

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06320

研究課題名(和文)両生類変態をモデルとした消化管上皮幹細胞のニッチ形成機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms underlying formation of intestinal stem cell niche during amphibian metamorphosis

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アフリカツメガエル小腸では、甲状腺ホルモン(TH)により幼生上皮の一部(予定幹細胞)が脱分化して幹細胞となり、周囲にニッチが形成される。この機構を解明するため、本研究ではトランスジェニックカエルを使って予定幹細胞を同定し、その分子細胞生物学的特徴(TH受容体の発現、ヒストン修飾等)を明らかにした。また、哺乳類成体の小腸で幹細胞維持に必須なニッチ細胞であることが最近報告されたFoxl1発現繊維芽細胞が、両生類では幹細胞と同時に出現することも見出した。さらに、培養系を使ってHippo経路の主要エフェクターYap1の機能を解析し、Yap1が幹細胞と繊維芽細胞両方の増殖を促進することを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変態期に甲状腺ホルモン(TH)により幹細胞が誘導される両生類消化管は、幹細胞の研究に貴重な実験モデルを提供している。本研究ではアフリカツメガエル小腸を使い、哺乳類成体の小腸で上皮再生に重要な役割を果たすHippo経路が、幹細胞ニッチの形成に関わることを初めて報告した。また、哺乳類小腸の主要なニッチ細胞のマーカーであるFoxl1の発現が、THによりShhを介して幹細胞近くの結合組織細胞で誘導されることも見出した。TH依存性のニッチ形成機構は、ヒトに至る陸上脊椎動物共通に保存されていると考えられ、本研究の成果は幹細胞制御に関する理解を深め、再生医療の発展に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：In the *Xenopus laevis* intestine, thyroid hormone (TH) induces some of the larval epithelial cells to dedifferentiate into stem cells, around which the niche is formed. In this study, to clarify molecular mechanisms of formation of the stem cell niche, we identified stem cell precursors by using transgenic tadpoles and analyzed their molecular and cellular biological characteristics, focusing on the expression of TH receptors and histone modifications. We also found that fibroblasts expressing Foxl1, which have been recently shown to be essential as niche cells for stem cell maintenance in the adult mammalian intestine, become detectable concomitantly with the appearance of the stem cells in the *X. laevis* intestine. Furthermore, by using a culture system, we demonstrate that Yap1, a main effector of Hippo signaling, promotes proliferation of both the stem cells and fibroblasts in the *X. laevis* intestine, suggesting its important role in the stem cell formation.

研究分野：消化器系の発生生物学

キーワード：消化管 幹細胞 ニッチ形成 甲状腺ホルモン 変態 シグナル伝達経路 アフリカツメガエル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

陸上脊椎動物の消化管上皮には幹細胞が存在し、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供給している。幹細胞を制御する機構の解明は生命維持に重要であるが、消化管での研究は立ち遅れている。特に、幹細胞マーカーを発現する前の前駆細胞(予定幹細胞)を同定することは難しく、発生過程で成体幹細胞やニッチがどのようにして形成されるのか、脊椎動物全体を通じて殆ど明らかにされていない。

変態期に全身の作りかえが起こる両生類では、甲状腺ホルモン(TH)により幹細胞ニッチが誘導されることから、両生類消化管はニッチ形成の研究にユニークで好個な実験モデルとなっている。申請者はこれまでに、アフリカツメガエル幼生の小腸を実験モデルとして使い、変態前の幼生上皮には膜蛋白質 receptor tyrosine kinase-like orphan receptor (Ror2) Ror2 を発現する細胞が少数散在し、変態期に Ror2 のリガンドである Wnt5a の発現が TH により上昇すると、幹細胞へと脱分化することを明らかにした。また、数多く同定されている TH 応答遺伝子の発現および機能解析を行い、幹細胞の出現には Wnt、Shh 等のシグナル伝達経路が関与することを報告した。さらに、電子顕微鏡観察により、幹細胞の出現と同時にその直下に繊維芽細胞が密集し、基底膜構造の変化を介して幹細胞と頻りに細胞接触をすることも見出した。しかし、このような結合組織の形態的变化が、各シグナル伝達経路とどのように関連してニッチ形成に至るのか、依然として謎である。これを解く鍵として申請者らは、Hippo シグナル伝達経路の主要なエフェクターである転写共役因子 Yap1 の発現が、TH により上昇することを見つけた。哺乳類の小腸では Hippo 経路は結合組織からのシグナルを上皮に伝える経路として最近注目され、Wnt 経路と密接に関連し、Wnt5a が Yap1 の標的遺伝子であることも知られている。そこで本研究では、Yap1 を始めとする Hippo 経路に関わる TH 応答遺伝子に焦点をあて、Ror2 を指標にして予定幹細胞を同定し、他の動物では同定困難な予定幹細胞における TH 応答遺伝子の発現解析を行い、さらに予定幹細胞を幹細胞へと誘導できる独自に開発した培養系を使って TH 応答遺伝子の機能解析を進めることにより、ニッチ形成のシグナルネットワークの全容解明を目指した。

2. 研究の目的

(1) 変態期のアフリカツメガエル小腸における TH 応答遺伝子の発現パターンやエピジェネティックな変化を細胞レベルで解析し、Ror2 を指標に同定される予定幹細胞だけがもつ分子細胞学的特徴を見つける。特に、器官レベルでは役割に違いがあることが示唆されている2つの TH 受容体、TR α と TR β の発現に焦点をあて、TH により幹細胞へと脱分化する予定幹細胞と、細胞死(アポトーシス)へと向かう残りの上皮細胞(幼生固有細胞)とで TR α , β の発現にどのような違いがあるか、また、その違いがエピジェネティックな変化と関連しているか否かを明らかにする。

(2) Yap1 を始めとする Hippo シグナル伝達経路に関わる TH 応答遺伝子について、ツメガエル小腸における発現解析および培養系を使った機能解析を行い、Hippo 経路がニッチ形成に果たす役割を明らかにする。さらに、これまでニッチに関わるものが報告されている複数のシグナル伝達経路(Hippo、Shh、Wnt 等)相互の関連について解析を進め、ニッチ形成に関わる TH 依存性のシグナルネットワークの全体像を明らかにしていく。

3. 研究の方法

(1) Ror2 発現細胞のみを GFP で検出可能にしたトランスジェニックアフリカツメガエル (Ror2 Tg カエル) (作製済み) を使い、変態前から変態完了までの各発生段階の小腸を摘出し、固定後、組織切片を作製した。GFP を検出することにより予定幹細胞を同定し、TR α および TR β の発現、ヒストン修飾の状態 (転写活性化の AcH4、転写抑制の H3K27me3 等) について、予定幹細胞、幹細胞、幼生固有細胞の間でどのような違いがあるかを *in situ* hybridization (ISH) および免疫組織化学的解析により経時的に調べた。

(2) 変態前から変態完了までの各発生段階の野生型ツメガエルから小腸を摘出し、固定後、切片を作製した。Yap1 を始めとする Hippo 経路関連 TH 応答遺伝子の発現を RT-PCR および ISH により経時的に解析した。次に、Ror2 Tg カエルを使って予定幹細胞を同定し、各 TH 応答遺伝子がコードする蛋白質がどのタイプの細胞で検出されるかを免疫組織化学により解析した。Hippo 経路が不活性化すると核に移行することが知られている Yap1 については、細胞の核に蛋白質が局在するか否かについても調べた。

Yap1 の機能を解析するため、変態前の幼生から小腸を摘出し、培養系を使って TH 存在下で幹細胞を誘導する時の Yap1 の機能阻害実験を行った。Yap1 と TEAD1 との結合を阻害する verteporfin (VP) を培養液に加え、26°C で 7 日間培養した。コントロールとして VP を加えない培養液でも小腸を培養し、経時的に小腸の培養片を固定して組織切片を作製した。各小腸での幹細胞の出現、幹細胞および結合組織細胞の増殖・分化について、各種マーカーを使って免疫組織化学により定量的に解析した。VP を添加した場合と添加しなかった場合 (コントロール) とで培養結果を比較することにより、Yap1 が幹細胞や結合組織細胞にどのような影響を及ぼすのかを調べた。

哺乳類成体の小腸において幹細胞維持に必須なニッチ細胞のマーカーとして知られている Foxl1 に着目し、ツメガエル小腸での Foxl1 の発現を RT-PCR、ISH および免疫組織化学により解析した。また、電子顕微鏡観察により、Foxl1 発現細胞の構造的特徴や、幹細胞の出現に伴う微細構造の変化について調べた。さらに、これまでニッチ形成に関わることが明らかになっている Shh、Wnt 等のシグナル伝達経路と Foxl1 発現との関連を追究していくため、Foxl1 発現細胞を同定するための Tg カエルの作製を試みた。

4. 研究成果

(1) Ror2 Tg カエルの小腸を使って予定幹細胞を同定し、TR α は変態前の上皮では予定幹細胞特異的に発現し、幹細胞の出現後は幹細胞特異的に発現することを明らかにした。これに対し、TR β の発現は変態前の小腸ではいずれの細胞でもほとんど検出されなかった。その後、変態期の血中の TH 量の増加に合わせて TR β の発現は一過性に急上昇し、活発に増殖中の幹細胞や結合組織細胞でも、細胞死を開始した幼生固有細胞でも、TR β は強く発現することがわかった。これらの結果は、予定幹細胞の脱分化や幹細胞の維持には TR α が、幼生固有細胞のアポトーシスには TR β が中心的な役割を果たし、脱分化後の幹細胞や結合組織細胞の増殖には TR α と TR β の両方が関わることを示している。

ヒストン修飾について免疫組織化学的に解析した結果、予定幹細胞では同時期の幼生固有細胞に比べてヒストンのアセチル化が進み転写がより活性化されていること、THにより脱分化した後の幹細胞では、さらにアセチル化が促進され多くの遺伝子の転写が活性化されていることを見出した。これに対し、転写抑制のヒストン修飾 (H3K27me3) は、この時期の幹細胞では検出されなかった。これらの結果は、幹細胞系列で発現する TR が、ヒストンのアセ

チル化を介して幹細胞発生に関わる遺伝子群の転写を活性化することを示唆している。

(2) Hippoシグナル伝達経路に関わる遺伝子の発現解析により、ツメガエルの小腸ではHippo経路の主要エフェクターであるYap1の発現がTHの間接的作用を受けて上昇すること、他のTaz, Tead1, Lats等の遺伝子発現もTHにより変動することを示す結果を得た。また、Ror2 Tgカエルを使った免疫組織化学的解析により、Yap1蛋白質は変態前には予定幹細胞の核に、変態期には増殖中の幹細胞とその近くの結合組織細胞の核に局在することも明らかになった。Yap1は核に移行して標的遺伝子の転写を促進することが知られていることから、Yap1が予定幹細胞の脱分化や、その後の幹細胞と近くの結合組織細胞の増殖に関わる遺伝子の発現を促進する可能性が示唆された。

そこで、ツメガエルの小腸培養系を使ってYap1の機能解析を行ったところ、Yap1の阻害剤であるVP存在下ではVP非存在下(コントロール)に比べ、出現する幹細胞もその近くの結合組織細胞も細胞数が減少し、細胞増殖も低下していた。この結果は、Yap1が幹細胞と結合組織細胞両方の増殖を促進することを示している。

哺乳類成体小腸の主要なニッチ細胞のマーカーであるFoxl1の発現解析を行い、ツメガエル小腸では変態期に幹細胞の出現と同時に、その近くに密集する結合組織細胞特異的にFoxl1が発現することを見出した。さらに、THがFoxl1発現細胞を誘導することを培養下で実証し、THの直接的作用により予定幹細胞で発現するShhが、近くの結合組織細胞に作用してFoxl1の発現を誘導することを明らかにした。また、電子顕微鏡観察により、変態期に出現するFoxl1発現細胞は幹細胞直下に密集する繊維芽細胞であり、構造的にも哺乳類小腸のニッチ細胞(telocyteと呼ばれる繊維芽細胞)と類似の細胞で、盛んに増殖する幹細胞に向かって細長い突起を伸ばしていることを見出した。これらの結果は、両生類の変態期に出現するFoxl1発現細胞が、幹細胞ニッチの形成に中心的な役割を果たすことを示唆している。そこで、Hippo経路を始め、これまでニッチ形成に関わることが明らかになっているShh、Wnt等の複数のシグナル伝達経路とFoxl1発現との関連を追究していくため、Foxl1発現細胞のみをGFPで検出可能なFoxl1 Tgカエルを新たに作製した。今後、Foxl1 Tgカエルを使ってシグナル伝達経路相互の関連をさらに追究していけば、ニッチ形成に関わる複雑なシグナルネットワークの詳細を解明していくことが可能である。

変態期にTHにより幹細胞が誘導される両生類小腸は、幹細胞ニッチ形成の研究に貴重な実験モデルを提供している。両生類の変態におけるHippo経路の役割についてはこれまで報告がなく、Hippo経路が幹細胞ニッチ形成に関わることを実証したのは国内外を通じて本研究が初めてである。また、哺乳類成体の小腸において幹細胞維持に必須なニッチ細胞であることが証明されているFoxl1発現細胞が、両生類では変態期に幹細胞と共にTHにより誘導されることも本研究で初めて明らかとなった。進化の過程で脊椎動物が獲得したTH依存の幹細胞ニッチ形成機構は、ヒトに至るまで陸上脊椎動物共通に保存されていると考えられ、これを支持する証拠も増えつつある。本研究の成果は、幹細胞制御の普遍的なメカニズムに関する理解を深めると共に、消化器系の再生医療に有用な情報を与えるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hasebe Takashi, Fujimoto Kenta, Ishizuya-Oka Atsuko	4. 巻 388
2. 論文標題 Essential roles of YAP-TEAD complex in adult stem cell development during thyroid hormone-induced intestinal remodeling of <i>Xenopus laevis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 313 ~ 329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-022-03600-5	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 Hasebe Takashi, Fujimoto Kenta, Ishizuya-Oka Atsuko	4. 巻 10
2. 論文標題 Thyroid hormone-induced expression of Foxl1 in subepithelial fibroblasts correlates with adult stem cell development during <i>Xenopus</i> intestinal remodeling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-77817-1	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 Hasebe Takashi, Fujimoto Kenta, Buchholz Daniel R., Ishizuya-Oka Atsuko	4. 巻 292
2. 論文標題 Stem cell development involves divergent thyroid hormone receptor subtype expression and epigenetic modifications in the <i>Xenopus</i> metamorphosing intestine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 113441 ~ 113441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2020.113441	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 該当する
1. 著者名 Fujimoto Kenta, Hasebe Takashi, Kajita Mitsuko, Ishizuya-Oka Atsuko	4. 巻 228
2. 論文標題 Expression of hyaluronan synthases upregulated by thyroid hormone is involved in intestinal stem cell development during <i>Xenopus laevis</i> metamorphosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development Genes and Evolution	6. 最初と最後の頁 267 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00427-018-0623-x	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hasebe T., Fujimoto K., Buchholz D. R., Ishizuya-Oka A.
2. 発表標題 Signaling pathways essential for thyroid hormone-induced intestinal remodeling of <i>Xenopus laevis</i> .
3. 学会等名 6th Biennial North American Society for Comparative Endocrinology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷部孝、藤本健太、岡敦子
2. 発表標題 甲状腺ホルモンにより繊維芽細胞で発現誘導されるFoxl1のツメガエル小腸幹細胞ニッチへの関与
3. 学会等名 第92回日本動物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本健太、長谷部孝、岡敦子
2. 発表標題 アフリカツメガエル小腸再構築において結合組織特異的に発現する幹細胞ニッチ因子候補Wnt2b
3. 学会等名 第92回日本動物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷部孝、藤本健太、岡敦子
2. 発表標題 アフリカツメガエルの消化管再構築におけるHippo経路の役割
3. 学会等名 第91回日本動物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本健太、長谷部孝、岡敦子
2. 発表標題 アフリカツメガエル小腸の成体幹細胞の発生に関わるWnt遺伝子群の発現解析
3. 学会等名 第91回日本動物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷部孝、藤本健太、岡敦子
2. 発表標題 アフリカツメガエルの消化管再構築におけるHippo関連遺伝子のホメオログ特異的な発現変動
3. 学会等名 第90回日本動物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷部孝、藤本健太、Daniel R. Buchholz、岡敦子
2. 発表標題 アフリカツメガエル変態期の消化管再構築における甲状腺ホルモン受容体サブタイプの発現とエピジェネティックな変化
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本健太、長谷部孝、梶田満子、岡敦子
2. 発表標題 Possible roles of hyaluronan signaling in stem cell niche formation during intestinal remodeling in <i>Xenopus leavis</i>
3. 学会等名 第51回日本発生生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷部孝、藤本健太、岡敦子
2. 発表標題 アフリカツメガエル変態期の消化管再構築におけるHippo関連遺伝子の発現解析
3. 学会等名 第89回日本動物学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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		
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

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
---------	---------