

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07136

研究課題名(和文) 消化管上皮幹細胞の系譜解析とニッチ形成機構解明のための培養系の開発

研究課題名(英文) Lineage analysis of intestinal stem cells and development of the culture system to study the stem cell niche

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：変態期アフリカツメガエルの小腸上皮では、Ror2を発現する予定幹細胞が、甲状腺ホルモン(TH)により幹細胞へと誘導される。本研究では、幹細胞ニッチ形成機構を解明するため、トランスジェニックカエルを使って予定幹細胞を組織細胞化学的に同定し、その培養系の開発を進めた。また、TH応答遺伝子を*in vitro*で解析し、幹細胞出現時には標準Wnt経路とNotch経路が活性化され、幹細胞の増殖を促進することを明らかにした。さらに、THを引き金として合成されるヒアルロン酸が、CD44を介しWnt経路を活性化することも見出した。

研究成果の概要(英文)：In the *Xenopus laevis* intestine during metamorphosis, thyroid hormone (TH) induces some epithelial cells that express Ror2 to dedifferentiate into stem cells. In the present study, to clarify molecular mechanisms underlying the formation of stem cell niche, we histocytochemically identified precursors of the stem cells using transgenic frogs and developed a culture system for them. In addition, we performed *in vitro* analyses of TH response genes and found that both canonical Wnt and Notch signaling pathways are activated in the stem cells from their appearance and promote their proliferation. Furthermore, we have shown that hyaluronan newly synthesized by TH activates the Wnt pathway via CD44, suggesting the important role of hyaluronan in the formation of stem cell niche.

研究分野：発生生物学

キーワード：小腸 幹細胞 Ror2 Wntシグナル経路 甲状腺ホルモン 変態 培養 アフリカツメガエル

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物成体の消化管では、上皮組織内の定位置に幹細胞が局在し、周囲の微小環境(ニッチ)により制御されながら、生涯に渡ってすべての上皮細胞をつくり出している。なかでも小腸上皮は、細胞の入れ替わりが最も速い組織であり、その幹細胞は生命維持に必須である。しかし、幹細胞を制御するしくみについてはまだ断片的な情報しか得られておらず、特に、個体発生の過程でどのようにして小腸の幹細胞やニッチが形成されるのか、脊椎動物全体を通じて殆ど未知である。

両生類の小腸は、変態期に甲状腺ホルモン (TH) の作用により哺乳類小腸に共通のマーカをもつ幹細胞が誘導されることから、幹細胞ニッチの研究に貴重なモデル系を提供している。アフリカツメガエルの小腸では、現在までに数千ものTH応答遺伝子が同定され、これらの遺伝子を解析していくことにより幹細胞ニッチの形成機構を分子レベルで解明することが可能である。申請者はこれまでに、変態期のツメガエル小腸を実験材料とし、THにより幼生上皮の大部分はアポトーシスを起こして消失する一方、ごく少数の細胞は幹細胞へと脱分化し、その周囲にニッチが形成されることを報告した。さらに、幹細胞になりうる細胞は変態前の幼生上皮内に散在し、Wnt5a受容体の1つ、receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (Ror2) を発現していることを見出した。このことは、幹細胞出現前の幼生上皮は、幹細胞へと運命づけられた少数のRor2発現細胞(予定幹細胞)と、アポトーシスへと運命づけられた大多数の細胞(幼生型固有細胞)の、2つの細胞群に大きく分けられることを示している。そこで、Ror2を指標にすれば予定幹細胞を同定でき、その組織細胞化学的特徴や細胞系譜を辿ることが可能であると考え、本研究の着想に至った。また、Ror2の発現を利用して予定幹細胞を幼生型固有細胞から分離し、THにより幹細胞へと

誘導できる培養系を開発できれば、幹細胞制御に関わるTH応答遺伝子の機能解析が従来よりも容易になると期待される。そこで本研究では、予定幹細胞を使った培養系の開発にも挑み、幹細胞ニッチ形成の分子機構の解明を目指す。

2. 研究の目的

(1) Ror2発現細胞のみを蛍光タンパク質で検出可能なトランスジェニック(Tg)アフリカツメガエルを作製し、TH的作用により幹細胞へと脱分化する予定幹細胞と、アポトーシスを起こす幼生型固有細胞との間で、組織細胞化学的にどのような違いがあるのかを明らかにする。さらに、Cre/loxP システムを導入したTgカエルを作製し、予定幹細胞の系譜を辿る。

(2) Ror2 が予定幹細胞の細胞膜に存在することを利用し、変態前の小腸幼生上皮から予定幹細胞を分離する。この予定幹細胞を結合組織と再結合させ、TH存在下で幹細胞へと効率よく誘導できる培養系を開発する。さらに、この再結合培養片についてRNA-seq解析を行い、幹細胞制御に関わる候補遺伝子を見つける。

(3) 幹細胞制御への関与が予想される遺伝子について、培養系を使ってその機能を順次解析し、ニッチ形成に重要なシグナル経路を明らかにしていく。

3. 研究の方法

(1) 種々の Ror2 転写調節領域にレポーター遺伝子として GFP をドライブさせた DNA コンストラクトを作り、これらを導入して Tg カエルを作製した。次に、各 GFP 導入カエルの小腸において GFP 発現が Ror2 発現と一致するか否かを免疫組織化学により解析し、Ror2 転写調節領域の特異性を調べた。特異性が確認できた GFP 導入カエルを用い、変態

前の各発生段階の幼生から小腸を摘出した。GFP により Ror2 を発現する予定幹細胞を同定し、それ以外の幼生型固有細胞と、遺伝子発現やエピジェネティックにどのような違いがあるのか、*in situ* hybridization および免疫組織化学により解析した。さらに、予定幹細胞の系譜を辿るため、特異性を確認した Ror2 転写調節領域に Cre をドライブさせたコンストラクトを作製し、ライン化した *loxP* 導入カエルにこれを導入し、ダブル Tg カエルを作製した。

(2) 予定幹細胞の培養系を開発するため、変態前の幼生から小腸を摘出し、ディスペーゼ処理により幼生上皮を結合組織から単離した。この上皮を、抗 Ror2 抗体をまぶした吸着ビーズを使い、Ror2 が細胞膜に局在する予定幹細胞とそれ以外の幼生型固有細胞とに分離した。次に、各上皮細胞のマーカーを使って細胞分離の精度や細胞の生存率を調べた。さらに、分離した上皮細胞を結合組織と再結合させ、TH により幹細胞が誘導されるか否かを調べた。

(3) 幹細胞制御への関与が予想される候補遺伝子の機能について、培養系を使って解析した。変態前の幼生から小腸を摘出し、TH 存在下（遺伝子発現が上昇する状態）では培養液に遺伝子産物の阻害剤等を添加して当該遺伝子の機能を抑制、TH 非存在下では遺伝子産物のタンパク質等を添加して当該遺伝子の機能を促進させ、26°C で7日間培養した。経時的に各培養片を固定して組織切片を作製し、各培養片での幹細胞の出現・増殖・分化について、免疫組織化学により定量的に解析した。各培養条件下での結果を比較することにより、当該遺伝子が幹細胞に及ぼす影響について調べた。

4. 研究成果

(1) 特異性を確認した Ror2 転写調節領域

を使って GFP 導入カエルを作製し、その小腸を用いて TH 受容体の 1 つ、TR α が予定幹細胞で発現し、幼生型固有細胞では発現しないことを見出した。そこで TR α の機能に注目し、TR α をノックアウトしたカエル (TR α KO) の小腸を解析したところ、TR α KO 小腸では野生型小腸に比べて幹細胞の出現およびその後の成体上皮の形成が遅れることを示す結果を得た。このことは、予定幹細胞特異的に発現する TR α が、幹細胞への脱分化のタイミングを制御していることを示唆している。さらに、予定幹細胞でのヒストンの修飾状態が、幼生型固有細胞のものとは異なり、血中の TH レベルが上昇し始める変態始動期から活性化されることも見出した。これらの結果から、脱分化直前の予定幹細胞では、核内受容体である TR α が、幹細胞出現に関わる遺伝子の転写活性をエピジェネティックに高めていることが示唆された。

薬剤投与時に Ror2 を発現している細胞のみを永久的に標識するため、Cre/*loxP* システムを導入したダブル Tg カエルを作製し、ライン化を進めた。このラインが確立されれば、予定幹細胞の系譜をより正確に、発生初期から解析することが可能になる。

(2) 市販の抗 Ror2 抗体を使った吸着ビーズ法では予定幹細胞の分離が不十分であったため、Ror2 の細胞外領域を特異的に認識する抗体を新たに作製し、この抗体を使って幼生上皮を予定幹細胞と幼生型固有細胞とに分離した。また、上記(1) で GFP 導入カエルが作製できたため、フローサイトメトリーによる予定幹細胞の分離にも着手した。現在、両方法で細胞分離の精度や細胞生存率を比較検討し、分離法の改良を進めている。上皮細胞を結合組織と再結合させ、TH により幹細胞を誘導する方法は既に確立しており、最適な分離法が確立されれば、両者を組み合わせた培養系を使って幹細胞制

御関連遺伝子の機能解析をより容易に効率よく進めることが可能になる。

(3) 遺伝子の発現解析等により、CD44とその主要リガンドであるヒアルロン酸(HA)を合成する酵素が、脱分化直後の幹細胞自身とその近くの繊維芽細胞でTHにより一過性に発現上昇することを見出した。そこで、HAの合成阻害実験を培養下で行ったところ、HA合成の低下により標準Wnt経路が不活性化し、幹細胞の増殖が抑制された。この結果は、THを引き金として新たに合成されるHAが、CD44を介してWnt経路を活性化することにより、幹細胞増殖を促進することを示唆している。同様に、分泌タンパク質SFRP2も、THにより一過性に発現上昇し、Wnt経路を活性化して幹細胞増殖を促進することを培養実験により明らかにした。この他、Notch経路が幹細胞出現と同時に幹細胞で活性化することも見出した。Notch経路の阻害培養実験により、この経路が幹細胞の増殖や維持に必須である他、細胞分化の決定に関与することを明らかにした。

以上の結果から、HAや幹細胞近くの繊維芽細胞が、Wnt経路やNotch経路を制御することにより、ニッチ形成に重要な役割を果たすことが示唆された。

予定幹細胞をRor2を指標に同定でき、THにより幹細胞へと実験的に誘導できる両生類幼生の小腸は、幹細胞やそのニッチ形成の研究に格好な、ユニークな実験モデルである。近年、哺乳類の小腸でも、THが上昇する時期(出産～離乳期)に、既存の上皮の一部から幹細胞が出現することが報告された。THを引き金とする幹細胞ニッチの形成機構は、脊椎動物間で進化的に保存されていることが予想され、その機構の全貌解明が待たれている。本研究で得られた予定幹細胞やニッチ

形成に関わる成果は、陸上脊椎動物共通の幹細胞制御のしくみへの理解を深めるものであり、消化器系癌幹細胞の発生機序の解明や再生医療の発展にも寄与するものと期待される。

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 8件)

Sakane, Y., Iida, M., Hasebe, T., Fujii, S., Buchholz, D. R., Ishizuya-Oka, A., Yamamoto, T., Suzuki, K.T. Functional analysis of thyroid hormone receptor beta in *Xenopus tropicalis* founders using CRISPR-Cas. 査読有
Biol. Open (2018) 7: e
DOI: 10.1242/bio.030338

Hasebe, T., Fujimoto, K., Kajita M., Ishizuya-Oka, A. Essential roles of thyroid hormone-regulated hyaluronan/CD44 signaling in adult stem cell development during *Xenopus laevis* intestinal remodeling. 査読有
Stem Cells (2017) 35(10): 2175-2183
DOI: 10.1002/stem.2671

Ishizuya-Oka, A. How thyroid hormone regulates transformation of larval epithelial cells into adult stem cells in the amphibian intestine. 査読有
Mol. Cell. Endocrinol. (2017) 459: 98-103
DOI: 10.1016/j.mce.2017.02.026

Ishizuya-Oka, A. Organ culture of the *Xenopus* tadpole intestine. 査読有
Cold Spring Harb Protoc. (2017) 10: e
DOI: 10.1101/pdb.prot097683

Choi, J., Ishizuya-Oka, A., Buchholz, D. R. Growth, development, and intestinal remodeling occurs in the absence of thyroid hormone receptor α in tadpoles of *Xenopus tropicalis*. 査読有
Endocrinology (2017) 158(6): 1623-1633
DOI: 10.1210/en.2016-1955

Hasebe, T., Fujimoto, K., Kajita, M., Fu, L., Shi, Y.-B., Ishizuya-Oka, A. Thyroid hormone-induced activation of Notch signaling is required for adult intestinal stem cell development during *Xenopus laevis* metamorphosis. 査読有
Stem Cells (2017) 35(4): 1028-1039
DOI: 10.1002/stem.2544

Hasebe, T., Fujimoto, K., Kajita M.,

Ishizuya-Oka, A. Thyroid hormone activates Wnt/ β -catenin signaling involved in adult epithelial development during *Xenopus laevis* intestinal remodeling. 査読有
Cell Tissue Res. (2016) 365: 309-318
DOI: 10.1007/s00441-016-2396-8

岡 敦子 消化器系の進化と発生のメカニズム 査読無 日本医科大学医学会雑誌 (2015) 11(3): 155-160 <http://www2.nms.ac.jp/jmanms/pdf/011030155.pdf>

[学会発表](計 9件)

藤本健太、長谷部孝、梶田満子、岡 敦子 アフリカツメガエル小腸におけるヒアルロン酸シグナルの幹細胞ニッチ形成に果たす役割 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018年3月

名倉京、佐藤夢子、長谷部孝、岡 敦子、平良真規 無尾両生類の変態における幽門形成の組織学と遺伝子発現 第40回日本分子生物学会大会 2017年12月

長谷部孝、藤本健太、梶田満子、岡 敦子 アフリカツメガエル小腸上皮の幹細胞制御におけるヒアルロン酸/CD44 シグナルの役割 第88回日本動物学会 2017年9月

長谷部孝、岡 敦子 アフリカツメガエル消化管再構築の分子基盤: Notch シグナルの役割 第88回日本動物学会シンポジウム 2017年9月

藤本 健太、長谷部 孝、梶田 満子、岡 敦子 アフリカツメガエルの小腸再構築におけるヒアルロン酸シグナルの役割 第50回日本発生生物学会 2017年5月

藤本 健太、長谷部 孝、梶田 満子、岡 敦子 アフリカツメガエルの消化管再構築におけるヒアルロン酸合成酵素の遺伝子発現解析 第39回日本分子生物学会大会 2016年12月

Hasebe T., Fujimoto, K., Kajita M., Fu L., Shi Y.-B., Ishizuya-Oka, A. Thyroid hormone-induced activation of Notch signaling is required for intestinal remodeling during *Xenopus laevis* metamorphosis. 第87回日本動物学会大会 2016年11月

長谷部 孝、藤本 健太、岡 敦子 アフリカツメガエルの消化管再構築において Wnt シグナルは甲状腺ホルモンにより活性化され成体型上皮発生に關与する 第57回日本組織細胞化学会学術集会 2016年9月

長谷部孝、梶田満子、岡 敦子 ツメガエル変態期の消化管再構築におけるNotchシグ

ナルの役割: DLL1とDLL2の発現解析
第86回日本動物学会大会 2015年9月

[図書](計 0件)

[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:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<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: 50175254

(2) 研究分担者

(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: 70329027

藤本 健太 (FUJIMOTO, Kenta)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50403580

(4) 研究協力者