

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570078

研究課題名(和文) 消化管上皮の脱分化を制御する幹細胞ニッチ形成機構の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of development of the stem cell niche regulating intestinal epithelial dedifferentiation

研究代表者

岡 敦子 (ISHIZUYA-OKA, Atsuko)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：50175254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：両生類の消化管では、変態期に甲状腺ホルモンにより幼生型上皮の一部が脱分化して幹細胞となり、成体型上皮を新たに形成する。本研究では、幹細胞への脱分化機構の分子レベルでの解明を目指し、アフリカツメガエル小腸を実験モデルとして用い、甲状腺ホルモン応答遺伝子の発現解析および培養系を用いた機能解析を進めた。その結果、Wnt5a/Ror2シグナル経路が幼生型上皮の脱分化に必須であることが明らかになった。さらに、幼生型上皮内に散在するRor2発現細胞が幹細胞へと脱分化することが示唆されたため、Ror2発現細胞の系譜解析用のトランスジェニックカエルの作製に着手した。

研究成果の概要(英文)：In the amphibian digestive tract, some of larval epithelial cells dedifferentiate into adult stem cells by the inductive action of thyroid hormone (TH). In the present study, to clarify molecular mechanisms underlying the epithelial dedifferentiation into the stem cells, we performed expression and functional analyses of TH response genes, using the culture system for the *Xenopus laevis* small intestine. Our results indicate that TH-activated Wnt5a/Ror2 signaling is essential for the larval epithelial dedifferentiation accompanied by changes in cell morphology. In addition, our findings strongly suggest that absorptive epithelial cells expressing Ror2, which are scattered in the larval epithelium, can dedifferentiate into the stem cells. To clarify the origin of the stem cells, we isolated the promoter of Ror2 and started to generate transgenic frogs for lineage analysis of the epithelial cells expressing Ror2.

研究分野：発生生物学

キーワード：小腸 幹細胞 上皮脱分化 甲状腺ホルモン 変態 アフリカツメガエル ニッチ シグナル伝達経路

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の消化管上皮では組織内の決まった場所に幹細胞が局在し、周囲の微小環境(ニッチ)の影響を受けながら、他のすべての上皮細胞を生産にわたって供給し続けている。この成体幹細胞を制御するしくみは器官の維持や再生に重要であるが、消化管での幹細胞研究は立ち遅れ、発生過程で幹細胞やそのニッチがどのようにして形成されるのか、まだ殆ど明らかにされていない。

変態期に全身的な体の作りかえが起こる両生類の消化管では、哺乳類消化管に類似の幹細胞を甲状腺ホルモン(thyroid hormone; TH)によって実験的に誘導することができ、幹細胞研究にユニークな実験モデルを提供している。申請者はこれまでに、アフリカツメガエル小腸を使った生体外培養系を確立し、分化した幼生型上皮の一部が脱分化することにより成体幹細胞が生じること、さらに、この脱分化には上皮と結合組織各々で発現するTH応答遺伝子が不可欠であることを、実験的に証明した。これらの結果は、各組織で発現するTH応答遺伝子を解析していくことにより、上皮脱分化の分子機構が解明可能であることを示している。近年、ツメガエルの小腸では数多くのTH応答遺伝子が同定されているが、その大部分は小腸における役割は未知である。そこで、申請者らはこれらのTH応答遺伝子の発現解析を進め、現在までにWntやNotchシグナル伝達経路に関わる遺伝子等、幹細胞の出現時に発現が高まる遺伝子を複数見出している。なかでもWnt5aの受容体の1つであるRor2は上皮で発現し、幹細胞が出現すると同時に幹細胞で特異的に強発現する、という興味深い発現パターンをもつ。Wnt5a/Ror2経路は細胞極性に与ることが他の器官系では知られており、幹細胞への脱分化過程で起こる上皮細胞の極性や形の変化に、この経路が関わっている可能性が高い。また、申請者はこれまでに幹細胞の出現時に限って上皮・結合組織間でcell contactが頻繁に起こることを報告しているが、Notch等の膜貫通タンパク質をコードするTH応答遺伝子は、cell contactを介した幹細胞制御に関与している可能性がある。そこで、これらのTH応答遺伝子に注目して解析を進めていけば、上皮の脱分化機構の解明に繋がると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究ではアフリカツメガエルの小腸を実験モデルとし、TH応答遺伝子の解析を進めることにより上皮脱分化機構の分子レベルでの解明を目指す。具体的には、以下のことを明らかにする。

(1) Wnt5a/Ror2経路に関わるTH応答遺伝子について、正常発生(幼生期から変態が完了するまで)における小腸での発現を詳細に解析する。特に、Ror2は変態前の幼生型上

皮ではどの分化タイプの細胞で発現しているのか、その細胞は変態期に丸い幹細胞へと形を変えるのか、等を明らかにする。培養系を用い、変態前の小腸をWnt5a/Ror2経路を活性化あるいは抑制した条件下で培養する。各条件下でのRor2発現細胞の形態的变化や幹細胞出現の有無等について解析し、この経路が幹細胞への上皮脱分化に及ぼす作用を明らかにする。

(2) Notchやtransient receptor potential (TRP)チャネルファミリーに属する分子等、細胞膜に遺伝子産物が存在するTH応答遺伝子について、正常発生(幼生期から変態が完了するまで)における小腸での発現を解析する。幹細胞出現時に一過性に発現が上昇し、上皮・結合組織間のcell contact部位で発現する遺伝子をスクリーニングする。さらに、これらの遺伝子について順次、上皮脱分化に及ぼす作用を培養系を用いて明らかにしていく。

(3) 上記(1)より、Ror2を発現する細胞が変態期に幹細胞へと脱分化することが明らかになった場合には、Ror2発現を手掛かりにして幹細胞の発生学的起源を追究するため、トランスジェニック(Tg)カエルを作製する。薬剤を投与した時にRor2発現細胞特異的に蛍光タンパク質を発現するようなTgカエルの作製に成功すれば、様々な発生段階でRor2発現細胞を蛍光標識し、その細胞が幹細胞になるか否かを調べることにより、幹細胞の起源を辿ることが可能となる。

3. 研究の方法

(1) 各発生段階(幼生期~変態完了直後)のアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)から、小腸を摘出した。Wnt5a、Ror2、Frizzled2の発現をRT-PCRおよび免疫組織化学的手法を用いて解析し、各遺伝子の発現パターンと変態期に出現する幹細胞との時間・空間的関連について調べた。変態前の幼生から小腸を摘出し、器官培養系を用いて26°Cで5日間培養した。TH非存在下(内在性のWnt5aの発現は上昇しない状態)では培養液にWnt5aを添加してWnt5a/Ror2経路を活性化し、TH存在下(THによりWnt5aの発現が上昇する状態)ではWnt5aの機能阻害抗体を添加してWnt5a/Ror2経路を抑制した。経時的に小腸を固定して組織切片を作製し、各小腸でのRor2発現細胞の形態を顕微鏡により観察した。また、各小腸における細胞増殖活性や幹細胞の出現について、増殖細胞や幹細胞のマーカー(PCNAやLgr5、Musashi-1等)を使った免疫組織化学により定量的に解析した。各条件下での培養結果を比較することにより、Wnt5a/Ror2経路が幼生型上皮の脱分化に及ぼす作用を調べた。

(2) 各発生段階(幼生期~変態完了直後)のツメガエルから、小腸を摘出した。Notch

やTRPチャネル等のTH応答遺伝子の発現を、RT-PCR、DIG標識RNAプローブを用いた *in situ* hybridization および免疫組織化学により解析し、幹細胞出現時に発現が上昇し、上皮・結合組織間の cell contact 部位で発現する遺伝子を選び出した。さらに、その機能について解析するため、培養系を用いて遺伝子産物やその阻害物質等の添加実験を開始した。

(3) Tgカエルを作製するために、まず Ror2 のプロモーターをツメガエルゲノムから単離した。このプロモーターの制御下に Cre を挿入し、薬剤(ドキシサイクリン)を投与した時に、Ror2 発現細胞でのみ Cre が活性化されるようにDNAコンストラクトを設計した。このコンストラクトをメガヌクレアーゼで処理した後、ツメガエルの受精卵に注入して Tgカエルを作製した。

4. 研究成果

(1) リガンドである Wnt5a と、その受容体である Ror2 と Frizzled2 の発現解析を行い、いずれも幹細胞が出現する時期に TH の作用を受けて発現が一過性に上昇することを示す結果を得た。ただし、TH 直接応答遺伝子は Frizzled2 のみで、Wnt5a と Ror2 は TH 以外のシグナルを介して間接的に発現が上昇することも明らかになった。さらに、各遺伝子を発現する細胞を経時的に観察し、Ror2 のみを変態前から幼生型上皮特異的に発現すること、Ror2 発現細胞は幼生型上皮内に散在的に分布し、刷子縁をもつ吸収上皮細胞であること、Ror2 発現細胞は変態期に単層円柱細胞から丸い幹細胞へと形を変化させること、等の結果を得た。これらの結果は、遅くとも幹細胞の出現直前には、Ror2 を発現する幼生型吸収上皮細胞は幹細胞の前駆細胞として決定されており、幹細胞の発生学的起源を辿るために Ror2 発現細胞の系譜解析が有効であることを示唆している。

(2) Wnt5a/Ror2 経路の役割を明らかにするために小腸の培養実験を行い、以下の結果を得た。TH 非存在下で Wnt5a を培養液に添加した場合には、Ror2 を発現する上皮細胞の形や極性が変化したが、幹細胞の出現には至らなかった。これに対し、TH 存在下で発現が高まる Wnt5a の働きを機能阻害抗体により抑制した場合には、TH により誘導される上皮細胞の形の変化が抑制され、TH 存在下であっても幹細胞は出現しなかった。これらの培養結果は、Wnt5a/Ror2 経路の活性化が、幹細胞への脱分化に充分ではないが必須であることを示している。また、Wnt5a は Ror2 発現細胞以外の幼生型上皮細胞にも作用し、その細胞増殖を促進した。このことは、Wnt5a が Ror2 以外の受容体(おそらく Frizzled2)を介して、canonical Wnt シグナル経路にも関わっていることを示唆している。そこで canonical Wnt 経路に関わる TH 応答遺伝子に

についても発現解析を始めた。幹細胞の出現時には TH の作用を受けて β -catenin の発現が高まり、タンパク質の核移行が観察される等、canonical Wnt 経路が活性化されることを示す結果も得た。

(3) 細胞膜に遺伝子産物が存在する TH 応答遺伝子の発現解析を行い、幹細胞の出現時に TH により発現が一過性に上昇する遺伝子として、Notch1 とそのリガンド Jagged1、2、TRPチャネルの1つである TRPP1、canonical Wnt 経路の標的遺伝子である CD44 等がこれまでに明らかになっている。このうち、cell contact の部位の幹細胞側では Notch1 や CD44、結合組織側では TRPP1 や Jagged1 等が発現していることを示す結果も得、これらの遺伝子の機能について解析中である。また、出現時の幹細胞では Notch1 の他に Hes 関連遺伝子である hairy-1 も強発現することから、上皮の脱分化には Notch 経路も関与することが示唆された。幹細胞への脱分化には、複数のシグナル経路間でのクロストークを含む複雑な機構が存在することが予想される。

(4) 上記(1)の成果より、Ror2 発現細胞の系譜解析が幹細胞の起源解明に有効であることが示唆されたため、この系譜解析に用いる Tgカエルの作製に着手した。単離に成功したツメガエル Ror2 プロモーターを使い、ドキシサイクリンを加えた時に Ror2 発現細胞特異的に Cre が活性化されるように作られた Tgカエルを得た。この Tgカエルの小腸を使い、Ror2 プロモーターの特異性を現在確認中である。さらに、Cre-loxP システムを用いて Ror2 発現細胞を永久標識するため、レポーターとなる loxP-EGFP-loxP-DsRed 導入 Tgカエルのライン化も進めている。これらの Tgカエルを使ったダブル Tgカエルの作製に成功すれば、発生初期まで Ror2 発現細胞の系譜を追跡することができ、脊椎動物では未知の、消化管幹細胞の発生学的起源を辿ることが可能になる。

哺乳類の小腸においても、TH が上昇する時期(授乳期から離乳期)に既存の上皮の一部が幹細胞へと脱分化することが近年報告され、TH が誘起する幹細胞への上皮脱分化機構は、脊椎動物間で進化的に保存されていることが提唱されている。したがって、本研究で得られた上記の成果は、陸上脊椎動物共通の上皮幹細胞への基本的な理解に役立つものである。また、生体内で最も細胞更新が速い組織である小腸上皮では、幹細胞の起源やそれを制御するニッチの分子レベルでの解明は医学的にも重要である。現在までのところ、Wnt5a/Ror2 経路を中心に、canonical Wnt 経路、Notch 経路等、TH によって活性化される複数の経路が幹細胞の出現に関与することが示唆されている。TH により幹細胞を誘導できるツメガエル小腸の利点を活かして

本研究をさらに進め、シグナル経路間のクロストークも含む複雑な機構の全貌を解明していくことができれば、消化管の再生医学や癌生物学の発展にも貢献できると考えている。

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)

Wen, L., Hasebe, T., Miller T.C., Ishizuya-Oka, A., Shi Y.-B. (2015) A requirement for hedgehog signaling in thyroid hormone-induced postembryonic intestinal remodeling. *Cell & Bioscience* 5: e13 査読有
DOI: 10.1186/s13578-015-0004-3

Ishizuya-Oka, A., Kajita M., Hasebe, T. (2014) Thyroid hormone-regulated Wnt5a/Ror2 signaling is essential for dedifferentiation of larval epithelial cells into adult stem cells in the *Xenopus laevis* intestine. *PLoS One* 9: e107611 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0107611

Miller, T.C., Sun, G., Hasebe, T., Fu, L., Heimeier, R.A., Das, B., Ishizuya-Oka, A., Shi, Y.-B. (2013) Tissue-specific upregulation of MDS/EVI gene transcripts in the intestine by thyroid hormone during *Xenopus* metamorphosis. *PLoS One* 8: e55585 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0055585

Ishizuya-Oka, A., Hasebe, T. (2013) Establishment of intestinal stem cell niche during amphibian metamorphosis. *Current Topics in Developmental Biology* 103: 305-327 査読有
DOI: 10.1016/B978-0-12-385979-2.00011-3

Sun, G., Heimeier R. A., Fu, L., Hasebe, T., Das, B., Ishizuya-Oka, A., Shi, Y.-B. (2013) Expression profiling of intestinal tissues implicates novel genes and pathways essential for adult stem cell development. *Endocrinology* 154: 4396-4407 査読有
DOI: 10.1210/en.2013-1432

Hasebe, T., Liezhen Fu, L., Thomas C. Miller, T. C., Zhang, Y., Shi Y.-B., Ishizuya-Oka, A. (2013) Thyroid hormone-induced cell-cell interactions in the development of adult intestinal stem cells. *Cell & Bioscience* 3: e18 査読有
DOI: 10.1186/2045-3701-3-18

[学会発表](計 8 件)

岡 敦子 甲状腺ホルモンが制御する小腸上皮幹細胞の発生：変態現象をモデルとした進化発生学的考察
第 56 回日本甲状腺学会学術集会 和歌山県民文化会館(和歌山)2013 年 11 月 15 日

Hasebe, T., Kajita, M., Ishizuya-Oka, A. Notch signaling-dependent gene expression of Hairy1 and Hairy2b during adult stem cell development in the *Xenopus laevis* intestine. The 8th biennial conference of the ISAREN 基礎生物学研究所(岡崎)2014 年 11 月 7-9 日

関本篤人、福永悦也、梶田満子、長谷部 孝、岡敦子 アフリカツメガエル変態期の消化管再構築における Jagged 1 と Jagged 2 の発現解析
第 85 回日本動物学会大会 東北大学(仙台)2014 年 9 月 13 日

岡 敦子、長谷部 孝 アフリカツメガエル小腸上皮の脱分化機構：Wnt5a/Ror2 シグナルの関与
第 84 回日本動物学会大会 岡山大学(岡山)2013 年 9 月 28 日

長谷部 孝、岡 敦子 アフリカツメガエル変態期の小腸における Hairy-1 と Hairy-2b の発現は Notch シグナル依存的である
第 84 回日本動物学会大会 岡山大学(岡山)2013 年 9 月 28 日

児玉万穂、藤井淳、松尾安希、長谷部 孝、岡 敦子、中村正久 アンドロゲンとその受容体はツチガエルの性を決める？
第 83 回日本動物学会大会 岡山大学(岡山)2013 年 9 月 27 日

長谷部 孝、岡 敦子 トランスジェニックカエルは 2 度輝く：変態期の消化管上皮幹細胞の起源と発生のメカニズム
第 83 回日本動物学会大会 大阪大学(大阪)2012 年 9 月 14 日

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再構築における hairy-1 および hairy-2b の発現解析
第 83 回日本動物学会大会 大阪大学(大阪)2012 年 9 月 15 日

[図書](計 1 件)

Schatten H. 編、Ishizuya-Oka, A. Cell and Molecular Biology and Imaging of Stem Cells: 6. Regulation of adult intestinal stem cells through thyroid hormone-induced tissue interactions during amphibian metamorphosis. John Wiley & Sons, Inc. (2014) 292 (pp.153-172)

〔産業財産権〕
出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
日本医科大学知的財産推進センター
<http://tlo.nms.ac.jp/researcher/762.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡 敦子 (ISHIZUYA-OKA, Atsuko)
日本医科大学・医学部・教授
研究者番号：5 0 1 7 5 2 5 4

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

長谷部 孝 (HASEBE, Takashi)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：7 0 3 2 9 0 2 7