

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20152

研究課題名（和文）ミニ腸を用いたNa輸送体のカップリングパートナーの生理学的意義の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the physiological significance of Na transporter coupling partners using the organoid

研究代表者

石塚 典子（Ishizuka, Noriko）

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：30440283

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：腸のNaCl吸収は、Na輸送体とCl輸送体がカップルして働くと考えられている。Na輸送体は小腸、大腸いずれも同一のNa輸送体であるが、Cl輸送体は小腸と大腸で異なる。マウスの摘出した組織を用い、腸管各部位における、NaCl吸収機序を検討した。小腸、盲腸及び中位大腸では、Na輸送体とCl輸送体がカップルして働いていることが示唆された。また腸の各部位からオルガノイドを作成することを試みた。オルガノイドは腸管各部位の特有の遺伝子が発現している腸上皮細胞に分化していることが示唆された。確立した手法を用い、腸管NaCl吸収機構の欠損したマウスの機序解明を試みたが、更なる検討の必要があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管におけるNaCl吸収機構の解明は、高血圧や慢性腎臓病の予防・治療を考える上で非常に重要である。近年、腸管からのNaCl吸収を抑制する薬剤の開発は臨床的に大きな関心を寄せられている。腸管NaCl吸収機構と栄養素の相互作用の全容が明らかにできれば、新たなNaCl吸収抑制機構のターゲットが明らかになり、食塩の吸収を更に効率的に妨げる薬剤や食品添加物等の開発に繋がる、特色ある基礎研究になる。本研究では、これら機構を解明することを試みた。

研究成果の概要（英文）：Intestinal NaCl absorption is thought to be mediated by a couple of Na and Cl transporters. The Na transporter is the same Na transporter in both the small intestine and the large intestine, but the Cl transporter is different in the small intestine and the large intestine. Using the isolated native tissue of mice, the mechanism of NaCl absorption at each segment was investigated. It was suggested that Na transporters and Cl transporters work as a couple in the small intestine, cecum and middle large intestine. We also tried to establish organoids from each segment of the intestine. It was suggested that organoids are differentiated into intestinal epithelial cells expressing unique genes in each segment of the intestinal tract. Using the established method, we tried to elucidate the NaCl absorption mechanism, which is reduced NaCl absorption in the small intestine, but further investigation was required.

研究分野：生理学

キーワード：消化管 NaCl吸収 NHE3 オルガノイド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

体液量の調節には消化管からのNaCl吸収と腎臓での排泄調節が重要である。消化管からのNaCl吸収は、Na輸送体とCl輸送体がカップルして働くと考えられている。Na輸送体は、小腸・大腸いずれもNHE3であることが示されているが、Cl輸送体に関しては、小腸ではPAT1、大腸ではDRAと異なる。また、小腸では、Na輸送体が、パートナーを替え栄養素輸送体PepT1ともカップルする(参考文献)。しかし、Na輸送体のカップリングパートナーが異なる理由、カップリング様式の分子機構、更にそれらが栄養素輸送体とどのように相互作用するかは全く知られていない。

現在までに消化管のNaCl吸収機構に関する研究は動物レベルと細胞株で行われてきているが、それぞれのデメリットがあった。近年その手法が確立された「腸オルガノイド」は、動物個体や細胞株を用いた研究における問題点を解決できる新たなツールである。オルガノイドは人為的に創出された「器官に類似した組織体」であり、「ミニ臓器」とも呼ばれ、生体から採取した組織幹細胞から作成される。The Scientist 誌はオルガノイドを「2013年の最大の科学的進歩の1つ」に選んでおり、その可能性が注目されている。「幹細胞操作技術」はここ数年で長足の進歩をとげており、特に腸においては、2009年にミニ小腸の培養技術が確立されたこと(参考文献)を皮切りとして、2017年には、生理学的手法が容易に導入できる「単層上皮のミニ腸」の培養方法も開発された(参考文献)。さらに興味深いことに、このミニ腸では、採取した部位ごとの輸送体発現が再現されており、同じミニ小腸でも空腸と回腸では輸送体の発現が異なることが示されている。また、単層上皮では、腸の複雑な立体構造である絨毛がないため輸送体機能活性が標準化できる。これら2点は、ミニ腸での機能解析の最大の利点でもある。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、NaCl吸収機構におけるNHE3のカップリングパートナーであるCl輸送体が小腸と大腸で異なることの生理学的意義の解明と、更に、小腸のNaCl吸収機構と栄養素吸収との相互作用を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

(1) マウスを用いた腸管各部位の検討 Na<sup>+</sup>輸送体とCl<sup>-</sup>輸送体のカップリング機構の検討  
マウスより小腸、盲腸、大腸3部位を採取し、ユッシングチャンパー法にて、経上皮コンダクタンスと、<sup>22</sup>Na<sup>+</sup>および<sup>36</sup>Cl<sup>-</sup>の経上皮フラックスを測定した。

#### (2) 腸オルガノイドの確立

マウス摘出標本でのフラックス測定では小腸と大腸での上皮の立体構造の違い、組織内での輸送体の発現部位差などにより、Na<sup>+</sup>輸送体、Cl<sup>-</sup>輸送体の共役機構を定量的に直接比較することは困難である。このため、腸管より幹細胞を単離し、分化させ腸管オルガノイドを作成し、さらに単層上皮に分化させることを試み、二次元培養の条件検討を行った。

腸管上皮幹細胞は陰窩細胞に含まれるため、マウス腸管より陰窩細胞を単離し、マトリゲル中で腸管上皮幹細胞塊(三次元スフェロイド)として継代、維持した。三次元スフェロイドは幹細胞の継代維持に必要な50%L-WRN CM (Wnt3a, R spondin3 and Noggin conditioned medium) 含む培地中で継代維持した。単層上皮細胞を形成するために、培養3日目の三次元スフェロイドを再懸濁し、カバースリップまたはトランズウェルに播種した。24時間後、50%L-WRN CMを除去し、0%CMで置き換え、細胞を分化させた。

培養前の単離した陰窩細胞、未分化の三次元スフェロイド、分化させた三次元オルガノイド(分化用培養液に置換後3日目)を用い、Real time RT PCR法により腸管上皮幹細胞マーカーであるLgr5 (leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5)、成熟細胞の指標として輸送体であるNHE3およびDRA、タイトジャンクション形成の指標としてClaudin-15の遺伝子発現を測定した。また、確立された単層腸オルガノイドについてNHE3、DRAの免疫蛍光染色、および、ユッシングチャンパー法にて経上皮透過性を示す電気的コンダクタンスの測定を行った。

#### (3) NaCl吸収能が低下したマウスにおける検討

細胞間のタイト結合部のタンパク質の一つを欠損させたマウス(TJ-KO)では上部小腸における栄養素吸収とNaCl吸収が著しく低下していた。NaCl吸収機構の低下機序の解明は、生体内の二次的な因子の関与を排除することが困難であった。このため、上記(2)で確立した方法を用いて、TJ-KOマウスの小腸幹細胞よりオルガノイドを樹立した。未分化及び分化させた三次元オルガノイドをマトリゲルごと凍結包埋し、免疫染色によりNHE3の細胞内発現を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) マウスを用いた腸管各部位の検討 Na<sup>+</sup>輸送体と Cl<sup>-</sup>輸送体のカップリング機構の検討  
マウスの小腸、盲腸及び中位大腸では、Na 輸送体である NHE3 を阻害すると Cl<sup>-</sup>吸収が抑制され、NHE3 と Cl<sup>-</sup>輸送体がカップルして働いていることが示唆された。また、NHE3 の阻害により経上皮透過性が変化すること、免疫染色により NHE3 がタイト結合近傍で強く発現していることが観察され、NaCl 吸収が傍細胞性輸送にも関わっていることが示唆された。

#### (2) 単層腸オルガノイドの確立

陰窩細胞の単離には、5mM EDTA、5mM EGTA、55mM sorbitol を含む上皮細胞分散用溶液を用いることで、単離される陰窩細胞の数が増加した。また、実験により、細胞の増殖能にばらつきが観察された。これは、L-WRN CM 中のニッチ因子である Wnt の濃度がコントロールされていないことによると考えられた。幹細胞培養液に Wnt シグナルを活性化する CHIR99021 を添加したところ、幹細胞スフェロイドの発育が向上した。既報では幹細胞培養液にはアノキスを防ぐために、ROCK 抑制剤である Y-27632 を常時添加している。分化誘導時には Y-27632 存在下では多核の細胞が見られたが、Y-27632 を除くことで改善された。さらに、分化誘導時には Notch シグナルを間接的に抑制するガンマセクレターゼの抑制剤である DAPT を添加することで分化が促進され、単層円柱上皮様の細胞が形成された。単層オルガノイド形成するためにカバースリップおよびトランズウェルに塗布するコーティング剤は既報では 0.1%ゼラチンが用いられているが、2.5%マトリゲルに変更したところ、連続した単層円柱上皮が再現性よく形成された。

オルガノイド並びに生体組織(単離クリプト)の幹細胞マーカー mRNA 発現量を比較した。未分化スフェロイドでは、幹細胞マーカーはいずれの部位でも生体組織より高く、幹細胞が選択的に濃縮されていることが示唆された。分化誘導したオルガノイドでは幹細胞マーカーは低下し、腸上皮に分化していることが示唆された(図 1)。また NHE3 と DRA は幹細胞スフェロイドでは発現が低く、分化誘導したオルガノイドでは発現が増加した。Claudin-15 は小腸では分化後に mRNA 発現が高くなったが、盲腸、大腸由来のオルガノイドでは発現が増加しなかった。免疫染色法で細胞内局在を検討すると、NHE3 はいずれの部位でも微絨毛構造様として観察された。DRA は、盲腸では微絨毛構造様に局在していた。近位大腸では、核近傍と思われる場所にも発現していた。トランズウェル上に分化誘導した単層オルガノイドを用いてバリア機能を評価した。ネイティブ組織とは異なり、単層オルガノイドでは、近位よりも遠位大腸で経上皮コンダクタンスが上昇する傾向が観察された。

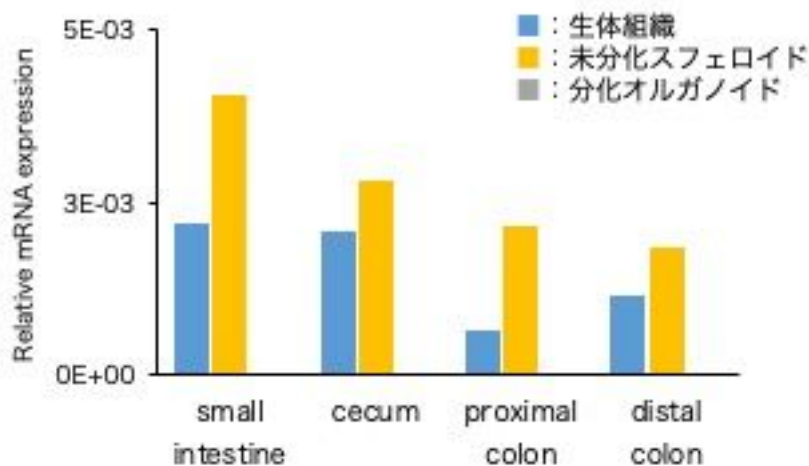


図 1. 腸オルガノイドにおける腸管上皮幹細胞マーカーの mRNA 発現量の変化

(3) コントロールである野生型マウスから作成した、未分化オルガノイドでは NHE3 の発現は観察されなかった。しかし、オルガノイドを分化させると NHE3 は頂端膜側に強く発現していた。TJ-KO マウス由来のオルガノイドでも、分化誘導をすると、NHE3 は頂端膜側に発現が観察された。TJ-KO マウス由来のオルガノイドは一旦凍結保存すると、理由は不明であるが増殖能が低下し、単層上皮標本を作成するために十分な量を増殖させられなかった。このため、発現している NHE3 の輸送機能は評価することができなかった。今後、オルガノイドによる NaCl 吸収機能と合わせて検討する必要がある。最近、単層腸オルガノイドをトランズウェル上に作成し、機能評価を行った結果が報告された(参考文献)。報告された手法を参考に、今後オルガノイドの輸送体機能の解析を進めていく。

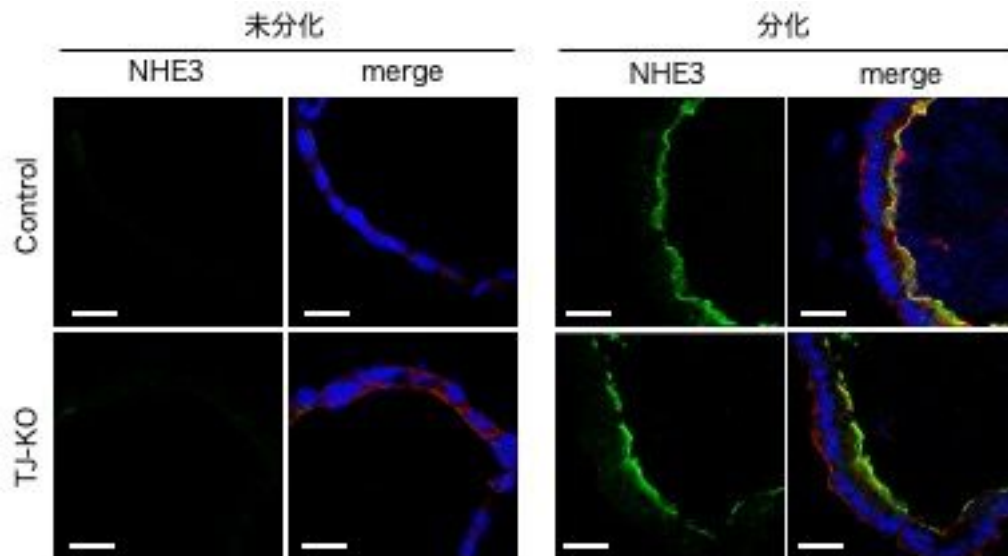


図2. 小腸オルガノイドにおける NHE3 発現の変化

コントロールマウスおよびタイト結合タンパク欠損(TJ-KO)マウスの小腸中位部より作成した三次元オルガノイドにおける NHE3 免疫染色像を示す。bar=100 μm、緑:NHE3、赤:アクチン、青:DAPI

#### 参考文献

- N Ishizuka et.al., Am.J.Physiol.315, G799-G809, 2018  
 S Sato et.al.,Nature 459, 262-266, 2009  
 K Kozuka et.al., Stem Cell Reports 9, 1976-1990, 2017  
 A J King et al., Sci. Transl. Med. 10, eaam6474, 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石塚 典子、伊久美 直毅、林 久由
2. 発表標題 NaCl 吸収輸送体のカップリング機構の解明
3. 学会等名 第66回 中部生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石塚 典子、伊久美 直毅、栗原 史弥、林 久由
2. 発表標題 腸オルガノイドを用いたNa+吸収輸送活性の測定
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会第32回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriko Ishizuka, Naotaka Ikumi and Hisayoshi Hayashi
2. 発表標題 Coupling mechanism for Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger and Cl <sup>-</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> exchanger in the intestine
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------