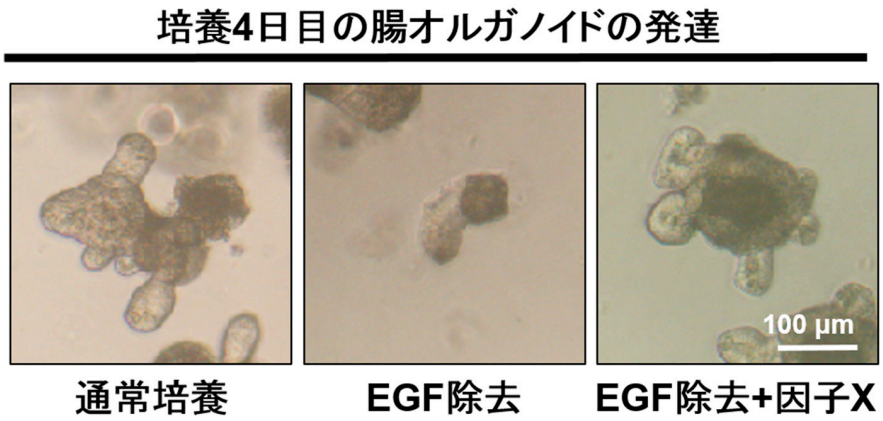
131　小腸上皮細胞の細胞寿命を制御する新規因子の探索	金野　祐

【目的】小腸上皮細胞は、他の細胞に比べ極めて短い周期で寿命を全うするが、寿命制御機構の全容は未だに明らかとなっていない。特に、小腸上皮細胞の寿命制御には細胞内シグナル伝達とその活性を調節する細胞外因子が重要であると考えられているものの、生体内で作用している具体的な細胞外因子に関しては未だに多くの点が未解明のままとなっている。そこで本研究では、腸管内腔に存在する物質中より、小腸上皮細胞の寿命制御に関わる新規因子を探索し、その作用機序の解明を試みた。

【方法】本研究では、小腸上皮細胞に対する腸管内腔の因子の直接的な作用について評価するため、*ex vivo* の実験系である腸オルガノイド培養を用いた解析を行った。腸オルガノイドの培養培地に、腸管内腔の因子である因子Xを添加し、腸オルガノイドの発達に与える影響について解析した。

【結果】腸管内腔に存在する因子Xは、腸オルガノイドの通常培養で使用されている上皮成長因子（epidermal growth factor: EGF）の代わりに添加した場合に、腸オルガノイドの発達を有意に促進させる作用があることが明らかとなった。

腸管内腔の因子Xによる腸オルガノイドの発達促進



131. 小腸上皮細胞の細胞寿命を制御する新規因子の探索

金野　祐

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，腸オルガノイド，細胞外因子

緒　言

我々の体を構成している細胞は、組織に応じてそれぞれ固有の寿命を持っており、寿命を終えると組織内より排除され、また新たな細胞と入れ替わる。そのような細胞の入れ替わりは言い換えれば新陳代謝であり、新しい細胞が常に供給されることは組織の恒常性を維持する上でも極めて重要であると考えられている。そして、生体内に数ある細胞の中でも小腸上皮細胞は、他組織の細胞と比べより短い期間（3〜5 日間）の細胞寿命を持つ細胞として知られている。小腸上皮細胞がなぜそのように早く寿命を迎えるかに関しては、病原微生物に対する感染防御のためなど諸説が唱えられているものの、実際の生理的意義と共にその制御機構は未だに多くの部分が未解明のままとなっている。

小腸上皮細胞は、絨毛底部の陰窩領域に局在する腸幹細胞が前駆細胞を経て増殖・分化することで成熟し、成熟した細胞は絨毛先端方向へ徐々に移動して、最期は絨毛先端部から細胞死を伴って遊離することで寿命を全うする。このような小腸上皮細胞の寿命制御には細胞内シグナル伝達が重要であると考えられており、細胞内シグナル伝達に異常が生じると、腸炎や過形成を発症する［1, 2］。細胞内シグナル伝達は、一般的に細胞膜に局在する受容体にリガンドとなる細胞外因子が結合することで活性化（または不活性化）し、それから下流の因子へ向け次々にシグナルが伝わることで細胞増殖、移動、分化、細胞死といった挙動に対する遺伝子の発現を調節する。小腸上皮細胞に対しては、腸管内腔に存在する物質がそのような細胞外因子となり得る可能性を持っており、そこには食事や腸内細菌の代謝物、及び腸上皮細胞自身が分泌する物質など多数の候補が存在する。本研究室では現在までに、グラム陽性細菌が産生する短鎖脂肪酸が小腸上皮細胞の増殖能や移動能に寄与する細胞外因子の一つであることを報告した［3］。さらに他の研究機関では、カロリー制限食や高脂肪食の給餌が、腸幹細胞の増殖・分化能に影響を与えるという報告もなされていることから［4, 5］、食事による細胞内シグナル伝達の調節もまた、小腸上皮細胞の寿命制御にとって重要であることが伺える。しかしながら、上記のような知見を踏まえつつも、生体の腸管内に存在する物質の中で小腸上皮細胞の寿命制御機構に作用している具体的な細胞外因子は何かという問いに関しては、未だに全ての答えが得られていないのが現状である。そこで本研究では、それらの中から小腸上皮細胞の寿命制御に関与する新規性の高い物質を探索・同定し、その詳細な作用機序の解明を試みるため、以下の解析を行った。

方法および結果

1. 腸オルガノイド培養の概要

小腸上皮細胞に対する腸管内腔の因子の直接的な作用について評価するため、本研究では *ex vivo* の実験系である腸オルガノイド培養を用いた解析を行った。佐藤らにより確立された腸オルガノイド培養は、腸幹細胞を含む陰窩領域を小腸より単離し、マトリゲルに懸濁して 3 次元培養することで、小腸上皮細胞の増殖や分化を反映した腸組織の再構成を *ex vivo* で再現することが可能である［6］。本研究では、マウス空腸より単離した陰窩を用いて腸オルガノイド培養を行った（図 1）。

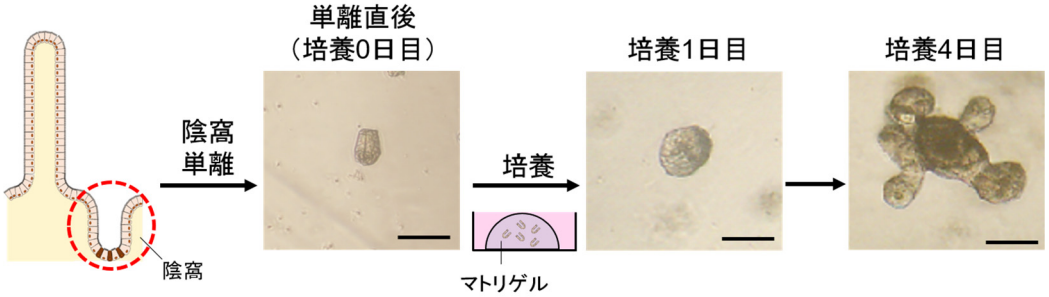


図 1. 腸オルガノイド培養の概要

マウス空腸より陰窩領域を単離し、培養培地と共にマトリゲル内で培養した。培養 1 日目には腸オルガノイドは球体構造を形成し、引き続き培養を行うことで培養 4 日目には生体の陰窩や絨毛に相当する領域を含む組織様構造体を形成した。Scale bar：100 μm。

2. 腸オルガノイド培養における因子Xの EGF 代替作用

腸オルガノイドの通常培養では、腸オルガノイドを正常に発達させるために細胞外因子の上皮成長因子（epidermal growth factor: EGF）、Noggin、R-spondin1 を培養培地へ添加する。それぞれの細胞外因子を培地中より除去すると、EGF または Noggin を除去した場合には、腸オルガノイドは培養 4 日目でも培養 1 日目のような球体構造が保持されており、正常に発達することができなかった（図 2a）。また、R-spondin1 を培養培地から除去した場合には、腸オルガノイドはその構造体自体を維持することができず、培養 4 日目までに全てが崩壊した（図 2a）。次に、各々の培養条件下において、本研究室で解析を進めている腸管内の細胞外因子である因子Xを添加して腸オルガノイドの発達に与える影響について検討したところ、因子Xは EGF の作用を代替して腸オルガイドの発達を有意に促進できることが明らかとなった（図 2a, 2b）。

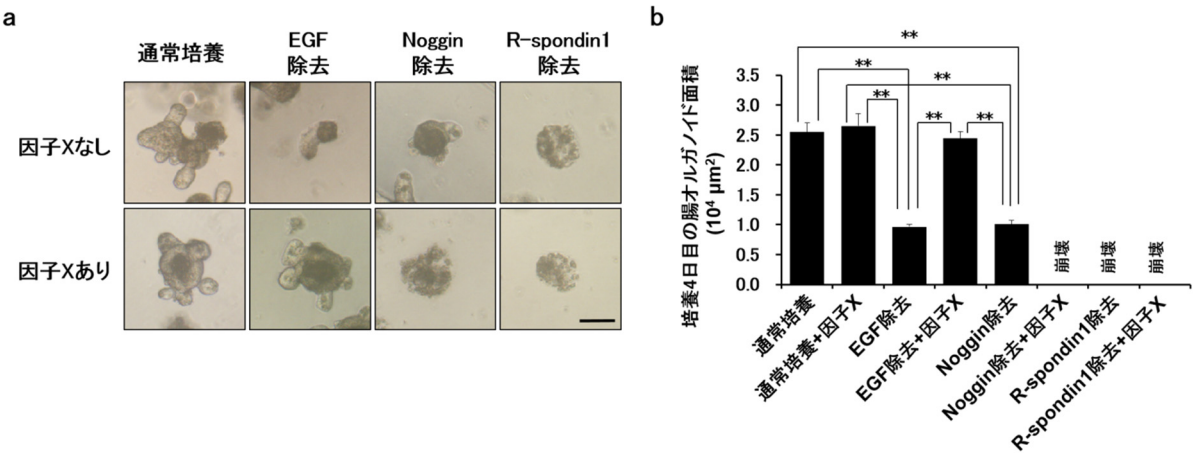


図 2. 腸オルガノイド培養における因子Xの EGF 代替作用

a）因子X（4 μM）の非存在下または存在下における、通常培養、EGF 除去、Noggin 除去、R-spondin1 除去の培養培地で培養された腸オルガノイドの発達（培養 4 日目）。Scale bar: 100 μm。b）各条件下での腸オルガノイドの発達の定量。腸オルガノイドの面積は、画像解析ソフト（Image J）を用いて測定、定量した。n = 30 オルガノイド。$^{**}p < 0.01$（ANOVA and Tukey's test）。

3. 因子Xによる濃度依存性の腸オルガノイド発達促進

因子Xによる腸オルガノイドの発達促進作用について詳細な検討を行うため、因子Xの希釈系列を作製し、EGF を除去した培養培地に添加してそれぞれの濃度での腸オルガノイドの発達について検討した。その結果、因子Xは 100 nM 以下の濃度では腸オルガノイド発達促進作用は示さず、4,000 nM（4 μM）の濃度で培養培地へ添加することで腸オルガノイドの発達を有意に促進できることが確認された（図 3）。

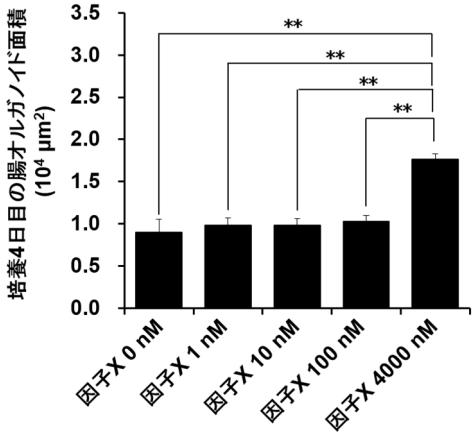


図 3. 因子Xによる濃度依存性の腸オルガノイド発達促進

EGF を除去した培養培地に因子Xを異なる濃度で添加し、培養 4 日目での腸オルガノイド面積を測定した。腸オルガノイドの面積は、画像解析ソフト（Image J）を用いて測定、定量した。n = 30 オルガノイド。$^{**}p < 0.01$（ANOVA and Tukey's test）。

考　察

本研究より、腸管内腔に存在する因子である因子Xには、腸オルガノイドの発達を促進させる作用があることが明らかとなった。腸オルガノイドの発達は、小腸上皮細胞の寿命制御に関わる細胞増殖や分化を反映していることから、因子Xは生体内でも小腸上皮細胞の寿命制御に関与する可能性が示唆された。また現在は、腸オルガノイドの発達促進に対する因子Xの作用機序について細胞内シグナル伝達や遺伝子発現の観点から詳細な解析を進めている。今後は因子Xの生体マウスでの作用に加え、腸炎や腫瘍形成をはじめとする腸疾患に与える影響についても解析することで、因子Xがそうした疾患の創薬ターゲットになり得るかどうかまで検討したいと考えている。

共同研究者・謝辞

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小谷武徳助教である。また本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く御礼申し上げます。

文　献

1） Yamashita H, Kotani T, Park JH, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H, et al. Role of the protein tyrosine phosphatase Shp2 in homeostasis of the intestinal epithelium. PLoS One. 2014 Mar 27;9(3): e92904. PMID: 24675817 DOI: 10.1371/journal.pone.0092904

2） Imada S, Murata Y, Kotani T, Hatano M, Sun C, Konno T, et al. Role of Src family kinases in regulation of intestinal epithelial homeostasis. Mol Cell Biol. 2016 Aug 22. pii: MCB.00311-16. PMID: 27550814 DOI: 10.1128/MCB.00311-16

3) Park JH, Kotani T, Konno T, Setiawan J, Kitamura Y, Imada S, et al. Promotion of Intestinal Epithelial Cell Turnover by Commensal Bacteria: Role of Short-Chain Fatty Acids. PLoS One. 2016 May 27;11(5): e0156334. PMID: 27232601 DOI: 10.1371/journal.pone.0156334

4) Yilmaz ÖH, Katajisto P, Lamming DW, Gültekin Y, Bauer-Rowe KE, Sengupta S, et al. mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. Nature. 2012 Jun 28;486(7404):490-5. PMID: 22722868 DOI: 10.1038/nature11163

5) Beyaz S, Mana MD, Roper J, Kedrin D, Saadatpour A, Hong SJ, et al. High-fat diet enhances stemness and tumorigenicity of intestinal progenitors. Nature. 2016 Mar 3;531(7592):53-8. PMID: 26935695 DOI: 10.1038/nature17173

6) 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 May 14;459(7244):262-5. Epub 2009 Mar 29. PMID: 19329995 DOI: 10.1038/nature07935