

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32670

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14418

研究課題名（和文）二次胆汁酸が腸管上皮幹細胞に与える影響の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the effect of secondary bile acids on intestinal epithelial stem cells

研究代表者

青木 綾子（AOKI, Ayako）

日本女子大学・家政学部・研究員

研究者番号：60610368

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）：本研究では二次胆汁酸が腸管上皮に及ぼす影響を解明することを目的とし、小腸および大腸オルガノイドに対するリトコール酸の添加効果を調べるとともに、リトコール酸の経口摂取がマウスの腸管上皮に与える影響を調べた。リトコール酸は、小腸オルガノイドにおいて腸管上皮幹細胞マーカーであるLgr5の発現を増強したが、大腸オルガノイドにおいては増強しなかった。また、リトコール酸の摂取は大腸上皮のLgr5陽性細胞を減少させ、腸管オルガノイド形成能を減少させた。以上から、リトコール酸は小腸上皮において幹細胞を増加させる可能性がある一方で、大腸上皮においては幹細胞を減少させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、リトコール酸が大腸において腸管上皮幹細胞の割合を減少させることを明らかにした。幹細胞の割合の減少は分化細胞の割合の増加を意味するため、リトコール酸は腸管上皮の分化を促進すると考えられる。リトコール酸は大腸がんを促進すると考えられているが、この作用との関係が今後明らかになれば、大腸がんの抑制に寄与する知見が得られる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, the effect of lithocholic acid on the small intestinal organoids and colonic organoids were investigated to elucidate the effect of secondary bile acids on the intestinal epithelium. Further, the effect of oral intake of lithocholic acid on murine intestinal epithelium was investigated. Lithocholic acid enhanced the expression of Lgr5, a marker of the intestinal stem cell, in small intestinal organoids, but not in colonic organoids. Oral intake of lithocholic acid reduced Lgr5-positive cells in the colonic epithelial cells and reduced the ability of colonic epithelial cells to form intestinal organoids. These results suggest that lithocholic acid may increase intestinal stem cells in the small intestine, while decreasing intestinal stem cells in the colon.

研究分野：食品免疫学

キーワード：腸管オルガノイド 胆汁酸 Lgr5

1. 研究開始当初の背景

近年、腸管のクリプトに存在する幹細胞から腸管オルガノイドという腸管上皮組織体を培養する技術が確立された。腸管上皮細胞の幹細胞は Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (Lgr5) を発現しており、Lgr5 陽性細胞は単細胞から腸管オルガノイドを誘導できる。腸管オルガノイドは幹細胞だけでなく、吸収上皮細胞、腸管内分泌細胞、杯細胞などの分化細胞を組織体に有している。腸管オルガノイドは小腸と大腸、それぞれの幹細胞から誘導できるが、その誘導方法は異なる。小腸オルガノイドは、腸管上皮幹細胞をマトリゲル中で、増殖因子である Epidermal growth factor、幹細胞の分化抑制に働く BMP の阻害タンパク質である Noggin、幹細胞の自己複製において重要な増殖因子である Wnt シグナルを活性化する R-spondin を含んだ培地で培養することで誘導できる。一方、大腸オルガノイドの誘導にはさらに、Wnt3 が必要である。これは、小腸オルガノイドには Wnt3 を分泌し、幹細胞の増殖を助けるパネート細胞が存在するのに対し、大腸オルガノイドには存在しないためである。この違いは、小腸上皮と大腸上皮の細胞構成、および幹細胞の制御機構の違いを反映している。

一次胆汁酸(コール酸など)は肝臓においてコレステロールから合成され、胆汁として腸管に分泌される。その後、胆汁酸は小腸で再吸収されるが一部は腸内細菌により変換を受け、二次胆汁酸(デオキシコール酸、リトコール酸など)となる。この二次胆汁酸には古くから発がん促進作用があることがわかっており、大腸がん患者では二次胆汁酸濃度が高いこともわかっている。また、胆汁酸は大腸だけでなく小腸のがんの発生原因となることも報告されており、これらの作用が胆汁酸の発がん促進作用に関連していると考えられている。

大腸がんの発生機構としては腺腫から段階的に発がんしていくという説が支持されている。Lgr5 陽性幹細胞に変異を誘導した場合には、非常に効率よく腺腫が形成されることが分かっており、腺腫内において Lgr5 陽性幹細胞が tumor initiating cells となっていると考えられている。Lgr5 は現在、大腸がん幹細胞のマーカーとしても利用されており、Lgr5 の発現は大腸がん患者の予後と相関することや、腫瘍形成において極めて重要な役割を果たしていることがわかっている。以上のように、腸管上皮幹細胞は大腸がんの発生に大きく関係していることが示唆されている。

2. 研究の目的

胆汁酸は腸内細菌により二次胆汁酸に変換され、発がん性を示すことが報告されているが、二次胆汁酸が腸管上皮幹細胞に及ぼす影響についてはわかっていなかった。そこで本研究では、腸管オルガノイドを用いて二次胆汁酸が腸管上皮に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

小腸オルガノイドに対するコール酸および二次胆汁酸(デオキシコール酸、リトコール酸)の添加効果を調べた。マウス小腸からクリプト画分を調製し、マトリゲル中、R-spondin、Noggin、EGF を含む培地に、クリプト画分と共に、コール酸、デオキシコール酸、リトコール酸を 100 μ M となるように添加し、小腸オルガノイドを誘導した。1 週間培養後、小腸オルガノイドの形態を観察するとともに、RNA を回収し、cDNA 合成を行い、幹細胞マーカーである Lgr5 の遺伝子発現を real-time PCR で解析した。また、リトコール酸が作用する受容体として知られる Transmembrane G protein-coupled Receptor 5 (TGR5)、Farnesoid X receptor (FXR)、Pregnane X receptor (PXR) のアゴニスト(それぞれベツリン酸、INT-747、PCN)を添加した培地で小腸オルガノイドを誘導し、Lgr5 の遺伝子発現を real-time PCR で解析した。

続いて、大腸オルガノイドに対するリトコール酸の添加効果を調べた。マウス大腸からクリプト画分を調製し、マトリゲル中、R-spondin、Wnt3a、Noggin を産生する L-WRN 細胞の培養上清を含む培地で培養することで大腸オルガノイドを誘導した。誘導した大腸オルガノイドは 7 日に 1 回植え継ぎを行うことで維持した。植え継ぎを行ってから 3 日後の大腸オルガノイドに、リトコール酸を 100 μ M となるように添加し 4 日間培養した。培養後、大腸オルガノイドの形態を観察を行うとともに、Lgr5、杯細胞マーカー Mucin2 (Muc2)、内分泌細胞マーカー Chromogranin A (ChgA)、L 細胞マーカー Glucagon (Gcg) の遺伝子発現を real-time PCR で解析した。次に、大腸オルガノイドの増殖に与えるリトコール酸の影響を解析するため、リトコール酸を添加して誘導した大腸オルガノイドに 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) を添加して培養し、フローサイトメーターにより EdU 陽性細胞の割合を解析した。さらに、リトコール酸の作用に関わる受容体を調べるため、各受容体のアゴニストであるベツリン酸、INT-747、PCN、カルシトリオールを添加した培地で大腸オルガノイドを培養し、Lgr5 と各分化マーカーの遺伝子発現を real-time PCR により解析した。

リトコール酸の経口摂取がマウス大腸上皮に与える影響を解析するため、0.1%リトコール酸を含む固形飼料を Lgr5-EGFP ノックインマウスに 2 週間自由摂取させ、大腸上皮細胞における Lgr5-EGFP 陽性細胞の割合を、フローサイトメーターを用いて解析した。また、大腸上皮細胞から誘導されるオルガノイド数を計数した。

4. 研究成果

コール酸、デオキシコール酸、リトコール酸を添加し、小腸オルガノイドを誘導後、形態を顕微鏡で撮影した。また、幹細胞マーカーである Lgr5 の遺伝子発現を real-time PCR で解析した。その結果、リトコール酸の添加によりオルガノイドの形態が、突起のある構造からスフェロイド様に変化した。さらに、コール酸およびリトコール酸の添加により Lgr5 の遺伝子発現が有意に上昇することがわかった(図 1)。これらの結果から、リトコール酸は小腸オルガノイドの誘導において幹細胞の割合を増加させる可能性があることが示唆された。続いて、ベツリン酸、INT-747、PCN を添加した培地で小腸オルガノイドを誘導し、Lgr5 の遺伝子発現を real-time PCR で解析した。その結果、TGR5 のアゴニストであるベツリン酸を添加した際に、Lgr5 の遺伝子発現が有意に上昇することがわかった。以上から、リトコール酸は小腸オルガノイドにおいて、幹細胞の割合を増加させる可能性があること、また、その作用には TGR5 が関与している可能性があることがわかった。

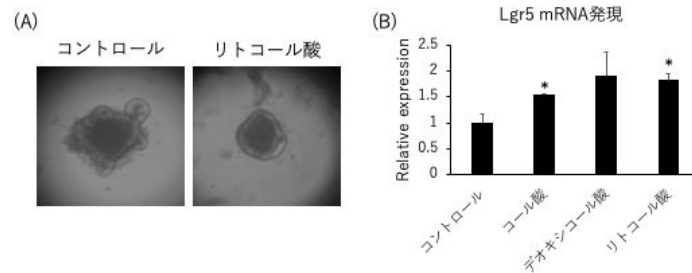


図1. 小腸オルガノイドの形態およびLgr5 mRNA発現に対する胆汁酸の効果

100 μ Mの胆汁酸（コール酸、デオキシコール酸、リトコール酸）を添加した培地で小腸オルガノイドを誘導した。1週間培養後、小腸オルガノイドの形態 (A) および、Lgr5のmRNA発現量 (B) を調べた。Lgr5 mRNA発現量は、コントロールを1とした時の相対値で示した。各値は平均値 \pm SDで示した。Student t test, * p <0.05 vs コントロール

大腸オルガノイドにリトコール酸を添加して 4 日培養後に、オルガノイドの形態を顕微鏡で撮影した。その結果、予想外に、リトコール酸を添加することでオルガノイドの形態がスフェロイド様の形状から突起のある構造に変化した(図 2)。また、リトコール酸の添加により、L 細胞マーカーである Gcg の発現が上昇することがわかった。リトコール酸を添加して誘導した大腸オルガノイドに EdU を添加し培養後、フローサイトメーター解析を行った結果、リトコール酸の添加により、EdU 陽性細胞の割合が減少することがわかった。これらのことからリトコール酸は、大腸オルガノイドに対しては細胞の増殖を抑制し、分化を促進することが示唆された。大腸オルガノイドにベツリン酸、INT-747、PCN を添加した時の各マーカーの遺伝子発現を real-time PCR で解析した結果、いずれのアゴニストにおいても Lgr5 の発現は上昇せず、逆に PCN の添加で発現が抑制されることがわかった。また、PCN の添加により ChgA、Gcg の発現が上昇することもわかった。これらのことから、PXR は、リトコール酸による大腸上皮の分化の促進に関係している可能性が示唆された。

リトコール酸の摂取がマウス大腸上皮の幹細胞に与える影響を、フローサイトメーターを用いて調べた結果、リトコール酸の摂取により大腸上皮における Lgr5 陽性細胞の割合が減少することが分かった。また、リトコール酸の経口摂取により、大腸上皮のオルガノイド形成能が抑制されることが明らかになった。これらの結果から、リトコール酸は大腸上皮においては腸管上皮幹細胞を減少させることが明らかになった。

以上から、リトコール酸は小腸オルガノイドに対しては幹細胞を増加させる可能性があること、逆に、大腸オルガノイドに対しては分化を促進する方向に働く可能性があることがわかった。また、リトコール酸の摂取は大腸上皮において幹細胞の割合を減少させることが明らかになった。

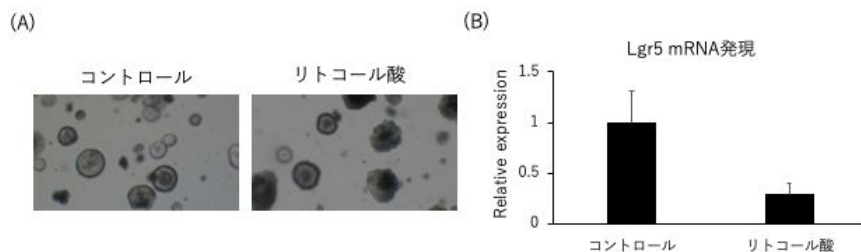


図2. 大腸オルガノイドの形態およびLgr5 mRNA発現に対するリトコール酸の効果

大腸オルガノイドを誘導し、培養3日目に100 μ Mのリトコール酸を添加した。培養2日後、大腸オルガノイドの形態 (A) および、Lgr5のmRNA発現量 (B) を調べた。Lgr5 mRNA発現量は、コントロールを1とした時の相対値で示した。各値は平均値 \pm SDで示した。

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

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