

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 12 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440184

研究課題名(和文)腸上皮組織に存在するアセチルコリンの新規生理学的役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of a novel physiological function of acetylcholine in gut epithelium

研究代表者

高橋 俊雄(Takahashi, Toshio)

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・統合生体分子機能研究部・研究員

研究者番号：20390792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は腸オルガノイド培養系を用いて、腸上皮細胞内ACh産生系が存在すること、及び腸上皮にある内因性AChが代謝型ムスカリン性ACh受容体(mAChRs)を介して腸幹細胞の分化・増殖、維持機構に関与することを突き止めた。さらに、「多段階質量分析イメージング」(MS/MS測定)を応用することにより、ごく微量のAChを腸組織切片から直接検出し、腸上皮組織にAChが分布していることを初めて可視化することに成功した。本研究により、非神経性AChが細胞分化、組織形成に関与しているという今までほとんど研究のターゲットにされなかったAChの新規生理学的役割をin vitroで明らかにすることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Non-neuronal acetylcholine (ACh) is predicted to function as a local cell signaling molecule. The physiological significance of the presence of non-neuronal ACh in the intestine remains unclear. Here, experiments using cultured crypt-villus organoids that lack nerve and immune cells led us to suggest that endogenous ACh is synthesized in the intestinal epithelium to evoke growth and differentiation of the organoids through activation of muscarinic ACh receptors (mAChRs). Extracts of cultured organoids exhibited a noticeable capacity for ACh synthesis. Treatment of organoids with carbachol down-regulated growth of organoids and expression of marker genes for each epithelial cell type. On the other hand, mAChR antagonists enhanced growth and differentiation of Lgr5-positive stem cells. Collectively, our data provide evidence that endogenous ACh released from mouse intestinal epithelium maintains the homeostasis of intestinal epithelial cell growth and differentiation via mAChRs.

研究分野：発生生物学

キーワード：細胞・組織 シグナル伝達 生体分子 生理学 発生・分化 非神経性アセチルコリン オルガノイド
腸幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 小腸は、小腸上皮組織の更新システム過程において、クリプトの底部にある腸幹細胞が盛んに増殖する中で、腸幹細胞が分化の決定を受けると分化過程に移行して、吸収上皮細胞、腸内分泌細胞、杯細胞、パネート細胞へ分化しながら徐々に小腸上皮細胞としての特徴を獲得することによって形成・維持されている。小腸上皮が担う3つの主要な機能として、吸収機能、バリア機能、受容・伝達・応答機能がある。このことは、腸幹細胞の分化・増殖、維持が正常に行われていることにより、小腸上皮の恒常性(ホメオスタシス)が維持されていると考えられる。

(2) 一方で、アセチルコリン(ACh)は最も良く研究されている古典的神経伝達物質で、脳などの神経系においてコリン作動性神経で合成される。近年、AChが哺乳類の心臓や免疫系などの非神経系にも存在し、AChが組織及び細胞特異的機能を担うことが明らかにされている。例えば、心筋細胞は独自でACh産生システムを持ち、細胞エネルギー代謝を負に調節するという役割が明らかにされている(Kakinuma et al. (2009) *FEBS J.* **276**, 5111-5125)。また、リンパ球には、神経系と同様に、コリン作動系に必要な構成要素がすべて存在し、リンパ球の機能調節に関与している可能性を示唆する報告がある(Kawashima and Fujii (2003) *Life Sci.* **74**, 675-696)。腸においては、腸上皮組織にAChが存在することが示唆されていたが、非神経性コリン作動系の存在とその生理学的役割は明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

(1) 本基盤研究では、研究代表者が提唱する腸上皮における非神経性コリン作動系の存在とその生理学的役割を明らかにすることを目的とした。具体的には、その役割は腸幹細胞の分化・増殖、維持機構に関する想定し、純化したクリプトを無血清で三次元培養する技術(腸オルガノイド培養系)を用いて、腸上皮細胞内AChによる腸上皮組織の形成・維持の分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 小腸からクリプトを単離し、単離したクリプトを腸オルガノイドまで成長させる。腸オルガノイドは、腸幹細胞から絶えず腸上皮細胞を生産し、三次元の組織構造体を形成し、維持している(図1)。しかしながら、腸幹細胞からは、神経細胞や免疫細胞は分化しない。10日間培養した腸オルガノイドは、クリプトレベルまで機械的に碎き、再培養が可能である。また、通常の培養細胞と同じく凍結保存も可能である。



図1 腸オルガノイドの成長とその模式図。

(2) 腸オルガノイドを用いて、腸上皮細胞内ACh産生系が存在することを遺伝子発現解析、生化学的解析を行う。さらに、質量分析を2回以上連続して行う「多段階質量分析イメージング」(MS/MS測定)を応用することにより、ごく微量のAChを腸組織切片から直接検出し、腸上皮組織に存在するAChの分布を可視化する。

(3) ACh受容体は、代謝型ムスカリン性ACh受容体(mAChRs)とニコチン性ACh受容体(nAChRs)に大別される。そこで、腸オルガノイドにおけるACh受容体のサブタイプ及びサブユニットの遺伝子発現様式をRT-PCRで調べる。そして、その結果をもとに、サブタイプ選択性ACh受容体アゴニスト及びアンタゴニストを用いて、どの受容体を介してシグナルが伝達されるかを腸オルガノイドの成長と個々の細胞のマーカー遺伝子の発現変動を指標に評価する。

(4) 細胞レベルの解析には、腸幹細胞を可視化した*Lgr5-EGFP-ires-CreERT2*マウスから腸オルガノイドを作製し、フローサイトメトリー(FACS)を用いて、薬物処理と無処理の腸オルガノイドに含まれる腸幹細胞の数の変動を調べる。

4. 研究成果

(1) 研究代表者は腸オルガノイド培養系(Sato et al. (2009) *Nature*, **459**, 262-265; Takahashi (2016) *Methods Mol. Biol.* in press)を用いて、腸上皮細胞内ACh産生系が存在すること、及び腸上皮にある内因性AChが代謝型ムスカリン性ACh受容体(mAChRs)特にM1, M2, M3サブタイプを介して腸幹細胞の分化・増殖、維持機構に関与することを突き止めた(Takahashi et al. (2014) *FEBS J.* **281**, 4672-4690)。さらに、「多段階質量分析イメージング」(MS/MS測定)を応用することにより、ごく微量のAChを腸組織切片から直接検出し、腸上皮組織にAChが分布していることを初めて可視化することに成功した(Takahashi et al. (2014) *FEBS J.* **281**, 4672-4690)。論文のイメージング画像は、*FEBS J.* **281** (2014)の表紙を飾った(図2)。また、本論文の内容を、ドイツのギーセンで行われた第4回非神経性アセチルコリン国際会議において口頭発表し、Best Short Oral Presentation賞を受賞した他、本論文の概要について執筆した(Takahashi *Neurotransmitter* (2015) **2**, e499)。本研究により、非神経性AChが細胞

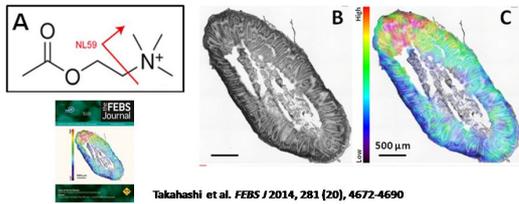


図 2 イメージング質量分析による ACh の腸上皮内分布。(A) ACh の構造。矢印は MS/MS 測定で断片化される個所を示す。(B) 腸切片像。(C) MS/MS 測定で得られた ACh 像。(B) の像と重ね合わせた。

分化、組織形成に関与しているという今までほとんど研究のターゲットにされなかった ACh の新規生理学的役割を *in vitro* で明らかにすることに成功した (図 3)。

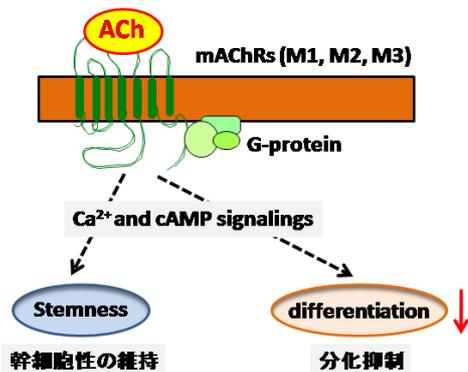


図 3 代謝型 mACHRs (M1, M2, M3) を介した内因性 ACh の腸幹細胞制御 (Takahashi et al. FEBS J. 2014 より改変)

(2) nAChRs を介した非神経性 ACh の制御については、選択的アゴニストであるニコチンを作用させると、腸オルガノイドの成長及びマーカー遺伝子の発現に対して促進効果を示し、一方、選択的アンタゴニストのメカミールアミンを作用させると、抑制効果を示すことを見出している。次に、ニコチン投与後の nAChRs 下流域に働く遺伝子群を、RNA-Seq 法によるトランスクリプトーム比較解析を行った結果、Wnt シグナルの 1 つである *Wnt5a* の発現が顕著に変動することを突き止めた。薬理実験の結果から、*Wnt5a* はニコチンと同様、腸オルガノイドの成長及びマーカー遺伝子の発現を促進し、*Wnt5a* の分泌阻害剤である IWP-2 で処理すると、抑制効果を示すことを見出した。さらに、メカミールアミンの効果抑制は、*Wnt5a* によりレスキューされることを確認している。このことは、nAChRs シグナルの下流域に Wnt シグナル (*Wnt5a*) が関与していることを強く示唆する結果である。抗体染色の結果から、nAChRs サブタイプが 2/4 であることを明らかにできた。また、2/4 及び *Wnt5a* が腸幹細胞のニッチの役割を果たしているパネート細胞に局在していることから、非神経性 ACh の刺激を受けたパネート細胞が Ca^{2+} シグナルを介して *Wnt5a*

を放出し、傍分泌により腸幹細胞の分化・増殖を促進しているという結論に達した (図 4)。以上の成果をまとめて、現在、論文投稿中である。

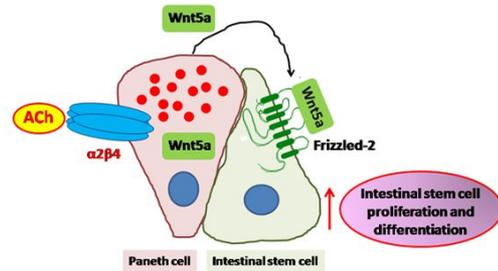


図 4 チャネル型 nAChRs を介した内因性 ACh の腸幹細胞制御仮説。

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)

Takahashi T, Ohnishi H, Sugiura Y, Honda K, Suematsu M, Kawasaki T, Deguchi T, Orihashi K, Hippo Y, Watanabe T, Yamagaki T and Yuba S. Non-neuronal acetylcholine as an endogenous regulator of proliferation and differentiation of Lgr5-positive stem cells in mice. *FEBS J.* (査読有) 281, 2014, 4672-4690. DOI: 10.1111/febs.12974

Takahashi T and Takeda N. Insight into the molecular and functional diversity of cnidarian neuropeptides. *Int. J. Mol. Sci.* (査読有) 16, 2015, 2610-2625. DOI: 10.3390/ijms16022610

Takahashi T Non-neuronal functions of acetylcholine via muscarinic receptor subtypes: cellular proliferation and differentiation in mammals. *Neurotransmitter* (査読有) 2: e499. DOI: 10.14800/nt.499

高橋俊雄「CompBiol 2015 合同シンポジウム」"ホストオミクス時代における画像解析の最前線" 顛末記. 比較生理生化学 (査読有) Vol. 33, No. 1, 2016, 22-24. <http://www.jscpb.org/>

高橋俊雄 多段階質量分析イメージングによる腸上皮組織中のアセチルコリン分布とその役割. 比較内分泌学 (査読有) Vol. 42, No. 158, 2016, 49-50. <http://www.jsce1975.jp/index.php>

Takahashi T New trends and perspectives in the function of non-neuronal acetylcholine in crypt-villus organoids in mice. *Methods Mol. Biol.* (査読有) 2016

(In press) DOI: 10.1007/7651 2016.1

〔学会発表〕(計9件)

高橋俊雄 熊本大学発生医学研究所 発生セミナー 腸幹細胞システムを制御する非神経性アセチルコリンの役割. 7.17 (2014) 熊本

高橋俊雄 広島大学理学研究科生物科学専攻 情報生理学研究室セミナー 腸上皮組織に存在するアセチルコリンの新規生理学的役割. 8.5 (2014) 広島

高橋俊雄 他 第36回日本比較生理生化学会 (11th International Congress of Neuroethology) Non-neuronal acetylcholine as an endogenous regulator of proliferation and differentiation of Lgr5-positive stem cells in mice. 7.28-8.1 (2014) 札幌

高橋俊雄 他 第47回日本発生生物学会 腸幹細胞システムを制御する非神経性アセチルコリンの役割. 5.27-5.30 (2014) 名古屋

Takahashi T. *et al.* 4th International Symposium on Non-neuronal Acetylcholine Non-neuronal acetylcholine is an endogenous regulator of proliferation and differentiation of Lgr5-positive stem cells in mouse gut. 8.28-30 (2014) Giessen, Germany

高橋俊雄【招待講演】第40回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第37回大会合同大会合同シンポジウムI「ポストオミクス時代における画像解析の最前線」多段階質量分析イメージングによる腸上皮組織中のアセチルコリン分布とその役割. 12.11-12.13 (2015) 広島

高橋俊雄 第86回日本動物学会腸上皮から放出されるアセチルコリンによる腸上皮幹細胞の分化・増殖制御. 9.17-19 (2015) 新潟

Takahashi T. XVth International Symposium on Cholinergic Mechanisms. Visualization of acetylcholine distribution in intestinal tissue sections by tandem imaging mass spectrometry and its function in mice. 10.16-20 (2016) Marseille, France

高橋俊雄 第22回国際動物学会会議・日本動物学会87回大会合同大会 Non-neuronal functions of acetylcholine via muscarinic receptor subtypes: Intestinal stem cell proliferation and differentiation.

11.14-20 (2016) 沖縄

〔図書〕(計7件)

Takahashi T. Elsevier LF Peptides in Handbook of Hormone Handbook. Eds. Takei Y, Ando H, and Tsutsui K, Chapter 62, p425, 2015

Takahashi T. Elsevier Head Activator in Handbook of Hormone Handbook. Eds. T Takei Y, Ando H, and Tsutsui K, Subchapter 62A, pp426-427, 2015.

Takahashi T. Elsevier Hym-323 in Handbook of Hormone Handbook. Eds. Takei Y, Ando H, and Tsutsui K, Subchapter 62B, pp428-429, 2015.

Takahashi T. Elsevier GLWamide in Handbook of Hormone Handbook. Eds. Takei Y, Ando H, and Tsutsui K, Chapter 89, pp483-484, 2015.

Takahashi T. Elsevier Hym-176 in Handbook of Hormone Handbook. Eds. Takei Y, Ando H, and Tsutsui K, Chapter 90, pp485-486, 2015.

Takahashi T. Elsevier Hym-301 in Handbook of Hormone Handbook. Eds. Takei Y, Ando H, and Tsutsui K, Chapter 91, pp487-488, 2015.

高橋俊雄 他 共立出版「研究者が教える動物実験」生理活性ペプチドを“見つける”技. 日本比較生理生化学会編集 第2巻 pp187-190, 2015.

〔その他〕

公益財団法人サントリー生命科学財団
URL: <http://www.sunbor.or.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 俊雄 (TAKAHASHI, Toshio)
公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・統合生体分子機能研究部・研究員
研究者番号: 20390792

(3) 連携研究者

弓場 俊輔 (YUBA, Shunsuke)
独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究グループ長
研究者番号: 40263248

末松 誠 (SUEMATSU, Makoto)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 00206385