

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15032

研究課題名(和文)細胞周期特性を利用した腸管幹細胞の純化と再生医療への応用

研究課題名(英文) Purification of intestinal stem cells on the basis of their cell cycle status and its application to regenerative medicine

研究代表者

武石 昭一郎 (Takeishi, Shoichiro)

九州大学・生体防御医学研究所・研究員

研究者番号：10647720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：腸管の形成・維持機構の解明には、この組織を構成する細胞を生み出す腸管幹細胞の同定が重要である。これまでにCBC幹細胞と+4幹細胞という2種類の細胞が腸管幹細胞として報告されているが、これらよりもさらに未分化な細胞集団が存在する可能性も考えられる。本研究課題では、組織幹細胞が静止期に留まっていることに着目して、腸管幹細胞の純化を試みた。まず、CDKインヒビターp57が+4幹細胞に多く発現していること、ならびにこの幹細胞の静止期の維持に必要であることを突き止めた。次に、p57の発現を指標にして+4幹細胞からさらに腸管幹細胞を純化するために、p57発現細胞の系統追跡実験に必要なマウスを作製した。

研究成果の概要(英文)：Identification of intestinal stem cells (ISCs), which give rise to differentiated cells in the intestine, is critical to understand mechanisms of morphogenesis and maintenance of this organ. Although two kinds of cells, referred to as CBC stem cells and +4 stem cells, were reported as ISCs, it is still presumed that more undifferentiated stem cells might exist. In this grant, we aim to purify ISCs based on the finding that tissue stem cells remain in the quiescent state of the cell cycle. We found that CDK inhibitor p57 is abundantly expressed in +4 stem cells and required for the maintenance of their quiescence. To further purify ISCs on the basis of p57 expression, we generated mice for lineage tracing experiments of p57-expressing cells in the intestine.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：腸管幹細胞 +4幹細胞 CBC幹細胞 静止期 CDKインヒビター p57 Bmi1 Lgr5

1. 研究開始当初の背景

腸管は吸収上皮細胞、杯細胞、内分泌細胞、タフト細胞、パネート細胞などにより構成され、これらの分化細胞は腸管幹細胞から生み出される。したがって、腸管の形成・維持機構の解明には、腸管のヒエラルキーの最上流にある(=最も未分化な)腸管幹細胞の同定が欠かせない。これまでに2種類の細胞が腸管幹細胞として報告されている。一つは陰窩(クリプト)の底に存在し、Lgr5をマーカーとする細胞(crypt base columnar; CBC 幹細胞)であり [Barker et al., *Nature* (2007)], もう一つはクリプトの底から約4番目(+4ポジション)の細胞に該当し、Bmi1を発現している+4幹細胞である [Sangiorgi et al., *Nat. Genet.* (2008)]. 最近の研究により、CBC 幹細胞よりも+4幹細胞の方が上流であることが示唆されているが [Tian et al., *Nature* (2011)], +4幹細胞よりもさらに上流の幹細胞が存在する可能性も十分に考えられ、最も未分化な腸管幹細胞の同定には未だ至っていない状況である。

2. 研究の目的

最も未分化な腸管幹細胞を同定するために、組織幹細胞が細胞周期を脱出して静止期に維持されている [Orford et al., *Nat. Rev. Genet.* (2008)] ことに着目した。静止期から細胞周期への進入はサイクリン-CDK 複合体によって正に制御されることが知られており [Sherr and Roberts, *Genes Dev.* (1999)], 申請者を含むグループはこの複合体の活性を阻害する CDK インヒビター-p57 が造血細胞や神経組織において幹細胞分画に高発現していること、ならびにこれらの細胞の静止期維持に必要であることを明らかにしている [Matsumoto et al., *Cell Stem Cell* (2011); Furutachi et al., *EMBO J.* (2013)]. この知見は、p57 が全身の幹細胞において高発現していて、静止期の維持に関わっている可能性を示唆している。そこで本研究課題では、「p57 は腸管幹細胞においても静止期の維持に重要であり、この分子の発現を指標にして腸管幹細胞をさらに純化できるのではないか」という仮説を立て検証することにした。

3. 研究の方法

仮説 1: p57 は腸管幹細胞を静止期に維持している

これまでに報告されている複数の幹細胞分画で p57 の発現量を比較した。この結果を踏まえ、腸管で p57 を欠損させたマウスにおいて+4 幹細胞の細胞周期解析を行った。

仮説 2: p57 を発現している細胞が最も未分化な腸管幹細胞である

この仮説を検証するために、生体内で p57 を可視化できるマウス、ならびに p57 発現細胞から分化した細胞を追跡できるマウスを作製した。

4. 研究成果

(1) これまでに報告された腸管幹細胞における p57 の発現量の比較

+4 幹細胞と CBC 幹細胞における p57 の発現量を比較するために、まず Bmi1-GFP マウスおよび Lgr5-GFP マウスそれぞれから FACS を用いて GFP⁺細胞を採取し、リアルタイム PCR で p57 の発現量を調べた。すると、p57 は Bmi1⁺細胞で多く発現していたのに対して、Lgr5⁺細胞ではほとんど発現していなかった (図 1 左)。また、他の CDK インヒビターである p21 や p27 ではそのような発現パターンはみられなかった。さらに、腸管において p57 を発現している細胞の存在部位を確かめるために、抗 p57 抗体を用いて免疫組織染色を行ったところ、p57⁺細胞は+4 ポジションに位置して Bmi1 も発現しており、Lgr5⁺細胞とは異なることが分かった (図 1 右)。以上の結果から、p57 は+4 幹細胞に多く発現していることが明らかになった。

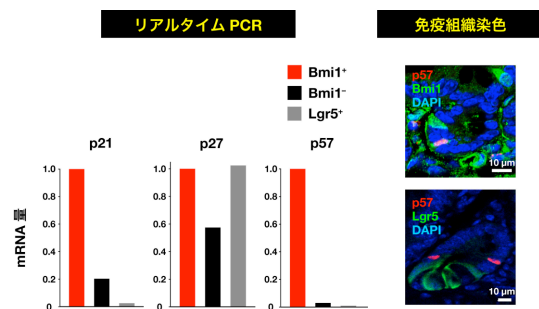


図 1 p57 は+4 幹細胞に多く発現している

(2) +4 幹細胞の静止期維持における p57 の役割

上記の結果を踏まえて、+4 幹細胞の静止期維持における p57 の役割の解明に着手した。腸管においてタモキシフェン誘導性に Cre を発現する Villin-Cre-ER マウスと、申請者らが作製した p57 flox マウス [Matsumoto et al., *Cell Stem Cell* (2011)], さらに Bmi1-GFP マウスを交配して Villin-Cre-ER/p57^{flox}/Bmi1-GFP マウスを作製し (p57 遺伝子はゲノムインプリンティングを受けており、母方由来の遺伝子座からのみ発現する [Matsuoka et al., *Genes Dev.* (1995)]), タモキシフェンを投与して腸管特異的に p57 を欠損させた。このマウスを用いて、フローサイトメトリーで細胞周期解析を行ったところ、コントロールマウス (Villin-Cre-ER/p57^{flox}/Bmi1-GFP) と比較して、Bmi1⁺細胞の静止期 (PI^{low}Ki67^{low} 分画) の割合が減少していた (図 2)。この結果は、p57 が+4 幹細胞の静止期の維持に必要であることを示している。

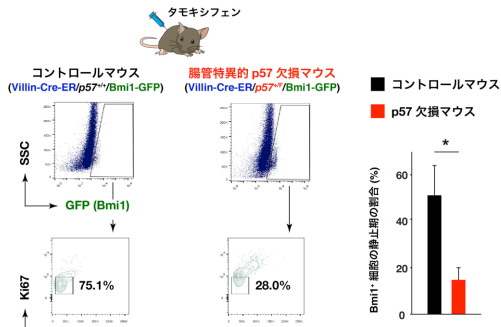


図2 p57は+4幹細胞を静止期に維持している

(3) 腸管への侵襲時に p57 が果たす役割

組織幹細胞は静止期に留まることにより侵襲から保護されていると考えられているため、外的ストレスが p57 を欠損させた腸管幹細胞へ及ぼす影響を次に調べた。Villin-Cre-ER/p57^{+/-} マウスにタモキシフェンと抗がん剤である 5-FU を投与したところ、コントロールマウスと比較して、1 視野あたりのクリプトの数が減少し、腸管壁も薄くなっていた (図 3)。この結果は、p57 が+4 幹細胞を静止期に留めることにより、この細胞集団、ひいては腸管全体を侵襲から防御している可能性を示唆している。

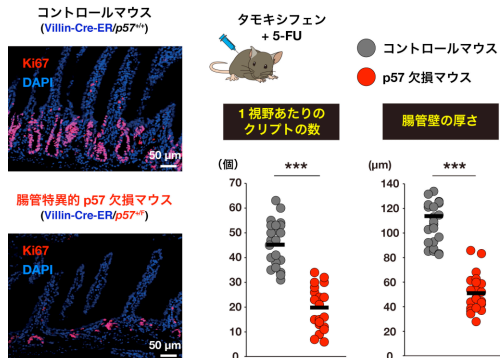


図3 p57は腸管を侵襲から防御している

5-FU による傷害から腸管が再生する過程で、Bmi1⁺細胞は静止期から細胞周期へと入り (図 4 左)、分化細胞を産生する。興味深いことに、この細胞周期への進入の際に Bmi1⁺細胞における p57 の発現量は低下していた (図 4 右)。

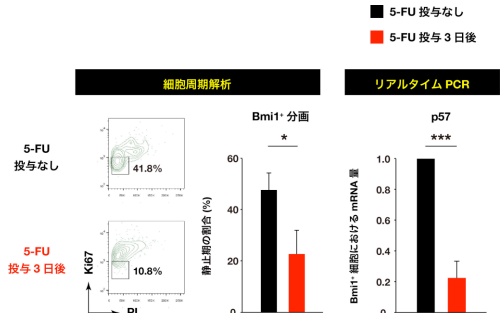


図4 腸管への侵襲後に+4幹細胞が細胞周期へと進入する際に p57 の発現量は低下する

(4) p57 の発現を指標にした腸管幹細胞の純化

前述の Bmi1-GFP マウスにおける抗 p57 抗体を用いた免疫組織染色の結果を詳細に検討したところ、Bmi1⁺細胞のうち、p57 を発現している細胞は4割にも満たず (図 5)、p57⁺細胞は+4 幹細胞と異なる細胞集団であることが明らかになった。

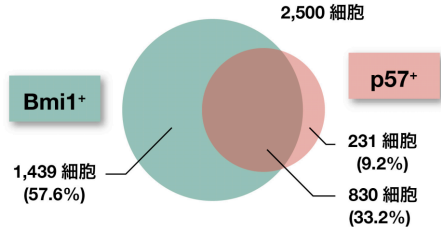


図5 p57⁺細胞と+4幹細胞は異なる細胞集団である

本研究課題の目的である p57 の発現を指標にした腸管幹細胞の純化のために、1. p57 可視化マウス、ならびに 2. p57⁺細胞を系統追跡するマウスを作製して交配し、p57⁺細胞およびこの細胞から分化した細胞が標識されるような系の確立を試みた (図 6)。この系において腸管を構成する全ての細胞が p57⁺細胞から生み出されたのであれば、p57⁺細胞は腸管幹細胞であるという結論に至る。

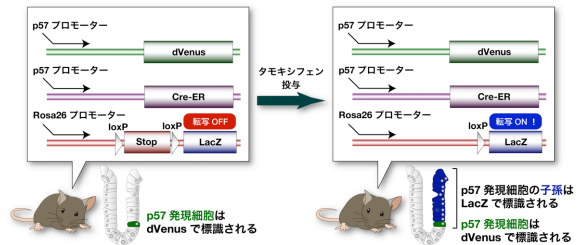


図6 p57⁺細胞の系統追跡実験の概要

p57 可視化マウスに関しては、p57 遺伝子座に蛍光タンパク質 destabilized Venus (dVenus) を組み込んだ p57-2a-dVenus ノックインマウスを作製した。このマウスにおいて抗 p57 抗体を用いて免疫組織染色を行ったところ、p57 の蛍光と dVenus の発現が一致したことから、dVenus の発現は内在性の p57 の発現を反映していると考えられた (図 7)。

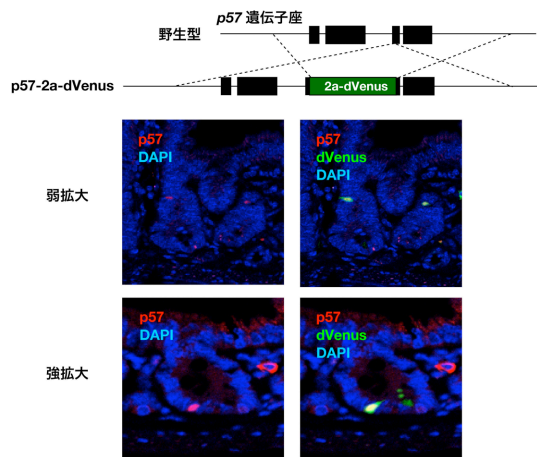


図7 p57 可視化マウスの作製

p57⁺細胞を系統追跡するマウスに関しては、p57 遺伝子座に Cre-ER を組み込んだ p57-2a-Cre-ER ノックインマウスの作製を試みた。このマウスを Rosa26 領域のマーカー (LacZ) マウスと交配し、タモキシフェンを投与すると、p57 を発現していた細胞が LacZ で標識されるため、X-gal 染色により p57⁺細胞から分化した細胞を可視化することができる (図 6)。本研究課題では、この 2a-Cre-ER を p57 遺伝子座にノックインした ES 細胞の作製まで完了した (図 8)。

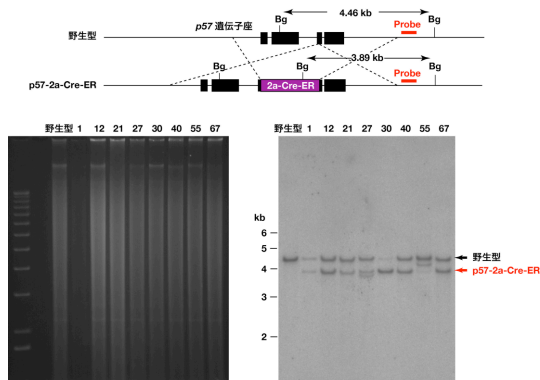


図 8 p57⁺細胞を系統追跡するマウスの作製

今後、図 6 に示したようなマウスを作製し、さらに Bmi1 と共染色して p57⁺細胞から +4 幹細胞が生じているかどうか、すなわち p57⁺細胞が腸管のヒエラルキーの最上流の幹細胞かどうかを検証する予定である。

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 1 件)

- ① Takeishi, S. & Nakayama, K.I.: To wake up cancer stem cells, or to let them sleep, that is the question. *Cancer Sci.* (査読有), (advance online publication).

[学会発表] (計 5 件)

- ① 比嘉 綱己, 沖田 康孝, 松本 有樹修, 武石 昭一郎, 中山 敬一: p57 は静止状態の腸管幹細胞を制御することで腸管上皮の恒常性を維持する. **第 38 回日本分子生物学会年会**, 神戸 (12/3, 2015).
- ② Higa, T., Okita, Y., Matsumoto, A., Takeishi, S. & Nakayama, K.I.: p57 maintains epithelial homeostasis via regulation of quiescent intestinal stem cells. **The 25th Hot Spring Harbor International Symposium**, Fukuoka (11/14, 2015).
- ③ Takeishi, S., Matsumoto, A., Naka, K., Hirao, A. & Nakayama K.I.: Disruption of quiescence by p57 ablation confers oncogene addiction to leukemia stem cells through

altered microenvironmental regulation. **The 18th Medical Institute of Bioregulation Retreat**, Kumamoto (7/16, 2015).

- ④ Higa, T., Okita, Y., Matsumoto, A., Takeishi, S. & Nakayama, K.I.: p57 is required for the maintenance of quiescence in intestinal stem cells. **The 18th Medical Institute of Bioregulation Retreat**, Kumamoto (7/16, 2015).
- ⑤ 武石 昭一郎: p57 は p53 の活性化と pre-TCR シグナルのバランスを取ることで T 細胞の分化を制御し、悪性リンパ腫の発症を抑制する. **第 11 回麒麟塾**, 東京 (7/11, 2015).

[図書] (計 2 件)

- ① 武石 昭一郎: がん幹細胞における細胞周期制御. 日本臨牀, 73(5): 779-783, 日本臨牀社 (東京) (2015).
- ② 武石 昭一郎: 細胞外の代謝エネルギーはがんの進展を促しうる. 細胞工学, 34(4): 406, 秀潤社 (東京) (2015).

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
なし

- 取得状況 (計 0 件)
なし

[その他]

ホームページ
九州大学 生体防御医学研究所
<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

武石 昭一郎 (Shoichiro Takeishi)
九州大学・生体防御医学研究所・特任助教
研究者番号: 10647720

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし