

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860158

研究課題名(和文) 腸管上皮細胞におけるオートファジーの生理的役割

研究課題名(英文) The physiological role of autophagy in the intestinal epithelial cells

研究代表者

浅野 純平 (Junpei, Asano)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任助教

研究者番号：70463809

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)：オートファジーは細胞質内の変性タンパク質や障害を受けたオルガネラを分解する機構の一つであり、細胞の恒常性維持に重要である。本研究では腸管上皮に着目し、定常状態及びストレス環境下におけるオートファジーの役割を検証した。腸管上皮特異的なオートファジー欠損マウスで放射線照射後の上皮再生に低下が認められ、主な原因に劇的なLgr5+幹細胞の減少とTA細胞内ミトコンドリアの機能障害が考えられた。本研究によりオートファジーがLgr5+幹細胞とTA細胞の恒常性維持を通じて腸管上皮の再生に重要な役割を担う事が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is one of the essential systems to degrade denatured-proteins and damaged-organelles in the cytosol, and maintain cellular homeostasis. In this study, we focus on intestinal epithelial cell (iEC) and addressed the role of autophagy in iEC homeostasis under steady-state and stress conditions. The mice in which lack autophagy in iEC show impaired iEC regeneration after irradiation, including the significantly reduction of Lgr5+-intestinal stem cells (ISCs) and dysfunction of mitochondria in transit-amplifying (TA) cells. Our study revealed that Autophagy plays an important role for iEC regeneration through maintaining the homeostasis of Lgr5+- ISCs and TA cells.

研究分野：免疫学

キーワード：上皮機能

1. 研究開始当初の背景

(1) オートファジーは細胞質内の不溶性タンパク質やオルガネラを分解するための主要機構であり、細胞や組織のホメオスタシス機構に重要な役割を担っている事が明らかになっていった。さらにオートファジーは感染症、癌、肥満などの疾患に関与するとの報告もなされていて疾患制御の観点から注目されていた。

(2) パネート細胞の分泌顆粒形成や炎症性腸疾患(IBD)の発症にオートファジーが関わる事が知られていた。一方、こうした報告はすべてパネート細胞に焦点を当てた研究から得られたものであり、腸管上皮を形成する他細胞におけるオートファジーの役割は不明であった。

(3) 腸管上皮は、未分化細胞 (progenitor) が存在するクリプトと分化した細胞からなる絨毛から構成されている。上皮再生の起点となる幹細胞は、Lgr5 (leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5) 陽性であり、クリプトの底部で幹細胞ニッチとして機能するパネート細胞に挟まれる形で存在する事が明らかにされていた。また幹細胞は増殖が盛んな TA (transit-amplifying) 細胞を経て分化した上皮細胞になる機構も明らかにされていた。

(4) 研究開始当初、本課題研究者は腸管上皮特異的にオートファジー関連遺伝子、Atg5 遺伝子を欠損するマウス (*Atg5^{lox/lox} Villin-Cre(Atg5^{ff} IEC)*) において放射線照射後、腸管上皮が破綻することを見出していた。破綻する所以はオートファジー欠損に伴うアポトーシスや再生機構の変化であると予想し本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究課題では多様な生理機能を有する腸管上皮に着目して、定常状態およびストレス環境下においてオートファジーが恒常性維持にどのような役割を果たしているか検証した。

-平成 25 年度-

腸管上皮細胞の再生機構におけるオートファジーの役割を検証した。

1. 腸管上皮細胞におけるオートファジー誘導を確認

腸管上皮は外来性抗原の影響下にあるためオートファジーが恒常的に誘導されている可能性を考えた。一方、オートファジーは飢餓などのストレス付加で誘導が亢進するとの報告もあり、本研究では定常状態の他、飢餓や放射線照射などのストレス環境下におけるオートファジー誘導を確認した。

2. ストレス負荷後の腸管上皮組織を観察

先述のように本課題研究者は *Atg5^{ff} ΔIEC* マウスで放射線照射後、腸管上皮が破綻する事を見出していた。放射線照射に伴う組織の経時的变化に関する詳細なデータを得るべく、野生型マウス (*Atg5^{lox/lox}*) と比較しながら組織のデータ収集に努めた。

3. オートファジーとアポトーシスの関連性を検証

オートファジーとアポトーシスは正負の両面で結び付いている事が報告されている。ターンオーバーが早い腸管上皮では再生とアポトーシスが不可分の関係にあると考えられ、関連性を検証した。

4. オートファジー欠損によりミトコンドリアの機能が変化するか検証

ミトコンドリアはエネルギー産生の際に活性酸素種(ROS)を産生する。ROS の産生に伴い次第にミトコンドリアにダメージが蓄積してくるため、細胞はオートファジー(マイトファジー)機構で恒常的に障害を受けたミトコンドリアを分解し、活性を維持している。通常、組織再生の際には多くのエネルギーが必要になる。それ故、ミトコンドリアのエネルギー産生能は再性に直結すると考えられ、オートファジー欠損によるミトコンドリア機能の変化を検証した。

-平成 26 年度-

上皮再生の起点になる Lgr5⁺幹細胞に焦点を当て一連の研究を行った。Lgr5⁺幹細胞は放射線照射からの腸管上皮再生に必要な不可欠と報告されている。また、幹細胞ニッチであるパネート細胞の特性も解析した。

1. オートファジー欠損により Lgr5⁺幹細胞の性質が変化するか検証

腸管 Lgr5⁺幹細胞の放射線照射後の動態についていくつかの報告がなされ、Lgr5⁺幹細胞の生存率と腸死線量に関連性があるといわれている。それ故、*Atg5^{ff} IEC* マウスの放射線照射に伴う腸管上皮の破綻は Lgr5⁺幹細胞数の減少や幹細胞性低下が引き金になっているとも考えられ、一連の解析を行った。

2. オートファジーと幹細胞ニッチの関連性を検証

パネート細胞は幹細胞ニッチとして機能する事が明らかになっている。オートファジー欠損でパネート細胞から産生される幹細胞維持に必須な増殖因子の発現に変化が生じるか検証した。

3. 研究の方法

1. 腸管上皮細胞におけるオートファジーの誘導について

オートファジー誘導の指標となるオートファゴソームの形成をオートファジー関連分子、LC3 が GFP 標識される LC3-GFP-tg マウスを用い解析した。LC3 はオートファゴソームに集積するため、オートファジーの誘導部位が可視化できる。LC3-GFP-tg とその陰性コントロールとして *Atg5^{flox/flox} Villin-Cre* マウスを交配した得たマウス (*Atg5^{ff}ΔIEC* LC3-GFP) を用い、定常並びに飢餓状態、放射線照射後の腸管上皮におけるオートファジー誘導を高分解能蛍光顕微鏡で観察した。

2. ストレス負荷後の腸管上皮組織について

野生型及び *Atg5^{ff} IEC* マウスに放射線照射 (10Gy) を施し照射 24 時間、5 日、7 日後の腸管組織を時系列に H&E 染色で評価した。

3. オートファジーとアポトーシスの関連性について

定常状態並びに放射線照射後のアポトーシス誘導を野生型マウスと *Atg5^{ff} IEC* マウスで比較した。アポトーシスは TUNEL 染色で評価した。

4. オートファジー欠損によるミトコンドリア機能の変化について

野生型及び *Atg5^{ff} IEC* マウスを用い一連の解析を行った。それぞれのマウスからクリプトを調製、酵素処理で細胞を分離した後、フローサイトメーター (FACS) でミトコンドリアの呼吸活性と細胞内 ROS 量を比較した。解析上、クリプト構成細胞を抗-CD24 抗体及び抗-c-Kit 抗体に対する染色性を基に杯細胞 (c-Kit⁺CD24⁻)、パネート細胞 (c-Kit⁺CD24^{high})、Progenitor 細胞 (c-Kit-CD24^{low})、内分泌細胞 (c-Kit-CD24^{high}) に分離した。ミトコンドリアの呼吸活性は Rhodamine 123、細胞内 ROS 濃度は CellROX を用い解析した。さらにミトコンドリアの微細形態を電子顕微鏡で観察した。

5. オートファジー欠損による Lgr5⁺幹細胞の変化について

Lgr5⁺幹細胞が GFP 標識されている *Lgr5-EGFP-ires-CreERT2* マウスを野生型及び *Atg5^{ff} ΔIEC* マウスに掛け合わせ、*Atg5^{ff} Lgr5-EGFP-ires-CreERT2* (野生型 *Lgr5*) マウスと *Atg5^{ff} ΔIEC Lgr5-EGFP-ires-CreERT2* (*Atg5^{ff} ΔIEC Lgr5*) マウスを作製し、一連の実験を行った。このようなマウスから細胞を調製することで、GFP を指標に Lgr5⁺幹細胞について様々な解析が可能になる。さらに本研究では、*In vitro* クリプト絨毛器官 (オルガノイド) 培

養法で幹細胞の増殖能を解析した。

6. オートファジーと幹細胞ニッチの関連性について

野生型及び *Atg5^{ff} ΔIEC* マウスのクリプトから細胞を調製し、パネート細胞で生産される Lgr5⁺幹細胞に重要な増殖因子 Wnt3、EGF、Dil4 の mRNA 量を qPCR 法で比較した。

4. 研究成果

1. 腸管上皮細胞におけるオートファジーの誘導について

野生型 LC3-GFP-tg マウスで 1 クリプトあたり 10~15 個のオートファゴソームが検出され、定常状態でも恒常的にオートファジーがクリプト内で誘導されている事が確認された (図 1)。オートファゴソーム数は放射線照射 (照射 3.5 日後) と飢餓で増加する事から、オートファジーはストレス負荷で亢進すると言える。なお *Atg5^{ff} ΔIEC* LC3-GFP マウスではオートファゴソームの形成は見られない事から、その形成は ATG5 依存的であると判断した。

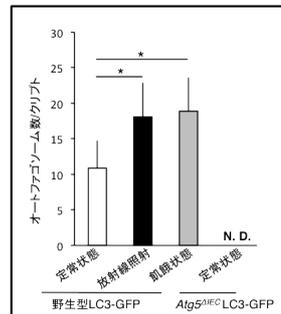


図 1. オートファゴソーム数/クリプト、*p<0.005

2. ストレス負荷後の腸管上皮組織について

H&E 染色上、定常状態の腸管上皮組織は野生型と *Atg5^{ff} ΔIEC* マウス間で違いが認められなかった。しかしながら放射線照射 5 日後になると、野生型マウスは正常な組織構造を保つ一方で、*Atg5^{ff} ΔIEC* マウスではクリプトの矮小化と平坦な絨毛が認められた (図 2)。放射線照射 7 日後の組織も同様な傾向であり、放射線照射後の *Atg5^{ff} ΔIEC* マウスにおいてアポトーシスの亢進、もしくは再生低下が起きていると推測した。

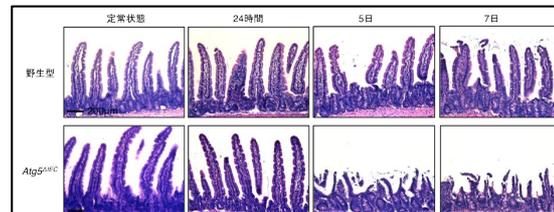


図 2. 空腸の H&E 染色 (倍率 × 10)

3. オートファジーとアポトーシスの関連性について

先述の結果から *Atg5^{fl/fl} ΔIEC* マウスでアポトーシスが亢進している可能性を考え、TUNEL 染色を行った。定常状態では TUNEL 陽性細胞をほとんど認めなかったが、放射線照射後には 6 時間をピークに陽性細胞が観察された(図 3)。結果的に野生型と *Atg5^{fl/fl} ΔIEC* マウス間でクリプトあたりの TUNEL 陽性細胞数に違いは無かったため、放射線によるアポトーシス誘導に差はないと断定した。

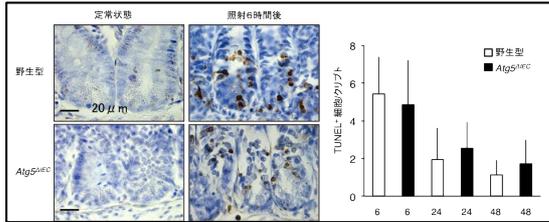


図 3. 空腸の TUNEL 染色 (倍率×100)、TUNEL 陽性細胞数/クリプト

4. オートファジー欠損によるミトコンドリアの機能変化について

オートファジー機構による選択的なミトコンドリアの分解をマイトファジーといい、変性ミトコンドリアの排除に不可欠である。それ故、先述のようにオートファジー欠損に伴うミトコンドリアの機能変化を推測し、FACS を用いる解析を行った。興味深いことに *Atg5^{fl/fl} ΔIEC* マウスの Progenitor (*Lgr5⁺* 幹細胞と TA 細胞)細胞数が有為減少する事が確認された(図 4.c; *c-Kit-CD24^{low}*)。一方、他細胞の数に大きな違いがなかった(図 4.a; 杯細胞、b; パネート細胞、d; 内分泌細胞)。

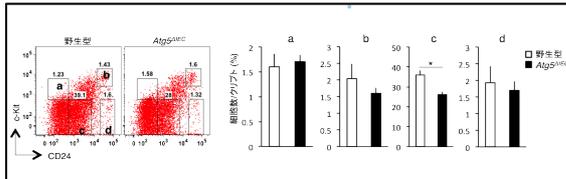


図 4. 空腸クリプト細胞の FACS 画像と 1 クリプトあたりの各細胞数(%), **p*<0.02

次にミトコンドリアの呼吸活性を野生型と *Atg5^{fl/fl} ΔIEC* マウスの各細胞(図 4.a-d)で比較した。ミトコンドリア膜電位(呼吸活性)低下を示す Rhodamine123 の Low peak が *Atg5^{fl/fl} ΔIEC* マウスの Progenitor 細胞で高くなっており、オートファジー欠損でミトコンドリアの機能障害が生じる事が明らかになった(図 5)。このような呼吸活性の低下は *Atg5^{fl/fl} ΔIEC* マウスのパネート細胞でも認められた(図非表示)。

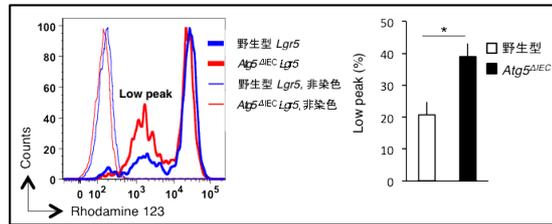


図 5. Progenitor 細胞内のミトコンドリア活性、**p*<0.02

引き続き細胞内 ROS 量を野生型と *Atg5^{fl/fl} ΔIEC* マウスの各細胞(図 4.a-d)で比較したところ、ROS 量は *Atg5^{fl/fl} ΔIEC* マウスの Progenitor 細胞(c)で多い事が明らかになった(図 6)。一方、他細胞内の ROS 量に差はなかった(図非表示)。

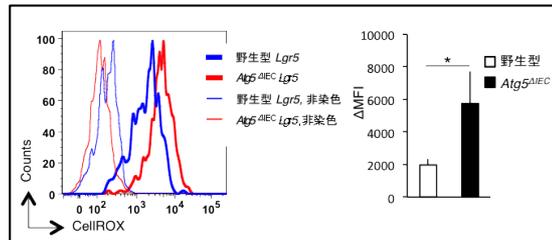


図 6. Progenitor 細胞内の ROS 量, **p*<0.05

さらに電子顕微鏡による観察で *Atg5^{fl/fl} ΔIEC* マウスの TA 細胞内に内部構造が崩壊した変性ミトコンドリアが数多く確認された(図 7. 三角印)。一方、変性ミトコンドリアは *Lgr5⁺* 幹細胞内には見られなかった(図非表示)。変性ミトコンドリアが TA 細胞に際立って見られるのは、活発なエネルギー産生を行いながら盛んに分裂している事で多く産生される ROS がミトコンドリアを障害するためと考えられる。

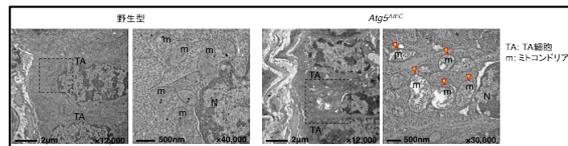


図 7. TA 細胞内のミトコンドリア電顕画像

以上の結果からミトコンドリアの活性維持にマイトファジーが必要であり、特に TA 細胞の増殖性を維持する上で重要と考えられる。

5. オートファジー欠損による *Lgr5⁺* 幹細胞の変化について

Atg5^{fl/fl} ΔIEC マウスの放射線照射に伴う腸管上皮の破綻は *Lgr5⁺* 幹細胞数の減少や幹細胞性の低下を引き金とする再生低下に因ると推測し、野生型 *Lgr5* 及び *Atg5^{fl/fl} ΔIEC Lgr5* マウスを用い解析を行った。これらマウスを用いることで解析上、Progenitor 細胞を GFP が陽性な *Lgr5⁺* 幹細胞と陰性な TA 細胞に区別出来る。驚くべきことに *Atg5^{fl/fl} ΔIEC* マウ

スの $Lgr5^+$ 幹細胞は激減していた(図 8)。一方、両系統間の TA 細胞数に違いはなかった(図 8)。

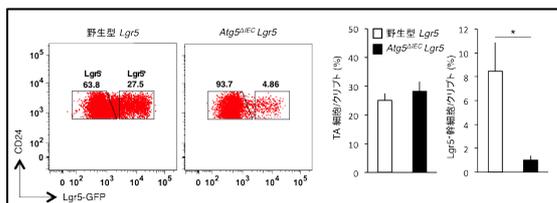


図 8. Progenitor 細胞及びクリプトあたりの $Lgr5^+$ 幹細胞数と TA 細胞数、* $p<0.01$

また $Lgr5^+$ 幹細胞を解析する際、両系統間におけるミトコンドリア呼吸活性及び細胞内 ROS 量を $Lgr5^+$ 幹細胞と TA 細胞のそれぞれで比較し、ミトコンドリアの呼吸活性が $Atg5^{fl/fl\Delta IEC}$ マウスの TA 細胞で低下している事、対照的に ROS 量が $Atg5^{fl/fl\Delta IEC}$ マウスの $Lgr5^+$ 幹細胞と TA 細胞の両方で高い事を確認した。

次にオルガノイド培養法で幹細胞の増殖能(幹細胞性)を検証した。この方法は幹細胞性やニッチの微小環境を *in vitro* で再現出来るもので、オルガノイド形成能から幹細胞性を把握できる。野生型及び $Atg5^{fl/fl\Delta IEC}$ マウスからクリプトを調製、抗酸化剤の *N*-acetyl-*L*-cysteine (NAC) 存在下、非存在下で経時的にオルガノイドの成長を 7 日間観察した。 $Atg5^{fl/fl\Delta IEC}$ マウス由来のクリプトを培養した場合、オルガノイド形成効率(培養 7 日目のオルガノイド数/培養に供したクリプト数)の低下が見られた(図 9)。また形成効率は NAC 存在下で上昇する事(図 9)から、過剰な ROS が細胞の分裂低下を招いていると言える。

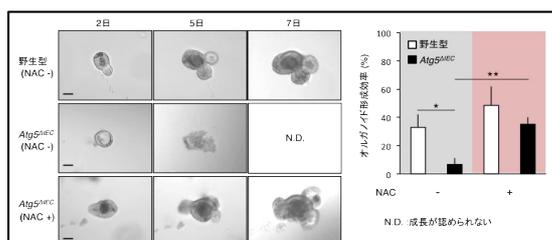


図 9. オルガノイド形成効率、* $p<0.01$ 、** $p<0.01$

他方で $Atg5^{fl/fl\Delta IEC}$ マウスに長期間 NAC を投与し ROS 量を低下させた後に $Lgr5^+$ 幹細胞数を解析したが大きな変化は認められず(図非表示)、 $Atg5^{fl/fl\Delta IEC}$ マウスで $Lgr5^+$ 幹細胞数が激減する原因は別にあると考えられる。

6. オートファジーと幹細胞ニッチの関連性について

幹細胞ニッチとして働くパネート細胞から産生される複数の幹細胞増殖因子の発現がオートファジーに規定されていると予想し、野生型と $Atg5^{fl/fl\Delta IEC}$ マウス間でそれらの発現を比較した。結果的に両マウス間で

$Wnt3$ 、 EGF 、 $Dll4$ の mRNA 量に違いは見られず(図 10)、 $Atg5^{fl/fl\Delta IEC}$ マウスにおける $Lgr5^+$ 幹細胞数低下はニッチ側の要因でないと考えられる。

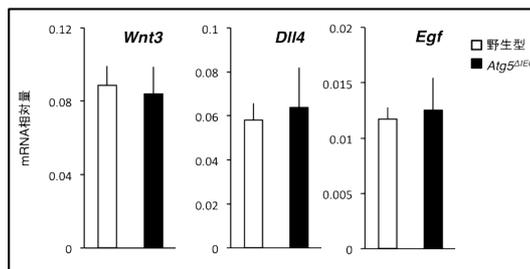


図 10. $Wnt3$ 、 $Dll4$ 、 EGF の mRNA 相対量

以上の結果から、腸管上皮細胞特異的なオートファジー欠損で生じる上皮破綻は劇的な $Lgr5^+$ 幹細胞の減少と TA 細胞内ミトコンドリアの機能障害に起因する再生低下に因る事が明らかになった。今後、オートファジー欠損で $Lgr5^+$ 幹細胞が減少する機構を明らかにし、本研究成果を論文にする予定でいる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

The role of autophagy in the maintenance of intestinal epithelial homeostasis. 日本免疫学会、2013 年 12 月 13 日、幕張メッセ。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/bre/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 純平 (ASANO JUNPEI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任助教

研究者番号：70463809