

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15132

研究課題名（和文）腸幹細胞傷害時にみられる上皮成熟分化細胞の脱分化制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidating the regulatory mechanisms of intestinal epithelial cell dedifferentiation during intestinal stem cell injury

研究代表者

竹見 祥大（Takemi, Shota）

北海道大学・先端生命科学研究院・特任助教

研究者番号：70871440

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：小腸の陰窩底部に位置する幹細胞が傷害を受け死滅すると、腸幹細胞付近に位置する分化細胞は脱分化を引き起こし、幹細胞様の性質を獲得して上皮再生に寄与することが知られているが、腸の分化細胞がどのように脱分化を引き起こすのか、その機序はほとんど不明である。そこで本研究では、腸幹細胞の3次元培養により生体構造を模した「腸オルガノイド」を用いて成熟分化細胞であるパネート細胞の脱分化の分子機構を明らかにすることを目的とした。本研究ではフェムト秒レーザーのレーザーパワーと細胞へ当たる時間を最適化し、リアルタイムで細胞の挙動を観察できる系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小腸幹細胞が傷害を受け死滅すると引き起こされる分化細胞の脱分化は上皮再生に寄与することが知られており、この脱分化機構の破綻はがんや炎症といった疾病につながるため、脱分化制御の機構を解明することは重要である。本研究では、この脱分化機構の解明につながる基礎的な研究成果を生み出すものである。

研究成果の概要（英文）：It is known that when stem cells located at the base of the crypts of the small intestine are injured and die, differentiated cells located near intestinal stem cells cause dedifferentiation, acquire stem cell-like properties and contribute to epithelial regeneration, but the mechanism of how intestinal differentiated cells cause dedifferentiation is largely unknown. Therefore, the aim of this study was to elucidate the molecular mechanisms of the dedifferentiation of Panete cells using intestinal organoids. In this study, the laser power of the femtosecond laser and the time at which it was applied to the cells were optimised, and a system was constructed to observe the behaviour of the cells.

研究分野：腸上皮幹細胞

キーワード：腸上皮幹細胞 脱分化 オルガノイド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2009年に腸幹細胞が特定されて以来、絨毛を構成する分化細胞は絨毛底部の幹細胞から供給されることが明らかになったが、腸幹細胞が破壊されても小腸の構造は維持されることが分かっていた。なぜ幹細胞を破壊しても小腸の形は崩れないのか。それは、幹細胞の死滅により幹細胞付近に位置する分化細胞が脱分化を引き起こし、幹細胞様の性質を獲得して上皮再生に寄与するからである。この上皮再生過程の破綻はがんや炎症につながり得るため [Schwitalla et al., Cell. 2013]、腸分化細胞の脱分化機構の解明はがんや炎症性腸疾患の予防や治療の観点から極めて重要である。しかし、従来の解析方法は、脱分化した後の細胞系譜を組織切片により解析するもので、リアルタイムで脱分化を解析することが不可能であるため、腸分化細胞が脱分化する機序は現在でもほとんど不明である。

### 2. 研究の目的

腸オルガノイドを用いて成熟分化細胞の1種であるパネート細胞の脱分化の分子機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、次の方法のみ実施した。

#### ・レーザーによる幹細胞破壊と蛍光を指標にしたセルソーティング

幹細胞の物理的な破壊によって、幹細胞に隣接するパネート細胞の脱分化を誘導するために、脱分化検出システムを導入した小腸オルガノイドを作製し、顕微鏡下でリアルタイム蛍光測定を行いながら、レーザーにより幹細胞を破壊する。一つの陰窩に複数個の幹細胞が存在するため、破壊する幹細胞の数や位置を検討する。レーザーによる破壊の後、小腸オルガノイドの蛍光を継時観察し、黄色(脱分化の最中を意味する)を呈する細胞が生じる時間を計測する。

### 4. 研究成果

本研究ではまず腸幹細胞とパネート細胞にそれぞれ緑色蛍光と赤色蛍光を発する腸オルガノイドの作製を目指した。腸幹細胞が緑色蛍光を発する(Lgr5-GFP)マウスから腸オルガノイドを作製し、幹細胞がGFP蛍光を発することを確認した。また、このGFP蛍光はオルガノイドを継代するごとに退色することを明らかにした。次にパネート細胞のマーカータンパク質であるLysozymeの下流に赤色蛍光であるRFPをノックインするためのコンストラクトを作製し、Cas9タンパク質とガイドRNAとともに腸オルガノイドへの導入を試みた。しかし、RFP蛍光を呈する腸オルガノイドは得られなかった。次

に、パネート細胞の脱分化現象をリアルタイム観察するために、フェムト秒レーザーを用いて腸幹細胞を特異的に死滅させる条件を検討した。フェムト秒レーザーのレーザーパワーと細胞へ当てる時間を最適化し、リアルタイムで細胞の挙動を観察できる系を構築できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------