

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06751

研究課題名(和文)非神経細胞型アセチルコリン受容体を介した腸幹細胞の分化・増殖制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of regulatory mechanism of intestinal stem cell proliferation and differentiation via non-neuronal acetylcholine receptors

研究代表者

高橋 俊雄 (Toshio, Takahashi)

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・統合生体分子機能研究部・主幹研究員

研究者番号：20390792

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)：研究代表者は、チャネル型nAChRsの役割を調べた結果、腸幹細胞に隣接するパネート細胞に局在するチャネル型 $\alpha 2-4$ を介して腸幹細胞の分化・増殖が促進されていることを明らかにした。さらに、代謝型mAChRs (M1-M5) のノックアウトマウス(KOマウス)の解析から、M3-KOマウスのクリプトでは、EphB/ephrin-Bファミリー分子の濃度勾配の変動により、腸幹細胞の分化・増殖が促進されていることを見出した。すなわち、腸幹細胞に局在する代謝型M3を介して分化・増殖が抑制されていることを明らかにした。本研究により、代謝型M3とチャネル型 $\alpha 2-4$ を介した拮抗的な腸幹細胞の制御の一端が見えてきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、幹細胞やそのニッチを容易に同定することができる腸幹細胞システムをモデル系とすることにより、いまだ不明な点が多く残存する腸幹細胞と微小環境の相互作用によるホメオスタシスの維持機構の一端を明らかにすることができた。このことは、様々な組織幹細胞の基礎生物学的特性の理解にも繋がると考える。また、本研究により、腸上皮に存在するAChが腸幹細胞を制御する局所のシグナル分子であり、腸幹細胞制御の直接的及び間接的なACh作動性シグナリングが解明され、組織幹細胞による組織形成プログラムの解明に大きく貢献できると期待している。

研究成果の概要(英文)：Recent studies show that various mammalian non-neuronal cells synthesize acetylcholine (ACh) and operate cholinergic signaling via nicotinic and muscarinic ACh receptors (n- and mAChRs) in response to internal or external stimuli. Experiments using intestinal organoids that lack nerve and immune cells in culture show that endogenous ACh is synthesized in the intestinal epithelium to drive organoid growth and differentiation through activation of nAChRs and mAChRs. We found that ACh binds to $\alpha 2-4$ nicotinic ACh receptor, and induced Wnt signaling, and eventually proliferation and differentiation of intestinal stem cells (ISCs) are enhanced. Furthermore, Genetic ablation of M3 muscarinic ACh receptor showed to enhance proliferation and differentiation of ISCs through activation of EphB/ephrin-B signaling pathway. Collectively, signaling through the M3 and $\alpha 2-4$ appears to work together to maintain the homeostasis of intestinal epithelial cell growth and differentiation.

研究分野：動物生理学

キーワード：非神経性アセチルコリン オルガノイド 腸幹細胞 シグナル伝達経路 分化 増殖 組織形成 生体分子

1 . 研究開始当初の背景

腸上皮細胞は腸管の内側を覆っており、摂取した食物の消化・吸収、腸内細菌に対するバリア機能などの役割を担っている細胞である。これらの機能維持のために、腸上皮細胞は、常に陰窩（クリプト）に存在する腸幹細胞から新たに分化した細胞へと置き換わっている。従って、腸幹細胞の分化・増殖、維持が正常に行われることにより、小腸上皮の恒常性が維持されていると考えられる。

一方で ACh は神経化学伝達のメカニズムの発見につながった物質であることから、哺乳類における神経伝達物質として広く認識されている。しかしながら、ACh は細菌類、菌類、植物を含むほぼすべての生物種に[1,2]、また哺乳類の様々な非神経性細胞及び組織にも存在し[3]、局所的な細胞間の情報伝達に関与するなど[4]、様々な生理的役割を果たしていることが明らかになりつつある。すなわち、神経伝達物質としての ACh は、多様な役割のうちの一側面に過ぎないのかもしれない。そこで、研究代表者は、腸上皮細胞にも ACh が存在し、その機能が腸幹細胞の分化・増殖、維持を制御するという仮説を立てて、*ex vivo* 実験系の腸オルガノイド技術を用いた研究を開始した。

2 . 研究の目的

神経細胞型 ACh 受容体は主に神経細胞に発現し、神経伝達及び神経伝達の調節に関与している。一方、非神経系組織でも同受容体の発現が近年確認され、神経系とは異なる働きが示唆されている。最近、研究代表者は、ACh 受容体が腸上皮細胞及び腸幹細胞に発現し、リガンドである ACh を介して腸幹細胞の分化・増殖、及び維持に重要な生理的役割を果たすことを、腸オルガノイド技術により見出した。そこで本基盤研究では、ACh 受容体欠損マウスを用いて、腸幹細胞における代謝型ムスカリン性 ACh 受容体（mAChRs）とチャネル型ニコチン性 ACh 受容体（nAChRs）の機能及びシグナル伝達経路の違いを明らかにし、非神経細胞型 ACh 受容体を介した ACh の新規生理学的役割を解明することを目的とした。

3 . 研究の方法

（1）代謝型 mAChRs を介した非神経性 ACh の腸幹細胞制御

代謝型 mAChRs には M1 から M5 の 5 つのサブタイプが存在し、神経系ではそれぞれが固有の機能を担う。そこで、M1 から M5 まで全ての KO マウスを用い、腸幹細胞制御に対する各サブタイプの役割を直接的に明らかにする。これまでの成果から、腸上皮細胞から放出される内因性の ACh は、代謝型 mAChRs の M1, M2, M3 を介して腸幹細胞の幹細胞性の維持と分化抑制に関与していることを明らかにしている[5]。そこで、M1、M2 及び M3 の遺伝子の KO マウスの解析に着手する。M4 及び M5 については、今のところ腸幹細胞に対する機能は不明であるが、M4 及び M5 遺伝子が腸オルガノイドに発現していることを見出しているため[5]、まず各々の KO マウスの腸の形態を観察する。各々のサブタイプの下流域に働く遺伝子群については、全ての KO マウスについて、RNA-Seq 法によるトランス

クリプトーム比較解析を行う。そして、各々の代謝型 mAChR サブタイプの下流域で働くシグナル伝達経路の全体像を把握する。

(2) チャンネル型 nAChRs を介した非神経性 ACh の腸幹細胞制御

チャンネル型 nAChRs には様々なサブタイプが存在しており、サブユニットの組み合わせによって多様な表現型を有している。研究代表者は、腸幹細胞の分化・増殖を促進するチャンネル型 nAChRs のサブタイプが $\alpha 2\beta 4$ であることを突き止めている[6]。そこで、次にチャンネル型 nAChR サブタイプの $\alpha 2\beta 4$ を構成するサブユニット ($\alpha 2$ 及び $\beta 4$) のノックインマウス (KI マウス) の作製に着手する。方法は、CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いて、蛍光タンパク質を発現するサブユニット遺伝子の KO マウスを作出する (研究協力者: 岐阜大・医の大沢匡毅教授が担当)。各々の KI マウスが作製できれば、腸における形態・組織学的研究、機能学的研究、生化学的研究、及び RNA-Seq 解析を行い、WT マウスの場合と比較検討し、薬理実験で得られた成果の検証を行う。

(3) 代謝型 mAChRs とチャンネル型 nAChRs との機能的相互作用の解析

上記(1)(2)の結果から、どの ACh 受容体サブタイプが生体内の腸幹細胞において最も重要な働きを担っているかが明らかとなり、また、ACh 受容体サブタイプ同士が補完的な作用を持つ可能性についてより明瞭になる。仮説として、短期的にはチャンネル型 nAChRs を介して腸幹細胞の分化・増殖を促進する一方、長期的には、代謝型 mAChRs を介して腸幹細胞性の維持と分化抑制の方向に作用すると思われる。そこで、全ての代謝型 mAChR-KO マウス (M1-M5) におけるチャンネル型 nAChR サブユニット遺伝子の発現、及び $\alpha 2$ -, $\beta 4$ -KI マウスにおける代謝型 mAChRs の遺伝子発現解析、及び FACS を用いた単一細胞レベルでの解析を行う。

4. 研究成果

(1) 研究代表者は、5種類の代謝型 mAChR サブタイプ (M1-M5) の KO マウスの解析過程で、(a) M3-KO マウスのクリプトサイズが野生型マウス (WT マウス) に比べて増大していること、(b) クリプト領域の細胞増殖及び組織形成と領域化に關与する EphB2 受容体とそのリガンドである ephrin-B1, B2 の遺伝子発現が上昇していること、(c) EphB/ephrin-B シグナリングの下流域で働く MAPK/ERK シグナル伝達経路が活性化されていることを見出した。このことは、M3-KO マウスのクリプトサイズの増大は、腸幹細胞と未分化細胞の増殖が促進されているとともに、EphB/ephrin-B ファミリー分子の濃度勾配が変動しているためであると考えられた[7]。すなわち、WT マウスでは $M3 \rightarrow \text{EphB/ephrin-B} \rightarrow \text{MAPK/ERK}$ シグナルの協働によりクリプトの恒常性が維持されていると結論付けた。

(2) チャンネル型 nAChRs の役割について、腸オルガノイド培養系を用いた薬理実験及び RNA-Seq 解析から、Wnt シグナルを介して腸幹細胞の分化・増殖が促進されることを明らかにしている[6]。また、腸幹細胞制御に關与するチャンネル型 nAChRs は $\alpha 2\beta 4$ サブタイプで、腸幹細胞に隣接するパネート細胞に局在することも見出ししている[6]。そこで、 $\beta 4$ -KO キメ

ラマウスを作出し、その解析を行ったところ、クリプトサイズの減少が見られた。このクリプトサイズの減少は、パネート細胞を介した腸幹細胞の制御であり、その制御は Hippo-Notch シグナル伝達経路によることが示唆された[8]。

(3) 上記の成果から、代謝型 M3 (分化・増殖抑制) とチャンネル型 $\alpha 2\beta 4$ (分化・増殖促進) を介した ACh の拮抗作用による腸幹細胞の制御が考えられた[9]。また、先行研究として、腸上皮細胞の 1 種であるタフト細胞に ACh 合成酵素 (ChAT) が発現していることが明らかにされている[10]。本基盤研究により、腸幹細胞の幹細胞性を支える ACh シグナリング明らかとなり、“腸上皮コリン作動系ニッチ”という新たなホメオスタシスの維持機構を提唱できると期待している (図 1)。

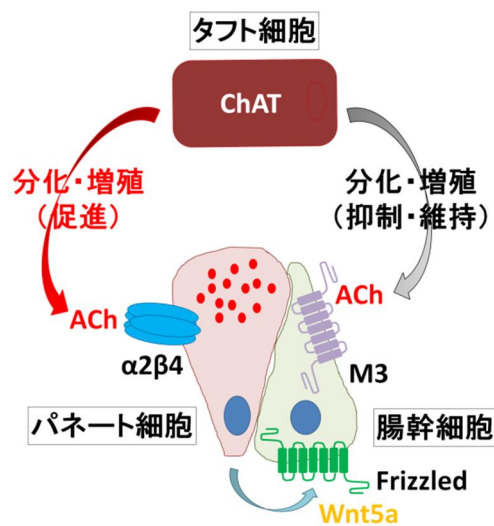


図1 3種の細胞による腸上皮コリン作動系ニッチの概念図。

<引用文献>

- [1] Horiuchi Y, Kimura R, Kato N, Fujii T, Seki M, Endo T, Kato T and Kawashima K. Evolutional study on acetylcholine expression. *Life Sci.* **72**, 2003, 1745-1756.
- [2] Murata J, Watanabe T, Sugahara K, Yamagaki T and Takahashi T. High-resolution mass spectrometry for detecting acetylcholine in *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.* **10**, 2015, e1074367.
- [3] Kawashima K and Fujii T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci.* **74**, 2003, 675-696.
- [4] Kakinuma Y, Akiyama T and Sato T. Cholinoceptive and Cholinergic Properties of Cardiomyocytes Involving an Amplification Mechanism for Vagal Efferent Effects in Sparsely Innervated Ventricular Myocardium. *FEBS J.* **276**, 2009, 5111-5125.
- [5] Takahashi T, Ohnishi H, Sugiura Y, Honda K, Suematsu M, Kawasaki T, Deguchi T, Orihashi K, Hippo Y, Watanabe T, Yamagaki T and Yuba S. Non-neuronal acetylcholine as an endogenous regulator of proliferation and differentiation of Lgr5-positive stem cells in mice. *FEBS J.* **281**, 2014, 4672-4690.
- [6] Takahashi T, Shiraishi A and Murata J. The coordinated activities of nAChR and Wnt signaling regulate intestinal stem cell function in mice. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2018, E738.
- [7] Takahashi T, Shiraishi A, Murata J, Matsubara S, Nakaoka S, Kirimoto S and Osawa M. Muscarinic receptor M3 contributes to intestinal stem cell maintenance via EphB/ephrin-B signaling. *Life Sci. Alliance* (2021) **4(9)**:e202000962.
- [8] Takahashi T, Shiraishi A and Osawa M. Upregulated nicotinic ACh receptor signaling contributes

to intestinal stem cell function through activation of Hippo and Notch signaling pathways. *Int. Immunopharmacol.* (2020) **88**:106984.

[9] Takahashi T. Multiple roles for cholinergic signaling from the perspective of stem cell function. *Int. J. Mol. Sci.* (2021) **22**:666.

[10] Schütz B, Jurastow I, Bader S, Ringer C, von Engelhardt J, Chubanov V, Gudermann T, Diener M, Kummer W, Krasteva-Christ G and Weihe E. Chemical coding and chemosensory properties of cholinergic brush cells in the mouse gastrointestinal and biliary tract. *Front. Physiol.* (2015) **6**:87.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Toshio Takahashi, Akira Shiraishi, Jun Murata, Shin Matsubara, Satsuki Nakaoka, Shinji Kirimoto, Masatake Osawa	4. 巻 4(9)
2. 論文標題 Muscarinic receptor M3 contributes to intestinal stem cell maintenance via EphB/ephrin-B signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Sci. Alliance	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202000962	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 Toshio Takahashi, Kazuo Fujishima, and Mineko Kengaku	4. 巻 22
2. 論文標題 Modeling intestinal stem cell function with organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222010912	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 Toshio Takahashi	4. 巻 22
2. 論文標題 Multiple roles for cholinergic signaling from the perspective of stem cell function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22020666	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 Ryota Matsuo, Suguru Kobayashi, Arisa Furuta, Tomohiro Osugi, Toshio Takahashi, Honoo Satake, and Yuko Matsuo	4. 巻 206
2. 論文標題 Distribution and physiological effect of enterin neuropeptides in the olfactory centers of the terrestrial slug Limax	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Comp. Physiol. A	6. 最初と最後の頁 401-418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00359-020-01400-2	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 Masatoshi Mita, Tomohiro Osugi, Toshio Takahashi, Takehiro Watanabe and Honoo Satake	4. 巻 290
2. 論文標題 Mechanism of gamete shedding in starfish: Involvement of acetylcholine in extracellular Ca ²⁺ -dependent contraction of gonadal walls	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gen. Comp. Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 113401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2020.113401	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 Toshio Takahashi	4. 巻 81
2. 論文標題 Roles of nAChR and Wnt signaling in intestinal stem cell function and inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. Immunopharmacol.	6. 最初と最後の頁 106260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2020.106260	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 Toshio Takahashi and Akira Shiraishi	4. 巻 21
2. 論文標題 Stem cell signaling pathways in the small intestine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 2032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21062032	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 F Morishita, T Takahashi, T Watanabe, T Uto, K Ukena, M Furumitsu and T Horiguchi	4. 巻 456
2. 論文標題 Identification of neuropeptides in gastropod mollusks. Classical and brand-new approaches	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IOP Conf. Ser.: Earth and Environ. Sci.	6. 最初と最後の頁 12001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1755-1315/456/1/012001	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 Toshio Takahashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Comparative Aspects of Structure and Function of Cnidarian Neuropeptides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front. Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2020.00339	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 三田雅敏、大杉知宏、高橋俊雄、渡辺健宏、佐竹炎	4. 巻 46
2. 論文標題 ヒトデの配偶子放出のメカニズム：ヒトデの放卵・放精はアセチルコリンによるCa ²⁺ -influxにより誘起される	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 比較内分泌学	6. 最初と最後の頁 79-81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5983/nl2008jsce.46.79	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 Hitoshi Tsugawa, Yasuaki Kabe, Ayaka Kanai, Yuki Sugiura, Shigeaki Hida, Shun-ichiro Taniguchi, Toshio Takahashi, Hidenori Matsui, Zenta Yasukawa, Hiroyuki Itou, Keiyo Takubo, Hidekazu Suzuki, Kenya Honda, Hiroshi Handa and Makoto Suematsu	4. 巻 18
2. 論文標題 Short-chain fatty acids bind to apoptosis-associated speck-like protein to activate inflammasomal complex to prevent Salmonella infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS Biol.	6. 最初と最後の頁 e3000813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3000813	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 Toshio Takahashi, Akira Shiraishi and Masatake Osawa	4. 巻 88
2. 論文標題 Upregulated nicotinic ACh receptor signaling contributes to intestinal stem cell function through activation of Hippo and Notch signaling pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. Immunopharmacol.	6. 最初と最後の頁 106984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2020.106984	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3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋俊雄
2. 発表標題 代謝型ムスカリン性ACh受容体M3は、EphB/ephrin-Bシグナリングを介して腸上皮幹細胞の維持に貢献する
3. 学会等名 第55回日本発生活物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋俊雄
2. 発表標題 腸の活発な再生・分化を支える非神経性アセチルコリンシグナリング
3. 学会等名 第46回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋俊雄
2. 発表標題 タイプ3ムスカリン性アセチルコリン受容体はephrinB/EphB receptorシグナリングを介して腸幹細胞分化・増殖を制御する
3. 学会等名 第53回日本発生活物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 高橋俊雄	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 4
3. 書名 BIO Clinica	

1. 著者名 Toshio Takahashi	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Apple Academic Press, USA	5. 総ページ数 406
3. 書名 Advances Invertebrate (Neuro)Endocrinology	

1. 著者名 高橋俊雄	4. 発行年 2020年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 3
3. 書名 Precision Medicine	

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人サントリー生命科学財団 http://www.sunbor.or.jp/
--

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
研究協力者	大沢 匡毅 (Osawa Masatake)	岐阜大学・大学院医学系研究科・教授	

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			
米国	NIDDK			