

令和 2 年 11 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2014～2018

課題番号：26115007

研究課題名（和文）老化ストレスシグナルによる腸管上皮幹細胞制御機構の解明

研究課題名（英文）Understanding of the Stem Cell Aging Regulation in Intestinal Stem Cells

研究代表者

佐藤 俊朗 (Sato, Toshiro)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：70365245

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 71,900,000 円

研究成果の概要（和文）：腸管上皮は体内で最も増殖の速い組織であり、その新陳代謝は陰窩底部にある幹細胞が担っている。細胞増殖に際して一定頻度のゲノム変異が生じるが、腸管上皮細胞に加齢とともにゲノム変異がどの程度蓄積するかはわかっていない。佐藤らは、ヒト腸管上皮幹細胞のオルガノイド培養を用い、正常および疾患組織において、腸管上皮幹細胞が加齢とともにどの程度蓄積し、疾患形質に結びつくかを検討した。その結果、腸管上皮幹細胞は1細胞当たりおよそ40変異/年の速度で蓄積し、発がん関連遺伝子変異の原因となることが示唆された。また、潰瘍性大腸炎による炎症によって変異速度が加速し、炎症に対する耐性に関与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまで不明であった、腸管上皮幹細胞の遺伝子変異蓄積が明らかにされた。また、本邦で増加している潰瘍性大腸炎患者の大腸上皮では、変異速度の加速と特異的な遺伝子変異の蓄積が確認された。本研究は、加齢による腸管上皮細胞の遺伝学的な変化と生物学的な形質への寄与を突き止めた学術的な意義の高い研究である。また、本研究で得られた成果は潰瘍性大腸炎の発がんリスク群の絞り込みに有効と考えられ、臨床的・社会的にも還元可能な優れた成果である。

研究成果の概要（英文）：Intestinal epithelium is the highest proliferative tissue in our body, and its self-renewal is fueled by intestinal stem cells resided at crypt bottoms. Cell proliferation ensues inevitable genomic mutations, however, it remains unknown to what extent intestinal stem cells accumulate genomic mutations along with aging. In this study, using human intestinal organoid culture, Sato et al. determined the dynamics of genomic mutations in healthy and diseased epithelium in association with aging and its relationship with disease phenotype. As a result, the mutation rate was projected to be 40 mutations/year in single intestinal stem cell. Moreover, we demonstrated that mucosal inflammation of ulcerative colitis accelerated the mutation rate of intestinal stem cells and acquired genetic mutations related to the resistance against inflammation.

研究分野：内科学 消化器内科

キーワード：大腸癌 炎症性腸疾患 オルガノイド 幹細胞 老化

1. 研究開始当初の背景

腸管上皮は腸管内腔の細菌叢や食餌抗原などの異物に対するバリアー機能を発揮する。腸管粘膜ではこうした外来抗原や微生物構成成分により、慢性的な炎症細胞浸潤が誘導され、生理的な炎症状態にある。長期間の炎症ストレス曝露は幹細胞に対して(エピ)ゲノム変化や幹細胞機能異常などのステムセルエイジングを引き起こすと考えられる(Lopez-Otin C et al. Cell 2013)。殊に、腸管上皮は体内で最も細胞増殖の盛んな組織であるため、ステムセルエイジングは個体の寿命を規定しうる重要な概念と考えられる。ヒト腸管上皮における加齢は、幹細胞機能を低下させることはなく、むしろ大腸発がんの主要因子となっている。このことは、腸管上皮幹細胞は長期間にわたる頻回の細胞分裂を許容する代償として、遺伝子変異の蓄積による発がんリスクを導いたと考えられる。高齢者のヒト腸管上皮は特徴的な DNA メチル化パターンを示し、大腸発がんとの関連が示された(Toyota M et al. PNAS 1999)。加齢エピゲノム変化は若年の潰瘍性大腸炎患者でも認められることから、慢性炎症が加齢現象を加速することが示唆された(Issa JP et al. Cancer Res 2001)。こうした報告から、腸管粘膜内の生理的炎症または病的炎症によるステムセルエイジングが大腸発がんの原因と考え、以下に示すヒト腸管上皮幹細胞機能解析系を利用し、そのメカニズム追及と治療標的開発につながる研究を着想した。腸管上皮幹細胞は培養が困難であるため、その機能解析は細胞株またはマウスを用いた研究に限定されてきた。我々は、世界で初めてマウス腸管上皮幹細胞培養技術を開発し(Nature 2009)、従来の技術的制約を打破した革新的な研究を展開してきた(Nature 2011, Nat Cell Biol 2012, Nature 2013)。本培養法では、たった1つの腸管上皮幹細胞から3次元組織構造体(オルガノイド)を形成させ、クローン化することができる。我々は培養技術開発を通して、マウスと異なり、ヒト腸管上皮幹細胞が p38 や p53 などの細胞ストレスシグナルに対して高い感受性を有することを見出してきた(Gastroenterology 2011, Unpublished data)。このような研究方法により、ヒト腸管上皮幹細胞のゲノム・エピゲノム・トランスクリプトームなどのオミックス研究への応用が期待されている(Science 2013)。また、幹細胞系譜の可視化技術により、ダイナミックな幹細胞機能を数理モデル化することが可能になった(Cell 2010)。我々はこうした学術的背景から、腸管上皮のステムセルエイジングを分子遺伝学・細胞生物学・システム医学を駆使した統合的理解を図る。

2. 研究の目的

潰瘍性大腸炎は、国内に14万人の患者を有し、比較的若年者においても大腸発がんリスクを有することから社会的問題となっている。我々は、通常の大腸がんも含め、慢性的な炎症ストレスシグナルがステムセルエイジングを介した発がんを導くと考え、本研究を考案した。研究代表者らはこれまで不可能であった腸管上皮幹細胞培養技術の開発に成功し、幹細胞の加齢現象を細胞生物学的に追及することが可能である(Nature 2009, Nature Medicine 2011)。既に、ヒト腸管上皮幹細胞はマウスに比し細胞ストレスに対して高い感受性をもつことを見出しており(Gastroenterology 2011)、長寿命であるヒトの組織を用いたステムセルエイジング研究に着目した。本研究は加齢に伴う腸管上皮幹細胞の(エピ)ゲノム・トランスクリプトーム変化と幹細胞機能異常を包括的に理解し、加齢を誘導する分子およびシグナル機構を解明することを目的とする。さらに、加齢分子メカニズムに基づいた人工的な加齢誘導モデルを作製し、加齢変化を抑制する全く新しい発がん予防治療の創出を目指す。また、包括的ゲノムデータを数理化し、ステムセルエイジングによる大腸がんハイリスクグループの予測を目指す。慢性炎症による発がんは本邦で発症率の高い慢性胃炎や慢性肝炎なども含有するため、本研究の成果は我が国のライフサイエンスの進展ならびに健康長寿社会の実現につながると考える。

3. 研究の方法

研究代表者は、これまで困難であった腸管上皮幹細胞の加齢研究を、新しく開発したヒト腸管上皮幹細胞培養技術を利用して進めていく。また、加齢患者および加齢の加速現象が示されている潰瘍性大腸炎患者から作製したヒト細胞に着目した研究を展開する。ステムセルエイジングの理解と効率的な研究応用を目的とし、体外においてヒト腸管上皮細胞の人工的な加齢の擬似化を試みる。研究代表者らは、既にゲノム編集技術によるヒト腸管上皮幹細胞の遺伝子改変、High Contents Analyzer による化合物ライブラリースクリーニング、マウスを用いた炎症・発がんモデルを構築し、本研究に必須となる基盤技術を整備している。さらに、従来の技術では不可能であったクローン化体性幹細胞のエキソーム解析を用いて、加齢による遺伝子変異数を正確に定量化し、担癌患者や腸内細菌などの環境因子に基づく発がんリスクとの相関を数理化する。広く領域内研究者と協力し、腸管上皮のステムセルエイジングの分子メカニズムを、細胞生物学・腫瘍学・システム生物学の統合的な観点から理解する。【平成 26 年度】(1) ヒト腸管上皮幹細胞クローンを用いたステムセルエイジングのエピ(ゲノム)解析(2) ヒト腸管上皮幹細胞培養技術を用いた人工的加齢モデルの構築(3) 慢性炎症性腸疾患モデルからの腸管上皮加齢マウスモデルの作製【平成 27 年度以降】(4) ステムセルエイジングのゲノム解析を基にした数理モデルの構築(5) 人工的加齢モデルを用いた加齢制御治療の創出(6) マウスモデルを用いた加齢制御治療の検討

4. 研究成果

研究代表者は、ヒト大腸上皮を用いたオルガノイド培養技術の最適化を行い、正常および大腸腫瘍上皮の効率的なオルガノイド培養の開発およびその分子遺伝学的な解析を行った (Fujii M et al. *Cell Stem Cell* 2016). その結果、大腸腫瘍に比して、正常大腸上皮はオルガノイド培養中でのゲノム安定性が示された。また、ゲノム編集によるオルガノイドへの人工的な遺伝子変異導入技術を開発し、遺伝子変異と発がんへの寄与を実証した (Matano M et al. *Nature Medicine* 2015)。さらに、ヒト腸管上皮細胞の増幅によって、幹細胞クローンレベルでの遺伝子変異蓄積を見出した (Bloczjl et al. *Nature*)。当初の想定に反し、潰瘍性大腸炎由来の大腸上皮は従来のオルガノイド培養が困難であることがわかった。これは炎症性腸疾患による慢性炎症が幹細胞の培養中でのリカバリーを阻害するものと考えられた。研究代表者はさらなる大腸上皮培養条件の最適化を行い、既存の培養で用いていた EGF と p38 阻害薬を IGF1 と FGF2 に置き換えることにより、培養効率の飛躍的な改善とともに、潰瘍性大腸炎由来上皮の培養が可能となった。このような条件の基、加齢の与える疾患組織幹細胞の解析を行った。潰瘍性大腸炎患者および健常者の大腸上皮より >30 ラインのクローン化オルガノイドを樹立し、培養によって全エキソーム解析が可能なゲノム量まで増殖させた。得られたオルガノイドを全エキソーム解析を行うことにより、疾患組織幹細胞クローンレベルでの変異蓄積量を推定した。特に、左側結腸型の潰瘍性大腸炎患者の炎症粘膜と非炎症粘膜を用いることにより、同一個体における炎症の変異数に与えるインパクトを計算した。その結果、炎症によって有意に変異数が増加することを見出した。さらに、全エキソーム解析の網羅性の利点を用い、潰瘍性大腸炎上皮で非腫瘍上皮にも拘わらず、高頻度に特定の遺伝子変異が蓄積することを見出した。こうした分子遺伝学的な変化は加齢とともに炎症環境に対して耐性を獲得する新しい機構と考えられた (Nanki K et al. *Nature* 2020)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 30 件)

1. Nakamoto N, ...他 19 名, **Sato T***, Kanai T*. Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver T helper 17 cell immune response in primary sclerosing cholangitis. **Nature Microbiology**. (査読有) 2019 年 4 巻. P. 492 ~ 503. DOI:10.1038/s41564-018-0333-1
2. Nanki K, ...他 20 名, Kanai T, **Sato T***. Divergent Routes toward Wnt and R-spondin Niche Independency during Human Gastric Carcinogenesis. **Cell**. (査読有) 2018 年 174 巻. P. 856 ~ 869. DOI: 10.1016/j.cell.2018.07.027
3. Fujii M, ...他 6 名, **Sato T**. Human Intestinal Organoids Maintain Self-Renewal Capacity and Cellular Diversity in Niche-Inspired Culture Condition. **Cell Stem Cell**. (査読有) 2018 年 23 巻. P. 787 ~ 793. DOI: 10.1016/j.stem.2018.11.016
4. Nakamura T, **Sato T**. Advancing Intestinal Organoid Technology Toward Regenerative Medicine. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**. (査読有) 2018 年 5 巻. P. 51-60. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2017.10.006
5. Sugimoto S, ...他 10 名, **Sato T**. Reconstruction of the Human Colon Epithelium In Vivo. **Cell Stem Cell**. (査読有) 2018 年 22 巻. P. 171-176. DOI: 10.1016/j.stem.2017.11.012
6. Kanaya T, ...他 12 名, **Sato T**, Williams I for R., Ohno H. Development of intestinal M cells and follicle-associated epithelium is regulated by TRAF6-mediated NF- B signaling. **The Journal of Experimental Medicine**. (査読有) 2018 年 215 巻 P. 501-519. DOI: 10.1084/jem.20160659
7. 戸ヶ崎 和博, **佐藤 俊朗**. 【オルガノイド再生医学-ミニ臓器を作る挑戦と応用の可能性】オルガノイド技術を活用した大腸癌研究のブレイクスルー. **医学のあゆみ**. (査読無) 2018 年 264 巻 8 号. P. 674-678. DOI:なし

8. **佐藤俊朗**. 【臓器老化の本質に迫るステムセルエイジング 幹細胞システムの変遷と加齢関連疾患のメカニズム】腸管上皮幹細胞のエイジングと発がん. **実験医学**.(査読無) 2017年 35 巻 8 号. P.1291-1296. DOI:なし
9. Shimokawa M, Ohta Y, Nishikori S, Matano M, Takano A, Fujii M, Date S, Sugimoto S, Kanai T, **Sato T**. Visualization and targeting of LGR5+ human colon cancer stem cells. **Nature**.(査読有) 2017年 545号.P. 187-192. DOI:10.1038/nature22081
10. Kon S, ...他 28 名, **Sato T**, et al. Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. **Nature Cell Biology**.(査読有) 2017年 19 巻. P. 530-541. DOI: 10.1038/ncb3509
11. Jinnohara T, ...他 7 名, **Sato T**,...他 7 名. IL-22BP dictates characteristics of Peyer ' s patch follicle-associated epithelium for antigen uptake. **The Journal of Experimental Medicine**.(査読有) 2017年 214 巻. P. 1607-1618. DOI:10.1084/jem.20160770
12. Sugimoto S, **Sato T**. Establishment of 3D Intestinal Organoid Cultures from Intestinal Stem Cells.**Methods in Molecular Biology**.(査読有) 2017年 1612 巻.P. 97-105. DOI: 10.1007/978-1-4939-7021-6_7
13. Hayashi A, ...他 3 名, **Sato T**, ...他 9 名, Kanai T. Intestinal Dysbiosis and Biotin Deprivation Induce Alopecia through Overgrowth of *Lactobacillus murinus* in Mice. **Cell Reports**.(査読有) 2017年 20 巻. P. 1513-1524. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.07.057
14. Blokzijl F,...他 14 名, **Sato T**, ...他 11 名. Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life. **Nature**. (査読有)2016年 238 巻. P.260-264 DOI: 10.1038/nature19768
15. Ohashi W, ...他 10 名, **Sato T**,...他 8 名. **PLoS Genetics**.(査読有) 2016年 12 巻. e1006349. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006349
16. Dominguez-Brauer C, ...他 22 名, **Sato T**, Mak TW. Mule Regulates the Intestinal Stem Cell Niche via the Wnt Pathway and Targets EphB3 for Proteasomal and Lysosomal Degradation. **Cell Stem Cell**.(査読有)2016年 19 巻 P.205-216. DOI:10.1016/j.stem.2016.04.002
17. Fujii M, ...他 11 名, **Sato T**. A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements. **Cell Stem Cell**. (査読有)2016年 18 巻 P. 827-838. DOI: 10.1016/j.stem.2016.04.003
18. Oudhoff MJ, ...他 12 名, **Sato T**, ...他 5 名. SETD7 controls intestinal regeneration and tumorigenesis by regulating Wnt/betacatenin and Hippo/YAP signaling. **Developmental Cell**. (査読有)2016年 37 巻 P.47-57. DOI: 10.1016/j.devcel.2016.03.002
19. Mihara E, ...他 5 件, **Sato T**, Takagi J. Active and water-soluble form of lipidated Wnt protein is maintained by a serum glycoprotein afamin/ -albumin. **eLife**.(査読有) 2016年 e11621. P.1-19. DOI: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.11621>
20. Nakajo A, ...他 8 名, **Sato T**, Harada A. EHBP1L1 coordinates Rab8 and Bin1 to regulate apical-directed transport in polarized epithelial cells. **The Journal of Cell Biology**. (査読有)2016年 212(3): P.297-306. DOI: 10.1083/jcb.201508086
21. **Sato T***, Clevers H*.SnapShot: Growing Organoids from Stem Cells. **Cell**. (査読有)

2015年.P. 1700-1700.e1. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.028>

22. Fujii M, Matano M, Nanki K, **Sato T***. Efficient gene engineering of human intestinal organoid using electroporation. **Nature protocol**. (査読有) 2015年10(10).P.1474-1485. DOI: 10.1038/nprot.2015.088
23. Matano M, ...他7名, **Sato T**. Modelling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. **Nature Medicine**. (査読有)2015年21(3)巻 P. 256-262. DOI: 10.1038/nm.3802. Epub 2015 Feb 23

[学会発表](計 40件)

1. **Toshiro Sato**. Evolving roles of organoids in human disease biology . Avison Biomedical Symposium 2018. 2018年
2. **Toshiro Sato**. The Evolving Roles of Organoids in Regenerative Medicine. DDW2018. 2018年
3. **佐藤俊朗**. 深化するオルガノイド技術:疾患細胞生物学への応用. 第91回生化学学会大会. 2018年
4. **佐藤俊朗**. ヒト腸管におけるステムセルエイジング.第41回日本分子生物学会年会.2018年
5. **Toshiro Sato**. MODELING OF GASTROINTESTINAL DISEASE USING ORGANOIDs . ISSCR International Symposium. 2018年
6. **Toshiro Sato**. Modeling Normal and Cancer Stem Cells using Organoids. The 2nd JSPS-NUS Joint Symposium. 2018年
7. **佐藤俊朗**. オルガノイドを用いた細胞系譜解析によるヒト正常大腸幹細胞挙動の可視化. 第17回日本再生医療学会総会. 2018年
8. **Toshiro Sato**. The evolving roles of organoids in disease biology. CDB Symposium 2018. 2018年
9. **Toshiro Sato**. Lineage Tracing of Human Colon Organoids Visualizes Self-Renewal of LGR5+ Stem Cells in Tissue Environments. 16th Surugadai International Symposium & Joint Usage/Research Program of Medical Research Institute International Symposium . 2017年
10. **佐藤俊朗**. オルガノイドが切り拓く再生医学. 再生医療産業化フォーラム. 2017年
11. **佐藤俊朗**, 南木康作, 下川真理子. 加齢・炎症ストレスの及ぼす腸管上皮幹細胞の分子遺伝学的変化 .IPS18 ステムセルエイジング:老化の謎は解明できるか? 第39回日本分子生物学会年会. 2016年
12. **Toshiro Sato**. Easy manipulation of the genome: CRISPR technology. Translational Basic Science Novel models for GI disease. UEGW 2016. 2016年
13. **Toshiro Sato**. Disease modeling of human colorectal cancer. EMBO. EMBL Symposium. 2016年
14. **Toshiro Sato**, Shinya Sugimoto, Mami Matano. Gut environments and human colorectal carcinogenesis. Symposium 17. The intestinal microflora and cancer. The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2016年
15. **Toshiro Sato**. Disease Modeling of Colorectal Cancer Using Orgnaoids,Concurrent IV Disease modeling II. ISSCR 2016. 2016年
16. **佐藤俊朗**. 腸管上皮オルガノイド培養の確立とその応用. 特別企画2 日本から世界に向けて発信されたトップ研究. 第102回日本消化器病学会大会. 2016年

17. **Toshiro Sato**. Intestinal Stem Cell Niche Signaling in Homeostatic and Diseased Epithelium. Session2. Gut homeostasis and IBD. The 5th International Forum of the 102nd General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology. 2016年
18. **Toshiro Sato**. Functional Dynamics of Human Colon Cancer Stem Cells. Cellular Dynamics in Tissues. National Institute for Basic Biology. 2016年
19. **Toshiro Sato**. Dynamics of stem cell system in intestinal epithelium. Biochemistry and Molecular Biology 2015. Symposium 3S4 Cell and Time. 2015年
20. **Toshiro Sato**. Modelling of colorectal cancer using CRISPR/Cas9 mediated engineering of human intestinal organoids. American Association of Cancer Research (AACR) annual meeting 2015. 2015年
21. **佐藤俊朗**. 消化器幹細胞の培養技術確立と再生医療への応用 第29回日本医学会総会 2015 関西. 2015年

〔図書〕(計 2 件)

1. **佐藤俊朗**, 武部貴則, 永樂元次 / 編. 株式会社羊土社. 実験医学別冊 決定版 オルガノイド 実験スタンダード 開発者直伝! 珠玉のプロトコール集 2019年. 全372ページ.
2. Date S, **Sato T***. Annual Review of Cell and Developmental Biology. Mini-Gut Organoids: Reconstitution of the Stem Cell Niche. 2015年. P. 269-289

〔産業財産権〕 該当なし

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 <http://organoidmed.org/>

6. 研究組織

- (1) 研究分担者 なし
(2) 研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。