

33. 腸管上皮のターンオーバーにおける細胞死の研究

川根 公樹

京都産業大学 総合生命科学部 生命システム学科

Key words : 細胞死, 腸管, 上皮細胞, 細胞脱落

緒言

私達の腸上皮は生涯を通じて細胞のターンオーバーが行われる¹⁾。本研究は、このとき腸管上皮細胞でおこるアポトーシスともネクローシスとも異なる細胞死(細胞脱落)に着目し、その分子機構を解明することを目的とする。細胞脱落において、細胞死する細胞は、隣接細胞が細胞境界に形成するアクチン-ミオシンリングの収縮によって押し出されて組織から除かれる²⁾。またこの時、脱落細胞が占めていたスペースは隣接細胞によってシールされ、上皮のバリア機能が損なわれるのを防ぐ。すなわち細胞脱落は、隣接細胞との相互、協調作用によって行われる点が大きな特徴であり、これまで研究が進んできた浮遊細胞の細胞死と異なって分子機構の理解は遅れている。本研究では、細胞脱落の分子機構の解明を通じて腸管の恒常性及びその破綻による疾患(腸炎や癌など)を理解し、これまでにない側面から新規治療法の開発に道を拓くことを目指す。

方法

細胞脱落は、要旨の図に示すようにどのように脱落すべき細胞が決定されるか(脱落の運命決定)、脱落が隣接細胞との相互作用を通じてどのように実行されるか(脱落の実行)、細胞が脱落した後の間隙がどのようにシールされるか(脱落後の組織修復)の3つの過程によって行われる。本研究では、上皮細胞の細胞脱落の一連の過程の分子機構を解明するために、ショウジョウバエ腸上皮、マウス培養腸組織(オルガノイド)、ヒト及びマウス培養細胞を解析系として用い、以下の三つの戦略と手法を駆使して研究を行う。

1. マウス小腸上皮において、まもなく脱落する古い細胞と若い細胞のマイクロアレイ解析を行い、脱落の運命を決定する機構を解明する。
2. 私達が樹立したRNAiスクリーニング系をショウジョウバエの腸上皮で用いて、脱落の各過程を司る遺伝子を同定する。
3. マウスオルガノイド、ヒト及びマウス培養細胞を用い、細胞脱落に重要な役割を果たす可能性の高い分子のライブイメージング解析により、脱落の実行機構及び組織修復機構を解明する。

結果

1. マウス小腸上皮を用いたマイクロアレイ解析

細胞脱落に関与する遺伝子の候補を抽出するため、マウス小腸において細胞脱落のおこる絨毛頂端部と、細胞脱落のおきないその下部における遺伝子発現の比較解析を行った。具体的には、マウス小腸の組織切片を用い、図1に示すように絨毛部を区分して、その内3カ所(頂端部の上部1/3、頂端部の下部2/3、中間部)をマイクロダイセクション法で分離した。続いて分離した各部よりRNAを抽出してマイクロアレイ解析を行った。その結果、絨毛頂端部で遺伝子発現が上昇する遺伝子を149個、減少する遺伝子を123個抽出した(未発表)。

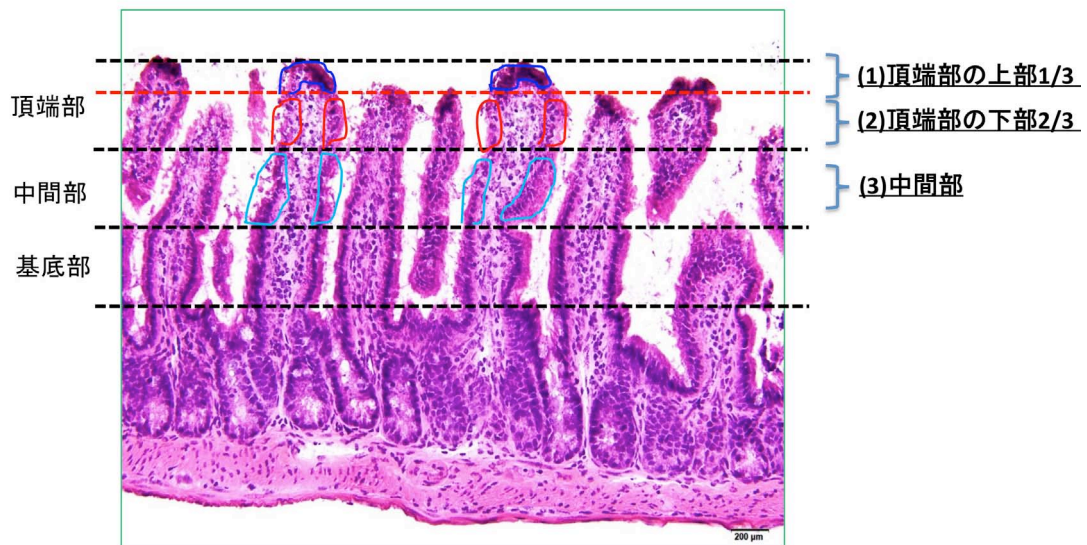


図1. マウス小腸上皮を用いたマイクロダイセクション及びマイクロアレイ解析
頂端部の上部 1/3、頂端部の下部 2/3、中間部の 3 カ所をそれぞれマイクロダイセクション法で分離した。

2. ショウジョウバエ腸管上皮を用いた RNAi スクリーニング

細胞脱落に関与する遺伝子を同定するため、ショウジョウバエの腸管上皮を用いた RNAi スクリーニングを開始した。まず、腸管の恒常性に異常を示す表現型を指標に一次スクリーニングを行った。具体的には、分化した腸上皮細胞で RNAi を誘導して各遺伝子のノックダウンを行い、腸の形態、サイズ、細胞数、腸管バリア機構などについて異常を示すものを検索した。現時点ではまだ 50 遺伝子（系統）の一次スクリーニングを完了したところであり、今後本格的にスクリーニングを推進する予定であるが、既に、腸の形態に大きな異常を示す系統などを複数同定している（図 2、図 3）。

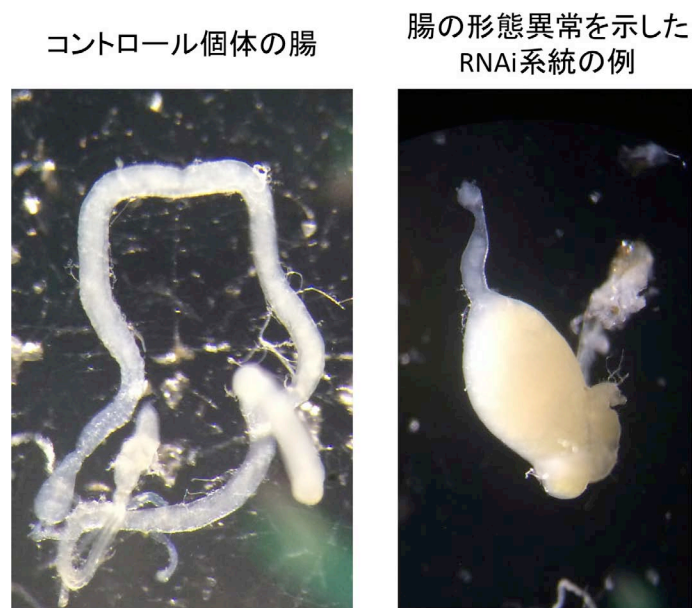


図2. RNAi 一次スクリーニングにおいて腸の形態に異常を示した例
RNAi を誘導した腸では、サイズ、形態に異常が観察された。



図3. RNAi一次スクリーニングにおいて腸管のバリア機能に異常を示した例

ショウジョウバエに青色色素を含む餌を摂取させた。野生型では腸管のバリア機能のため色素は消化管内に留まるが、バリア機能が破綻した個体では、体全身に色素が漏洩する。

3. 哺乳類培養細胞を用いたライブイメージング解析

哺乳類上皮培養細胞を用いて細胞脱落の解析を行うため、まず、ヒト、マウス上皮由来の計17種（Caco-2、T47D、DLD-1、EpH4細胞など）の細胞株のタイムラプス観察を行い、細胞脱落が頻度よくおこる細胞株を3種選定した。続いてそれら細胞を用いて、細胞脱落がおこる際の分子動態の解析を行うため、細胞骨格、細胞接着、細胞極性などに関するタンパク質と蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現する安定発現株の樹立を行った。アクチンを可視化できるプローブ（LifeAct）と蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現するDLD-1細胞など、ライブイメージング解析可能な安定発現株を複数樹立し、これらを用いて現在解析を行っている。細胞接着分子カドヘリンと蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現するEpH4細胞など、いくつかのものについては現在、作製中である。

考 察

1. マウス小腸上皮を用いたマイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析の結果、最頂端部で発現が変動していた遺伝子には、発現が減弱した細胞接着分子や、発現が上昇した細胞骨格リモデリング分子などが含まれる。これらの遺伝子は、実際に細胞脱落に関与している候補遺伝子と考えられ、今後、マウス小腸における発現パターンを *in situ* hybridization によって確認する。続いて、小腸オルガノイドを用いてこれら遺伝子の過剰発現及びノックダウン実験を行い、細胞脱落に及ぼす影響を調べていく。また、同様のマイクロアレイ解析を、ショウジョウバエ腸上皮の若い細胞と古い細胞とで行うことも計画しており、マウス小腸を用いた今回の解析結果と比較することで、腸上皮のターンオーバー、細胞脱落に関わる普遍的な機構の解明を目指していく。また、これら遺伝子発現の変動は、細胞脱落と直接の因果関係がなかったとしても、腸上皮細胞が時間経過とともに変容（老化？）する際のマーカーと位置づけることができ、短寿命細胞の寿命の決定機構の解明の手がかりになることも期待される。

2. ショウジョウバエ腸管上皮を用いたRNAiスクリーニング

一次スクリーニングを今後も継続するとともに、着目に値する表現型を示した遺伝子については、細胞脱落の過剰を評価出来る二次スクリーニング系でより詳細な解析を行う。また、現在までのスクリーニング結果では、分化した腸上

皮細胞で特異的に RNAi を誘導しているにも関わらず、上皮幹細胞に異常を示す遺伝子も複数観察されている。これらは細胞脱落と直接関係がなくても、細胞間相互作用の結果、幹細胞に細胞非自律的 (cell non- autonomous) に作用して腸管上皮の恒常性維持を担う重要遺伝子である可能性もある。

3. 哺乳類培養細胞を用いたライブイメージング解析

培養細胞を用いた、細胞脱落時の分子動態解析を今後も進めるとともに、マウス小腸オルガノイドを用いた同様の解析も計画する。

ショウジョウバエの成虫腸上皮、マウス小腸オルガノイド、哺乳類培養細胞の3つの細胞脱落解析系を駆使し、1、2、3、の各戦略で得られた知見を他の戦略で検証、発展させることによって相補的に活用することで、引き続き、細胞脱落の本質的な分子機構の解明を目指す研究を推進していくことを計画する。

文 献

- 1) Günther C, Neumann H, Neurath MF, Becker C. Apoptosis, necrosis and necroptosis: cell death regulation in the intestinal epithelium. *Gut*. 2013 ;62(7):1062-71. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301364.
- 2) Eisenhoffer GT, Rosenblatt J. Bringing balance by force: live cell extrusion controls epithelial cell numbers. *Trends Cell Biol*. 2013 ;23(4):185-92. doi: 10.1016/j.tcb.2012.11.006.