

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08001

研究課題名(和文) 消化管杯細胞系統による上皮恒常性・粘膜再生の制御機構

研究課題名(英文) Homeostasis and regeneration of intestinal epithelium regulated by goblet cell lineage

研究代表者

黒川 憲 (Kurokawa, Ken)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40868999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：粘膜障害・再生時には幹細胞ニッチから分泌されるRspodin3(Rspo3)が重要な働きをもつことが近年示唆されている。今回、消化管上皮に発現するRspo3の受容体の一つであるLgr4に着目し、消化管上皮特異的にRspo3を過剰発現またはLgr4を欠損する遺伝子改変マウスを新規に作成し、Rspo3-Lgr4シグナルによる消化管上皮幹細胞活性化と上皮恒常性維持機構、さらに杯細胞やパネート細胞を始めとする幹細胞ニッチの重要性について解析した。また、幹細胞や前駆細胞のレポーターマウスを用いた検討では、Rspo3-Lgr4シグナルは前駆細胞の活性化を介して消化管上皮恒常性に寄与す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

炎症性腸疾患は、近年多くの薬剤が臨床応用され、以前は外科的切除されていた重症例や難治例においても長期に腸管を温存することができるようになった。一方で、特に発症後に長期間慢性炎症が持続した症例では、粘膜リモデリングや炎症発癌が問題となっている。消化管上皮恒常性の破綻は、炎症や発癌に大きな影響があると考えられるが、その詳細は不明な点が多かった。今回、粘膜障害・再生時にRspo3-Lgr4シグナルが重要な働きをもつことが明らかになり、今後、新たな炎症・発癌メカニズムの解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have suggested that Rspodin3 (Rspo3) secreted from stem cell niches plays an important role in mucosal injury and regeneration. In this study, we focused on Lgr4, one of the receptors for Rspo3 expressed in the gastrointestinal epithelium. We generated transgenic mice that overexpress Rspo3 specifically in the gastrointestinal epithelium or lack Lgr4, and analyzed the importance of the Rspo3-Lgr4 signaling pathway in the activation of gastrointestinal stem cells and the maintenance of epithelial homeostasis. We also examined the role of the stem cell niche, including goblet cells and Paneth cells. Furthermore, by combining these transgenic mice with reporter mice for stem cells and progenitor cells, we suggested that the Rspo3-Lgr4 signaling pathway contributes to gastrointestinal epithelial homeostasis through the activation of progenitor cells.

研究分野：消化器内科

キーワード：消化管上皮恒常性 粘膜再生 幹細胞 前駆細胞 Wnt Rspodin Lgr

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患 (IBD) は主に消化管に原因不明の慢性炎症を生じる難治性疾患であるが、近年多くの薬剤が臨床応用され、以前は外科的切除されていた重症例や難治例においても長期に腸管を温存できるようになった。一方で、特に発症後に長期間慢性炎症が持続した症例では、粘膜リモデリングや炎症発癌が問題となっている。IBD の発症・増悪には、腸内細菌叢や免疫反応の異常、粘膜上皮恒常性の破綻等が複雑に関与している。なかでも上皮恒常性の破綻は、炎症や発癌に直接的な影響があると考えられるが、詳細は不明な点が多い。上皮恒常性の維持には、腺底部にある Lgr5 + 幹細胞が適切に分裂・分化を繰り返す必要があるが、その制御には幹細胞ニッチが必須である。Rspo3 は Lgr 受容体と結合し、Wnt 関連分子と複合体を形成することで Wnt 経路の活性化に極めて重要である。通常 Rspo3 は腺底部の間質細胞より分泌され、幹細胞に発現する Lgr5 へ作用して幹細胞能を維持するが、Lgr5+幹細胞は障害に弱く、粘膜障害により容易に消失する。近年、Rspo3 はより分化した細胞群に発現する Lgr4 にも作用することが報告され、Rspo3-Lgr4 シグナルは、腸管リモデリングや将来的な炎症発癌に関与する可能性が示唆されるが、詳細は明らかになっていない。以上より、慢性炎症による粘膜障害下の上皮恒常性がどのように維持され、その破綻が粘膜リモデリングや炎症発癌にどのように影響するのか、特に Rspo3-Lgr4 シグナルに着目し、解析を行った。

2. 研究の目的

本研究では、粘膜障害下の上皮恒常性に重要である可能性が示唆されている Rspo3-Lgr4 シグナルに着目し、その異常が消化管幹細胞活性化と上皮恒常性維持機構に及ぼす影響と機序について、さらに杯細胞やパネート細胞を始めとする幹細胞ニッチが粘膜障害・再生過程において果たす機能・役割について、申請者が独自に作製した複数の遺伝子改変マウスを組み合わせ、明らかにすることを目的とした。得られた成果は、IBD の発症・増悪機序の解明、慢性障害による上皮恒常性破綻と粘膜リモデリングや炎症発癌機序の解明等に貢献し、IBD の新規予防・治療法の確立につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Rspo3-Lgr4 シグナルの消化管上皮恒常性への影響を検討するため、Tet-On システムを用いて腸管上皮で選択的に Rspo3 を過剰発現する Rspo3 マウス、Lgr4 を欠損する Lgr4FF マウス、Rspo3 を過剰発現かつ Lgr4 を欠損する Rspo3;Lgr4FF マウスをそれぞれ新規に作成し、HE 染色や免疫組織化学染色により形態変化を解析する。

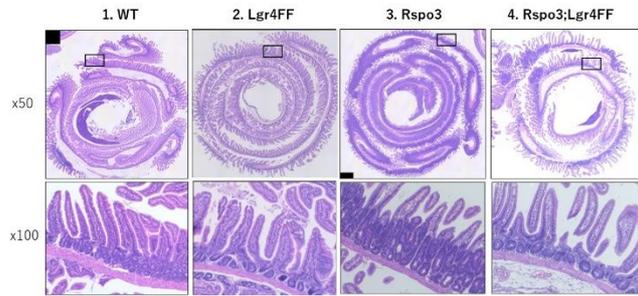
(2) Rspo3-Lgr4 シグナルのマウス腸管上皮恒常性への影響や関連するシグナル経路を検討するため、野生型と今回新規に作成した Rspo3 マウス、Lgr4FF マウス、Rspo3;Lgr4FF マウスの腸管組織からそれぞれ RNA を抽出し、網羅的遺伝子発現解析を行う。

(3) Rspo3-Lgr4 シグナルの消化管上皮幹細胞や前駆細胞の分化への影響を検討するため、野生型および Rspo3 マウスを Rosa26-LSL-TdTomato レポーターマウスと交配し、細胞系譜解析を行った。

4. 研究成果

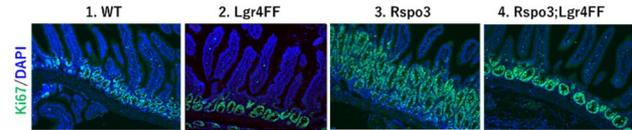
(1) 消化管上皮で特異的に Rspo3 を過剰発現する Rspo3 マウスでは腸陰窩の著明な肥厚を認めた一方で、同時に Lgr4 を欠損する Rspo3;Lgr4FF マウスでは形態変化が軽減しており、Rspo3 の受容体として Lgr4 の重要性が示唆された(図1)。免疫組織化学染色では Rspo3 マウスでは Ki67 + 増殖細胞が増加(図2)しており、パネート細胞等の特定の消化管上皮構成細胞も増加していた(図3)が、Rspo3;Lgr4FF マウスではいずれの変化も軽減していた。また、

図1



Rspo3 マウスを長期に観察すると、Ki67 陽性細胞は増加傾向が持続して異型性を生じたが、Rspo3;Lgr4FF マウスでは軽減した(図4)。

図2



(2) 野生型、Lgr4FF マウス、Rspo3 マウス、Rspo3;Lgr4FF マウスの腸管組織からそれぞれ抽出した RNA を用いて網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、Rspo3 マウスでは Wnt 関連遺伝子の発現が増加しており、Rspo3;Lgr4 マウスでは Wnt 関連遺伝子の発現が減少していた(図5)。

図3

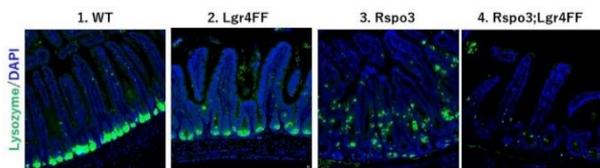
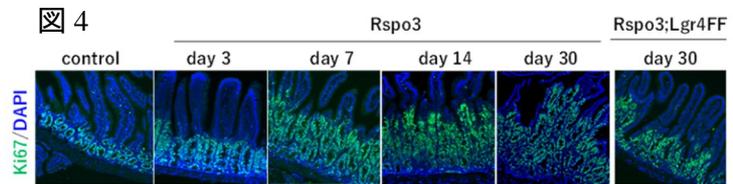
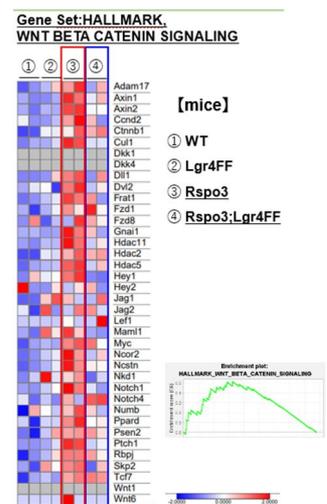


図4



現在、Rspo3-Lgr4 シグナルに関連する候補遺伝子についてさらに詳細な解析を進めている。

図5

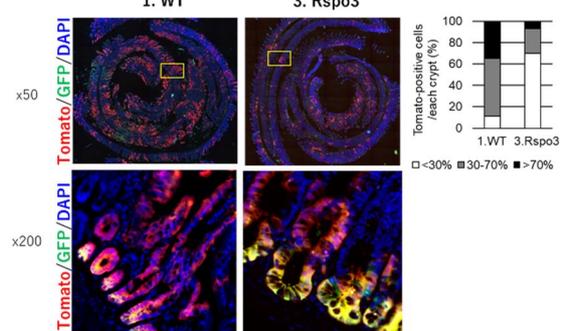


(3) Rspo3-Lgr4 シグナルの消化管上皮幹細胞や前駆細胞の分化への影響を検討するため、野生型および Rspo3 マウスをレポーターマウスと交配し、消化管上皮幹細胞や前駆細胞の細胞系譜解析を行った。

消化管上皮で Rspo3 を過剰発現させると腸陰窩の著明な肥厚が生じるが、Lgr5 + 消化管上皮幹細胞からの分化は寧ろ抑制されており、特定の前駆細胞の増加や分化が誘導されている可能性が示唆された(図6)。

以上より、Rspo3-Lgr4 シグナルは、腸上皮の恒常性制御において極めて重要な役割を果たすことが示されたが、Rspo3 シグナルを受ける Lgr4+ 前駆細胞の詳細や下流のシグナル経路など、依然として明らかになっていない点も多く、引き続き詳細な解析を進めていく方針である。

図6



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kurokawa Ken, Wang Timothy C., Hayakawa Yoku	4. 巻 132
2. 論文標題 R-spondin 3 governs secretory differentiation in the gastric oxyntic glands	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 e163380
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI163380	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 該当する

1. 著者名 黒川 憲、藤城 光弘	4. 巻 38
2. 論文標題 特集 あなたの知らないIBD診療の世界 1. 既存治療のupdate(4)UCにおけるバイオ製剤を回避する方法 - サラソスルファピリジン, 局所製剤およびチオプリン製剤の上手な使い方	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 臨床消化器内科	6. 最初と最後の頁 387 ~ 392
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.19020/CG.0000002566	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 黒川憲、早河翼、藤城光弘
2. 発表標題 臓器移植後免疫抑制状態に生じた新規・増悪IBDと感染性腸炎の病態と治療
3. 学会等名 Japan Digestive Disease Week 2022
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 黒川憲、井原聡三郎、藤城光弘
2. 発表標題 肝移植治療前後における原発性硬化性胆管炎患者に合併する潰瘍性大腸炎の特徴と課題
3. 学会等名 第109回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2023年 ~ 2024年

1. 発表者名 黒川憲、早河翼、藤城光弘
2. 発表標題 R-spondin 3/Lgr4シグナルによる胃上皮幹細胞制御
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Ken Kurokawa, Yoku Hayakawa, Mitsuhiro Fujishiro
2. 発表標題 REGULATION OF GASTRIC MUCOSAL HOMEOSTASIS BY R-SPONDIN 3-LGR4 SIGNAL
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Chihiro Shiomi, Ken Kurokawa, Yoku Hayakawa, Mitsuhiro Fujishiro
2. 発表標題 Regulation of Intestinal Epithelial Homeostasis by R-spondin 3-Lgr4 Signal
3. 学会等名 JCA-AACR Special Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2024年～2025年

1. 発表者名 塩見千尋、黒川憲、井原聡三郎、村上恵太、坪井真代、山下綾、木下裕人、早河翼、藤城光弘
2. 発表標題 当院での潰瘍性大腸炎におけるステロイド漸減に関する検討
3. 学会等名 第110回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2024年～2025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
研究 分担 者	早河 翼 (Hayakawa Yoku) (60777655)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	

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