

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 8日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20570060

研究課題名（和文）トランスジェニックカエルを用いた消化管上皮幹細胞のニッチに関する研究

研究課題名（英文）Study of the intestinal epithelial stem cell niche using transgenic frogs

研究代表者

岡 敦子 (OKA ATSUKO)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：50175254

研究成果の概要（和文）：両生類の消化管では、甲状腺ホルモン（TH）を引き金として幹細胞が出現し、哺乳類類似の成体型上皮を形成していく。本研究では、幹細胞を制御するニッチの分子的基盤の解明を目指し、トランスジェニックガエルの小腸を使って上皮と結合組織の再結合培養実験を行った。その結果、幹細胞が幼生型上皮の脱分化によって生じ、成体型上皮が形成されるためには、上皮で発現する TH 応答遺伝子と、結合組織で発現する TH 応答遺伝子の両方が必要であることが明らかとなった。さらに、TH 応答遺伝子の発現解析を行い、Shh や Wnt 等のシグナル経路が、ニッチ形成に重要な役割を果たすことを示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：In the amphibian digestive tract, thyroid hormone (TH) induces stem cells that generate the adult epithelium similar to the mammalian counterpart. In the present study, to clarify molecular mechanisms regulating the stem cells, we performed tissue recombinant culture experiments, using the small intestine of transgenic *Xenopus laevis* tadpoles. Our results indicate that both TH response genes expressed in the epithelium and those in the connective tissue are necessary for the larval epithelium to dedifferentiate into the adult stem cells. In addition, expression analyses of TH response genes suggest important roles of Shh and Wnt signaling pathways in establishment of the stem cell niche.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、形態・構造

キーワード：トランスジェニックカエル、甲状腺ホルモン受容体、小腸、器官培養、組織間相互作用、幹細胞、変態、脱分化

1. 研究開始当初の背景
哺乳類の消化管上皮では、幹細胞周辺の微小

環境（ニッチ）が、幹細胞の制御に重要な役割を果たすことが古くから提唱されている。

しかし、その分子機構は未だに充分には解明されていない。

両生類の消化管では、変態期に幼生型上皮の大部分がアポトーシスにより消失する。同時に少数の幹細胞が出現し、幹細胞が増殖・分化することにより、哺乳類消化管に類似の細胞再生系をもつ成体型上皮が形成される。成体型上皮の形成に至るこの一連の過程は甲状腺ホルモン (TH) により実験的に誘導できることから、両生類の消化管は、幹細胞制御の研究に好個なモデル系を提供している。なかでもアフリカツメガエルの小腸では、これまでに数多くの TH 応答遺伝子がクローニングされ、**dominant positive** 型の TH 受容体 (dpTR) 遺伝子を導入したトランスジェニックガエル (dpTR カエル) も作製されている。そこで、dpTR カエルの小腸を使えば、培養下で組織依存的に TH 応答遺伝子の発現を変化させることによって、ニッチの分子的基盤を解析していくことができると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、THを引き金として生じる両生類の変態という現象を利用して、哺乳類の小腸ではまだ充分には明らかにされていない幹細胞ニッチの分子的基盤の解明を目指す。具体的には、以下のことを明らかにする。

(1) 幹細胞を起源とする成体型上皮の形成に、結合組織からの作用は必要か？

dpTR カエルの小腸を使って、上皮と結合組織の再結合培養実験を行い、組織依存的に dpTR 遺伝子を発現させる。dpTR により調節される TH 応答遺伝子の組織依存的な発現が、成体型上皮の形成にどのような影響を及ぼすのか、免疫組織化学的手法を用いて明らかにする。

(2) 成体型上皮の幹細胞は、分化した幼生型上皮に由来するか？

GFP 遺伝子を導入したカエル (GFP カエル) の小腸を使って、(1)と同様に、上皮と結合組織の再結合培養実験を行う。各小腸において、TH 処理により誘導される幹細胞が GFP を発現するか否かを調べることにより、幹細胞がどの組織に由来するのかを明らかにする。

(3) どのようなTH応答遺伝子が、幹細胞の制御に関与するか？

①変態期および(1)で培養した各小腸において、これまでにクローニングされている TH 応答遺伝子の発現解析を行う。各遺伝子の発現パターンと成体型上皮形成との時

間・空間的関連を調べることにより、幹細胞の制御に関わる遺伝子の候補を複数同定する。

②小腸の培養アッセイ系を用いて、①で同定した遺伝子の機能解析を行い、成体型上皮形成における各遺伝子の役割を明らかにしていく。

3. 研究の方法

(1) ①野生型アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) および熱ショック蛋白質プロモーターの下流に dpTR 遺伝子を導入した dpTR カエルの変態前の幼生から、それぞれ小腸を摘出する。

②各小腸を、ディスペーゼ処理により上皮と結合組織とに分離する。組織を再結合させることにより、上皮も結合組織も共に dpTR カエルに由来する小腸、上皮のみが dpTR カエルに由来する小腸、結合組織のみが dpTR カエルに由来する腸、上皮も結合組織も共に野生型カエルに由来する小腸、の4通りの組み合わせの小腸をつくる。

③各小腸を、熱ショック処理しながら、TH 非存在下で1週間培養する。

④経時的に小腸を固定し、成体型上皮の幹細胞を抗 Musashi-1 または LGR5 抗体により、増殖細胞を抗 BrdU 抗体により、分化した吸収上皮細胞を抗腸脂肪酸結合蛋白質 (IFABP) 抗体により、それぞれ免疫組織学的に検出する。

⑤4通りの組み合わせの小腸での培養結果を比較することにより、dpTR 遺伝子の組織依存的な発現によって、成体型上皮の形成がどこまで進行するのかを解析する。

(2) ①野生型ツメガエルおよび CMV プロモーターの下流に GFP 遺伝子を導入した GFP カエルの変態前の幼生から、それぞれ小腸を摘出する。

②各小腸を、(1)と同様の方法で、上皮と結合組織とに分離する。組織を再結合させることにより、4通りの組み合わせの小腸をつくり、TH 存在下で5日間培養する。

③各小腸を固定し、出現した幹細胞を免疫組織化学的に検出し、幹細胞が GFP を発現しているか否かを調べる。

④4通りの組み合わせの小腸での培養結果を比較することにより、成体型上皮の幹細胞が、変態前の上皮に由来するのか否かを検証する。

(3) ①変態期および(1)で培養した各小腸において、アフリカツメガエルの小腸でこれまでに数多くクローニングされている TH 応答遺伝子の発現を、Real-time RT-PCR および DIG 標識 RNA プローブを用いた *in situ*

hybridization (ISH) を用いて解析する。

②上皮または結合組織特異的に発現し、かつ、その発現パターンが成体型上皮の形成と時間・空間的に密接に関連する遺伝子を、複数見つけ出す。

③幹細胞制御への関与が予測される遺伝子について、順次、申請者がこれまでに確立した培養アッセイ系や遺伝子導入法を用いて機能解析を行う。培養下で当該遺伝子の発現や機能を阻害または促進させることにより、遺伝子産物が成体型上皮幹細胞に及ぼす影響を、免疫組織化学的手法を用いて定量的に解析する。

4. 研究成果

(1) 成体型上皮を形成する幹細胞の出現には、結合組織におけるTH応答遺伝子の発現が必須である

①はじめに、dpTRカエルの小腸を培養に用いるための予備実験として、培養下でdpTR遺伝子を最も効率よく発現させる熱ショック処理の条件設定を行った。さらに、その条件下でdpTR遺伝子だけを発現させることにより、幹細胞の出現から成体型上皮形成に至る過程を *in vitro* で再現できることを確認した。このことは、変態前のdpTRカエルの小腸を使えば、THが存在しなくても、dpTRを発現させることにより、成体型上皮の形成に必要なTH応答遺伝子すべての発現を誘起できることを示している。

②そこで、dpTRカエルを使って上皮と結合組織の再結合培養実験を行った。成体型上皮を形成する幹細胞は、上皮も結合組織も共にdpTRを発現する小腸でのみ検出された。上皮だけがdpTRを発現し、結合組織は発現しない小腸では、形態的に未分化な細胞は検出されるものの、これらの細胞は幹細胞マーカーを発現せず、成体型上皮を形成することができなかった。また、上皮も結合組織も共にdpTRを発現しない小腸や、結合組織だけがdpTRを発現する小腸では、どちらも未分化細胞は検出されず、成体型上皮も形成されなかった。

以上の結果は、成体型上皮を形成する幹細胞が出現するためには、上皮で発現するTH応答遺伝子だけでは不十分であり、結合組織で発現するTH応答遺伝子が必要不可欠であることを、示している。すなわち、上皮で発現するTH応答遺伝子と結合組織で発現するTH応答遺伝子の両方が幹細胞の出現に必要であり、かつ両方があれば充分であることを、本研究の結果は国内外で初めて実験的に証明するものである。したがって、本実験モデルでは、組織特異的に発現するTH応答遺伝

子を解析していくことにより、幹細胞ニッチの分子的基盤を追究する、というアプローチが可能である。

(2) 幼生型上皮の一部が脱分化することにより、幹細胞が出現する

①GFPカエルの小腸を用いた再結合培養実験を行ったところ、成体型上皮を形成する幹細胞は、上皮がGFPカエルに由来する小腸ではGFPを発現し、上皮が野生型カエルに由来する小腸では発現しなかった。これらの培養結果は、幹細胞は幼生型上皮に由来し、上皮以外の組織には由来しないことを、示している。一方、これまでの報告から、変態前の幼生型上皮内には形態的に未分化な細胞は存在せず、幹細胞マーカーも検出されないことが知られている。今回の結果と考えあわせると、幹細胞は、分化した幼生型上皮の一部が脱分化することによって生じることが示唆される。

②哺乳類では、分化した体細胞が再プログラミングする際に、幹細胞への脱分化に伴って核のラミンのタイプが変化することが報告されている。そこで本研究では、変態期のツメガエル小腸でのラミンの発現解析を行った。幹細胞の出現に伴い、幼生型上皮細胞で発現する核ラミンのタイプが、分化型のlamin Aから未分化型のlamin IIIへと変化することを見出し、幼生型上皮が脱分化することを支持する傍証も得た。

以上の結果から、変態期の小腸で形成される幹細胞ニッチには、幹細胞の増殖や分化を制御する因子だけではなく、分化した上皮細胞を幹細胞へと脱分化させるために必要な因子も含まれていると考えられる。哺乳類小腸の再生時にも、上皮の脱分化が起こることが提唱されているが、その分子機構は依然として未解明である。本実験モデルを使って未知の脱分化ニッチ因子を将来解明することができれば、消化管の再生医学に大きな貢献をすることができると期待される。

(3) 複数のシグナル伝達経路が、組織間相互作用を介して幹細胞の制御に関与する

TH応答遺伝子の発現解析の結果、現在までに以下の知見を得ている。

①TH直接応答遺伝子であるSonic hedgehog (Shh) が成体型上皮の幹細胞に特異的に強発現するのに対し、Shhの受容体Patched-1やShhシグナル伝達経路に関わるSmoothed, Gli1-3は、いずれもTHにより

結合組織特異的に発現が急上昇する。さらに、ShhのインヒビターであるHipも、その発現は結合組織特異的である。これらの結果は、Shhが直接作用するのは上皮ではなく結合組織内の細胞であり、Shhの標的遺伝子の中にニッチ因子が含まれている可能性を示している。

②活発に増殖中の幹細胞および幹細胞周辺の繊維芽細胞において、Wnt5a、Frizzled、CD44などのWntシグナル伝達経路に関わる遺伝子の発現が、THにより一過性に急上昇する。

以上の発現解析の結果、Shh および Wntシグナル伝達経路が、幹細胞ニッチの形成に伴って活性化されることが明らかになったため、現在、両経路に関与する TH 応答遺伝子に注目して、さらに詳細な発現解析を進めている。培養系を用いた遺伝子の機能解析も進行中であり、これまでに、Wnt5a が上皮の脱分化に関与することを示す結果などを得つつある。さらに、生体内での TH 応答遺伝子の機能や、シグナル伝達経路間の相互作用についても明らかにするため、新たなトランスジェニックカエルの作製にも着手したところである。

Shh や Wnt シグナル伝達経路は、哺乳類の小腸上皮の細胞再生系の維持に関与していることが最近明らかになりつつある。本実験モデルで得られる成果は、陸上脊椎動物に共通な、消化管幹細胞を制御する分子機構への理解に寄与するものであり、研究のさらなる進展によりニッチ因子の解明が進んでいけば、消化器癌の発生機序の解明にも有用な情報を提供できると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① Hasebe T., Kajita M., Fu L., Shi Y.-B., Ishizuya-Oka A. (2012)
Thyroid hormone-induced sonic hedgehog signal up-regulates its own pathway in a paracrine manner in the *Xenopus laevis* intestine during metamorphosis.
Dev. Dyn. 241: 403-414 査読有
DOI: 10.1002/dvdy.23723
- ② Ishizuya-Oka A., Shi Y.-B. (2011)
Evolutionary insights into postembryonic development of adult intestinal stem cells.
Cell Biosci. 1: e37 査読有
DOI: 10.1186/2045-3701-1-37

- ③ Matoi N., Hasebe T., Suzuki KT., Ishizuya-Oka A. (2011)
Spatiotemporal expression profile of NO29/nucleophosmin3 in the intestine of *Xenopus laevis* during metamorphosis.
Cell Tissue Res. 344: 445-453 査読有
DOI: 10.1007/s00441-011-1163-0
- ④ Shi Y.-B., Hasebe T., Fu L., Fujimoto K., Ishizuya-Oka A. (2011)
The development of the adult intestinal stem cells: Insights from studies on thyroid hormone-dependent amphibian metamorphosis.
Cell Biosci. 1: e30 査読有
doi:10.1186/2045-3701-1-30
- ⑤ Hasebe T., Kajita M., Iwabuchi M., Ohsumi K., Ishizuya-Oka A. (2011)
Thyroid hormone-regulated expression of nuclear lamins correlates with dedifferentiation of intestinal epithelial cells during *Xenopus laevis* metamorphosis.
Dev. Genes Evol. 211: 199-208 査読有
DOI: 10.1007/s00427-011-0371-7
- ⑥ Ishizuya-Oka A. (2011)
Amphibian organ remodeling during metamorphosis: insight into thyroid hormone-induced apoptosis.
Dev. Growth Differ. 53: 202-212 査読有
doi: 10.1111/j.1440-169X.2010.01222.x.
- ⑦ Sun G., Hasebe T., Fujimoto K., Lu R., Fu L., Matsuda H., Kajita M., Ishizuya-Oka A., Shi Y.-B. (2010)
Spatio-temporal expression profile of stem cell-associated gene LGR5 in the intestine during thyroid hormone-dependent metamorphosis in *Xenopus laevis*.
PLoS ONE 5: e13605 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0013605
- ⑧ Hasebe T., Buchholz D.R., Shi Y.-B., Ishizuya-Oka A. (2010)
Epithelial-connective tissue interactions induced by thyroid hormone receptor are essential for adult stem cell development in the *Xenopus laevis* intestine.
Stem Cells 29: 154-161 査読有
doi: 10.1002/stem.560.
- ⑨ Ishizuya-Oka A. (2010)
Apoptosis in amphibian organs during metamorphosis.
Apoptosis 15: 350-364 査読有
DOI: 10.1007/s10495-009-0422-y
- ⑩ Mathew S., Fu, L., Hasebe T., Ishizuya-Oka A., Shi Y.-B. (2010)
Tissue-dependent induction of apoptosis by matrix metalloproteinase stromelysin-3 during amphibian metamorphosis.
Birth Defects Res. Part C 90:55-66 査読有

DOI: 10.1002/bdrc.20170

- ⑪ Ishizuya-Oka A., Hasebe T., Buchholz D. R., Kajita M., Fu L., Shi Y.-B. (2009)
The origin of the adult intestinal stem cells induced by thyroid hormone in *Xenopus laevis*.
FASEB J. 23(8):2568-2575 査読有
doi: 10.1096/fj.08-128124
- ⑫ Ishizuya-Oka A., Shi Y.-B. (2008)
Thyroid hormone regulation of stem cell development during intestinal remodeling.
Mol. Cell. Endocrinol. 288: 71-78 査読有
DOI: 10.1016/j.mce.2008.02.020
- ⑬ Hasebe T., Kajita M., Shi Y.-B., Ishizuya-Oka A. (2008)
Thyroid hormone-upregulated hedgehog interacting protein is involved in larval-to-adult intestinal remodeling by regulating sonic hedgehog signaling pathway in *Xenopus laevis*.
Dev. Dyn. 237: 3006-3015 査読有
doi: 10.1002/dvdy.21698

[学会発表] (計 10 件)

- ① 長谷部 孝、梶田満子、岡 敦子
アフリカツメガエル変態期の消化管再構築における転写因子 Gli1-3 の発現解析
第 82 回日本動物学会大会
旭川大雪クリスタルホール 2011 年 9 月 22 日
- ② 長谷部 孝、岡 敦子
ドミナントポジティブ型甲状腺ホルモン受容体の発現により誘起されるアフリカツメガエル成体型腸上皮の発生
第 43 回日本発生学会大会
京都国際会館 2010 年 6 月 22 日
- ③ 長谷部 孝、梶田満子、岡 敦子
アフリカツメガエル変態期の消化管における Smoothened の発現解析
第 81 回日本動物学会大会
東京大学駒場 2010 年 9 月 23 日
- ④ 長谷部 孝、梶田満子、岡 敦子
両生類の消化管再構築において Shh シグナルに応答して促進される Patched-1 の発現解析
第 80 回日本動物学会大会
静岡グランシップ 2009 年 9 月 17 日
- ⑤ Hasebe T., Kajita M., Ishizuya-Oka A.
Hedgehog interacting protein regulates Sonic hedgehog signaling essential for the intestinal remodeling during amphibian metamorphosis.
6th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology & Neurobiology
Berlin, Germany 2009 年 9 月 23 日
- ⑥ 岡 敦子、梶田満子、長谷部 孝
アフリカツメガエルの成体型小腸上皮を

形成する幹細胞の起源
第 79 回日本動物学会大会
福岡大学七隈 2008 年 9 月 7 日

[その他]
ホームページ等
<http://tlo.nms.ac.jp/researcher/762.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 敦子 (OKA ATSUKO)
日本医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50175254

(2) 研究分担者

()
研究者番号:

(3) 連携研究者

長谷部 孝 (HASEBE TAKASHI)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70329027