

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06993

研究課題名(和文) タイト結合分子による腸上皮幹細胞の新規運命決定機構

研究課題名(英文) Fate decision of intestinal stem cells by tight junction molecules

研究代表者

田中 瑞子 (Tanaka, Mizuko)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：40583638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、タイト結合分子によって腸管上皮幹細胞の運命が決定される可能性について検証することを目指した。幹細胞ニッチに特異的に局在するクローデインが見出せなかったため、タイト結合を構成するJAMファミリー分子の一つで、先天性短腸症候群の原因遺伝子であるCLMPに着目して研究を進めた。CLMPは、腸管の蠕動を制御することが報告されている。私たちはCLMPを特異的に認識するラットモノクローナル抗体を作製し、免疫染色法によって腸管におけるCLMPの発現細胞や局在を検討した。その結果、CLMPが平滑筋層間の神経叢周辺に発現していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、タイト結合分子の神経叢組織での機能はほとんど知られていませんでした。CLMPがつくる細胞接着構造が分かれば、神経叢組織においてタイト結合の果たす役割の解明につながると期待できます。また、腸の蠕動運動は自律神経の支配を受け、消化の効率に影響します。蠕動運動を司る分子機構の解明は、先天性の短腸症候群のみならず、自律神経失調症を含むさまざまな消化障害の理解につながり、治療法の開発につながると考えられます。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the mechanism of fate decision of intestinal stem cells. Although tight junctions are well-known to be responsible for barrier function, our lab hypothesized that tight junction molecules including claudins regulate the fate of the stem cells. As a result, we could not find any evidence that claudins are involved in the maintenance or differentiation. Thus, we examined other tight junction molecule CLMP, a causative gene of human congenital short bowel disease. We made monoclonal antibodies against CLMP and examined the localization. CLMP was localized around the intestinal plexus, which regulate peristalsis of the intestine. A recent report showed that CLMP-KO mice exhibit peristalsis defect, which fits well with our observation. We are currently working on precise identification of CLMP-expressing cells.

研究分野：人体病理学

キーワード：腸管幹細胞 CLMP

### 1. 研究開始当初の背景

腸管上皮幹細胞などの組織幹細胞のニッチ領域では、細胞間の相互作用が幹細胞性の維持や増殖を制御していることが知られているが、タイトジャンクション(本研究では"タイト結合"と呼ぶ)分子の役割には全く目が向けられていなかった。申請者の研究室では、胎生期上皮組織に上皮分化に応じて発現するクローディン6 (CLDN6) に着目し、CLDN6 が上皮の分化を制御する可能性を信じて研究を行ってきた。これを踏まえて、幹細胞間や幹細胞・ニッチ細胞間をシールするタイト結合分子の細胞間接着シグナルに着目して腸上皮幹細胞の新規運命決定機構を解明しようと考えた。

### 2. 研究の目的

タイト結合分子が細胞間隙における分子透過性を制御することはよく知られているが、シグナル分子としての機能に関する知見はほとんど報告されていない。一方、受容体型チロシンキナーゼではC末端細胞内ドメインのチロシン残基が自己リン酸化され、pYモチーフとして様々なシグナル分子をリクルートする足場として働くことが知られている。そこで、申請者らは、様々なタイト結合分子のC末端細胞内ドメインを調べたところ、複数のチロシン残基が脊椎動物のいくつかのタイト結合分子に保存されていることを見出した。このような背景から本研究では『組織幹細胞間や組織幹細胞・ニッチ細胞間を繋ぐタイト結合分子の会合が、組織幹細胞の運命を決定する』というこれまでの常識を覆す発想を検証する。具体的には、『タイト結合分子の会合が、C末端細胞内ドメイン内のチロシン残基とシグナル分子の結合を惹起して細胞内シグナルを活性化し、転写因子とクロストークする』という分子機構を想定している。

### 3. 研究の方法

(1) 正常小腸・大腸組織の凍結切片を用いてタイト結合分子が幹細胞間および幹細胞・ニッチ細胞間に局在するかを検討する。

(2) 腸オルガノイド培養は、陰窩-絨毛軸および陰窩-表層上皮軸を模倣できる系で、ゲノム編集等の遺伝子操作も可能である。そこで本系を用い、着目したタイト結合分子の発現を検証する。また、Tet-ON型やCRISPR/Cas9型などを用い、各タイト結合分子の発現を誘導またはノックアウトし、腸上皮幹細胞の維持・自己複製・分化に及ぼす影響を明らかにする。

(3) 申請者らはCLDN6の対合に関わる第2細胞外ドメイン(EC2)がCLDN6シグナル活性に関与していることを示唆する可能性のあるデータを持っている。クローディンのいずれかが腸上皮幹細胞の運命決定に関わることが明らかになった場合、その遺伝子をノックアウトした腸オルガノイド培養系に野生型あるいはEC2欠損型CLDNを導入し、その性状を解析する。またCLDN6シグナルを阻害できる可能性のあるCLDN6-EC2ポリクローナル抗体を作製した経験をもとに、CLDN2シグナルを阻害するポリクローナル抗体を同様に作製する。これらの抗体を用いて、腸オルガノイド培養におけるCLDN接着を阻害して腸上皮幹細胞の挙動を検討する。

### 4. 研究成果

(1) マウス正常腸組織の凍結切片を用いて、腸管幹細胞が存在する陰窩周辺の蛍光免疫染色を行い、幹細胞周辺に特異的に発現するクローディンについて検討を行った。その結果、Cldn6やCldn12については全く検出されなかった。検出されたものについては、Cldn2は陰窩から陰窩の少し上まで、Cldn3はほぼ全域、Cldn4は分泌系の細胞とパネート細胞、Cldn7はほぼ全ての細胞のラテラル膜上、Cldn15はほぼ全体だが絨毛に強く発現していた。いずれのクローディンも、幹細胞や幹細胞ニッチに特異的な局在を示すものはなかった。

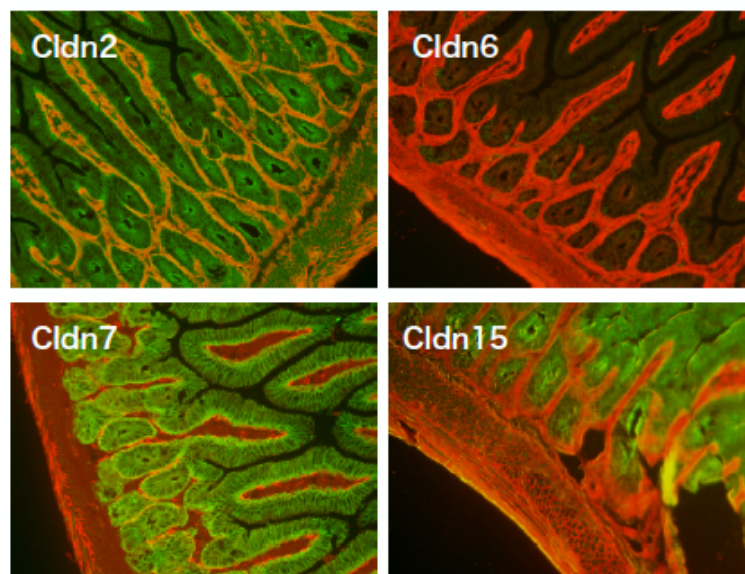


図1 各クローディンの局在(緑) 赤はHSPG

(2) そこで、クローディンに関してこれ以上、上記の『仮説』を追求することは諦め、他のタイト結合分子について検討を重ねることにした。

タイト結合の膜分子ファミリーにはクローディン以外に TAMP と JAM がよく知られている。TAMP はオクルディン、トリセルリン、MARVELD3 からなり、ほぼすべての上皮細胞に発現しているため、幹細胞特異的なシグナルを制御している可能性はないと考えた。そこで、JAM ファミリーに着目した。JAM ファミリーは約 9 種類からなり、JAM-A はほぼ全ての上皮に見出される。JAM-B や JAM-C は線維芽細胞系の細胞や筋肉に普遍的に見られる。それ以外の JAM ファミリー分子についてはあまり解析が進んでいない。申請者は、JAM ファミリーのひとつである CLMP に着目した (図 2)。

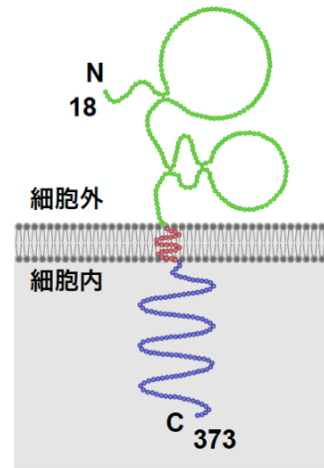
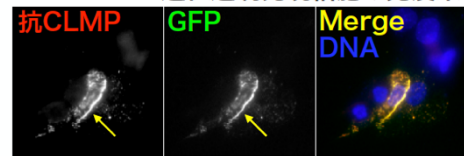


図 2 JAM ファミリー分子 CLMP

CLMP は先天性の短腸症候群の原因遺伝子として最近同定されており、腸管の分化や増殖に関与している可能性が高いと考えた。まず、CLMP の細胞質ドメインを免疫することによって CLMP を認識するラットモノクローナル抗体を作製した (図 3)。エピトープ部位に変異を導入した CLMP をネガティブコントロールに用いて検討した結果、この抗体は免疫染色およびウェスタンブロット法において、高い特異性をもって CLMP を認識できることが確かめられた (図 3 下側)。

CLMP-GFP一過性過剰発現細胞の免疫染色



CLMP-GFP発現細胞のウェスタンブロット

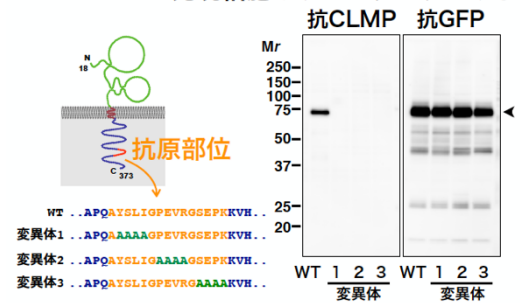


図3 私たちが樹立した抗CLMP抗体は高い特異性でCLMPを認識できる

次に、この抗体を用いてマウス腸管の凍結切片を染色したところ、驚いたことに、腸管陰窩ではなく平滑筋層の間に局在をみとめた (図 4)。腸管平滑筋層は、内側が輪状筋、外側が縦走筋の二層構造になっているが、CLMP は、二層の間、および、輪状筋の内側の、アクチンがほとんど発現していない領域の点状の染色像を示した。こうした領域には、腸管を支配する神経叢が存在することが知られている。現在、免疫電顕法によって CLMP が実際に神経叢周辺のどの細胞のどの構造体に局在しているのかを調べているところである。また、本研究の遂行中に、他の研究室から CLMP ノックアウトマウスの解析結果が報告され CLMP は腸管の蠕動を制御していることが明らかにされた (Langhorst H et al., Dis Model Mech, 2018)。現時点では蠕動の不全から腸の閉塞・壊死をへて腸管が短い表現型を生じていると解釈するのが妥当と考えられている。CLMP が蠕動を司る神経叢に局在しているという私たちの結果は、この報告と符合すると考えている。

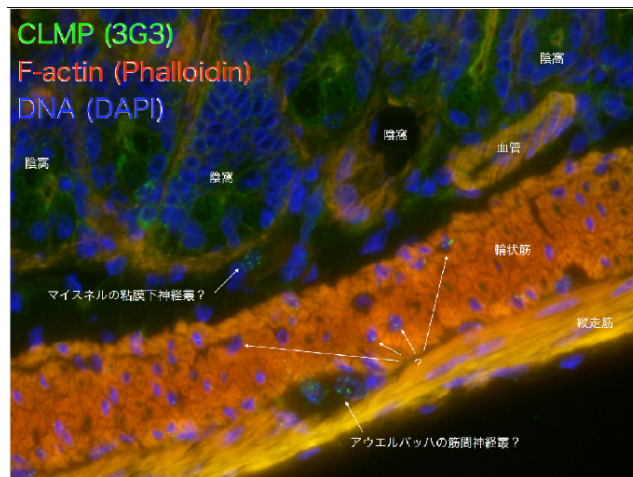


図4 腸管におけるCLMPの局在 赤はアクチン 青はDNA

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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	千葉 英樹  (Chiba Hideki)  (00295346)	福島県立医科大学・医学部・教授   (21601)	
研究分担者	東 智仁  (Higashi Tomohito)  (70515072)	福島県立医科大学・医学部・准教授   (21601)	

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