

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20340

研究課題名(和文)重症病態における腸管上皮幹細胞機能異常の解明とその維持に関わる治療の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of intestinal stem cell dysfunction in severe illness and development of treatment related to maintenance of intestinal stem cell function

研究代表者

山田 知輝 (Yamada, Tomoki)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：40623434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：全身侵襲時に腸管機能不全が発症するメカニズムは十分に解明されていない。腸管上皮幹細胞の機能に注目し、このメカニズムの解明を目指した。まずCLPモデルでは陰窩中の細胞分裂している細胞数に減少傾向が見られた。腸管上皮幹細胞の増殖・分化に関わるシグナルをRT-PCR法で評価したところ、Wnt3、Wntに抑制的に働くBMP4、BMPを阻害するNoggin、Stem cellの未分化性の維持に関与するNotch1はCLP群で24時間後に低下していた。CLP侵襲にてLgr5陽性細胞数も減少していた。CLP侵襲にて腸管上皮幹細胞障害が起こることにより、絨毛萎縮や腸管蠕動不全が生じる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of intestinal dysfunction develops during systemic invasion has not been sufficiently elucidated. We focused on the function of intestinal stem cells and aimed to elucidate this mechanism. First, in the CLP model, the number of cells during cell division in the crypt was decreasing. The signals involved in the proliferation or differentiation of intestinal stem cells were evaluated by RT-PCR, and it was found that Wnt3, BMP4 (that inhibits Wnt), Noggin (that inhibits BMP), and Notch1 (that is involved in maintaining undifferentiated state of intestinal stem cell) were decreased after 24 hours in the CLP group. The number of Lgr5 positive cells was also decreased in the CLP group. Intestinal stem cell damage caused by CLP may cause villous atrophy and intestinal peristaltic dysfunction.

研究分野：救急・集中治療医学、栄養管理

キーワード：腸管上皮幹細胞 腸管機能不全 全身性炎症症候群 敗血症 Lgr5 Wnt

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症、重症外傷をはじめとする全身性炎症反応症候群 ( Systemic inflammatory response syndrome: SIRS ) を来たす重症患者において、腸管は主要な標的臓器の一つである。腸管内の細菌や毒素、腸間膜リンパ成分、腸管粘膜免疫バランスの崩壊などが、全身性炎症反応の進行や感染症の合併を引き起こす可能性が指摘されている ( MacFie J, O'Boyle C, Mitchell CJ, et al. Gut 1999;45:223-228 )。また、敗血症、重症外傷をはじめとする重症病態において、下痢、便秘、腸管内容物の逆流等、容易に腸管機能不全を呈し、この併発が予後を左右する重要な因子であることが近年注目されてきており、その制御が緊喫の課題となっている。sepsisをはじめとする重症病態モデルで、腸絨毛の委縮・腸管上皮細胞の脱落が生じることが示されている ( Dominguez JA, Samocha AJ, Liang Z, et al. Crit care med 2013;41:e275-285 ) が、全身侵襲時における腸管機能不全発症のメカニズムは未だ十分に解明されていない。

腸管上皮の恒常性は、未分化細胞の「増殖」と4種の細胞(吸収上皮・内分泌・パネート・杯細胞)への「分化」が、生涯にわたり厳密に調節されることで維持されており、この増殖・分化が陰窩-絨毛内という構造的に明瞭な一つの単位で調節されることを特徴とする。陰窩底部の幹細胞を由来とする細胞は、増殖・分化の運命決定を重ねつつ移動し、終末分化を経た後、絨毛部先端より管腔へと排出される。陰窩-絨毛単位におけるこの増殖・分化調節には、Wnt、bone morphogenetic protein ( BMP )、Notchなどの複数のシグナル経路があることが明らかとなってきた ( 水谷知裕, 中村哲也, 渡辺守. 分子消化器病 2011;8:7-13 )。

そこで我々は、ショック、感染等の全身侵襲下、腸管虚血、酸化ストレス、様々なサイトカイン等による負荷で、急性期に腸管上皮が損傷を受けると共に、腸管上皮幹細胞機能障害が生じ、長期に渡り上皮細胞再生が抑制されて粘膜障害が持続しているのではないかと仮説を立てた。

ここ最近まで、腸管上皮幹細胞の分子マーカーが不明であったことから、厳密な意味での幹細胞の性状は明らかにはされていなかった。2007年になり Hans Clevers ラボで陰窩にある leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5 ( Lgr5 ) 陽性細胞が腸管上皮幹細胞であることが同定され、また、Lgr5 遺伝子座に green fluorescent protein ( GFP ) と Cre estrogen receptor ( CreER ) をノックインし、タモキシフェン投与により Lgr5 発現細胞において Cre が核内に移行するマウスを作製し、この Lgr5-GFP-ires-CreER マウスと Cre レポーターマウスを交配することにより、Lgr5 発現細胞の子孫細胞をすべて可視化することに

成功した ( Barker N, van Es JH, Kuipers J, et al. Nature 2007;449:1003-1007 ) ことで、腸管上皮幹細胞の研究が進むようになった。

### 2. 研究の目的

BrdU ( Bromodeoxyuridine : 臭素化デオキシウリジン ) を用いて健常時と敗血症時の陰窩・絨毛の細胞分裂状態を評価したうえで、C57BL/6J マウスの腸管上皮幹細胞に特異的に Enhanced Green Fluorescent Protein ( EGFP ) が発現する Lgr5-CreER マウスを用いて、敗血症モデルマウスを作製し、全身侵襲時の腸管上皮幹細胞の動態を経時的に解析し、かつ同時に、腸管上皮幹細胞の増殖・分化の制御に関わる機能分子 ( Wnt, BMP など ) を定量し、侵襲に伴うその動向を探ることで、全身侵襲における腸管上皮幹細胞機能障害のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

実験は3段階に分けて行った。

#### BrdU を用いた侵襲時の腸管上皮の turn over についての実験

腸管上皮の turn over が敗血症による重度侵襲時にどうなっているかを把握するために、C57BL/6J マウスを用い、盲腸結紮穿孔 ( cecal ligation puncture: CLP ) による敗血症モデルと Sham operation 群に対し、BrdU を投与し、その変化を見た。CLP 群 ; 定型的にモデル作製した ( 腹部正中切開にて、盲腸を遊離させ回盲部の盲腸側を盲端から 1cm のところで 3-0 絹糸で結紮する。結紮部の末梢側を注射針で穿孔させた後腹腔内に戻し閉腹する。生食を 1ml 皮下注する )、1 週間生存率約 30% モデル ( 18G 針 ) ならびに 70% モデル ( 23G 針 ) の二種類を作成する。Sham 群 ; 開閉腹し、生食を 1ml 皮下注する。対象臓器 : 十二指腸 ( 下降脚中央 )、回腸 ( 回盲部から口側に 2-4cm )、大腸 ( 横行結腸中央 ) 介入 ( CLP または sham ) と同時ならびに介入 21 時間後に 5-bromo-2'-deoxyuridine ( BrdU ) 100mg/kg を腹腔内投与し、BrdU 投与 3 時間後にパラホルムアルデヒドで還流固定し、凍結切片をクリオスタットにて作成した。抗 BrdU 抗体を用いて、敗血症により腸管上皮における細胞の分裂、増加がどのような影響を受けるかを免疫蛍光染色により定量化 ( 陰窩 3 つあたりの BrdU 陽性細胞数、n=4 ) し評価した。

#### 侵襲時の腸管上皮幹細胞の増殖・分化の制御に関わる機能分子に関する実験

C57BL6J mouse ( male, 10 ~ 12W ) を用い、CLP モデル並びに Sham Operation 群に関して、腸管上皮幹細胞の増殖・分化の制御に関わる機能分子として Wnt3、Wnt3a、R-spondin1、EGF ( Epidermal growth factor )、BMP4 ( bone morphogenetic protein 4 )、BMP2、Noggin、

Notch1、DII1(delta-like1)、DII4(delta-like4)ならびに各腸管上皮構成細胞のマーカーとして、Lgr5(腸管上皮幹細胞)、Alpi(enterocyte)、lysozyme(パネート細胞)、Muc2(杯細胞)、chromograninA(腸管内分泌細胞)さらには炎症のマーカーであるIL-6をReal-time PCRによる核酸発現の解析をすることで、全身侵襲に対する腸管上皮幹細胞を含む腸管上皮細胞の応答性を明らかにすることを試みた。

上記同様、CLPモデル(1週間生存率約30%モデル(18G針)ならびに70%モデル(23G針)の二種類)を作成し、Sham Operation群と共に介入3時間後、24時間後に犠死せしめ、小腸を摘出し、十二指腸ならびに回腸を30~50mgずつ採取した。その後Isogenを用いてホモジナイズしRNAを抽出し、さらにTURBO DNA-free kit(Life Technologies)を用いてRNAを精製した。さらにこれをHigh Capacity RNA-to-cDNA kit(Life Technologies)を用いてcDNA化した。cDNA 20ngを用いて、StepOnePlusリアルタイムPCRシステム(Applied Biosystem)のSYBR Green Fastモードでreal-time PCRを施行、Sham群の一個体の-actinの発現量を基準値として、遺伝子発現量を相対的に定量化した。

### Lgr5-EGFP-IRES-creERT2マウスを用いた腸管上皮幹細胞機能の評価

腸管上皮幹細胞に特異的にEGFPが発現するLgr5-EGFP-IRES-creERT2マウスを用いて、上記敗血症モデルを作成し、Sham Operation群と共に介入3時間後、24時間後に還流固定し、十二指腸、回腸、大腸の切片を作成した。1週間生存率約30%モデル(18G針)ならびに70%モデル(23G針)の二種類を作成する。これらを蛍光顕微鏡で観察・比較することで、侵襲下における腸管上皮幹細胞の増殖・分化・細胞死を形態学的に評価する。視認できる陰窩数に対する、Lgr5陽性細胞が残っている陰窩数の比を検討した。

### 統計学的解析

数値データは±SDで記載。全ての統計学的解析はWindows版SPSS version 23.0を用い、p<0.05を統計学的有意とした。細胞数の検討ならびにRT-PCRの結果は一元配置分散分析、post hoc testでTukeyのHSD検定を用い、比較検討した。

## 4. 研究成果

### BrdUを用いた侵襲時の腸管上皮のturn over についての実験

犠死の3H前にBrdU100mg/kgを腹腔内投与し、Sham手術後3時間、24時間で犠死せしめたマウス(Sham3H、Sham24H)と、23G針でCLPを作り3時間後、24時間後に犠死せしめたマウス(23CLP3H、23CLP24H)、同様に18G針でCLPを作ったマウス(18CLP3H、18CLP24H)のそれぞれを4匹ずつ用いた。空腸の切片の免

疫蛍光染色像を図1に示す。

BrdU陽性細胞数の結果を図2に示した。回腸におけるSham24Hと23CLP24Hの間にBrdU陽性細胞数の有意差が認められ、全体的に、侵襲を加えると陰窩中のBrdU陽性細胞数、ひいては細胞分裂している細胞が減少している傾向が見られた。

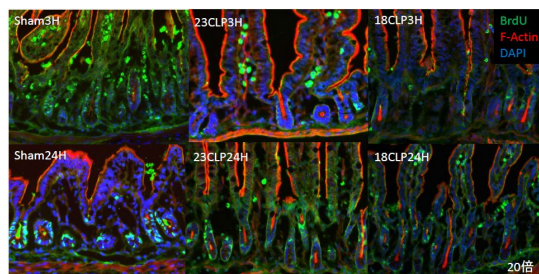


図1 BrdU回腸免疫染色像

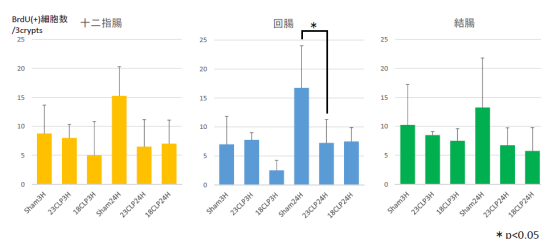


図2 3CryptsあたりのBrdU陽性細胞数

我々の実験では、侵襲により陰窩の細胞分裂している細胞数が減少している傾向があった。重度侵襲下で絨毛高が低下するといった報告はこれまでも複数あり(Dominguez JA, Critical care medicine 2013、Jiang LY, World journal of emergency medicine 2010、細田 信, 外科と代謝・栄養 1988)これを細胞分裂の観点から観察しており、今回有意差が生じなかった原因としては実験個体不足や評価タイミングが早すぎた可能性があると思われる。今後追加実験にて個体数を増やすことや、長期にわたって評価することが必要であると考えている。

### 侵襲時の腸管上皮幹細胞の増殖・分化の制御に関わる機能分子に関する実験

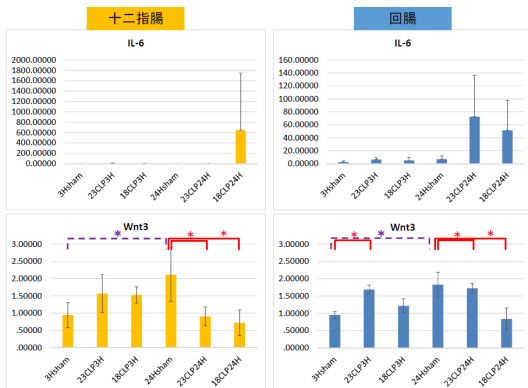
Sham手術後3時間、24時間で犠死せしめたマウス(Sham3H、Sham24H)と、23G針でCLPを作り3時間後、24時間後に犠死せしめたマウス(23CLP3H、23CLP24H)、同様に18G針でCLPを作ったマウス(18CLP3H、18CLP24H)のそれぞれを4匹ずつ用いた。それぞれ犠死と同時に小腸を摘出し、十二指腸ならびに回腸を採取した。CLP群およびSham Operation群における、腸管上皮幹細胞の増殖・分化の制御に関わる機能分子、各腸管上皮構成細胞のマーカー、IL-6をReal-time PCRで測定した結果を図3に示した。黄色は十二指腸の結果を、青は回腸の結果を示す。また、同時間で侵襲の度合いに応じて結果に有意差があるものを赤実線で示し、同侵襲で時間経過によって結果に有意差があるものを紫破線で示す。

した。

炎症の指標である IL-6 は CLP 群で有意に高いことが予想されたが、18CLP で異常高値となっていたこともあり、有意差は認めなかった。

腸管上皮幹細胞の増殖・分化の制御に関わる機能分子では、陰窩底部における未分化細胞の増殖のシグナルである Wnt3 は CLP 群の 3 時間後で増加、24 時間後で有意に低下しており、Wnt 活性化に働く R-spondin1 も 24 時間後の CLP 群で低下していた。同じく Wnt 活性化に働く EGF は CLP 群の回腸でむしろ増加していた。対して Wnt に抑制的に働く BMP は BMP2 には差を認めなかったものの、BMP4 では 3 時間後は CLP 群で増加するものの、24 時間後では有意に減少していた。BMP の阻害タンパクである Noggin も 3 時間後は CLP 群でおおむね高くなるものの、24 時間後では高侵襲の CLP 群で低下していた。Stem cell の未分化性の維持に関与する Notch1 は 3 時間後の CLP 群において増加し、24 時間後では減少していた。Notch シグナルの活性化に関与する Dll1 は CLP 群で増加、Dll4 は差を認めなかった。これらの結果から腸管上皮細胞の増殖・分化を調整するシグナルは CLP 侵襲下で急性期に増加し、その後減少するものが多いことが分かった。例外的に EGF は 3 時間後も 24 時間後も CLP 侵襲下で増加していた。またこれらの変化は十二指腸よりも回腸でより顕著に見られた。結果のサマリーを図 4 に示した。

各腸管上皮構成細胞のマーカーとしては、腸管上皮幹細胞マーカーの Lgr5 は十二指腸では有意な変化見られなかったが、回腸では CLP3 時間後で増加するものの 24 時間後には低下していた。パネート細胞の lysozyme は十二指腸では CLP 群の 24 時間後に有意に低下していたのに対し、回腸では高侵襲の CLP 群で 24 時間後には有意に低下していたものの、低侵襲 CLP 群ではむしろ増加傾向にあった。Alpi (刷子縁) は十二指腸で 3Hsham に比して 23CLP3H で有意に減少、Muc2 (杯細胞) は十二指腸で 3Hsham に比して 18CLP3H で有意に増加、24Hsham に比して 23CLP3H で有意に減少していたが、特異的な傾向を見いだせなかった。chromograninA (腸管内分泌細胞) は回腸において 18CLP3H、23CLP24H でそれぞれ増加していた。



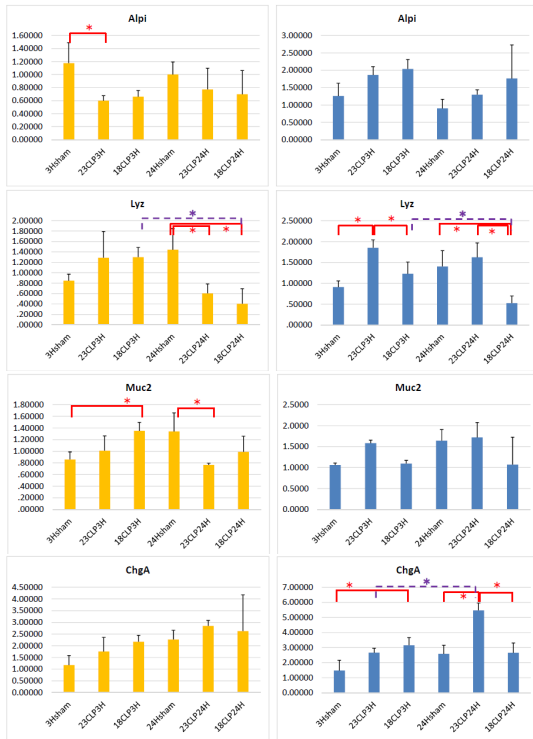


図3 RT-PCR 結果

\* p<0.05

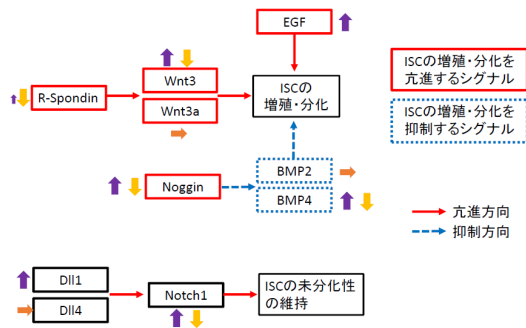


図4 RT-PCR 結果のサマリー

### Lgr5-EGFP-IRES-creERT2 マウスを用いた腸管上皮幹細胞機能の評価

Lgr5-EGFP-IRES-creERT2 マウスを用いて、実験と同様に Sham3H、Sham24H、23CLP3H、23CLP24H、18CLP3H、18CLP24H を4体ずつ作製し、十二指腸、回腸、結腸を切片とした。それぞれの回腸の切片の蛍光顕微鏡像を図5に示す。

切片中の陰窩の Lgr5 陽性細胞保有率を図6に示した。十二指腸、回腸、結腸ともに Sham3H と比べて 23CLP3H、18CLP3H で低下、Sham24H と比べて 23CLP24H、18CLP24H で低下しており、侵襲が加わると明らかに Lgr5 細胞数が減少していた。18G が 23G かの侵襲度の違いや、同じ侵襲で 3H が 24H かの時間経過よっての差は認めなかった。

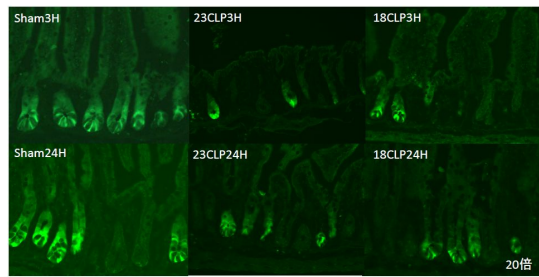


図5 Lgr5 回腸蛍光顕微鏡像

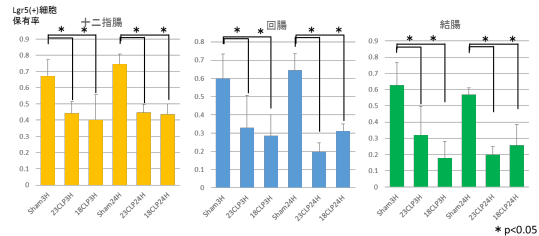


図6 Crypt の Lgr-5 陽性細胞保有率

腸管上皮細胞の増殖・分化を調整するシグナルの多くは CLP 侵襲下で3時間後で増加、24時間後で有意に低下していた。また、Lgr5-EGFP-IRES-creERT2 マウスを用いた実験では CLP 侵襲が加わると明らかに陰窩の Lgr5 細胞数が減少しており、腸管上皮幹細胞に何らかの障害を生じていることが示唆された。さらに Wnt や EGF などの腸管上皮細胞の増殖・分化を亢進する方向に働くシグナルは主にパネート細胞から出ており (Sato T, Science 2013)、各腸管上皮構成細胞のマーカーとして、腸管上皮幹細胞マーカーの Lgr5、パネート細胞の Lysozyme が24時間後の特に高侵襲の CLP 群で有意に低下していたことから考えるに、CLP 侵襲で障害されるのは腸管上皮幹細胞そのものではなく、パネート細胞であるかもしれないと考えている。そこで今後は同様の CLP 群と Sham 群に対し、パネート細胞を同定するための Lysozyme 免疫染色とアポトーシスの検出のための TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 染色を同時に行い、また、Lgr5-EGFP-IRES-creERT2 マウスに TUNEL 染色を行うことで腸管上皮幹細胞のアポトーシスがないかどうか、かつ、その隣の細胞であるパネート細胞の状態を同時に把握する、という実験を予定している。さらには CLP でパネート細胞機能不全が起きるならば、敗血症で誘導されるこういった因子が関与しているのかを明らかにしていく必要がある。パネート細胞は感染防御にも幹細胞賦活化にも重要な機能を担っており、重症病態下でパネート細胞を守ることが腸管治療における基本になる可能性もあると考えている。

今回の実験では全身侵襲により腸管上皮細胞の増殖・分化に関与するシグナルに異常をきたし、さらに陰窩の細胞分裂能の減少と腸管上皮幹細胞障害が起こっていることが示

された。このことが腸管上皮障害を引き起こし絨毛萎縮や腸管蠕動不全が生じ、栄養障害や腸管免疫能の低下などにつながっている可能性が考えられた。このメカニズムの解明と共に、腸内細菌叢の関与も含め、今後もさらなる研究を続ける予定である。

#### 5．主な発表論文等

なし

第 45 回日本救急医学会総会・学術集会( 形成 29 年 10 月 24 日～26 日 ) にて発表予定

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

山田 知輝 ( YAMADA, Tomoki )

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：40623434