

腸管上皮に発現するヒト固有遺伝子の機能解析

群馬大学生体調節研究所粘膜エコシステム制御分野

佐々木 伸雄

【本課題開始時の背景と課題】

Notch シグナルは多細胞生物において進化的に非常に良く保存された経路であり、発生過程において細胞の運命決定に重要な役割を果たす。また、Notch シグナルは成体になってからも各臓器に存在する組織幹細胞の恒常性維持機構に機能しているため、Notch シグナルの異常はがんなどの疾患の原因になり得ることが知られている。近年、Notch シグナル構成因子の1つである *NOTCH2* 受容体遺伝子は、ヒトへの進化の過程において重複した遺伝子座を形成し、チンパンジー以降の動物は新規に *NOTCH2NL* 遺伝子を獲得したことが明らかにされた。先行研究により、*NOTCH2NL* は神経幹細胞における Notch シグナルを活性化する機能を持ち、ヒト大脳皮質において神経細胞数を増加させる働きを持つことが報告された。しかし、① *NOTCH2NL* はどのような分子機構で Notch シグナルの活性化を制御するのか、また、② *NOTCH2NL* の脳神経以外の臓器における役割、などについては未だ不明なままである。

近年、シングルセル RNA シーケンス解析は隆盛を極めており、ヒト大腸上皮組織も同技術で詳細に調べた論文が報告された (Parikh et al. Nature 2019)。その結果、新規に発見された BEST4 遺伝子発現に分類される特別な細胞集団が発見され、この特殊な BEST4+細胞集団に *NOTCH2NL* が特異的に発現していることが示されていた。そこで我々は、ヒト大腸組織に注目してヒト固有遺伝子 *NOTCH2NL* の分子機能を解明することを目的とし、本研究を推進することにした。

【本課題の特徴】

ヒト固有遺伝子の機能を解析するためには、マウスなどのモデル動物を使用することができない。また、ヒトの臓器発生における遺伝子機能を解析するためには、オルガノイドのような生体外組織培養法が必須になってくる。近年の幹細胞培養技術の進展により、ES/iPS 細胞からは様々な臓器をシャーレ上で再現することが可能であり、ヒト腸管も培養することが可能になった。しかし、ES/iPS 細胞から作製された腸管オルガノイドは、胎児の十二指腸様の遺伝子プロファイルを示すのみであり、未だ大腸を再現することができていない (Watson et al. Nature Med 2014)。そのため、現時点においてヒト大腸組織に発現している *NOTCH2NL* の機能を解析するためには、我々が開発した組織幹細胞由来のオルガノイド法（以下、オルガノイド法はこちらを示す）を用いる以外方法はない。さらに、CRISPR/Cas9 の登場により、ヒトのゲノム編集も比較的容易に実施できる時代が到来し、ヒト大腸オルガノイドでも容易に遺伝子ノックアウト株を作製することができるため、オルガノイドを用いてヒト固有遺伝子の機能解析は実行可能である。その中でも、ヒト大腸オルガノイドに外来遺伝子をノックインすることに成功しているのは、申請者がこれまで所属してきた Hans Clevers 先生 (オランダ) と佐藤俊朗先生 (慶應大) の研究室のみである。したがって、申請者はヒト腸管オルガノイドを安定的に培養でき、かつ高い遺伝子編集技術を習得しているため、世界的に見ても様々な臓器におけるヒト固有遺伝子の機能を解析するのに有利な状況にあると考えられる。

【結果報告】

本課題研究の申請時には以下に示す 3 つマイルストーンを設定して、1 年半の助成内において研究を推進し、それぞれの成果を挙げることに成功した。

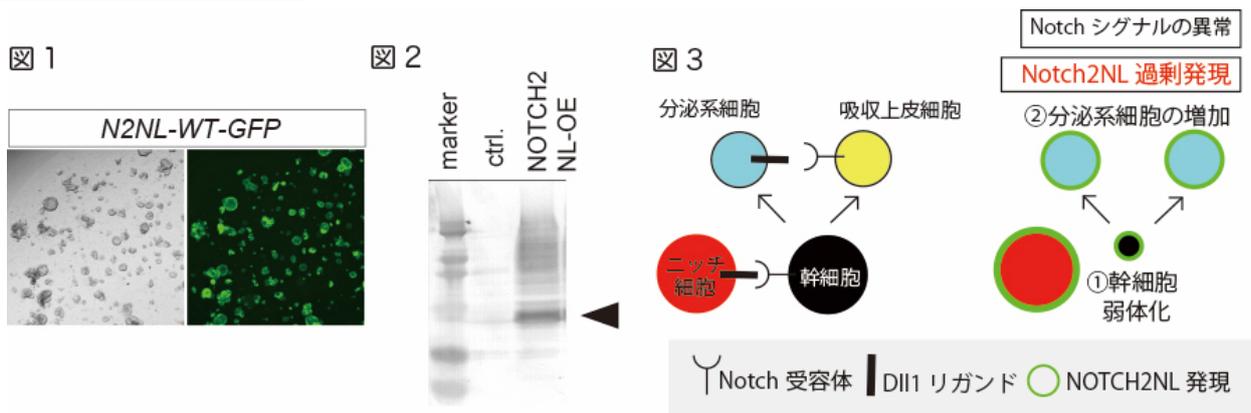
(1) 新天地におけるヒトオルガノイド培養法の立ち上げ

本課題研究は健康人ボランティアから入手するヒト大腸組織から樹立するオルガノイド（以下、大腸オルガノイド）を必須とするものである。申請者は、本助成を受けたタイミングで現所属大学において独立した研究室を立ち上げるようになったため、まず初めにオルガノイド培養の全てをゼロから立ち上げることにした。侵襲性のあるヒト検体を入手するために、群馬大学人を対象とする医学系研究倫理審査委員に本研究の倫理申請を行い、承認を得た (HS2021-274)。大腸オルガノイド培養に必要な成長因子はペプチドの状態で購入することが可能であるが、価格が高い、ロット間の活性にばらつきが多いという問題があることから、次にオルガノイド培養に必要な成長因子の安定発現細胞株の作成を行った。共同研究者の Hans Clevers 先生 (Hubrecht 研究所)、佐藤俊朗先生 (慶應大) から発現ベクターを入手し、293T 細胞、CHO 細胞を利用し、Wnt3a, Noggin, R-spondin1 を効率良く発現させる細胞株を樹立した。これらの培養上清は Clevers 研、佐藤研の培養上清と同等の活性を示しており、実際にヒト大腸オルガノイドを長期間安定的に培養することに成功した。

(2) ウイルスベクターを用いた NOTCH2NL 過剰発現株の作出・機能解析

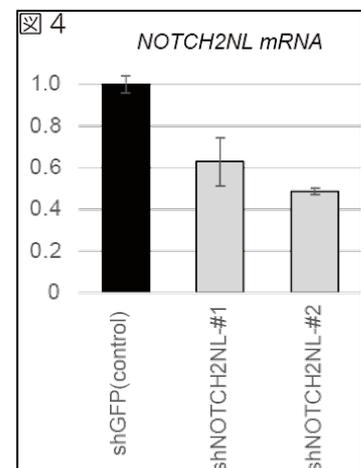
ヒト固有遺伝子である NOTCH2NL の機能を調べるために、まず我々はマウス大腸オルガノイドに NOTCH2NL を強制発現させることにした。クローニングした全長のヒト NOTCH2NL cDNA をレンチウイルスベクターに組み込んだ (*pLenti-NOTCH2NL-IRES-eGFP*)。 *pLenti-NOTCH2NL* ウイルスを、マウス大腸オルガノイドに感染させ、選択薬剤を利用することで、NOTCH2NL が組み込まれたマウス大腸オルガノイドを作製した。選択薬剤耐性を示す *pLenti-NOTCH2NL-IRES-eGFP* 外来遺伝子が挿入されたマウス大腸オルガノイドは GFP を均一に発現していることを蛍光顕微鏡で確認した (図 1)。さらにウエスタンブロッティング法により、マウス大腸オルガノイド NOTCH2NL 発現株で NOTCH2NL 遺伝子が強制発現されていることを確認した (図 2)。

マウス大腸オルガノイドにおいてヒト固有遺伝子 NOTCH2NL 遺伝子安定発現株が樹立できたので、次に RNA-seq による網羅的な遺伝子発現変動解析を行った。まず初めに Notch シグナルの標的遺伝子である Hes ファミリーの遺伝子発現を確かめたところ、NOTCH2NL 強制発現オルガノイドにおいては、*Hes1, 5, 7* などの遺伝子発現が低下していた。以前の脳神経幹細胞研究報告では、NOTCH2NL 遺伝子は Notch シグナルに対して正の制御因子であることが示されていたので、大腸オルガノイドにおいて NOTCH2NL は Notch シグナルに対して、“負”に機能することは驚くべき結果であった。腸管幹細胞の恒常性維持機構において Notch シグナルは正に機能していることが報告されていたので、NOTCH2NL 強制発現マウス大腸オルガノイドにおける腸管幹細胞マーカー (*Lgr5, mTert, Axin2* など) の発現を調べたところ、これらの腸管幹細胞マーカー遺伝子の発現量も低下していた。また、腸管上皮細胞を構成する分化細胞マーカー遺伝子群も調べたところ、幹細胞マーカー遺伝子の発現パターンとは相反して、分泌系細胞である杯細胞、腸内分泌細胞のマーカー遺伝子は顕著に増加していた。これまでの腸管幹細胞研究成果により、腸管上皮組織で Notch シグナルの活性化が低下すると分泌系細胞数が増加することが知られているため、NOTCH2NL 過剰発現マウス大腸オルガノイドで観察される分泌系細胞の分化誘導の表現型は、Notch シグナルの活性化が抑制されたためと考えられる。このように NOTCH2NL 過剰発現マウス大腸オルガノイドで観察される腸管幹細胞ダイナミクスの異常は、全て Notch シグナルの活性低下に依存するものであったため、**NOTCH2NL は腸管上皮において Notch シグナルの負の制御因子である事が示唆された。**



(3) ヒト大腸オルガノイドを用いた NOTCH2NL 機能欠損株の作製・機能解析

次に、ヒト固有遺伝子 NOTCH2NL の腸管上皮における機能を理解するために、ヒト大腸オルガノイドにおいて NOTCH2NL 遺伝子欠損株の作製を試みた。初めに NOTCH2NL 遺伝子を欠損させるために CRISPR/Cas9 法の利用を計画していたが、NOTCH2NL 遺伝子は進化の過程において NOTCH2 遺伝子座の重複によって獲得されたものであるため、NOTCH2 遺伝子と区別できる NOTCH2NL 配列特異的な gRNA 認識配列を見つけることができなかった。そこで計画を変更し、レンチウイルスを用いた short hairpin (sh)RNA ノックダウン法を用いて NOTCH2NL 遺伝子の機能を阻害することにした。NOTCH2NL 遺伝子座特異的に認識する相補的な塩基配列を 2 箇所 (#1, #2) 設定し、ヒト大腸オルガノイドで NOTCH2NL shRNA を恒常的に発現させる (*NOTCH2NL-KD*) 株をそれぞれ作製した。NOTCH2NL shRNA を発現させたヒト大腸オルガノイドにおいて NOTCH2NL の発現レベルを RT-qPCR 法で確認したところ、40~50%程度の発現が抑制されていることが確認できた (図 4)。そこで、これらの NOTCH2NL-KD 株を用いて、RNA-seq により網羅的に遺伝子発現変動解析を行った。その結果、対照群に比べ NOTCH2NL-KD 株で有意な発現変動 (FDR < 0.05, 2-fold change) を示す 978 遺伝子が確認された。この 978 遺伝子について Gene Ontology 解析を実施したところ、代謝や糖新生、低酸素、また p53 シグナル経路に関与する遺伝子群が有意に検出された。



この樹立した NOTCH2NL-KD ヒト大腸オルガノイド株の Notch シグナル経路

について詳細に確認したところ、NOTCH2NL 過剰発現した場合とは反対に、Notch シグナル標的遺伝子 HES1 の発現上昇が確認できた。さらに、腸管上皮幹細胞や腸管上皮を構成する分化細胞のマーカー遺伝子の発現についても確認したところ、こちらにも NOTCH2NL を過剰発現させた場合と対照的な表現型を示し、杯細胞のマーカー遺伝子 (MUC2, TFF3, ZP16 など) は顕著に減少しており、吸収上皮細胞のマーカー遺伝子 (APOB, CA2 など) が上昇していた。以上の結果より、ヒト大腸組織に発現している NOTCH2NL は、NOTCH シグナルに対し負の制御因子として機能し、腸管幹細胞の細胞運命決定機構に重要な役割をはたすことが示唆された。

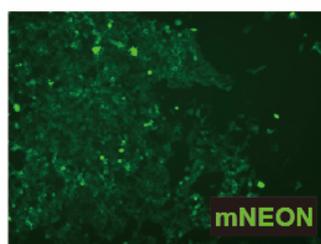
【追加の研究成果】

本課題研究を申請した内容は上記の研究のみであったが、(1) 群馬大学医学部消化管外科の協力、(2) オルガノイド培養のスムーズな立ち上げ、(3) 優秀なスタッフが参加してくれたおかげで、申請時の予定内容よりも大幅に進めることができたので、追加データについても併せて報告する。

(4) NOTCH2NL の細胞内局在観察

次に我々は NOTCH2NL の分子機能を理解するために、細胞内の局在性について調べた。抗 NOTCH2NL 抗体は複数販売されているが、これらの抗体の全ては免疫細胞化学染色法には使用できないことが分かった。そこで我々は CRISPR-HOT 法 (Artegiani et al. Nature Cell Biol. 2020) を用いて mNEON 蛍光タンパク質を NOTCH2NL 遺伝子座に挿入し、NOTCH2NL の細胞内局在を可視化することにした。ヒト大腸オルガノイドに CRISPR-HOT mNEON vector を導入し、FACS 装置を用いて mNEON 陽性細胞を回収し、再度オルガノイドを形成させた。その結果、mNEON タンパク質がノックインされたヒト大腸オルガノイドを樹立することに成功した (図 5)。現在、ヒト大腸上皮細胞における NOTCH2NL の細胞内局在について、様々なマーカーと二重染色することで確認しているが、NOTCH2NL は細胞質全体に局在しているが、一部小胞体に蓄積していることが明らかになった。そこで NOTCH2NL が Notch シグナルを負に制御する分子メカニズムを考えるため、小胞体内で Notch 受容体、もしくはリガンドと結合し、細胞表面への輸送が阻害されているのではないかと仮説を立てた。そこで、我々はこの NOTCH2NL-mNEON ヒト大腸オルガノイド株を用いて免疫共沈降試験を行った。その結果、NOTCH2NL はリガンド DLL1 と結合することが明らかとなった (図 6)。以上の結果をまとめると、ヒト大腸組織に発現している NOTCH2NL は、ニッチ細胞に発現することで DLL1 の細胞表面への輸送を阻害し、その結果 Notch シグナルを負に制御するメカニズムが考えられた (図 7)。そのため NOTCH2NL が発現しているニッチ細胞の隣の大腸幹細胞は、Notch シグナルがオフになり、そこから派生する娘細胞は杯細胞など分泌系の細胞に分化する (図 7)。大腸上皮において杯細胞数が適切に調節されることは、感染防御などの側面からも恒常性維持に重要なことである。ヒト大腸は他の動物に比べて長い管腔構造をもっており、その場所ごとに杯細胞の数に多様性があることが知られている。そのため、進化の過程で獲得したヒト固有遺伝子が腸管上皮細胞の多様性を生み出すのに機能していることが推測された。また、脳神経幹細胞では NOTCH2NL は Notch シグナルに対して正の制御因子であるのに対し、大腸幹細胞では負の制御因子として機能する事が分かった。つまり、NOTCH2NL は Notch シグナルに対し組織ごとに異なる、Context-dependent な働きをすることが明らかとなった。現在、ここまでの内容をまとめて論文投稿の準備を行っている最中である。

図 5



1: ctrl. organoid
2: NOTCH2NL-mNEON organoid

図 6

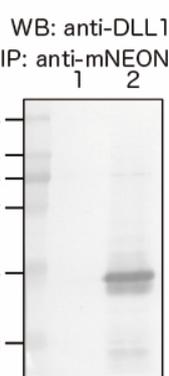
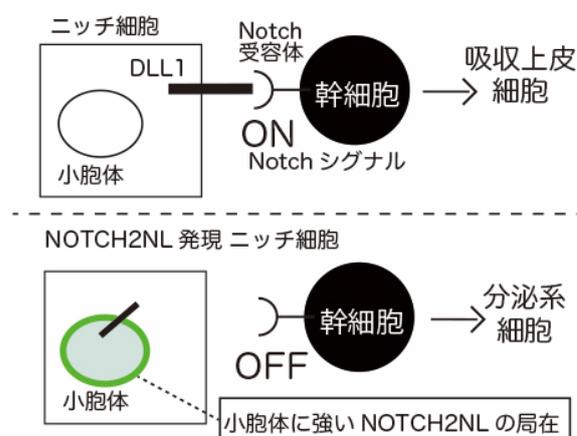


図 7 NOTCH2NL の不均一な発現による多様性



(5) 大腸上皮における NOTCH2NL の新展開

ヒト大腸組織における NOTCH2NL の機能解析を進めていく上で、予想外の結果も得ることができた。上述した NOTCH2NL 過剰発現、機能喪失オルガノイドを用いた遺伝子発現比較解析を行ったところ、共通して p53 シグナルに関与する遺伝子発現変動が確認された。NOTCH2NL を過剰発現させると p53 シグナルの標的遺伝子群が低下し、反対に NOTCH2NL 機能阻害オルガノイドでは、これらの遺伝子群が上昇していた (図 8 次頁)。そこで、実際に NOTCH2NL と TP53 (ヒト p53) が相互作用するかについて検証するために、遺伝子改変 (NOTCH2NL-

mNEON) ヒト大腸オルガノイドを用いて免疫共沈実験を行った。その結果、抗 mNEON 抗体による免疫共沈によって、ヒト大腸オルガノイドのタンパク質抽出液から TP53 タンパク質を回収することができた(図 9 次頁)。以上の結果より、ヒト大腸組織において NOTCH2NL は TP53 と複合体を形成することにより、その下流のシグナル経路を制御する可能性が示唆された。TP53 は大腸癌発症に重要だと考えられているが、世界中の大腸癌オルガノイドバイオバンクの遺伝子解析結果は、TP53 遺伝子座に変異が確認されている大腸癌患者は 50-60%程度であることを報告している。したがって実際に発癌過程における TP53 の役割は未だ不明である。また、p53 は発癌過程だけではなく、細胞老化などに関与することが知られており、我々も最近ヒトの培養細胞を用いて、TP53 が液層分離により細胞質に蓄積することを明らかにし、この細胞内液滴に蓄積する TP53 は DNA ダメージ依存的に細胞老化を誘導するのに重要であることを報告した (Oda et al. Cell Prolif 2023)。したがって、今後は様々な年代 (20~80 代) の大腸オルガノイドを樹立し、p53 シグナル経路を介した細胞老化とヒト固有遺伝子の関係性について理解を図りたいと考えている。

図 8 NOTCH2NL の変動に伴った TP53 シグナルの GO 解析

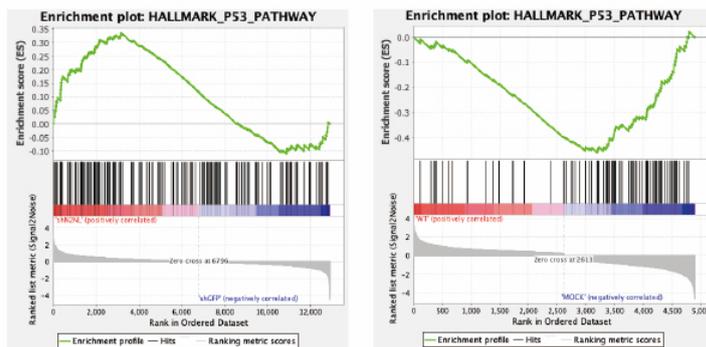
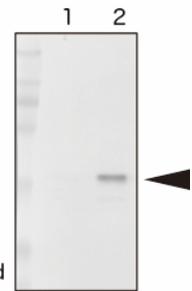


図 9

WB: anti-TP53
IP: anti-mNEON



1: ctrl. organoid

2: NOTCH2NL-mNEON organoid