

研究報告書

「腸管の恒常性における細胞死と DNA 分解の役割」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研究者: 川根 公樹

1. 研究のねらい

本研究は、腸管上皮細胞のターンオーバーにおけ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）及び細胞死に関連する DNA 分解に着目し、これを通じて腸管の恒常性及びその破綻による疾患を理解することを目的とする。これまで、細胞の増殖や分化などの振る舞いによって主に理解されてきた、『腸管の恒常性維持機構』の問題に、『細胞死』という独自の視点から取り組むことで、関連が予想される癌、炎症疾患、感染などに対し、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狙う。

上皮細胞は組織から脱落してその一生を終える。これは血球（浮遊）細胞の終焉が貪食細胞による貪食であるのに対し、組織において細胞社会を形成する接着細胞の終焉の重要な特徴である。脱落は、細胞が互いに接着した組織で効率よく細胞を除去するための洗練された能動機構であり、発生過程、組織のターンオーバーなど種々の局面で観察される普遍的現象である。脱落する細胞は、隣接細胞が細胞境界に形成するアクチン-ミオシンから構成されるリングが収縮することで組織から除かれ、いわばこれは『他殺』の要素を持つ（図 1）。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、上皮の持つ重要な働きであるバリア機能が損われるのを防ぐ。すなわち脱落は、隣接細胞との相互、協調作用によって行われる『細胞社会における細胞死』であり、主に研究が進んできた浮遊細胞の細胞自律的な死と異なって分子機構の解明は遅れており、多くの重要命題が未解決である。時間経過が細胞にもたらす変容の実体及びこの変容が脱落の運命（細胞寿命）を決定する機構、隣接細胞が寿命を迎えた細胞を認識し脱落を開始させる機構、脱落の実行装置アクチン-ミオシンリングの形成、収縮、解体の機構など、いずれも理解は乏しい。このため脱落の生理的意義も実証ができない現状であるが、脱落の異常は腸管における疾患、特に腸炎など炎症性免疫疾患や癌との関連が予想され、早急にこれを検証する必要がある。また、脱落によって死んだ腸管上皮細胞は貪食されないため貪食細胞内で DNA 分解がおこることはないと考えられており、この時の DNA 分解機構は不明である。

これらを踏まえ、分子機構がほとんど不明である細胞脱落（細胞死）の分子機構をまず明らかにし、これをもとにこれらの機構に破綻を来すマウスに生じる異常及び腸管疾患を解析することを計画した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究ではまず、複数の動物種からなる *in vivo*、*in vitro* の細胞脱落の解析系を立ち上げた。すなわち哺乳類上皮培養細胞、マウス小腸オルガノイド、ショウジョウバエ腸管上皮、ショウジョウバエ体表上皮などの実験系において生理的な細胞脱落の解析が可能となり、これらを

用い、RNAi スクリーニング、イメージング等の手法を組み合わせ解析を行い、以下の成果を挙げた。A. ショウジョウバエの生体上皮を用いた RNAi スクリーニングによって細胞脱落に関与する遺伝子を同定した。同定した遺伝子は、細胞内輸送や死細胞の処理に関わる可能性のある遺伝子などであり、これらがどのように細胞脱落に関与するのかの解析を現在も進めている。B. 哺乳類上皮培養細胞及びショウジョウバエの生体上皮を用いた定量ライブイメージング解析により、細胞脱落時の接着分子の動態を明らかにした。脱落細胞のアドヘレンスジャンクションは細胞脱落直前に消失し、速やかに隣接細胞間で新たな接着が形成されるのに対し、タイトジャンクションは新たな形成がおこった後、もしくは同様のタイミングで脱落細胞-隣接細胞間の接着が消失することがわかった。この機構により、上皮組織はバリアを維持しつつ効率よく不要な細胞の排除を行っていると考えられる。C. ショウジョウバエの腸上皮を用いた解析により、ターンオーバーの際の細胞脱落に先立ってアポトーシスが起きており、その経路はリガンド-レセプターを介さない内因性アポトーシス経路であることを明らかにした。D. 細胞脱落のマーカースとして、ATP 濃度の減少、Ca 濃度の上昇などを、その候補として抽出した。

これらの知見に基づいた解析を継続して進めることで、細胞脱落の本質的機構の解明につながることを期待される。

(2) 詳細

研究テーマ A 『遺伝子ノックダウンによる細胞脱落を司る遺伝子のスクリーニング』

盛んに細胞のターンオーバーがおこるショウジョウバエ腸上皮において細胞数の増加を指標として、また蛹期の体表上皮において細胞脱落の減少（ライブイメージングで検出）を指標として、RNAi トランスジェニックライブラリーを用いて細胞脱落に関与する遺伝子のスクリーニングを行った。種を越えて保存された細胞脱落を担う遺伝子の同定を目指し、まず候補遺伝子の抽出のため、マウス小腸のマイクロダイセクション-マイクロレイ解析を行い、腸上皮のターンオーバーの際に細胞が脱落する絨毛の先端部とその下部における遺伝子発現を網羅的に比較解析した。その結果をもとに絨毛先端部で発現が上昇する遺伝子、減少する遺伝子を計 300 個抽出した。加えて、ショウジョウバエの腸上皮において上皮細胞の終末分化に伴って発現が上昇する遺伝子を既存の報告から抽出した。さらに細胞脱落に関与することが予想される遺伝子を過去の報告や独自の仮説から抽出した。これらによって抽出した約 1000 個の遺伝子を対象に RNAi スクリーニングを行った結果、小胞輸送に関与する可能性が考えられる遺伝子やアポトーシス細胞の処理に関与する可能性が考えられる遺伝子などを脱落に関与する遺伝子として同定した。

研究テーマ B 『哺乳類上皮培養細胞を用いた、細胞脱落時における細胞接着の動態解析』

細胞が脱落するには、細胞間接着、細胞-基質間接着の喪失が必要となるが、この機構及び、この間、上皮のバリア機能がどのようにして保たれているかは明らかでない。また、細胞接着の喪失が細胞脱落の引き金になることを示唆した報告もあり、細胞脱落の理解には細胞接着の動態の解明が不可欠となる。私たちは、無刺激で高頻度の細胞脱落がおこることを見出したマウス乳腺上皮細胞株の EpH4 細胞を用い、細胞間の物理的な接着を担っているアドヘレンスジャンクション及びバリア機能を担うタイトジャンクションの細胞脱落時の動態解析を行っ

た。

まず、アドヘレンスジャンクションの接着分子である E-Cadherin と GFP の融合タンパクを発現する安定発現株を用いて、タイムラプス観察を行ったところ、脱落が進行する過程において、脱落細胞と隣接細胞間の細胞境界の Cadherin の消失が観察された (図 1A)。取得した画像を用いて、脱落細胞と隣接細胞の細胞境界における GFP の輝度を定量したところ、脱落開始からしばらくは輝度はほぼ一定であるが、脱落完了の直前に急速な輝度の減少がおこることが分かった。また、脱落完了後は、速やかに隣接細胞間に Cadherin の集積がおき、新たな接着が形成されることがわかった。アドヘレンスジャンクションの消失は、脱落が開始した後、脱落が完了する直前におこることから、細胞脱落の引き金となっているとは考えにくく、上皮組織の恒常性を保ちながら脱落細胞を組織から剥離させるのに重要な役割を果たしていることが示唆された。次に、バリア機能を担うタイトジャンクションについても同様の解析を行った。その結果、Cadherin とは異なり、脱落細胞と隣接細胞間のタイトジャンクションは脱落時も消失することなく維持されており、隣接細胞同士が新たなタイトジャンクションを形成した後、あるいはタイミングを同じくして消失することが明らかとなった (図 1B)。この動態によって細胞脱落時も上皮組織のバリアが維持されていると考えられる。実際に、細胞培地中に蛍光標識した Dextran を添加し、Dextran の細胞境界への侵入を検証する実験によって、脱落細胞が脱落する間、バリアは維持されていることも確認した。

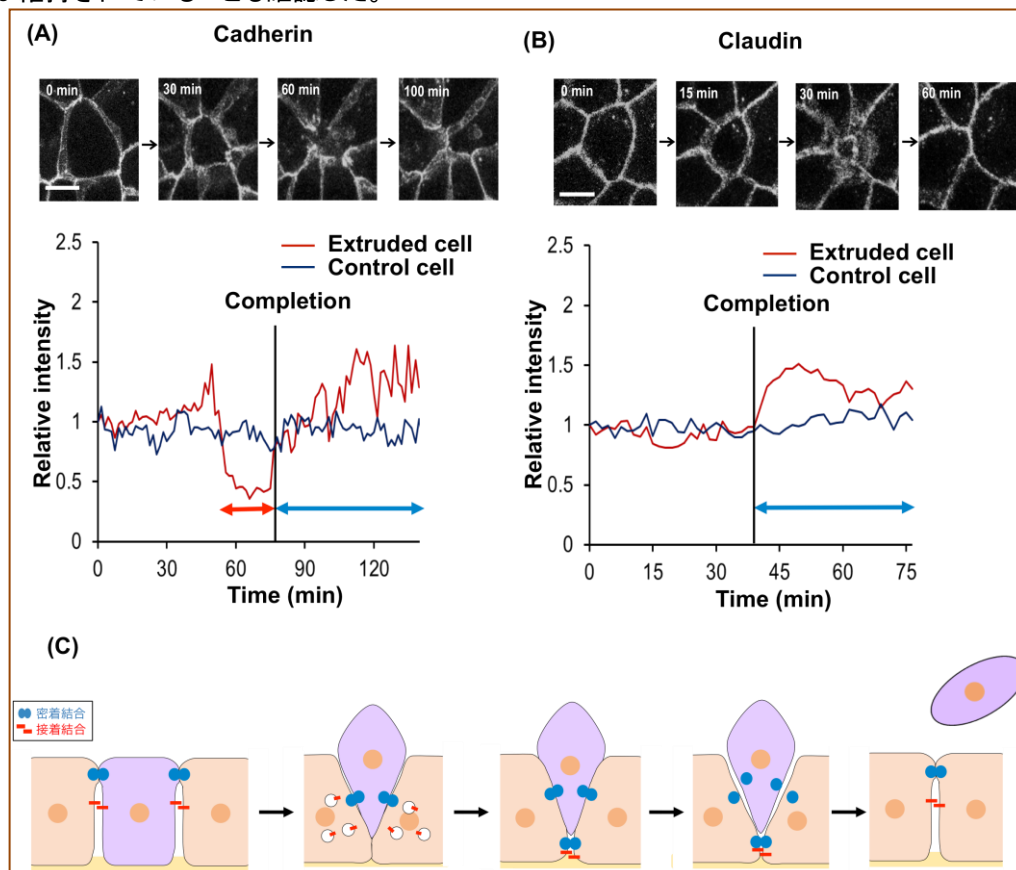


図 1. 細胞脱落時の細胞接着の動態。Cadherin (A)、Claudin (B)を可視化し、細胞脱落時の各動態をタイムラプス解析及び取得した画像を用いた定量解析した。(C)明らかとなった細胞接着動態の模式図。

また、これら分子動態を、より生体内組織に近い状態でライブイメージング解析するため、これを可能にする、マウス小腸オルガノイドを用いた解析系を樹立した。

研究テーマ C 『ショウジョウバエ腸上皮を用いた、ターンオーバーにおける細胞脱落の分子機構の解析』

哺乳類と同様にターンオーバーがおこるショウジョウバエの腸上皮を用い、細胞脱落を司る分子機構を解析した。まずショウジョウバエの分化した腸上皮細胞特異的に、アポトーシスの実行因子であるカスパーゼを阻害するP35タンパク質を発現させたところ、細胞密度の上昇が観察され細胞脱落が抑制されたことが示唆された。続いて、アポトーシスにおいてその活性が必要であるエフェクターカスパーゼのノックダウンを行った場合でも細胞密度の上昇がみられた。さらに細胞脱落に先立っておこると考えられるこのアポトーシスが内因性経路あるいは外因性経路のいずれの経路によるものかを明らかにするため、外因性経路に参与するリガンド (Eiger) および受容体 (Wengen) のノックダウンを行なったところ、細胞密度に変化は見られなかった。一方、ミトコンドリアを介した内因性経路で細胞死を誘導するDarkのノックダウンを行なったところ細胞密度の上昇がみられた。以上の結果より、ショウジョウバエの腸上皮のターンオーバーでは内因性の経路を介したアポトーシスをおこした後に細胞が脱落することがわかった (図2)。

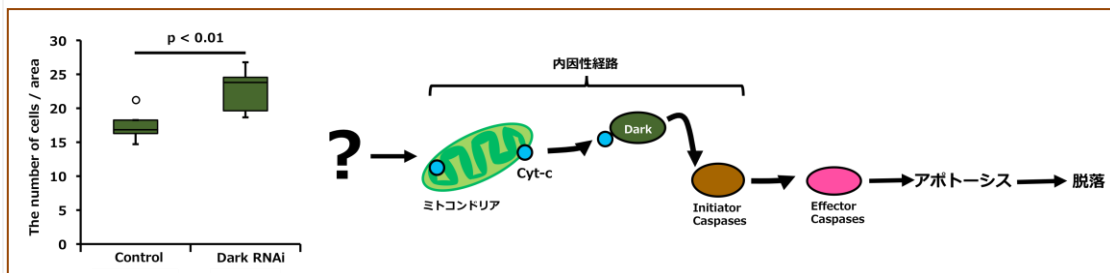


図2. ショウジョウバエの腸上皮のターンオーバーにおける細胞脱落は、内因性経路によるアポトーシスによっておこる。Darkのノックダウンによって腸上皮の細胞密度が上昇する(左)。明らかとなった機構の模式図を示す(右)。

研究テーマ D 『脱落細胞のマーカーの探索』

脱落する細胞のマーカーに関する知見の欠如が、細胞脱落の解析を大きく妨げている。これを踏まえ、複数の解析系において、免疫染色を含む各種染色実験やバイオブローブ等を用いた実験を行い、脱落する細胞で観察される変化を探索した。その結果、ATP濃度の減少、カルシウム濃度の上昇などを、その候補として抽出した。

研究テーマ E 『腸管内での DNA 分解の解析』

腸管内での DNA 分解の解析を行うため、糞便からの DNA の抽出、解析する実験系を立ち上げた。DNA 分解酵素のノックアウトマウスを用いた解析を今後行っていく。

3. 今後の展開

研究テーマ A 『遺伝子ノックダウンによる細胞脱落を司る遺伝子のスクリーニング』

研究テーマ C 『ショウジョウバエ腸上皮を用いた、ターンオーバーにおける細胞脱落の分子機構の解析』

得られた知見をもとに、ショウジョウバエの腸上皮において、脱落に先立っておこるアポトーシスを誘導する要因は何なのかを RNAi スクリーニングで探索していく。最終的には脱落する細胞内で初めにおこる変容は何なのか、その分子実体を明らかにすることを目指す。

加えて、これまでのスクリーニングにおいて、どのように細胞脱落に関与するか明らかでない遺伝子も同定されており、これらがどのような役割を細胞脱落に果たしているかを明らかにすることで細胞脱落の分子機構の全容解明に貢献すると考えられる。また複数の細胞脱落の系で、その機構がどこまで共通あるいは異なるかも定かではなく、一つの系で得られた知見を他の解析系で検証することで、この問題にも答を提出していく。

研究テーマ B 『哺乳類上皮培養細胞を用いた、細胞脱落時における細胞接着の動態解析』

細胞脱落時の接着分子の動態解析では、細胞境界から接着分子が消失する際、隣接細胞の細胞質内に Cadherin、Claudin を含む小胞が観察され、エンドサイトーシス等の機構によって細胞内へ取り込まれていることが示唆された。今後はこの取り込みの分子機構、及び細胞脱落后に隣接細胞間で新たな接着が形成される機構の解析を計画する。さらに今回明らかとなった細胞接着の動態が細胞脱落に果たす役割、意義を明らかにしていく。また、オルガノイドを用いたライブイメージング系の確立に成功しており、これを用いて、培養細胞等を用いた研究で明らかとなった知見の検証を行う。

研究テーマ D 『脱落細胞のマーカーの探索』

これらが細胞脱落のマーカーとなり得ることが今後の解析で検証できれば（組織や状況特異的であっても、広く細胞脱落に共通するものであっても）、マーカーをもとに、まもなく脱落を迎える細胞をセルソーターによって分取し、各種オミクス解析を行うことで細胞脱落の引き金を引く分子機構に迫っていく。

研究テーマ E 『腸管内での DNA 分解の解析』

DNA 分解酵素のノックアウトマウスを用いた解析を今後行っていく。

今後は現在までに得た知見を実証し、詳細な分子機構までの解明を目指しつつ、成果を学術論文として発表していく。本研究を今後も推進し、細胞脱落の分子機構を解明することで、腸炎や消化器癌、あるいは呼吸器、皮膚疾患などの種々の疾患と細胞脱落の関連が明らかになると期待される。さきがけ研究において、細胞脱落の優れた解析系を複数樹立できたので、これらを用いて細胞脱落を促進または抑制する化合物スクリーニングを簡便に行うことが可能である。この展開を実現させ、各種上皮疾患の治療、予防薬の候補化合物を数年のレベルで得ることを目指す。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

予備的データを得、立ち上げの後半に差し掛かったところからの研究開始であり、まず始めの 1 年間で、哺乳類上皮培養細胞、マウス小腸オルガノイド、ショウジョウバエ腸上皮、ショウジョウバエ蛹期体表上皮など様々な細胞脱落の解析系の構築を完成させることができた。これらを用いた遺伝子スクリーニングの計画については、当初の実験デザインがうまく

ークせず、さらなる修正を余儀なくされたが、新たな代替法を速やかにセットアップしてスクリーニングを実施し、現在までに少なくとも 2 つの興味深い遺伝子が細胞脱落に関与することを見出した。また、ライブイメージングを用いたアプローチにおいては、細胞接着分子の動態に着目してアドヘレンスジャンクション及びタイトジャンクションの動態を明らかにし、その動態が細胞脱落に果たす役割を示唆できた。さらにショウジョウバエの腸上皮をモデルに、ターンオーバーにおける脱落にアポトーシスが先立っておこることを明らかにし、今後、その引き金を引く機構への展開を可能にした。以上の複数の研究課題において進捗がみられたが、いずれにおいても、論文投稿までさらにいくつかの追加解析、データが必要である。さきがけ研究期間内の当初の達成目標と比較すると、遅れ気味であるが、本挑戦的課題において複数のテーマが十分に萌芽し、今後の 1-3 年間での結果が期待できる状況に達していると自己評価する。本研究に必要不可欠である共焦点レーザー顕微鏡の購入に予算の大半を費やしたが、この機器の導入と活用により、イメージングなしには実施できない解析を充分に行い、いくつかの成果に直結させることができた。今後は、当該期間で得られた成果を速やかに発展させ、『今後の展開』で記載した、上皮系の種々の疾患に対する社会貢献をもたらすことを目指していく。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題は腸管上皮細胞のターンオーバーにおけるアポトーシスともネクロシスとも異なる細胞死(細胞脱落)及び細胞死に関連するDNA分解に着目し、これを通じて腸管の恒常性及びその破綻による疾患を理解することを目的とした。これまで、細胞の増殖や分化などで主に理解されてきた、『腸管の恒常性維持機構』の問題に、『細胞脱落』という独自の視点から取り組み、関連が予想される癌、炎症疾患、感染などに対し、これまでにない側面から新規治療法の開発を狙った注目すべき研究である。ショウジョウバエの生体上皮を用いたRNAiスクリーニングによって細胞脱落に関与する遺伝子を同定、また、哺乳類上皮培養細胞及びショウジョウバエの生体上皮を用いた定量ライブイメージング解析により、細胞脱落時の接着分子の動態を明らかにし、ショウジョウバエの腸上皮を用いた解析により、ターンオーバーの際の細胞脱落に先立ってアポトーシスが起きており、その経路はリガンド-レセプターを介さない内因性アポトーシス経路であることを明らかにした。

川根公樹研究者は以上のように着実に成果を出しており、今後解析を継続して進めることで、細胞脱落の本質的機構の解明につながる事が十分に期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Horiguchi H, Endo M, Kawane K, Kadomatsu T, Terada K, Morinaga J, Araki K, Miyata K, Oike Y: ANGPTL2 expression in the intestinal stem cell niche controls epithelial regeneration and homeostasis. EMBO J. 36: 409-424, Feb. 2017

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 川根公樹: 「細胞社会の中で上皮細胞はいかにして生涯を閉じるのか? -他者(他細胞)との相互協調作用によって実行される細胞死(細胞脱落)の研究-」第 9 回 ELBION 技術研究会 2017 年
2. 中井彩香, 山田信人, 早矢仕健留, 川根公樹: 「細胞脱落時における上皮バリア維持機構の 解析」2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年
3. 川根公樹: Cell Death in Cellular Society. 熊本大学リエゾンラボ研究会・HIGOプログラム最先端研究セミナー, 2015年
4. 川根公樹: 細胞社会における細胞死. -細胞死に伴うDNA分解と上皮細胞の細胞終焉である細胞脱落-, 大阪大学微生物病研究所第23回ブリッジセミナー, 2015年