

令和 2 年 5 月 27 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 234

氏 名

天久朝恒

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： Imperial College London (UK)2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。交尾に伴う成体の器官リモデリング機構の解明：腸管の組織可塑性に着目して3. 派遣期間：平成 30 年 5 月 1 日 ～ 令和 2 年 4 月 30 日

4. 受入機関名及び部局名

Imperial College London, Institute of Clinical Sciences5. 所期の目的の遂行状況及び成果...書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

研究・調査実施状況

研究の目的

生殖は多大なエネルギーコストのかかるプロセスである。そのためヒトを含む多くの動物では、妊娠に伴い、ホルモン・代謝・免疫といった全身レベルでの生理的変化が起こる。哺乳類と同等の器官系をもつキロショウジョウバエは、交尾に伴う器官や組織の変化を調べるための優れた遺伝学的ツールである。派遣前に所属していた研究室において我々はキロショウジョウバエ成虫メスの卵子幹細胞の増殖がオスとの交尾刺激によって活発化されることを発見した (Ameku and Niwa, 2016 *PLoS Genetics*)。2018 年に我々はこの交尾依存的な卵子幹細胞の増殖が腸から分泌されるペプチドホルモンにより制御されることを報告した (Ameku et al., 2018 *PLoS Biology*)。さらに、派遣先の先行研究により、交尾は腸管上皮における生理的変化(腸管サイズの増加、脂質代謝の活性化)を引き起こすことが報告された (Reiff et al., 2015 *eLIFE*)。この変化は産卵数の維持に必要であることから、腸管の「上皮組織」における変化は交尾と生殖をつなぐ重要なメカニズムといえる。哺乳類においても、妊娠メスは消化管サイズが増加することが知られている一方で、成体の器官の可塑性を制御するメカニズムや、その生理学的意義については不明な点が多い。そこで本研究は、哺乳類における生殖に伴う腸管上皮組織のリモデリングに着目し、その分子メカニズムおよび生理的意義の解明を目的とした。

これまでに得られた成果と今後の展望

1) 腸管上皮細胞を単離するためのプロトコルの確立

腸管は上皮細胞のみならず、免疫細胞や筋細胞、神経細胞といった様々なシステムにより構成される異質性の高い器官である。そのため、成体の腸管から上皮細胞のみを単離するプロトコルの確立を試みた。成体マウスの小腸（回腸）から腸管上皮細胞を単離するために、酵素消化法およびフローサイトメトリー法を用いた（図1）。先行研究（Magness et al., 2013 *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*）のプロトコルをもとに実験条件を最適化し、成体マウスの腸管から上皮細胞のみを高い生存率で単離し RNA を抽出するプロトコルの確立に成功した（生存率：90%–95%、RNA integrity：8–10）。

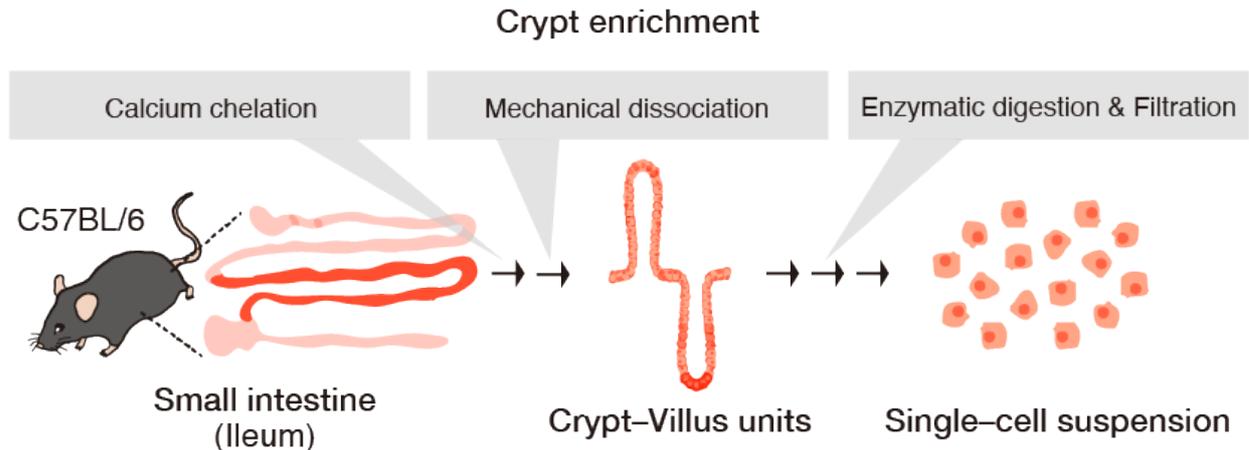


図1 成体マウスの腸管上皮細胞の単離

2) 成体マウスから単離した腸管上皮細胞におけるトランスクリプトーム解析

腸管上皮細胞におけるリモデリングを遺伝子発現レベルで追究するために、フローサイトメトリーによって単離した腸管上皮細胞において RNA シーケンシングを実施した。キョウジョウバエを用いた先行研究において、成虫の腸管には遺伝子発現および代謝レベルで性差が存在し、これらの違いはそれぞれの性における生殖の制御に必要であることが知られている（Hudry et al., 2016 *Nature*; Hudry et al., 2019 *Cell*）。このことから、まずはオスおよびメスの成体マウスの腸管上皮細胞においてトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、オスとメスの間で 103 遺伝子が有意に発現変動していた。これらの発現変動遺伝子の中には性染色体由来のいくつかの遺伝子が含まれる一方で、そのほとんどは常染色体由来の遺伝子であった。遺伝子オンロジー解析の結果、メスにおいては免疫に関わる遺伝子群が、オスにおいては代謝に関わる遺伝子群が有意に発現上昇していたことが示された。これらの結果は哺乳類の腸管上皮細胞において性的二型が存在し、それらが生殖に関わる可能性を示唆している。

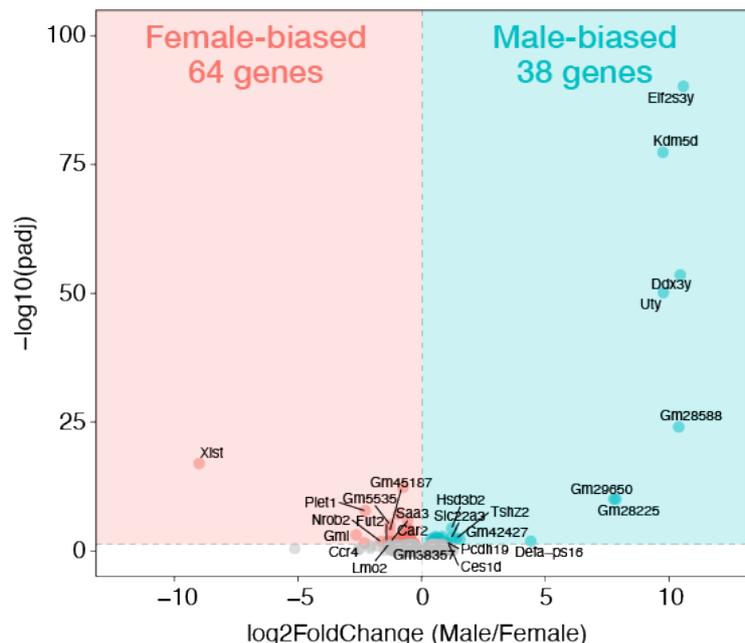


図2 トランスクリプトーム解析における発現変動遺伝子

3) 泌乳期マウスにおける腸リモデリングの解析

生殖期における腸管の可塑性を調べるために泌乳期マウスを用いた。成体における小腸の長さおよび重量を測定したところ、オスとメスの間では有意な差がみられなかった一方で、泌乳期マウスでは、小腸の長さおよび重量に有意な増加がみられた。遺伝子発現レベルでの変化を調べるために(1)で記した酵素消化法およびフローサイトメトリー法によって腸管上皮細胞を未交尾オス、未交尾メス、泌乳期メスのそれぞれから単離しRNAを抽出した。これらのサンプルは(2)と同様にトランスクリプトーム解析を実施する予定である。RNAのクオリティーはすでにバイオアナライザーで確認済みであり、RNAサンプルは派遣先研究所におけるゲノミクスファシリティに提出済みである。

さらに、腸管上皮細胞は吸収細胞をはじめ分泌細胞や幹細胞といった機能的に異なる細胞種によって構成されているため、発現変動遺伝子がどの細胞種で変化しているのか、また生殖状態の変化が腸管上皮を構成する細胞集団にどのような影響を与えるのかを調べるために、シングルセルにおけるRNAシーケンシングを実施する予定である。(1)で上述したプロトコルを用いることによって、フローサイトメトリー後に90%以上の生存率のシングルセルが単離できることを確認済みである。シーケンシングには派遣先研究室におけるゲノミクスファシリティで確立されたキットを、得られたデータの解析にはバイオインフォマティクスファシリティで確立されたパイプラインを用いる。また予備実験として、すでに公開されている論文のデータを再解析することにより(図3)、オスとメスの間において、着目する細胞集団によって異なる発現変動遺伝子が得られることを確認している。

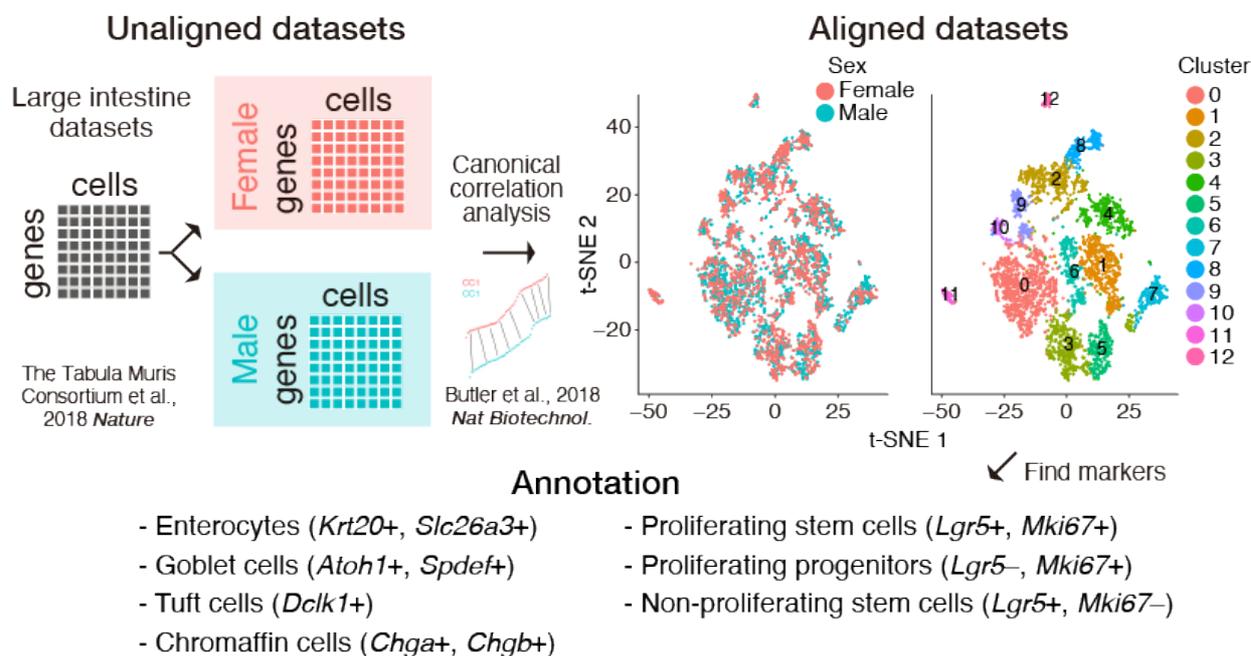


図3 シングルセル公開データを用いた再解析 (大腸)

成果の発表・関係学会への参加状況

現在までに得られた研究成果は、JSPS-Crick Symposium on Gut Circuits を含む4つの学会および研究集会において報告した(口頭発表1回、ポスター発表3回)。本研究室テーマは、特別研究員採用終了後も同研究室において引き続き実験を実施して、これまでに得られた成果とともに論文として報告する予定である。