

across the rat blood-placental barrier in vivo. *Med Mol Morphol*. 査読有 47(1):14-20 (2014)
doi: 10.1007/s00795-013-0029-9.

Fukudome I, Kobayashi M, Dabanaka K, Maeda H, Okamoto K, Okabayashi T, Baba R, Kumagai N, Oba K, Fujita M, Hanazaki K:

Diamine oxidase as a marker of intestinal mucosal injury and the effect of soluble dietary fiber on gastrointestinal tract toxicity after intravenous 5-fluorouracil treatment in rats. 査読有 *Med Mol Morphol*. 47(2):100-7 (2014)
doi: 10.1007/s00795-013-0055-7.

Liu MS, Wang D, Morimoto H, Yim HC, Irving AT, Williams BR, Sadler AJ: Molecular dynamics reveal a novel kinase-substrate interface that regulates protein translation. *J Mol Cell Biol*. 査読有 6(6):473-85 (2014)
doi: 10.1093/jmcb/mju044.

Morimoto H, Baba R, Haneji T, Doi Y: Double-stranded RNA-dependent protein kinase regulates insulin-stimulated chondrogenesis in mouse clonal chondrogenic cells, ATDC-5. *Cell Tissue Res*. 査読有 351(1):41-7 (2013)
doi: 10.1007/s00441-012-1521-6.

Haneji T, Hirashima K, Morimoto H: Okadaic acid activates the PKR pathway and induces apoptosis through PKR stimulation in MG63 osteoblast-like cells. *Int J Oncol*. 査読有 42(6):1904-10 (2013)
doi: 10.3892/ijo.2013.1911.

Aoki S, Udo K, Morimoto H, Ikeda S, Takezawa T, Uchihashi K, Nishijima-Matsunobu A, Noguchi M, Sugihara H, Toda S: Adipose tissue behavior is distinctly regulated by neighboring cells and fluid flow stress: a possible role of adipose tissue in peritoneal fibrosis. *J Artif Organs*. 査読有 16(3): 322-31 (2013)
doi: 10.1007/s10047-013-0702-8.

[学会発表](計 17 件)

馬場良子、國分啓司、森本景之、藤田 守: 乳飲期由来オルガノイドの形態学的解析 第 121 回 日本解剖学会 総会・全国学術集会 2016 年 3 月 28-30 日 ビッグパレット ぶくしま (福島県・郡山市)

高橋宏典、馬場良子、國分啓司、森本景之: 培養小腸オルガノイドの形態学的解析 第 57 回 日本顕微鏡学会 九州支部総会・学術講演会 2015 年 11 月 21 日 九州大学 (福岡県・春日市)

馬場良子、國分啓司、森本景之、藤田 守: 乳飲期空腸由来オルガノイドの形態学的解析 日本解剖学会 第 71 回 九州支部学術集会 2015 年 10 月 31 日 熊本大学 (熊本県・熊本市)

馬場良子、國分啓司、石松菜那、森本景之、藤田 守: 乳飲期回腸由来オルガノイドの形態学的解析 第 47 回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2015 年 9 月 18-19 日 長崎大学 (長崎県・長崎市)

藤田 守、熊谷奈々、馬場良子、森本景之、小林道也、中村桂一郎: 胎内低栄養環境における消化管のエピゲノム変化 第 47 回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2015 年 9 月 18-19 日 長崎大学 (長崎県・長崎市)

Takahashi H, Baba R, Ishimatsu N, Morimoto H, Fujita M: 小腸の部位特異的オルガノイドの形態学的解析 Morphological analysis of small intestinal organoids. 第 120 回 日本解剖学会 総会・全国学術集会、第 92 回 日本生理学会大会合同大会 (The 120th Annual Meeting of The Japanese Society of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan) 2015 年 3 月 21-23 日 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)

馬場良子、森本景之、熊谷奈々、石松菜那、藤田 守: 小腸絨毛の再生過程における細胞動態 第 56 回 日本顕微鏡学会 九州支部総会・学術講演会 2014 年 12 月 6 日 宮崎市民プラザ (宮崎県・宮崎市)

熊谷奈々、馬場良子、森本景之、藤田 守: 妊娠初期の低栄養が出生後の大腸に及ぼす影響に関する超微形態学的研究 第 56 回 日本顕微鏡学会 九州支部総会・学術講演会 2014 年 12 月 6 日 宮崎市民プラザ (宮崎県・宮崎市)

熊谷奈々、馬場良子、森本景之、藤田 守: 妊娠初期の低栄養が新生児 (仔) の小腸に及ぼす影響に関する形態学的研究 日本解剖学会 第 70 回 九州支部学術集会 2014 年 10 月 25 日 産業医科大学 (福岡県・北九州市)

藤田 守、馬場良子、熊谷奈々、森本景之: 発達過程における小腸吸収上皮細胞の工

ンドサイトーシスに關与する膜系の変容
第 119 回 日本解剖学会総会・全国學術集
会 2014 年 3 月 27-29 日 自治医科大学
(栃木県・下野市)

熊谷奈々、馬場良子、森本景之、西田麗代、
藤田 守：
妊娠中期の低栄養が新生児の腸管に及ぼ
す影響に關する形態学的研究 第 119 回
日本解剖学会総会・全国學術集會 2014 年
3 月 27-29 日 自治医科大学 (栃木県・下
野市)

熊谷奈々、馬場良子、森本景之、西田麗代、
中村宏子、川俣沙織、藤田 守：
妊娠中期の低栄養が出生後の大腸に及ぼ
す影響に關する超微形態学的研究 第 69
回 日本顕微鏡学会 九州支部総会・學術講
演會 2013 年 12 月 14 日 九州大学(福岡
県・福岡市)

熊谷奈々、馬場良子、森本景之、西田麗代、
中村宏子、川俣沙織、藤田 守：
妊娠中期の低栄養が新生児の小腸に及ぼ
す影響に關する超微形態学的研究 日本
解剖学会 第 69 回 九州支部學術集會
2013 年 11 月 2 日 鹿児島大学(鹿児島県・
鹿児島市)

藤田 守、馬場良子、熊谷奈々、森本景之：
消化管上皮における消化・吸収機構 (シン
ポジウム) 第 45 回 日本臨床分子形態学
会総会・學術集會 2013 年 9 月 13-14 日
アクロス福岡 (福岡県・福岡市)

森本景之、馬場良子、佐藤永洋、藤田 守：
消化管上皮における二本鎖 RNA 依存プロテ
インキナーゼ (PKR) の発現 (シンポジウ
ム) 第 45 回 日本臨床分子形態学会総
会・學術集會 2013 年 9 月 13-14 日 福岡
アクロス福岡 (福岡県・福岡市)

藤田 守、熊谷奈々、馬場良子、森本景之、
西田麗代、脇丸千洋：
小腸粘膜上皮の新生・移動・脱落機構の解
析 第 118 回 日本解剖学会総会・全国学
術集會 2013 年 3 月 28-30 日 サポート
ホール高松・香川国際會議場 (香川県・
高松市)

馬場良子、森本景之、中俣潤一、石松菜那、
藤田 守：
小腸吸収上皮細胞の時期的・部位的差異
第 118 回 日本解剖学会総会・全国學術集
會 2013 年 3 月 28-30 日 サポートホ
ール高松・香川国際會議場 (香川県・高松
市)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.uoeh-u.ac.jp/University/dept/medicine/2kaibo.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 良子 (BABA, Ryoko)
産業医科大学・医学部・講師
研究者番号：90271436

(2) 研究分担者

森本 景之 (MORIMOTO, Hiroyuki)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：30335806

藤田 守 (FUJITA, Mamoru)
中村学園大学・栄養科学部・教授
研究者番号：60037471