

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870363

研究課題名(和文) 成体組織における幹細胞移動の意義と制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms and physiological significance of stem cell migration in the adult tissues

研究代表者

今城 正道 (IMAJO, Masamichi)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：00633934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体内では組織幹細胞は特別な微小環境(ニッチ)内に存在し、それにより幹細胞の機能が維持されている。腸上皮では、パネート細胞が幹細胞と隣接して存在し、幹細胞の維持に必要な因子を分泌している。この際、幹細胞はこれらの因子を十分に受容できるように、活発に移動し、パネート細胞とモザイクパターンを形成する。本研究では、この幹細胞移動を制御する機構の一端を解明し、特にYAP-TEAD複合体が重要な働きを示した。この成果は、幹細胞がニッチ内に静的に存在するという従来のイメージを覆すものであり、幹細胞移動の制御が組織恒常性に重要であることを示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Tissue-resident stem cells are located in the specific microenvironment (niche) that supports maintenance and proliferation of these cells. In the intestinal epithelium, Paneth cells reside adjacent to intestinal stem cells, and secrete signaling molecules that promote survival and proliferation of the stem cells. To receive a sufficient amount of these molecules, intestinal stem cells migrate vigorously and form a mosaic pattern with Paneth cells. In this study, we have identified one of molecular mechanisms that regulate the migration of intestinal stem cells and have shown that the YAP-TEAD protein complex plays an important role in regulating this process. These results challenge the current view that stem cells reside statically in their niche environment and suggest that regulation of the stem cell migration should be crucial for the maintenance of tissue homeostasis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：腸上皮 幹細胞 細胞移動 ニッチ YAP ephrin-Eph signaling

1. 研究開始当初の背景

(1) 腸上皮は細胞の新陳代謝が活発な組織であり、幹細胞からの増殖、分化、移動、アポトーシスにより絶えず細胞が更新されている。これらの過程の厳密な制御はこの組織の恒常性に必須であり、その異常は大腸癌などの病気と関連付けられている。近年、腸上皮幹細胞のマーカー遺伝子が同定され、また幹細胞を単離、培養することが可能となった事で、腸上皮は組織幹細胞研究のモデル組織となりつつあった (Simons et al., Cell, 2011, 145: 851-862)。

(2) 腸上皮幹細胞の増殖と維持に必要なニッチとしての機能を果たすと報告されていたのが、パネート細胞である。この細胞は、幹細胞と共に腸クリプト底部に局在し、Wnt や notch リガンドである Dll-1、EGF などのシグナル因子を供給することで、幹細胞に必要なニッチを形成する (Sato et al., Nature, 2011, 469: 415-418)。興味深いことに、クリプト底部では幹細胞とパネート細胞は交互に配置され、モザイク状のパターンを形成する。このパターン形成は、幹細胞がパネート細胞から十分なニッチシグナルを受け取る上で重要であると考えられる。一方で、このモザイクパターンは容易に乱れ得るものであり、絶えず修復されていることが予想される。例えば、幹細胞が増殖して2つに分かれた場合や古いパネート細胞がアポトーシスによって除かれた場合には、幹細胞同士が隣り合った領域が形成されるはずである。幹細胞が十分にニッチを獲得し未分化性を維持するには、幹細胞の増殖やパネート細胞への分化、移動によりパターンを再生する必要があるが、研究開始当初の時点でこの問題に取り組んだ研究は報告されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では腸上皮幹細胞がクリプト底部を活発に移動し、ニッチ細胞であるパネート細胞とモザイクパターンを形成する分子機構を解析した。それにより、成体組織における幹細胞移動の制御機構と生理的意義を解明することで、「幹細胞は受動的にニッチによって維持されるだけでなく、時に能動的に移動してニッチを探索する。」という幹細胞生物学の新しい概念を構築することを目指した。

3. 研究の方法

マウス腸上皮から単離した幹細胞をマトリゲルに包埋し、EGF、noggin、R-spondin1 の存在下に培養した。この培養法では、幹細胞とそこから産生された分化細胞が生体内に存在するクリプトや絨毛に類似した構造を形成することが知られている (Sato et al., Nature, 2009, 459: 262-265)。クリプトに相当する領域内では幹細胞とパネート細胞がモザイク状に配置することが報告さ

れており、この過程における幹細胞の移動を観察した。また、幹細胞における遺伝子発現状態を解析するために、幹細胞特異的に蛍光タンパク質を発現するマウス (Lgr5-eGFP マウス) を用いた。このマウスから単離した上皮細胞から、幹細胞を蛍光活性化セルソーター (FACS) で分離し、RT-PCR 等の方法で遺伝子発現状態を調べた。また、Lgr5-eGFP マウスの小腸上皮を二光子励起顕微鏡で観察することで、生体内における幹細胞移動を解析した。研究期間後半においては、生体内において、遺伝子の強制発現やノックダウンを行うために、センダイウイルスエンベロープによる腸上皮への新しい遺伝子導入法を用いた (研究成果の項を参照)。

4. 研究成果

(1) 始めに、生きたマウスのクリプトにおける幹細胞の動態を観察した。そのために、Lgr5-eGFP マウスを麻酔下で開腹し、二光子励起顕微鏡で観察した。その結果、幹細胞が実際に短時間の内に移動し、モザイクパターンを形成する様子が観察された (図1参照)。この結果は、幹細胞が時として活発に移動し、ニッチを探索することを示している。

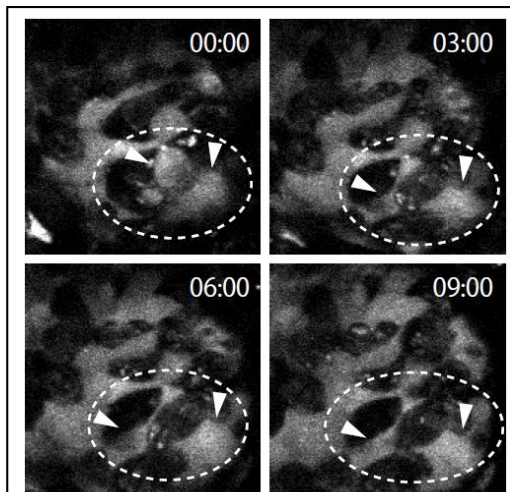


図 1. 生きたマウスのクリプト底部における幹細胞移動の一例。矢頭で示されている2つの隣接した幹細胞が9分間の間に位置を変え、パネート細胞(黒く抜けている部分)とのモザイクパターンを再形成した。

(2) 幹細胞移動を制御する分子機構を解明するために、オルガノイド培養法を用いた実験を行った。まず、パネート細胞由来の分泌因子のうち、モザイクパターンの形成に必要な因子を探索した。その結果、EGF、noggin、notch などの因子が幹細胞の移動を制御する因子として重要であることが分かった。これらの因子の下流で様々なシグナル伝達因子の活性が変化することで、幹細胞の移動が制御されていると考えられる。

(3) 幹細胞内で働く様々なシグナル伝達経路

の中で、幹細胞移動の制御に関わるものを探索した。その結果、Hippo 経路が重要な役割を果たすことを見出した。具体的には、Hippo 経路のエフェクターである YAP - TEAD 複合体を阻害すると、幹細胞移動が異常となり、幹細胞とパネート細胞のモザイクパターンが乱れることがわかった (図 2 参照)。また、この YAP-TEAD 複合体の活性が幹細胞内で高く、幹細胞の維持に必要であること、YAP-TEAD 複合体の阻害は幹細胞数を減少させることも見出している (Imajo et al., Nature Cell Biol., 2015, 17: 7-19)。従って、YAP-TEAD の機能は多岐にわたると考えられるものの、幹細胞移動の制御も YAP-TEAD による幹細胞の維持に重要な働きをする可能性がある。

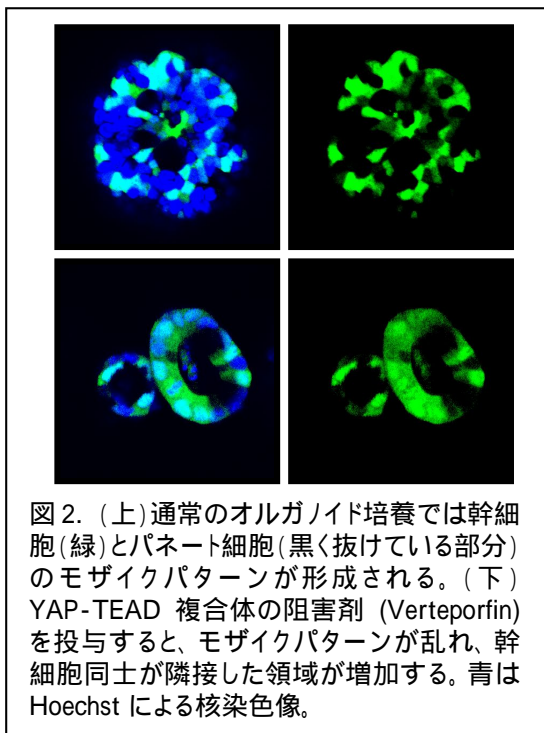


図 2. (上) 通常のオルガノイド培養では幹細胞 (緑) とパネート細胞 (黒く抜けている部分) のモザイクパターンが形成される。(下) YAP-TEAD 複合体の阻害剤 (Verteporfin) を投与すると、モザイクパターンが乱れ、幹細胞同士が隣接した領域が増加する。青は Hoechst による核染色像。

(4) 次に、YAP-TEAD 複合体の下流で幹細胞移動の制御に関わる因子を探索した。そのために、YAP をノックダウンしたマウス腸上皮の遺伝子発現状態をマイクロアレイで網羅的に解析した (Imajo et al., Nature Cell Biol., 2015, 17: 7-19)。その結果、細胞移動の制御に重要な役割を果たすことが知られている ephrin-Eph ファミリー遺伝子 (ephrin-A3, EphA4) の発現が、幹細胞において YAP-TEAD 複合体によって誘導されることを明らかにした。オルガノイド培養法において、ephrin-Eph シグナルを抑制すると幹細胞とパネート細胞によるモザイクパターン形成が阻害されたことから、ephrin-Eph シグナル伝達は YAP-TEAD の下流で、幹細胞移動を制御することが示唆された。以上の結果から、腸上皮の幹細胞内ではパネート細胞由来の分泌因子の下流で YAP-TEAD 複合体の活性が上昇し、ephrin-A3 と EphA4 の発現が誘導され、その結果 Eph-ephrin を介した幹細胞

同士の反発作用により幹細胞とパネート細胞のモザイクパターンが確立されるのではないかと考えている。このように、本研究により、腸上皮における幹細胞移動を制御する機構の一端が明らかになった。

(5) 本研究の遂行過程で、技術的に予想外の進展もあった。それは、センダイウイルスエンベロープ (HVJ-E) ベクターを用いた生きたマウス腸上皮への遺伝子導入法の開発である (Imajo et al., Nature Cell Biol., 2015, 17: 7-19)。この方法では、HVJ-E にプラスミドや siRNA を封入し、HVJ-E の膜融合能を利用することで、標的細胞内へと効率よく封入した分子を伝達することができる。それにより、生きたマウスの腸上皮において簡単に遺伝子の強制発現やノックダウンを行うことが可能となった (図 3 参照)。このことは、腸上皮における遺伝子機能の迅速な解明に貢献すると期待され、重要な成果であると考えている。実際に既に海外の研究期間から技術供与の依頼があり、共同研究を行っている。その結果、大腸癌の新しい抑制因子の機能解明という重要な成果につながった (Moran et al., Cancer Cell, 2015, 28: 815-829)。

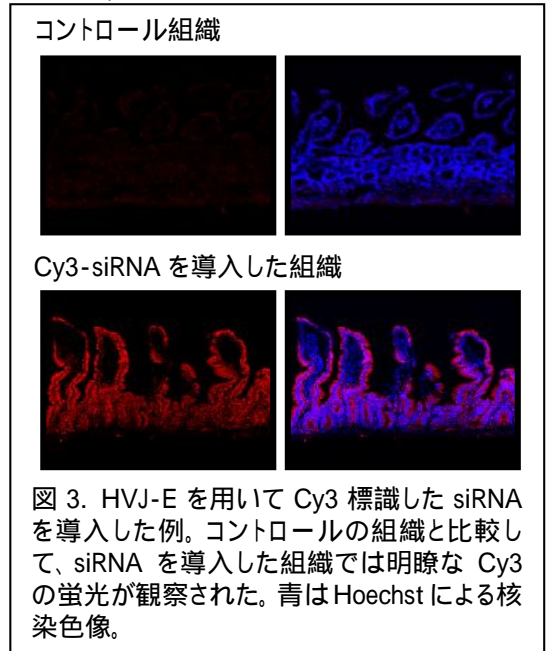


図 3. HVJ-E を用いて Cy3 標識した siRNA を導入した例。コントロールの組織と比較して、siRNA を導入した組織では明瞭な Cy3 の蛍光が観察された。青は Hoechst による核染色像。

(6) 上記 4 のように予想外の進展があった一方で、計画通りに研究が進まなかった部分も存在した。特に、当初予定していた Rho ファミリー GTPase の機能解析については明瞭な結果が得られなかった。これらのタンパク質の活性を FRET バイオセンサーで継続的に測定することを予定していたが、3 次元環境下で細胞を培養するオルガノイド培養法では、これが技術的に困難であったことが一因である。この分子活性測定が進まなかったこともあり、幹細胞移動を制御する機構の数理モデルの構築に必要な定量的パラメータの取得も十分に進まなかった。これらの点につ

いては、実験条件を試行錯誤し、技術的な改善を図りながら、今しばらく継続して研究することが必要であると考えている。

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 6 件)

(1) Paloma Ordonez-Moran, Caroline Dafflon, Masamichi Imajo, Eisuke Nishida (2015) HoxA5 counteracts stem cell traits by inhibiting Wnt signaling in colorectal cancer. *Cancer Cell*, 28, 815-829 (doi:10.1016/j.ccell.2015.11.001)(査読有)

(2) Masamichi Imajo, Miki Ebisuya, Eisuke Nishida (2015) Dual role of YAP and TAZ in renewal of the intestinal epithelium. *Nature Cell Biol.*, 17, 7-19 (doi:10.1038/ncb3084) (査読有)

(3) Masamichi Imajo, Miki Ebisuya, Eisuke Nishida (2015) HVJ-E-mediated gene transfer into the intestinal epithelium. *Protoc. Exch.*, (doi:10.1038/protex.2014.049) (査読無)

(4) 今城正道, 西田栄介 (2015) 腸上皮恒常性における Hippo シグナル伝達経路の役割. *実験医学*, 33, 2926-2933 (査読無)

(5) 今城正道, 松田道行 (2015) 特集 細胞シグナル操作法 I 4. その他 Wnt シグナル. *生体の科学*, 66 (5), 2-3 (査読無)

(6) Rei Mizuno, Yuji Kamioka, Kenji Kabashima, Masamichi Imajo, et al. (12 名中 4 番目) (2014) In vivo imaging reveals PKA regulation of ERK activity during neutrophil recruitment to inflamed intestine. *J. Exp. Med.*, 211, 1123-1136 (doi:10.1084/jem.20132112)(査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 今城正道, 西田栄介
腸上皮の幹細胞依存的な更新における Hippo 経路の役割、第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2015)(招待講演) 2015 年 12 月 1~4 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

(2) 今城正道
組織幹細胞の制御における Hippo 経路の新たな役割、第 8 回 Symphony (招待講演) 2015 年 9 月 26~27 日、ホテルメトロポリタンエドモント飯田橋(東京都千代田区)

(3) 今城正道, 西田栄介

生体内遺伝子導入法により解明された腸上皮幹細胞機能の新たな制御機構、第 66 回日本細胞生物学会大会(招待講演) 2014 年 6 月 13 日、奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

〔その他〕

雑誌論文と学会発表の一覧は研究代表者所属大学のホームページにて公開されている (<https://kyouindb.iimc.kyoto-u.ac.jp/j/hQ1mT>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今城 正道 (IMAJO, Masamichi)
京都大学・生命科学研究科・助教
研究者番号: 00633934

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし