

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K00903

研究課題名（和文）何が小腸上皮の時期的分化をスイッチするのか？～オルガノイドを用いた解析～

研究課題名（英文）What switches the temporal differentiation of the small intestinal epithelium?

研究代表者

馬場 良子（Baba, Ryoko）

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：90271436

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：新生児期マウス回腸において、頂部エンドサイトーシスに関する膜系と巨大ライソソームをもつ吸収上皮細胞が観察された。それらの構造は絨毛基部から先端に向かうにつれ、また、日数経過と共に発達したが、離乳後は消失した。陰窩は生後2週に発生し、その後、深さを増した。陰窩の形成に一致し、パネート細胞が認められ、その核はH3K27me3強陽性を示した。新生児期回腸由来オルガノイドにおいて、乳飲期に相当する時期の吸収上皮細胞頂部にエンドサイトーシスに関する膜系と巨大ライソソーム様構造が認められ、H3K27me3陽性細胞の存在が確認された。以上より、離乳前後の上皮変化にエピジェネティックな制御の関与が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

典型的なパネート細胞が回腸の陰窩底部に出現する生後2週より前に、パネート細胞と杯細胞の中間型のような形態的特徴を示す複数段階の細胞（中間型細胞）が観察された。また、成熟期の陰窩において、深部ほど典型的なパネート細胞が観察され、より浅い部分に複数段階の中間型細胞が観察された。時間軸および絨毛-陰窩軸におけるパネート細胞及び中間型細胞の関連が明らかになった。近年、炎症性腸疾患等で、パネート細胞と杯細胞の中間型のような形態を示す細胞が出現することが多数報告されており、本研究成果を基に、今後、それらの疾患時に生じる細胞との関連について解明することで、それらの疾患の機序解明につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In the neonatal mouse ileum, the absorptive cells that had an apical endocytic membrane system with a giant lysosome covered the surface of the villi. The system developed as the cells rise toward the tip of villus, and as mice grow. However, it disappeared in the absorptive cells after weaning. On the other hand, the shallow crypts formed around 2-weeks-old. Simultaneously, Paneth cells with many electron dense granules in the apical cytoplasm appeared in the base of the crypts. Its nucleus showed H3K27me positive. In the organoid derived from neonatal mouse ileal crypt, the absorptive cells exhibited the similar structure to those of the mouse villi epithelium. H3K27me3 positive cells present in the organoid. Our results suggested that epigenetic control participates in the shift the epithelial cell type from neonatal-suckling to weaning.

研究分野：形態学

キーワード：小腸 回腸 吸収上皮細胞 エンドサイトーシス オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

小腸は栄養の吸収において重要な器官である。その粘膜の構造は管腔に突出する絨毛と、粘膜固有層に陥入する陰窩に大別される。絨毛を覆う上皮には栄養の消化・吸収を担う吸収上皮細胞をはじめとする分化した細胞が並び、陰窩には幹細胞や未分化細胞が並ぶ。成熟期の小腸において、吸収上皮細胞が取り込む栄養の種類は部位によって異なるものの、その構造はほぼ同様である。しかし、私たちはこれまでに、齧歯類を用いて、発達の時期によって吸収上皮細胞が異なる形態と機能を示すことを報告してきた。特に、乳飲期小腸遠位部(図1右)の吸収上皮細胞は核(N)上部に巨大ライソゾーム(GL)

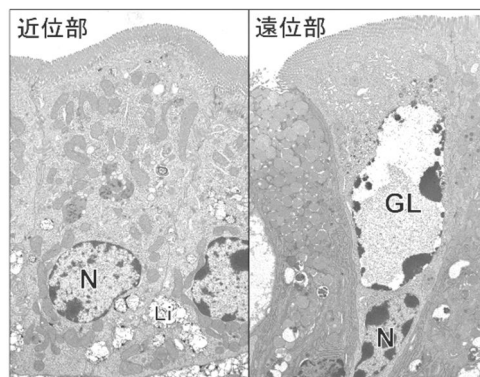


図1 乳飲期吸収上皮細胞の電顕像

を有し、同時期の小腸近位部(図1左)や成熟期小腸遠位部との形態的差異が顕著である。しかし、GLや発達したエンドゾームの膜系を持った吸収上皮細胞は離乳(生後3週)前に上皮から完全に消失する。小腸上皮幹細胞から種々の上皮細胞への分化機構については盛んに研究が行われているものの、同じ“吸収上皮細胞”でありながら、時期や部位で異なる形態を示すことはあまり知られておらず、その違いをもたらす機構については分かっていない。

近年、SatoとClevers(Nature, 2009)によって3次元培養(細胞組織体培養)法が開発された。単離した陰窩を*in vitro*で培養することで、永続的に細胞組織体(オルガノイド)として増殖させることができる。オルガノイド(図2)は上皮細胞のみで構成され、その内部に存在する管腔に面した絨毛様構造と外方に突出した陰窩様構造(矢頭)を形成する。また、上皮内には生体に見られる全ての細胞種が含まれる。この方法を用いて、私たちも成熟期マウスの小腸陰窩からオルガノイドを作製することに成功している。その結果、小腸近位部と遠位部由来の陰窩ではそれぞれ産生される上皮細胞種の割合が異なり、幹細胞自身が位置情報を有する可能性が示唆された。

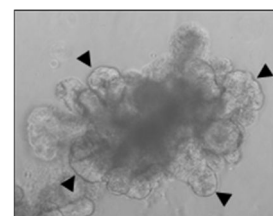


図2 オルガノイド

陰窩底部には全ての小腸上皮細胞を産み出す幹細胞が位置し、パネート細胞がそれを取り囲むように存在する。パネート細胞も幹細胞に由来する分化した上皮細胞で、リゾチーム、ディフェンシンやホスホリパーゼA2を分泌して自然免疫に関わることが知られている。その他に、最近のオルガノイドを用いた研究により、パネート細胞が幹細胞維持に必要な増殖因子(EGF, TGF α , Dll4, Wnt3)を発現し、小腸上皮幹細胞維持のための微小環境(ニッチ)を形成するという新たな機能が報告されている(Sato et al, Nature, 2011)。

“絨毛”形成は胎齢15日に始まり、出生後間もなく、絨毛に存在する吸収上皮細胞は母乳中の栄養吸収を開始する。その一方で、細胞を産生する場である“陰窩”は生後2週になってようやく形成され、この時期と一致して陰窩に存在するパネート細胞の成熟が起こることが知られている。また、パネート細胞の成熟から1週間以内に、

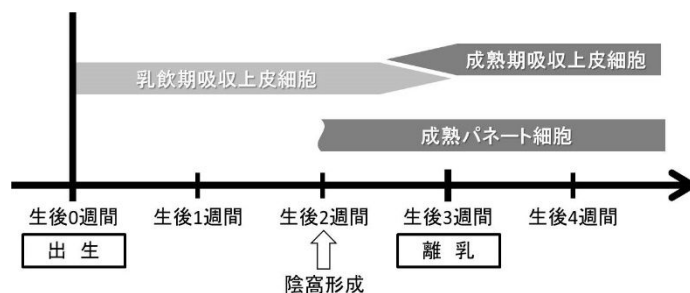


図3 時間軸と小腸上皮

絨毛を覆う吸収上皮細胞が乳飲期型から成熟期型へと完全に置き換わる(図3)。幹細胞の3次元培養で形成される構造がスフェロイド(組織への分化能を保持した細胞のコロニー)になるか、オルガノイドになるかは陰窩形成の前後で異なり、エピジェネティックな制御により幹細胞の運命が決定されることが示唆されている(Fordham et al, Cell, 2013)。私たちの着目する吸収上皮細胞も、離乳の前後で乳飲期型をとるか、成熟期型をとるか切り替わることから、このスイッチにエピジェネティックな機構が関与する可能性を考えた。

2. 研究の目的

- (1) マウス小腸遠位部(回腸)を用いて、時間軸に基づき、吸収上皮細胞の乳飲期型から成熟期型への置換、パネート細胞の成熟について、形態学的観察により明らかにする。
- (2) (1)の結果と合わせて、時間軸に基づき、回腸上皮細胞におけるヒストンのメチル化について、免疫組織化学的に明らかにする。
- (3) (1)(2)の結果から特徴的な形態を示す時期(臨界期)の回腸における遺伝子発現

(2) 免疫組織化学的解析

ヒストンのトリメチル化抗体として、H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3, H3K36me3, H3K79me3, H4K20me3抗体を用いて解析を行った。その結果、H3K4me3, H3K9me3, H3K36me3, H3K79me3, H4K20me3の発現については顕著な差は認められなかった。しかし、H3K27me3について、生後14日齢以降、陰窩底部に強陽性を示す核を持つ細胞が出現した。H3K27me3強陽性細胞はパネート細胞マーカー（Lysozyme抗体）陽性であった。

(3) 遺伝子発現解析

(1)(2)の結果を基に、回腸の組織切片からレーザーマイクロディセクションにより陰窩またはパネート細胞を切り出し、RNA抽出を試みた。切片の厚み、切片の種類等を工夫し、かなりの数の陰窩またはパネート細胞を切り出したにも拘らず、ほとんどRNAを得ることができなかった。そこで、(4)にて使用予定の磁気ビーズを利用した細胞分離システムを用い、magnetic beadsで標識された各細胞特異的な抗体を用いて上皮細胞を標識し、単離を試みた。幹細胞およびパネート細胞を分取し、目的の細胞が得られたか確認する目的で培養を試みたが、うまく育たなかった。この方法については、改良を加えて再検討する必要がある。

(4) オルガノイド培養実験

単離した陰窩の培養

陰窩形成前後の回腸より、幹細胞とパネート細胞を(1)(2)の結果を基に、種々の時期の回腸から陰窩を単離し、オルガノイド(またはスフェロイド)を作製し、継時的にサンプルを採取してTEMで観察した。その結果、陰窩を単離した時期が生後0日齢に近いほど、オルガノイドではなく、球状のスフェロイドを形成する割合が高く、陰窩形成時期である生後14日齢に近いほど、オルガノイドを形成する割合が高かった。また、TEMにてオルガノイド構成細胞を詳細に観察した結果、陰窩を単離した時期および培養期間が乳飲期(生後21日齢以前)に相当するオルガノイドにおいて、吸収上皮細胞頂部にエンドサイトーシスに關与する膜系構造が観察された。さらに、オルガノイド(またはスフェロイド)について、ヒストンのメチル化抗体を用いて免疫組織化学を行ったところ、強陽性を示す核を持った細胞の存在が確認された。

幹細胞+パネート細胞の培養:

(3)でも実施した、磁気ビーズを利用した細胞分離システムを用い、magnetic beadsで標識された各細胞特異的な抗体を用いて、幹細胞とパネート細胞を標識し、単離を試みた。分取された細胞を用いて培養を試みたが、うまく育たなかった。目的の細胞が単離できていない可能性があり、標識抗体を含め、この方法については改良を加えて再検討する必要がある。

(5) その他

(1)のTEM観察を詳細に進める中で、典型的なパネート細胞(図4D 細胞頂部に、周囲にhaloを有する電子密度の高い果粒を大量に持ったもの)が陰窩形成と共に出現する以前には、パネート細胞(図4D)と杯細胞(図4A)の中間型のような形態的特徴を示す細胞(中間型細胞)が複数段階(図4B, C)観察されることが分かった。また、成熟期の陰窩において、陰窩の深部ほど典型的なパネート細胞が観察され、より浅い部分には複数段階の中間型細胞が観察されることが分かった。このように、時間軸および絨毛-陰窩軸におけるパネート細胞及び中間型細胞の關連が明らかになった。

近年、炎症性腸疾患等において、パネート細胞と杯細胞の中間型のような形態を示す細胞が出現することが多数報告されている。そのため、今回の成果を基に、今後、それらの疾患時に生じる細胞との關連について解明することで、それらの疾患の機序解明につながる可能性がある。

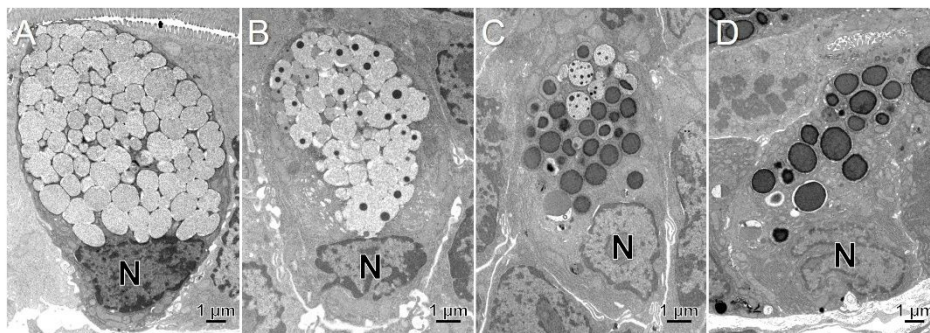


図4 A 杯細胞 B・C 中間型細胞 D パネート細胞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Honma Y, Sato-Morita M, Katsuki Y, Mihara H, Baba R, Hino K, Kawashima A, Ariyasu T, Harada M.	4. 巻 54(1)
2. 論文標題 Trehalose alleviates oxidative stress-mediated liver injury and Mallor-Denk body formation via activating autophagy in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Med Mol Morphol.	6. 最初と最後の頁 41-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-020-00258-2. Epub 2020 Jun 25.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Odaka M, Matsuo K, Ogino K, Kanazawa T, Baba R, Sakata Y, Asada K, Kasa S, Takai K, Maeda K.	4. 巻 54(1)
2. 論文標題 Efficacy of a novel mixture of substances derived from food and food additives for controlling <i>Dermanyssus gallinae</i> (Mesostigmata: Dermanyssidae).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 31-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Do BH, Nguyen TN, Baba R, Ohbuchi T, Ohkubo JI, Kitamura T, Wakasugi T, Morimoto H, Suzuki H.	4. 巻 9(11)
2. 論文標題 Calmodulin and protein kinases A/G mediate ciliary beat response in the human nasal epithelium.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int Forum Allergy Rhinol.	6. 最初と最後の頁 1352-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/alr.22442.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Morita K, Wang D, Baba R, Morimoto H, Song Y, Kanazawa T, Yoshida Y.	4. 巻 49(7)
2. 論文標題 Particulate Matter, Asian Sand Dust Delays Cyclophosphamide-induced Type 1 Diabetes in NOD Mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunol Invest.	6. 最初と最後の頁 698-710
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/08820139.2019.1699569.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Honma Y, Sato-Morita M, Katsuki Y, Mihara H, Baba R, Harada M.	4. 巻 48(1)
2. 論文標題 Trehalose activates autophagy and decreases proteasome inhibitor-induced endoplasmic reticulum stress and oxidative stress-mediated cytotoxicity in hepatocytes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hepatol Res.	6. 最初と最後の頁 94-105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.12892	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanemaru T, Kondo T, Nishi K, Yazumi T, Nakamura K, Morimoto H, Isobe S.	4. 巻 67(suppl 2)
2. 論文標題 Pre-embedding correlative light and electron microscopy using FluoroNanogold combined gold nanoparticle and new fluorescent dye, Fluolid NSL Orange.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 i30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfy085	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Teramachi J, Inagaki Y, Shinohara H, Okamura H, Yang D, Ochiai K, Baba R, Morimoto H, Nagata T, Haneji T.	4. 巻 23(2)
2. 論文標題 PKR regulates LPS-induced osteoclast formation and bone destruction in vitro and in vivo.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oral Dis.	6. 最初と最後の頁 181-188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.12592.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okamura H, Yoshida K, Morimoto H, Teramachi J, Ochiai K, Haneji T, Yamamoto A.	4. 巻 6(3)
2. 論文標題 Role of protein phosphatase 2A in osteoblast differentiation and function.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Clin Med	6. 最初と最後の頁 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm6030023.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 馬場良子, 國分啓司, 森本景之, 藤田 守	4. 巻 52(1)
2. 論文標題 回腸吸収上皮細胞の形態および機能の変化	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁 35-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 藤田 守, 馬場良子, 國分啓司, 森本景之, 太田啓介, 中村桂一郎, 小路武彦
2. 発表標題 胎児期の低栄養環境エピゲノム変化に伴う出生後の消化吸収機構解析
3. 学会等名 第125回 日本解剖学会 総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 國分啓司, 馬場良子, 中村桂一郎, 藤田 守, 森本景之
2. 発表標題 新生仔ラット回腸吸収上皮細胞の三次元超微形態解析
3. 学会等名 第125回 日本解剖学会 総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川恵美, 森本景之, 馬場良子, 國分啓司, 宮本 哲
2. 発表標題 腹膜透析における腹膜線維化においてマクロファージが果たす役割
3. 学会等名 第65回 日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原 一平、福留惟行、岡本 健、並川 努、馬場良子、藤田 守、森本景之、小林道也
2. 発表標題 消化管粘膜障害新規予想バイオマーカーを用いた抗がん剤による消化管毒性予防法の確立
3. 学会等名 第52回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 國分啓司、馬場良子、中村健太、太田啓介、中村桂一郎、藤田 守、森本景之
2. 発表標題 三次元的に観た乳飲期回腸吸収上皮細胞のエンドサイトーシスに関する膜系
3. 学会等名 第62回 日本顕微鏡学会 九州支部集会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroyuki Morimoto, Ryoko Baba, Keiji Kokubu
2. 発表標題 Bimolecular fluorescence complementation analysis of post-transcriptional modification.
3. 学会等名 第13回 日中合同組織細胞化学セミナー（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田 守、馬場良子、都合亜記暢、國分啓司、森本景之、中村桂一郎、小路武彦
2. 発表標題 胎内低栄養環境エピゲノム変化に関連する消化吸収機構の解明と生活習慣病
3. 学会等名 第51回 日本臨床分子形態学会 総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田 守、斎藤香陽子、都合亜記暢、東 龍平、中村桂一郎、國分啓司、馬場良子、森本景之、小路武彦
2. 発表標題 乳飲期回腸吸収上皮細胞におけるエンドサイトーシスに關与する膜系の空間超微形態解析
3. 学会等名 第61回 日本顕微鏡学会 九州支部集会・學術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本景之、馬場良子、國分啓司
2. 発表標題 胃ガン由来培養細胞における二本鎖RNA依存プロテインキナーゼ (PKR) の細胞内局在
3. 学会等名 第61回 日本顕微鏡学会 九州支部集会・學術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場良子、國分啓司、藤田守、森本景之
2. 発表標題 発達過程のマウス小腸におけるパネート細胞の形態変化
3. 学会等名 第61回 日本顕微鏡学会 九州支部集会・學術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金丸孝昭、近藤照義、西 健太郎、矢住 京、中村桂一郎、森本景之、磯部信一郎
2. 発表標題 新規蛍光色素Fluolid NSL Orange標識Nanogold®を用いた包埋前免疫染色による光電子相關顕微鏡法
3. 学会等名 第61回 日本顕微鏡学会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森本景之、馬場良子、國分啓司
2. 発表標題 破骨細胞形成におけるタンパク質相互作用の可視化解析
3. 学会等名 第59回 日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馬場良子、國分啓司、藤田 守、森本景之
2. 発表標題 マウス小腸陰窩形成におけるメチル化の影響
3. 学会等名 第123回 日本解剖学会 総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤照義、金丸孝昭、西 健太郎、矢住 京、松岡洋平、中村桂一郎、森本景之、磯部信一郎
2. 発表標題 腎虚血再灌流障害におけるCX3CL1の発現 FluoIdを用いたCLEM観察
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第74回 学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馬場良子、國分啓司、藤田 守、森本景之
2. 発表標題 生後におけるマウス小腸上皮とメチル化の関連
3. 学会等名 第37回 分子病理研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馬場良子、國分啓司、藤田 守、森本景之
2. 発表標題 発達過程のマウス小腸上皮におけるライソザイムの局在
3. 学会等名 第60回 日本顕微鏡学会 九州支部学術集会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馬場良子、國分啓司、藤田 守、森本景之
2. 発表標題 マウス小腸陰窩形成におけるメチル化の影響
3. 学会等名 第123回 日本解剖学会 総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金丸孝昭、小坂光二、近藤照義、中村桂一郎、森本景之、磯部信一郎
2. 発表標題 相関顕微鏡法と蛍光物質「Fluolid」
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第73回 学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金丸孝昭、近藤照義、中村桂一郎、森本景之、小坂光二、磯部信一郎
2. 発表標題 TEMによる相関顕微鏡法
3. 学会等名 第30回 九州電子顕微鏡技術研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 近藤照義、金丸孝昭、西 健太郎、矢住 京、松岡洋平、磯部信一郎、中村桂一郎、森本景之
2. 発表標題 新規蛍光色素Fluolidを用いた包埋前免疫染色法による光電子相関顕微鏡法 腎虚血再灌流障害時のCX3CL1発現をモデルとして
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第60回 記念シンポジウム（合同開催 日本顕微鏡学会 第59回 九州支部集会・学術講演会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 國分啓司、馬場良子、森本景之	4. 発行年 2019年
2. 出版社 第30回 電顕サマースクール実行委員会	5. 総ページ数 150
3. 書名 灌流固定法(第30回 電顕サマースクール テキスト)	

1. 著者名 馬場良子、國分啓司、横山 満、森本景之、藤田 守	4. 発行年 2018年
2. 出版社 電子顕微鏡 基礎技術チュートリアル	5. 総ページ数 100
3. 書名 医学生物学 電子顕微鏡基礎：医・生物分野でのゼロから聞ける、電子顕微鏡試料作成と観察の基礎の基礎！	

〔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
研究分担者	森本 景之 (Morimoto Hiroyuki) (30335806)	産業医科大学・医学部・教授 (37116)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	國分 啓司 (Kokubu Keiji) (00432740)	産業医科大学・医学部・助教 (37116)	

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