

自己評価報告書

平成 23年 4月 12日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20570060

研究課題名（和文）トランスジェニックカエルを用いた消化管上皮幹細胞のニッチに関する研究

研究課題名（英文）Study of the intestinal epithelial stem cell niche using transgenic frogs

研究代表者

岡 敦子 (OKA ATSUKO)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：50175254

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：トランスジェニックカエル、甲状腺ホルモン受容体、小腸、器官培養、組織間相互作用、幹細胞、変態、脱分化

1. 研究計画の概要

アフリカツメガエル変態期の小腸では、甲状腺ホルモン（TH）を引き金として幹細胞が出現し、哺乳類類似の成体型上皮が新たに形成される。本研究では、この小腸を用いて以下の実験を行い、消化管上皮幹細胞ニッチの分子実体の解明を目指す。

（1）熱ショック蛋白質プロモーターの下流に dominant positive 型 TH 受容体遺伝子を導入したトランスジェニックカエル（dpTR カエル）および野生型カエルの幼生より小腸を摘出し、上皮を結合組織から分離する。各組織を再結合させることにより、上皮、結合組織共に dpTR カエル由来の小腸（A）、上皮のみが dpTR カエル由来の小腸（B）、結合組織のみが dpTR カエル由来の小腸（C）、上皮、結合組織共に野生型カエル由来の小腸（D）、の4種類の小腸を作る。熱ショックをかけながら各小腸を TH 非存在下で培養した後、生じる上皮の変化（幹細胞の出現、増殖、分化、アポトーシス等）を免疫組織学的に解析する。A～Dの結果を比較することにより、組織依存的に発現する dpTR によって成体型上皮形成がどの段階まで進行するのかを明らかにする。

（2）TR は TH 応答遺伝子の発現を調節することが知られている。そこで、ツメガエル小腸でクローニングされた一連の TH 応答遺伝子について、変態期および上記 A～D の小腸における発現を RT-PCR および *in situ* hybridization (ISH)により解析する。各遺伝子の発現パターンと上皮形成との関連を調べることにより、幹細胞の出現、増殖、分化に関与する遺伝子の候補を見つけ出す。

（3）幹細胞制御への関与が予測される遺伝子について、順次、機能解析を行う。申請者が独自に開発した培養アッセイ系を用い、当該遺伝子の発現変化が幹細胞に及ぼす影響を、免疫組織化学的解析により明らかにする。

2. 研究の進捗状況

（1）①dpTRカエルの小腸を培養実験に用いるためにまず、熱ショックによりdpTR遺伝子を最も効率よく発現させる培養条件を設定し、dpTR の発現のみによって幹細胞の出現から成体型上皮形成に至る全過程が *in vitro* で誘起されることを実証した。そこで次に、②dpTRカエルと野生型カエルの小腸を用い、再結合培養実験を行った。成体型上皮の幹細胞は、上皮も結合組織も共にdpTRを発現する小腸だけで出現し、上皮のみがdpTRを発現する小腸では、未分化細胞が出現するものの幹細胞マーカーは検出されず、成体型上皮の形成には至らなかった。これらの結果から、幹細胞ニッチの形成には、上皮で発現するTH応答遺伝子と結合組織で発現するTH応答遺伝子の両方が必要であることが明らかとなった。③同様の方法で、GFP遺伝子を導入したカエルの小腸を用いて再結合培養実験を行い、幹細胞は幼生型上皮の一部が脱分化して出現することを明らかにした。したがって、結合組織で発現するTH応答遺伝子は、上皮の脱分化にも関与することが示唆された。

（2）幹細胞ニッチの構成因子を解明していくために、一連のTH応答遺伝子の発現解析を行った。変態期および再結合小腸培養片にお

ける発現パターンと上皮形成との関連を調べ現在までに、①幹細胞ではShhが、結合組織ではShhのインヒビターであるHipが組織特異的に発現すること、②幹細胞およびその周辺の繊維芽細胞では、Wnt5a、CD44などのWntシグナル伝達経路に関わる遺伝子が一過性に強発現すること、③幼生型上皮の幹細胞への脱分化に伴い、上皮細胞の核ラミンのタイプが変化すること等、数多くの知見を得ている。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

本研究で最も重要な実験である、dpTR カエルの小腸を用いた再結合培養実験に成功し、その結果を論文に発表することができた。研究は最終段階に入っている。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 最近、ツメガエル小腸では膨大な数のTH 応答遺伝子がクローニングされたため、RT-PCR と ISH による遺伝子の発現解析をさらに続ける必要がある。これまでの結果から、幹細胞ニッチには Shh および Wnt シグナル伝達経路が主として関与することが予想されるので、両経路に関わる TH 応答遺伝子を中心に解析を進めていく。

(2) 幹細胞制御への関与が予測される TH 応答遺伝子については、順次、その機能を検証していく。申請者は既に遺伝子の機能解析のための培養系や遺伝子導入法を確立しており、Musashi1、LGR5 など幹細胞を検出するためのマーカーも数多く見出しているため、これらを駆使して当該遺伝子の発現変化が幹細胞に及ぼす作用を詳細に解析する。

5. 代表的な研究成果

(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 10 件)

- ① Ishizuya-Oka A. (2011) Amphibian organ remodeling during metamorphosis: insight into thyroid hormone-induced apoptosis. *Dev. Growth & Differ.* 53:202-212 査読有
- ② Hasebe T., Buchholz D.R., Shi Y.-B., Ishizuya-Oka, A. (2010) Epithelial-connective tissue interactions induced by thyroid hormone receptor are essential for adult stem cell development in the *Xenopus laevis* intestine. *Stem Cells* 29:154-161 査読有

- ③ Ishizuya-Oka A., Hasebe T., Buchholz D.R., Kajita M., Fu L., Shi Y.-B. (2009) The origin of the adult intestinal stem cells induced by thyroid hormone in *Xenopus laevis*. *FASEB J.* 23(8):2568-2575 査読有
- ④ Ishizuya-Oka A., Shi Y.-B. (2008) Thyroid-hormone regulation of stem cell development during intestinal remodeling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 288:71-78 査読有
- ⑤ Hasebe T., Kajita M., Shi Y.-B., Ishizuya-Oka A. (2008) Thyroid hormone-upregulated hedgehog interacting protein is involved in larval-to-adult intestinal remodeling by regulating sonic hedgehog signaling pathway in *Xenopus laevis*. *Dev. Dyn.* 237:3006-3015 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 長谷部 孝, 岡 敦子 ドミナントポジティブ型甲状腺ホルモン受容体の発現により誘起されるアフリカツメガエル成体型腸上皮の発生 第 43 回日本発生学会大会 2010 年 6 月 22 日 京都国際会館
- ② 長谷部 孝, 梶田満子, 岡 敦子 アフリカツメガエル変態期の消化管における Smoothed の発現解析 第 81 回日本動物学会大会 2010 年 9 月 23 日 東京大学駒場
- ③ 長谷部 孝, 梶田満子, 岡 敦子 両生類の消化管再構築において Shh シグナルに応答して促進される Patched-1 の発現解析 第 80 回日本動物学会大会 2009 年 9 月 17 日 静岡グランシップ
- ④ Hasebe T., Kajita M., Ishizuya-Oka A. Hedgehog interacting protein regulates Sonic hedgehog signaling essential for the intestinal remodeling during amphibian metamorphosis. 6th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology & Neurobiology 2009 年 9 月 23 日 Berlin, Germany
- ⑤ 岡 敦子, 梶田満子, 長谷部 孝 アフリカツメガエルの成体型小腸上皮を形成する幹細胞の起源 第 79 回日本動物学会大会 2008 年 9 月 7 日 福岡大学七隈

[その他]

<http://tlo.nms.ac.jp/outer/kenkyusyashokai/index.html>