

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 17 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440160

研究課題名(和文)消化管上皮幹細胞の起源と幹細胞制御におけるNotchシグナル経路の役割

研究課題名(英文)Origin of the adult epithelial stem cell in the *Xenopus laevis* intestine and the role of Notch signaling in the stem cell regulation

研究代表者

長谷部 孝 (Hasebe, Takashi)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70329027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アフリカツメガエルの消化管では、変態期に甲状腺ホルモン(TH)の作用により、幼生型上皮細胞のほとんどが除去されるが、一部は成体型上皮幹細胞へと脱分化し、増殖・分化を経て成体型上皮を形成する。

本研究により、この消化管再構築においてTHによりNotch経路が活性化することがわかった。また、Notch経路を阻害すると、Notch応答遺伝子に加え、上皮幹細胞マーカーであるLGR5の発現も抑制された。さらに、本経路の阻害により、吸収細胞への分化の抑制と分泌細胞への分化の促進がみられたことから。これらの結果より、Notchシグナルは消化管再構築に重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the small intestine of *Xenopus laevis* during metamorphosis, which is caused by thyroid hormone (TH), most of the larval epithelial cells are removed by apoptosis whereas some cells dedifferentiate into the adult epithelial stem cells. They actively proliferate and differentiate to form the adult epithelium.

We found that during this intestinal remodeling, Notch signaling pathway is activated by TH and that inhibition of this pathway inhibits TH-induced up-regulation of Notch response gene and, more importantly, LGR5, an adult intestinal stem cell marker gene. In addition, inhibition of Notch suppressed differentiation of the stem cells into the absorptive epithelial cells, but facilitated their differentiation into the secretory epithelial cells. Our results suggest that Notch signaling plays important roles in the intestinal remodeling.

研究分野：発生生物学、比較内分泌学

キーワード：上皮幹細胞 消化管 甲状腺ホルモン 両生類 変態 Notchシグナル経路

1. 研究開始当初の背景

消化管は動物の生涯にわたり、食物の消化及び栄養素の吸収を担う重要な器官であり、その恒常性は厳密な制御機構によって維持されていると考えられている。特に上皮細胞は、摂取した飲食物や消化液などの刺激に曝されるため、ダメージを受けやすい。そのため哺乳類の小腸では、上皮細胞は5-7日毎に新しい細胞に入れ替わる。2007年にこの細胞再生系の要となる上皮幹細胞が同定され以来、幹細胞制御には、Hedgehog (Hh)、Notch、Wntなどのシグナル経路が関与することが明らかになりつつある。しかし、そのメカニズムは十分に解明されておらず、特に、上皮幹細胞の起源や幹細胞発生のメカニズムに関しては、ほとんど明らかにされていなかった。

無尾両生類は個体発生の過程で、甲状腺ホルモン (TH) の作用により草食の幼生から肉食の成体へと変態する。この食性の変化に備えて、消化管は劇的に再構築される。小腸上皮では幼生型細胞がアポトーシスにより除去され、新たに出現する幹細胞の増殖と分化によって成体型上皮が形成される (図1)。そして、この時期に哺乳類の小腸上皮に類似の細胞再生系を獲得する。これまでに我々は、Hhファミリーに属する Shh や Wnt の応答遺伝子である LGR5 などが成体型上皮幹細胞の出現とともに、その幹細胞で強く発現することを明らかにした。これらは哺乳類の小腸上皮幹細胞でも発現することが知られており、脊椎動物共通の幹細胞制御のメカニズムがあると予想される。我々はさらに、成体型幹細胞は幼生型上皮の脱分化により生じ、この幹細胞の発生過程では上皮組織と結合組織の組織間相互作用が不可欠であることを示す知見を得た。

このように、両生類の変態は幹細胞の起源や幹細胞制御のメカニズムを解明するための良いモデルであり、解析方法やツールも充実しつつある。

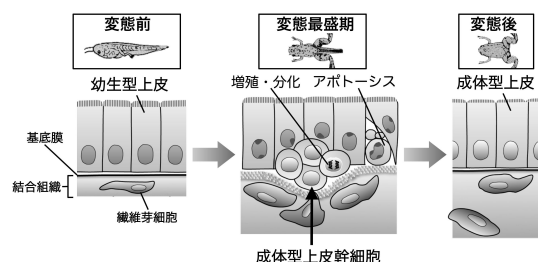


図1 アフリカツメガエル変態期の消化管再構築

2. 研究の目的

TH の作用により変態する両生類をモデルとし、変態期に出現する上皮幹細胞の起源や幹細胞制御のメカニズムを解析することを目的とした。まず、Cre/lox システムにより特定の細胞を永久標識することができるトランスジェニック (Tg) カエルを作製し、変態

期に出現する上皮幹細胞の起源を明らかにする。次に、幹細胞制御に関与することが期待される Notch シグナル経路を Cre/lox システムにより亢進 / 抑制する Tg カエルを作製し、幹細胞の発生や増殖・分化における Notch シグナル経路の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞系譜の追跡による上皮幹細胞の起源の探索

Cre レスポンダー-Tg ラインの確立

Cre による組換えの前は EGFP を、組換え後には dsRed2 を発現するようになる DNA コンストラクトを導入した Tg を作製し、成体まで成熟させて F1 Tg を得る (F0 は必ずモザイクになるため、F1 以降が必要である)。これを Cre レスポンダー-Tg ラインとする。

幹細胞特異的に発現する遺伝子の調節領域 (プロモーター) の単離と Tg カエルによる細胞特異性の検証

これまでに我々は、Ror2 や Hairy1 が変態最盛期に成体型上皮幹細胞で特異的に発現することを明らかにした。そこで、これらの遺伝子の調節領域と推測される領域をゲノムから単離し、rtTA (Dox 受容体: Tet-On システム) をドライブさせた上で、rtTA の作用により Cre が発現するカセットを組み込む。このコンストラクト (Cre ドライバー) を導入した Tg は、Dox 投与により上皮幹細胞のみで Cre が発現することが期待される。これを Tet レポーターである DRTREG Tg カエル (rtTA の作用により GFP を発現する) の受精卵に注入する。得られたダブル Tg を変態期まで飼育し、Dox 投与後に GFP を発現する細胞が期待通りであるかを確認する。

細胞系譜の追跡

で細胞特異性を確認したのち、Cre レスポンダー-Tg ラインから得た受精卵に、Cre ドライバーを導入し、ダブル Tg を得る。これを変態最盛期まで育て、Dox 投与により上皮幹細胞を dsRed で永久標識する。変態完了後に、すべての上皮細胞が dsRed を発現していれば、幹細胞を標識できたと判断する。続いて、同ダブル Tg を変態前まで飼育し、幼生型上皮に含まれることが推測される成体型上皮の予定幹細胞を Dox 投与により永久標識する。この個体を変態最盛期まで飼育、あるいは TH 処理により成体型上皮幹細胞の出現を促し、これが dsRed 陽性細胞であるかを確認する。これらの実験を通じて、成体型上皮幹細胞の起源となる細胞を特定する。

(2) 幹細胞制御における Notch シグナル経路の役割の解明

Cre ドライバー-Tg ラインの確立

Dox 投与により、全身で Cre を発現する DNA コンストラクトを導入した Tg を作製し、成体まで成熟させて F1 Tg を得る。これを Cre ドライバー-Tg ラインとする。

Cre レスポンダーコンストラクトとダブル

ル Tg の作製

Cre による組換えの前は EGFP を、組換え後には Notch 経路を亢進する遺伝子 (Notch-1CD) もしくは阻害する遺伝子 (Su(H)DBM) を発現するようになるコンストラクトを作製する。これを Cre ドライバー Tg ラインから得た受精卵に注入し、ダブル Tg を得る。

Notch 経路の亢進 / 阻害

で得られたダブル Tg を変態前まで飼育し、機能亢進の場合は TH 非存在下で、機能阻害の場合は TH 存在下で Dox を投与することで G0I を過剰発現させ、消化管再構築への影響を調べる。Tg 作製がうまくいかない場合は、アンタゴニストの投与により、同経路を阻害する (アゴニストは知られていない)。

4. 研究成果

以下の項目番号は、「3. 研究の方法」のものと対応する。

(1) 細胞系譜の追跡による上皮幹細胞の起源の探索

では、Cre レスポンダーとして、XeX (*Xenopus* Ef1) プロモーターあるいは CMV プロモーター (いずれもユビキタス) でレポーター遺伝子の発現を制御するコンストラクトを作製し、得られた F0 Tg をそれぞれ 10 匹ほど成体まで飼育した。しかしながら、いずれの F1 も non-Tg であり、生殖系の細胞にコンストラクトが導入されていないという非常に残念な結果となった。現在は、再度 F0 の作製に専心しており、F1 Tg を得られる確率を上げるため、トランスジェネシスの方法を改良したり、維持する F0 の個体数を増やす、などの対策を試みている。

で得られたダブル Tg (F0) を解析したが、GFP を発現する細胞を確認することができなかった。そのため、Ror2 や Hairy1 のプロモーターに直接 EGFP をドライブさせたコンストラクトを作製し、F0 Tg を作製して解析した。その結果、一部ではあるが、予定幹細胞と思しき細胞で GFP の発現が弱く確認され、単離したプロモーターが期待通りのものである可能性が高まった。現在は、再現性があるかどうかを確認中である。

(2) 幹細胞制御における Notch シグナル経路の役割の解明

で得られた Cre ドライバーの F0 Tg を成体まで飼育したが、F1 が全て non-Tg であった。こちらも (1) 同様に、再度 F0 の作製に専心している。

で用いる DNA コンストラクトは作製したが、で F1 Tg が得られなかったため、ダブル Tg の取得には至っていない。のライン化の後、再度実験を始める予定である。

まずは、Notch 経路に関連する遺伝子 (リガンド、受容体、応答遺伝子) の発現解析を行い、いずれも変態最盛期に TH の作用により発現が高まることがわかった。特に、応答

遺伝子である Hairy1 は上皮幹細胞特異的に、Hairy2b は結合組織特異的に発現しており、両方の組織で Notch 経路が活性化していることが示された。で述べた理由より、Notch 経路の亢進 / 阻害を行う過剰発現系は確立できなかったため、本経路の阻害剤であるセクレターゼ阻害剤 (GSI) を用いて、下記の実験を行った。

- 変態前の幼生を GSI で 3 日間処理し、その後、GSI 処理は続けたまま 3-5 日間の TH 処理により変態を促した (in vivo)。幼生の小腸を GSI 存在下で 3 日間培養し、その後、GSI 存在下で TH を添加して 5-7 日間培養し、消化管再構築を促した (in vitro)。
- 各タイムポイントにおいて、Notch 応答遺伝子、幹細胞マーカー、吸収上皮マーカー (培養のみ)、分泌上皮マーカー (培養のみ) の発現を調べた。

その結果、Notch 経路を阻害することで、Notch 応答遺伝子の TH による発現上昇が抑制された。さらに、TH による幹細胞マーカー (LGR5) の発現上昇も有意に抑制され (図 2)、細胞増殖も低下した。また、成体型上皮の分化を調べると、吸収細胞への分化が抑制され、分泌細胞への分化が促進された (図 3)。以上のことから、Notch シグナル経路は、幹細胞の発生およびその後の上皮の分化に重要な働きをしていることが明らかとなった (雑誌論文、学会発表)。Notch 経路が消化管の成体型幹細胞の制御に関与しているという知見は、脊椎動物では初めてであり、この分野において大変意義のある成果である。

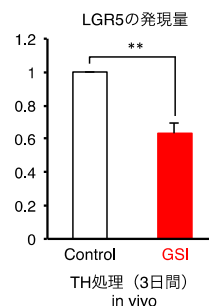


図 2 Notch 経路の阻害による LGR5 の発現抑制

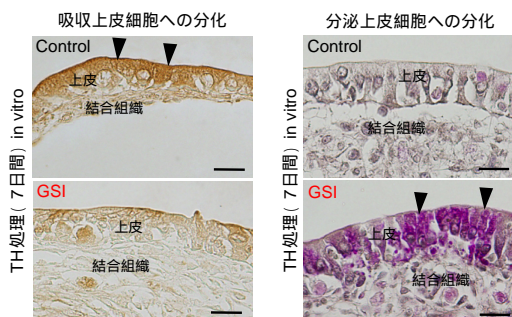


図 3 Notch 経路の阻害による吸収上皮への分化の抑制 (左) と分泌上皮への分化の促進 (右) 陽性細胞を矢尻で示している

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Hasebe T, Fujimoto K, Kajita M, Fu L, Shi Y-B, Ishizuya-Oka A. (2017). Thyroid hormone-induced activation of Notch signaling is required for adult intestinal stem cell development during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Stem Cells* 35:1028-1039 査読有り
DOI: 10.1002/stem.2544

Hasebe T, Fujimoto K, Kajita M, Ishizuya-Oka A. (2016). Thyroid hormone activates Wnt/beta-catenin signaling involved in adult epithelial development during intestinal remodeling in *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res.* 365:309-318 査読有り
DOI: 10.1007/s00441-016-2396-8

Hasebe T, Fu L, Miller TC, Zhang Y, Shi Y-B, Ishizuya-Oka A. (2013). Thyroid hormone-induced cell-cell interactions are required for the development of adult intestinal stem cells. *Cell Biosci.* 3:18 査読有り
DOI: 10.1186/2045-3701-3-18

Ishizuya-Oka A, Hasebe T. (2013). Establishment of intestinal stem cell niche during amphibian metamorphosis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 103: 305-327. 査読有り
DOI:
10.1016/B978-0-12-385979-2.00011-3

〔学会発表〕(計 10 件)

Hasebe T, Fujimoto K, Kajita M, Fu L, Shi Y-B, Ishizuya-Oka A. Thyroid hormone-induced activation of Notch signaling is required for intestinal remodeling during *Xenopus laevis* metamorphosis. The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan. 2016年11月17日-18日「沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)」

長谷部孝、梶田満子、岡敦子「ツメガエル変態期の消化管再構築における Notch シグナルの役割: DLL1 と DLL2 の発現解析」日本動物学会第 86 回大会 2015 年 9 月 19 日「朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)」

Hasebe T, Kajita M, Ishizuya-Oka A. Notch signaling-dependent gene expression of Hairy1 and Hairy2b during adult stem cell development in the

Xenopus laevis intestine. 8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology. 2014年11月7日「岡崎コンファレンスセンター(愛知県・岡崎市)」

関本篤人、福永悦也、梶田満子、長谷部孝、岡敦子「アフリカツメガエル変態期の消化管再構築における Jagged 1 と Jagged 2 の発現解析」日本動物学会第 85 回大会 2014 年 9 月 13 日「東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)」

長谷部孝、梶田満子、岡敦子「両生類変態期の消化管における Hairy1 と Hairy2b の発現は Notch シグナル依存的である」日本動物学会第 84 回大会 2013 年 9 月 28 日「岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)」

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.nms.ac.jp/nms/biology/Hasebe.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷部 孝 (HASEBE, Takashi)
日本医科大学生物学教室・准教授
研究者番号: 70329027

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

ブホルツ, ダニエル (BUCHHOLZ, Daniel R.)
シンシナティ大学生物科学科・准教授