

## 130. 腸上皮細胞をモデルとした細胞寿命決定機構の解明

小谷 武徳

神戸大学 大学院医学研究科 生化学・分子生物学講座 シグナル統合学分野

Key words : 腸上皮細胞, 腸内細菌, 細胞寿命, 短鎖脂肪酸

### 緒言

個々の組織を形成する細胞は、それぞれ固有の「寿命」をもつことがよく知られている。これまでにヒトにおいて、腸上皮細胞で約3-5日、皮膚ケラチノサイトで数週間から約1ヶ月、赤血球で約3ヶ月、脳神経細胞で数十年の寿命があると言われているが、どのようにして最終分化後の細胞の寿命が決定されているかについては明らかとなっていない。例えば神経細胞が長期にわたり生存しなければならない必然性は、記憶の保持という脳の最重要機能から容易に想像はできるが、この長期にわたる生存を可能にしている分子基盤についてはほとんど明らかにされていない。一方、寿命が最も短い細胞の代表である腸管の腸上皮細胞は腸管絨毛下端のクリプト（陰窩）に存在する幹細胞より分化した後、腸絨毛の頭頂部へと移動し、細胞死により腸絨毛より遊離して消滅することが明らかにされているが、細胞死までの短い寿命がどのようにして制御されているか、その分子機構についてはほとんど何も分かっていないのが現状である。さらに言えば、腸上皮細胞の寿命が何故このように短くあるべきかの生物学的意義も十分明らかにされていない。本研究では、腸内細菌による腸上皮細胞の寿命制御機構についての解析を行ったのでその成果について報告する。

### 方法および結果

#### 1. グラム陽性細菌による腸上皮細胞の増殖及び移動の促進

抗生剤カクテル（Ampicillin + Neomycin + Vancomycin + Metronidazol）を飲ませることで腸内細菌を除去したマウス<sup>1)</sup>にBrdUを腹腔注射し、BrdUによってラベルされた腸上皮細胞について経時的な観察を行った。その結果、抗生剤投与マウスでは通常のマウスに比べBrdU投与2時間後においてBrdU陽性腸上皮細胞が少ないことが明らかとなった（図1A）。また、BrdU投与後2-5日間でのBrdU陽性腸上皮細胞について観察を行ったところ、通常のマウスではBrdU投与2日でBrdU陽性腸上皮細胞は腸絨毛の先端に達し、その後少なくなり、5日目ではほとんど認められなくなるが、抗生剤投与マウスではBrdU投与2日でBrdU陽性腸上皮細胞は腸絨毛全体の半分ほどにしか達しておらず、BrdU投与5日目でも多くのBrdU陽性細胞が残っていることが確認できた（図1B）。また、抗生剤投与マウスの腸上皮細胞においては細胞の増殖を正に制御すると考えられるERKやSTAT3のリン酸化レベルが顕著に低下していた（図1C）。以上のことから、腸内細菌は腸上皮細胞の増殖や移動、さらにはその結果としてのターンオーバーの速度に対して促進的に寄与することが示唆された。

また、面白いことに各抗生剤をマウスに単独投与したところグラム陽性細菌に対して効果を示すAmpicillinやVancomycinは腸上皮細胞の増殖や移動を抑制する一方、グラム陰性細菌に作用するNeomycinは腸上皮細胞の増殖や移動を抑制しないことが明らかとなった（図1D）。このことから、グラム陽性細菌が腸上皮細胞の増殖や移動に対して促進的に作用していると考えられた。

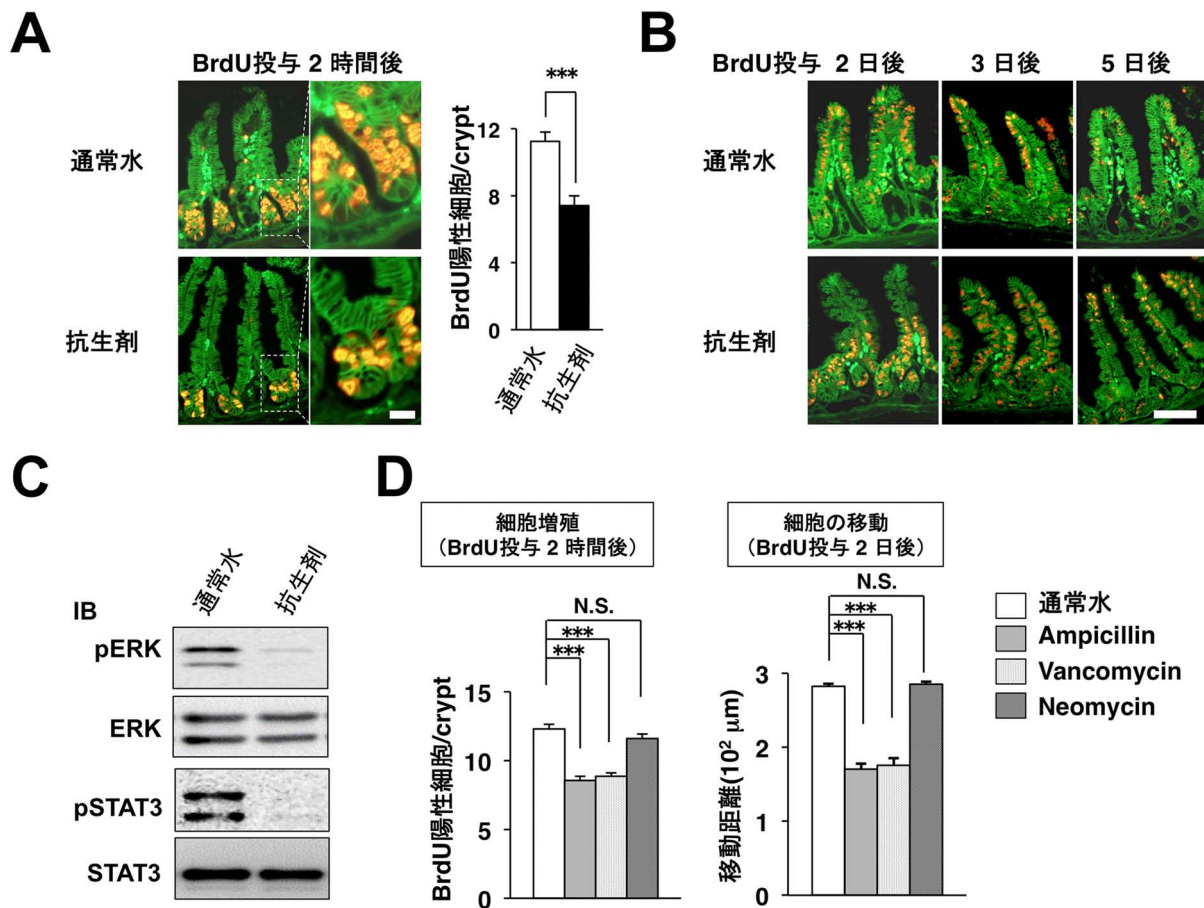


図 1. グラム陽性細菌による腸上皮細胞の増殖及び移動の促進

(A) 通常の水を飲んでいる成体マウス及び、抗生剤カクテル (Ampicillin + Neomycin + Vancomycin + Metronidazol) を 4 週間飲ませた成体マウスに BrdU を腹腔注射した。BrdU 投与 2 時間後に腸を回収し、 $\beta$ -catenin (緑) と BrdU (赤) の免疫組織化学染色を行った。Scale bar: 20  $\mu$ m. \*\*\* $p < 0.001$  (Student's t test)。(B) A と同様に抗生剤カクテルを 4 週間飲ませた成体マウスに BrdU を腹腔注射した。BrdU 投与 2 ~ 5 日後に腸を回収し、 $\beta$ -catenin (緑) と BrdU (赤) の免疫組織化学染色を行った。Scale bar: 100  $\mu$ m。(C) 通常の水を飲んでいる成体マウス及び、抗生剤カクテルを 4 週間飲ませた成体マウスから腸上皮細胞を回収し、ウエスタンブロットにより ERK と STAT3 のリン酸化レベルを評価した。(D) 通常の水を飲んでいる成体マウス及び、単独の抗生剤 (Ampicillin, Vancomycin, もしくは Neomycin) を 4 週間飲ませた成体マウスに BrdU を腹腔注射した。BrdU 投与 2 時間後に腸を回収し、BrdU 陽性細胞の数を評価した (左のグラフ)。また、BrdU 投与 2 日後に腸を回収し、クリプト底部から一番離れた位置にある BrdU 陽性細胞までの距離を測定した (右のグラフ)。\*\*\* $p < 0.001$  (ANOVA and Tukey's test)。N. S., not significant difference。

## 2. 短鎖脂肪酸による腸上皮細胞の増殖及び移動の促進

グラム陽性細菌は、Toll-like receptor 2 によって認識されることが知られる<sup>2)</sup>。しかしながら、Toll-like receptor 2 やその下流分子 Myd 88 のノックアウトマウスの腸上皮細胞においてはグラム陽性細菌を認識出来ないにもかかわらず、腸上皮細胞の増殖及び移動速度の低下が認められなかった。そこで次に腸内細菌が食物繊維を代謝することによって生じる短鎖脂肪酸<sup>3)</sup> が腸上皮細胞の増殖や移動を促進させるか否かについて明らかにするために、Vancomycin の経口投与によりグラム陽性細菌をなくしたマウスにさらに Vancomycin と共に短鎖脂肪酸のカクテル (Acetate + Propionate + Butyrate) を与え、BrdU ラベルにより腸上皮細胞を観察した。その結果、Vancomycin 処理によりグラム陽性細菌が消滅するにも関わらず短鎖脂肪酸を Vancomycin と共に与えたマウスでは腸上皮細胞の増殖及び移動が回復することが明らかとなった (図 2)。

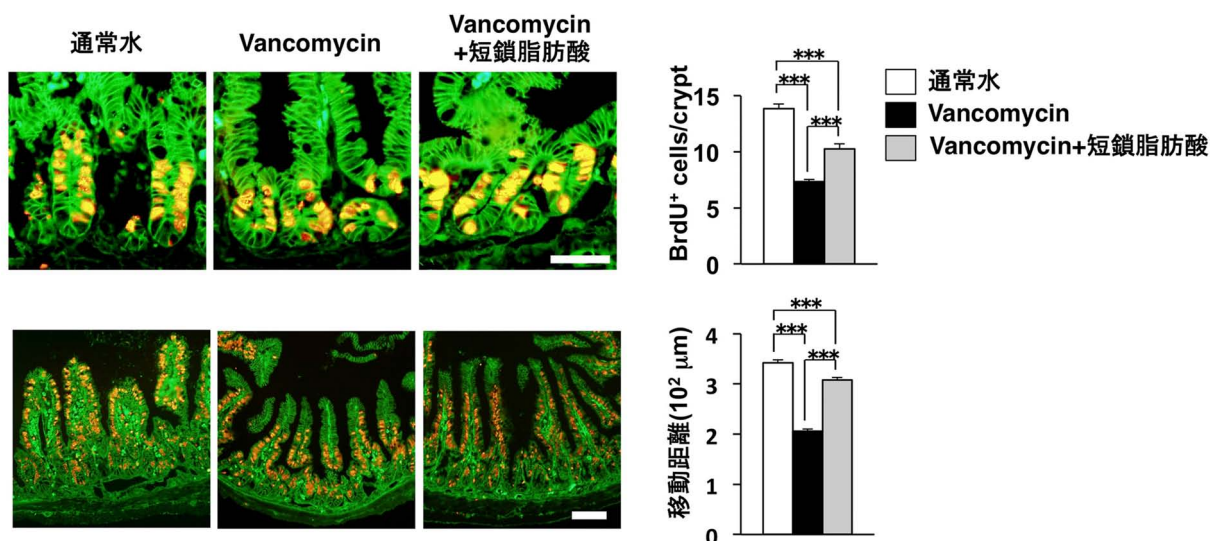


図2. 短鎖脂肪酸による腸上皮細胞の増殖及び移動の促進

通常の水を飲んでいる成体マウス、Vancomycin を4週間飲ませた成体マウス、Vancomycin を2週間飲ませた後に Vancomycin と短鎖脂肪酸カクテル (Acetate + Propionate + Butyrate) の混合液を2週間飲ませた成体マウスに BrdU を腹腔注射した。BrdU 投与2時間後 (上段) 及び2日後 (下段) に腸を回収し、 $\beta$ -catenin (緑) と BrdU (赤) の免疫組織化学染色を行った。上下段共に Scale bar: 100  $\mu$ m。上段のグラフは BrdU 投与2時間後のクリプトにおける BrdU 陽性細胞数を示し、下段のグラフは BrdU 投与2日後にクリプト底部から一番離れた位置にある BrdU 陽性細胞までの距離を示す。\*\*\*p < 0.001 (ANOVA and Tukey's test)。

また、腸管からクリプトを単離して培養した腸オルガノイドが成育を促進させるためには EGF が必要であるが<sup>4)</sup>、EGF 非存在下の培地においても短鎖脂肪酸は腸オルガノイドの成長を促進させることが明らかとなった (図 3A)。

一般に EGF は EGF 受容体によって認識されることで MAPK 経路を活性化し、細胞の増殖を正に制御することが知られる。そこで、短鎖脂肪酸が EGF の代わりに MAPK 経路を活性化するかについて腸オルガノイドを用いて検証したところ、短鎖脂肪酸は腸オルガノイドの MAPK 経路を活性化 (ERK をリン酸化) することが明らかとなった (図 3B)。さらに、MAPK 経路の阻害剤 (U0126) により短鎖脂肪酸による腸オルガノイドの成長促進は阻害されることも明らかとなった (図 3C)。

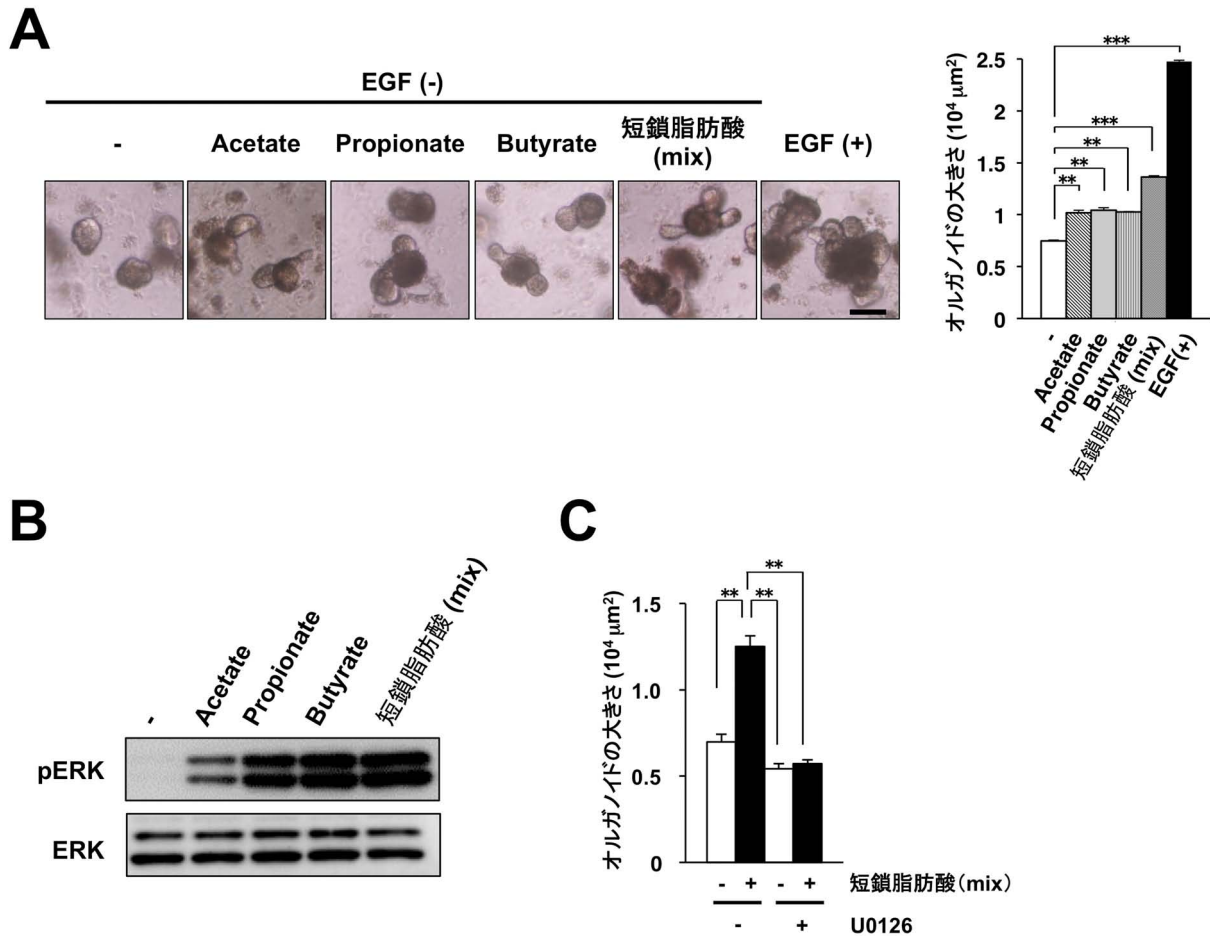


図3. 短鎖脂肪酸による腸オルガノイドの成育促進及び MAPK 経路の活性化

(A) EGF の非存在下および存在下、各短鎖脂肪酸の単独添加や短鎖脂肪酸カクテル (Acetate + Propionate + Butyrate) の添加による腸オルガノイドの成育 (培養4日目) の評価。Scale bar:  $100 \mu\text{m}$ 。\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$  (ANOVA and Tukey's test)。(B) 各短鎖脂肪酸の単独添加や短鎖脂肪酸カクテルの腸オルガノイド培養培地への添加による ERK のリン酸化誘導。ウエスタンブロットによる評価。(C) 短鎖脂肪酸依存的な腸オルガノイドの成育促進への MAPK 経路阻害 (MEK インヒビター U0126) の影響。\*\* $p < 0.01$  (ANOVA and Tukey's test)。

## 考 察

以上の結果から、グラム陽性細菌の代謝産物である短鎖脂肪酸が腸上皮細胞に直接働きかけることで腸上皮細胞の MAPK 経路を活性化し、腸上皮細胞の増殖及び移動を促進させ、さらにはその結果として、腸上皮細胞の寿命を短くしている可能性を見出した。今後は今回得られた結果について検証すると同時に、腸上皮細胞の寿命を制御する他の制御因子についても解析を進め、腸上皮細胞の寿命決定機構の全体像を明らかにしていくことが重要となる。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、神戸大学大学院医学研究科の的崎尚教授及び村田陽二准教授である。本稿を終えるにあたり、本研究を御支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004;118(2):229-41. Epub 2004/07/21. doi: 10.1016/j.cell.2004.07.002. PubMed PMID: 15260992.
- 2) Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015. PubMed PMID: 16497588.
- 3) Matsumoto M, Kibe R, Ooga T, Aiba Y, Kurihara S, Sawaki E, et al. Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. *Scientific reports*. 2012;2:233. Epub 2012/06/23. doi: 10.1038/srep00233. PubMed PMID: 22724057; PubMed Central PMCID: PMC3380406.
- 4) Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 2009;459(7244):262-5. Epub 2009/03/31. doi: 10.1038/nature07935. PubMed PMID: 19329995.