

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670113

研究課題名(和文)冬眠動物における腸粘膜上皮の細胞更新遅滞現象

研究課題名(英文)Retardation of epithelial cell renewal in the intestine of hibernating Syrian hamsters

研究代表者

園山 慶 (Sonoyama, Kei)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90241364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに、シリアンハムスターの冬眠時の腸粘膜上皮の細胞更新が著しく遅滞することを観察した。本研究ではその分子機序に関する情報を得ることを目的とした。まず、二種類のチミジンアナログを用いた二重標識法による陰窩-絨毛軸に沿った腸上皮細胞の移動速度の推定法を確立し、覚醒および冬眠個体の細胞移動速度をそれぞれ 5.9 ± 0.6 および 0.9 ± 0.2 $\mu\text{m}/\text{h}$ と推定した。免疫組織化学とRT-qPCRの結果、Wnt/カテニン経路とIhhシグナルのいずれも細胞更新遅滞に関与しないと考えられた。ハムスターの小腸上皮オルガノイド培養に成功し、これを用いて腸上皮細胞更新の制御因子の探索が可能になった。

研究成果の概要(英文)：Our preliminary observation suggests a marked retardation of cell renewal in the intestinal epithelium of hibernating Syrian hamsters. The present study aimed to obtain informations regarding molecular basis of this phenomenon. We established a dual labeling method using two thymidine analogues for estimating the cell migration rate along the crypt-villus axis in the intestinal epithelium. With this method, we estimated 5.9 ± 0.6 and 0.9 ± 0.2 $\mu\text{m}/\text{h}$ for the cell migration rates in the intestinal epithelium of active and hibernating hamsters, respectively. Immunohistochemistry and RT-qPCR analysis showed that Wnt/ -catenin pathway and Indian hedgehog signaling are unlikely to be involved in the retardation of cell renewal in the intestinal epithelium of hibernating hamsters. Finally, we successfully isolated the intestinal crypts from hamsters and cultured the organoids consisting of epithelial cells. Further studies will proceed to elucidate the molecular basis by using the organoidies.

研究分野：消化管生理学

キーワード：生理学 冬眠 腸 上皮細胞 細胞更新 ハムスター

1. 研究開始当初の背景

腸粘膜上皮は生体内で最も速い細胞更新を行う体性幹細胞系によって構築されており、その恒常性は厳密に調節されている。しかしながら、その分子機構の全体像は明らかになっていない。我々はこれまで、シリアンハムスターを用いて冬眠時の消化管生理に関する研究を行ってきた。その過程において、冬眠個体の腸粘膜上皮の細胞更新が著しく遅滞することを示唆する観察結果を得た。また、細胞更新の遅滞にともなう細胞の微細構造（刷子縁膜を構成する微絨毛）の変化、消化酵素活性の上昇、杯細胞のムチン糖鎖の変化、および細胞老化関連βガラクトシダーゼ活性の上昇が認められ、これらの知見から、冬眠個体の小腸粘膜上皮における細胞更新遅滞により、細胞寿命の延長にともなう上皮の過成熟と細胞老化が生じるものと推察した。しかしながら、冬眠個体において腸粘膜上皮の細胞更新遅滞を誘導する分子機序は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、冬眠ハムスターの腸粘膜上皮における細胞更新遅滞の分子機序に関する情報を得ることを目的とする。具体的には以下のようなものである。

- (1) 小腸粘膜上皮の陰窩-絨毛軸に沿った細胞移動速度を正確に推定する方法を確立し、冬眠個体と覚醒個体の細胞移動速度を比較する。
- (2) 小腸粘膜上皮の陰窩-絨毛軸に沿った細胞増殖・分化・移動に関する分子について、ハムスターの覚醒個体と冬眠個体との比較により、冬眠による発現動態を明らかにする。
- (3) ハムスターの小腸粘膜上皮組織を *in vitro* で培養し、細胞更新の遅滞を支配する分子を探索する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

(2)で述べるチミジンアナログを用いた上皮細胞移動速度の推定方法の確立には、6週齢の雄性 Wistar 系ラットを用い、精製飼料 (AIN-93G) を自由摂取させて飼育した。一方、冬眠実験には、10週齢の雄性シリアンハムスターを用い、4、24時間暗黒条件で飼育することにより冬眠を誘導し、冬眠開始の約1ヶ月後に安楽死させて臓器を採取した。対照とした覚醒個体は、23±2、12時間照明条件下で飼育した。飼料はいずれもハムスター用市販非精製飼料を自由摂取させた。

- (2) チミジンアナログを用いた上皮細胞移動速度の推定

5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) および 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)

をラットに一定時間間隔で投与し、一定時間後に安楽死させて小腸組織切片を作成し、BrdU を免疫組織化学により、EdU をクリックケミストリーにより検出した。BrdU 陽性細胞と EdU 陽性細胞間の距離を時間で除すことにより、細胞移動速度を推定した。また、この方法をハムスターの冬眠個体および覚醒個体に適用し、それぞれの小腸上皮細胞移動速度を推定した。なお、BrdU および EdU の冬眠個体への投与は、中途覚醒時に行った。

(3) 組織化学

定法によりパラフィン切片あるいは凍結切片を作成し、一次および二次抗体として抗 BrdU マウス IgG および HyLyte Fluor 555 標識抗マウス IgG ウサギ IgG を用いて BrdU を検出した。一方、EdU の検出には Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit を用いた。また、βカテニン、E-カドヘリン、およびタイトジャンクション関連タンパク (claudin-1 および ZO-1) の免疫組織化学を定法通り行った。

(4) mRNA 発現解析

小腸粘膜から Trizol 試薬を用いて全 RNA を分離し、ゲノム DNA を DNase により除去した後に逆転写して 1st-strand cDNA を得た。これを鋳型にしてリアルタイム定量 PCR (RT-qPCR) により mRNA レベルを比較した。内部標準として GAPDH を用いた。

(5) 腸管透過性の推定

FITC-dextran (FD4、平均分子量 4,000) をハムスターに経口投与し、1時間後の血清の FITC を蛍光分光光度計により定量し、腸管透過性の指標とした。なお、FITC-dextran の冬眠個体への投与は、中途覚醒時に行った。

(6) 小腸オルガノイドの培養と解析

小腸上皮細胞のみから構成される構造体であるオルガノイドを、Sato *et al.* (2009) にしたがって培養した。すなわち、ハムスターから小腸を摘出して陰窩を分離し、Noggin および R-Spondin 1 を添加した培地を用いて Matrigel 中で培養することによりオルガノイドを構築した。EdU を培地に添加した後、(3)と同様にして EdU 陽性細胞を検出し、共焦点顕微鏡で観察した。また、ハムスターの血清および小腸粘膜ホモジネート上清を培地に添加して培養したときのオルガノイドの形態および EdU 陽性細胞の割合を比較した。

4. 研究成果

(1) 小腸粘膜上皮の細胞移動速度

図1に示したように、ラットに BrdU お

よび EdU を一定時間間隔で投与し、組織切片上でそれぞれを免疫組織化学およびクリックケミストリーで検出する二重標識法により、陰窩-絨毛軸に沿った細胞移動速度を推定することが可能となった。この方法では、BrdU と EdU は交差反応せず、互換性があること、BrdU と EdU の投与の順番および時間間隔が移動速度推定に影響しないことを確認している。この方法を用いてハムスターの冬眠個体と覚醒個体における小腸粘膜上皮の細胞移動速度を推定した結果、前者で $5.9 \pm 0.6 \mu\text{m/h}$ 、後者で $0.9 \pm 0.2 \mu\text{m/h}$ であった。この結果より、絨毛基部から先端まで移動するのに要する日数を算出したところ、覚醒個体で約 3 日であるのに対し、冬眠個体で約 23 日であり、細胞更新が著しく遅滞していることが明らかになった。さらに、BrdU パルス実験による陰窩内の増殖細胞割合の比較において、覚醒個体に比較して冬眠個体で有意に低値を示した (60 ± 10 vs. $20 \pm 4\%$)。

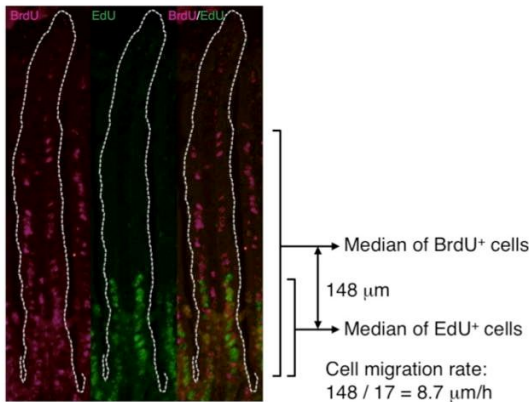


図1 BrdUとEdUの二重標識法を用いたラット小腸粘膜上皮の細胞移動速度の推定(赤、BrdU; 緑、EdU; 白点線、絨毛の輪郭)

(2) 上皮細胞の増殖・分化・移動に関する分子

腸上皮細胞の増殖・分化・移動は、Wnt/ β カテニン経路、BMP シグナル、Notch シグナル、Indian hedgehog (Ihh) シグナル等により調節されている (Logan & Nusse 2004)。本研究では、Wnt/ β カテニン経路について β カテニンと E-カドヘリンの発現様式を免疫組織化学により観察し、Ihh について RT-qPCR により mRNA レベルを比較した。その結果、 β カテニンのシグナルは絨毛上皮の細胞間および陰窩底部の細胞核に認められ、E-カドヘリンのシグナルは絨毛上皮の細胞間に認められたが、いずれも覚醒個体と冬眠個体との間に差はみられなかった (図 2)。したがって、冬眠個体の細胞増殖低下は Wnt/ β -カテニン経路の変化によるものではないと考えられた。また、Ihh mRNA レベルは覚醒個体に比して冬眠個体で約 50%に低下し

ていた。この結果は、マウスにおける Ihh シグナルの阻害が上皮細胞の移動速度増加につながったという報告 (Tang *et al.* 2006) と一致しない。つまり、Wnt/ β カテニン経路と Ihh シグナルのいずれも冬眠ハムスターの腸粘膜上皮における細胞更新遅滞には関与しないと考えられる。

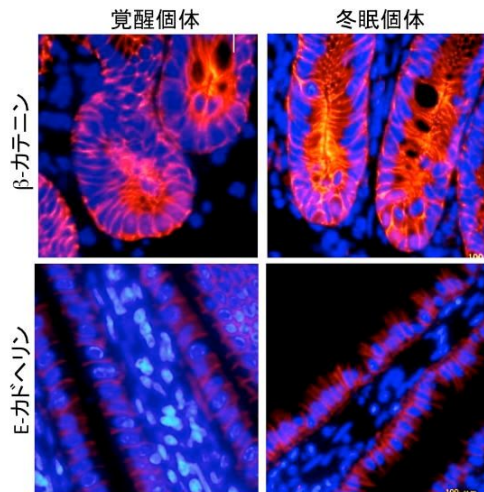


図2 ハムスターの小腸における β -カテニンとE-カドヘリンの発現(赤はそれぞれの免疫組織染色、青はDAPI染色)

(3) 腸粘膜バリア

前述したように、冬眠ハムスターの小腸粘膜上皮においては細胞更新遅滞にもなって上皮の過成熟と細胞老化が生じると考えられたので、その結果として腸粘膜バリア機能に変化が生じると予想し、これを解析した。難吸収性の蛍光プローブである FD4 を経口投与した後の血清中濃度を測定したところ、覚醒個体に比較して冬眠個体で有意な高値を示したので (0.12 ± 0.01 vs. $1.27 \pm 0.15 \text{ nM}$)、冬眠個体において腸管透過性が亢進していると考えられた。この機序としてタイトジャンクションに着目し、その構成タンパクである claudin-1 と ZO-1 の mRNA レベルを比較した結果、覚醒個体と冬眠個体で差はみられなかった。一方、免疫組織化学により、覚醒個体では上皮細胞間に claudin-1 陽性シグナルが確認でき、

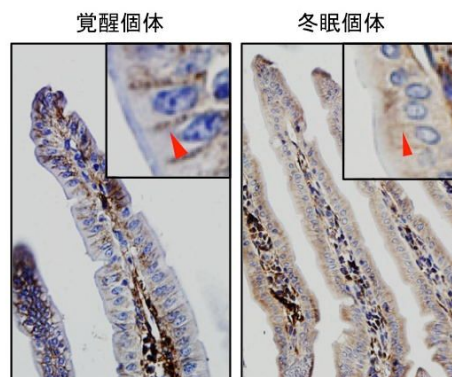


図3 ハムスターの小腸におけるclaudin-1タンパクの発現

細胞質部分ではみられなかった。冬眠個体では覚醒個体に比べて細胞間のシグナルは弱く、細胞質にびまん性にシグナルが確認された(図3)。このことから、冬眠時にはタントジャンクションの機能が低下する結果として腸管透過性が亢進する可能性が考えられた。

(4) 小腸オルガノイドを用いた探索

Sato *et al.* (2009) が報告したマウスの小腸オルガノイドと同様に、ハムスターの小腸陰窩からオルガノイドを作成・培養することに成功した(図4)。また、EdU パルスにより DNA 合成を行っている増殖細胞を共焦点顕微鏡により観察することができた。このことについて覚醒個体と冬眠個体から作成したオルガノイドにおいて差はみられなかったため、冬眠時の小腸粘膜上皮の細胞更新遅滞は幹細胞レベルで生じているものではないと推察した。また、覚醒個体および冬眠個体の小腸粘膜ホモジネート上清を添加した場合は、いずれもオルガノイドの形成が阻害された。現在のところ、オルガノイドを用いたアッセイ系により上皮細胞更新を制御する因子を見いだすに至っていない。

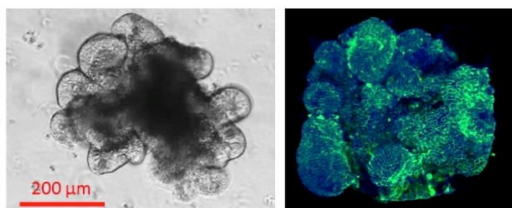


図4 ハムスターの小腸陰窩から作成したオルガノイド(左)とEdU陽性細胞(右、緑)

<引用文献>

Logan CY & Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.

Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ & Clevers H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009;459:262-265.

Tang Y, Swietlicki EA, Jiang S, Buhman KK, Davidson NO, Burkly LC, Levin MS & Rubin DC. Increased apoptosis and accelerated epithelial migration following inhibition of hedgehog signaling in adaptive small bowel postresection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G1280-G1288.

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1件)

Asano M, Yamamoto T, Tsuruta T, Nishimura N, Sonoyama K. Dual labeling with 5-bromo-2'-deoxyuridine and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine for estimation of cell migration rate in the small intestinal epithelium. *Development, Growth & Differentiation* 2015; 57: 68-73. (査読有) DOI: 10.1111/dgd.12191

[学会発表](計3件)

浅野 真未、園山 慶、冬眠シリアンハムスターの小腸におけるタイトジャンクション関連タンパク質の発現、第68回日本栄養・食糧学会大会、2014年5月31日、酪農学園大学(北海道江別市)

浅野 真未、園山 慶、冬眠シリアンハムスターの小腸における粘膜バリアの解析、日本栄養・食糧学会北海道支部会、2013年10月26日、北海道大学(北海道札幌市)

浅野 真未、山本 達朗、西村 直道、園山 慶、冬眠シリアンハムスターの小腸粘膜上皮における細胞更新に関する免疫組織化学、第67回日本栄養・食糧学会大会、2013年5月26日、名古屋大学(愛知県名古屋市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/fbc/sonoyama/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

園山 慶 (SONOYAMA, Kei)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 90241364