

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08972

研究課題名(和文) 腸上皮幹細胞ニッチの再構築と治療応用

研究課題名(英文) Reconstruction of Intestinal Epithelial Stem Cell Niche and Therapeutic Application

研究代表者

有村 佳昭 (Arimura, Yoshiaki)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80305218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患は、再燃、寛解を繰り返す慢性の難治性疾患である。現在、炎症抑制効果のある薬剤治療が中心であるが、適切な炎症のコントロールにも拘わらず、上皮再生が障害されている患者群が存在する。従って、腸上皮再生をもたらす根治療法の開発は極めて重要な研究課題である。本研究は、骨髄間葉系幹細胞を用いてex vivoにおいてより生理的な腸上皮幹細胞(intestinal stem cell, ISC)ニッチを人工的に再構築するために、ラットISC単離・培養技術の確立、EnteroidとMSCの共培養によるorganoidの作製に取り組み、その手法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic refractory disease repeating relapse and remission. Currently, drug therapy with an effect of suppressing inflammation is mainly used for patients with IBD, but despite adequate control of inflammation, there is a group of patients in which epithelial regeneration is impaired. Therefore, the development of curative therapy leading to intestinal epithelial regeneration is an extremely important research subject. In order to artificially reconstruct a more physiological intestinal epithelial stem cell (ISC) niche ex vivo using bone marrow mesenchymal stem cells, this research aims to establish the isolation and culture technology of rat ISC. We worked on the creation of organoid by co-culture of Enteroid and MSC and established the method.

研究分野：下部消化管分野

キーワード： 骨髄間葉系幹細胞 炎症性腸疾患 幹細胞ニッチ

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, IBD) は、再燃、寛解を繰り返す慢性の難治性疾患である。現在、炎症抑制効果のある薬剤治療が中心となっている。しかしながら、適切な炎症のコントロールにも拘わらず、上皮再生が障害されている患者群は存在する。上皮細胞の再生異常は、腸管粘膜バリアー機能の障害をもたらす。その結果、腸管炎症の持続につながる。このような観点から、IBD 患者に対する腸上皮再生をもたらす根治療法の開発は極めて重要な研究課題である。

2. 研究の目的

腸管上皮細胞が再生するためには、その足場としての間質細胞が必須である。従って、本研究では、骨髄間葉系幹細胞 (cultured mesenchymal stem/stromal cells, MSC) を用いた ex vivo における生理的な腸上皮幹細胞 (intestinal stem cell, ISC) ニッチを人工的に再構築すること目的した。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、ラットにおける大腸クリプトおよび大腸上皮幹細胞の単離・培養を確立する。
(2) 大腸上皮幹細胞の培養に共通の必須条件は、基本培地に加え、EGF, Noggin, R-spondin, WNT3A の 4 因子の存在であり、ヒトでは、さらに、Gastrin, Nicotinamide に加え、A-83-01 (ALK4,5,7 inhibitor), SB202190 (p38 inhibitor) の低分子化合物を要する。これらの薬剤を使用して検討を行った。

4. 研究成果

(1) 予備的検討では、(2) の薬剤の組み合わせでは、ラット大腸 Crypt の ex vivo 3 次元培養法は不可能であった。そこで、Ootani

らの腸管上皮初代培養法 (Nat Med 2009) と TMDU 法 (Nat Med 2011) を組み合わせ、Transwell のゲル内にラット大腸組織のホモジネートあるいは、大腸組織ホモジネートの上清で長期培養が可能であることを明らかにした。

(2) 大腸組織ホモジネートの上清のタンパク成分を疎水性、ゲルろ過および陰イオン交換クロマトグラフィーによる粗分画・精製した。その結果、278 タンパクが同定された。

(3) 活性分画に多く含有されたタンパクは 7 つ存在する。このうち、paracrine 様式で作用しうるものは EP-1 と Galectin-4 (Gal4) の 2 つのみであった。

(4) 本研究では、PGE2, Gal4 に絞り込み、3 次元培養における 2 つの分子の生理活性の再現性を確認した。

(5) PGE2, Gal4 を添加することにより、enteroid と MSC の共培養において、MSC が enteroid の外周に張り付くことが確認された (本研究ではこの状態を organoid として定義し enteroid と区別した) 一方で、PGE2, Gal4 が添加されていない共培養の群では、そのような現象が確認されなかった。

(5) 以上の結果から、MSC と ISC ニッチを人工的に再構築するシステムならびに必要な生理活性物質の同定に成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

Isshiki H, Arimura Y, Nagaishi K, Kawakami K, Onodera K, Yamashita K, Naishiro Y, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Establishment of a refined culture method for rat colon organoids. Biochem

Biophys Res Commun. 査読有, 489, 2017, 305-311.

Shimizu H, [Arimura Y](#), Onodera K, Takahashi H, Okahara S, Kodaira J, Oohashi H, Isshiki H, Kawakami K, [Yamashita K](#), Shinomura Y, Hosokawa M. Malignant Potential of Gastrointestinal Cancers Assessed by Structural Equation Modeling. PLoS One. 査読有, 11, 2016, e0149327.

Onodera K, [Arimura Y](#), Isshiki H, Kawakami K, Nagaishi K, [Yamashita K](#), Yamamoto E, Niinuma T, Naishiro Y, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y. Low-Frequency IL23R Coding Variant Associated with Crohn's Disease Susceptibility in Japanese Subjects Identified by Personal Genomics Analysis. PLoS One. 査読有, 10, 2015, e0137801.

Kawakami K, Minami N, Matsuura M, Iida T, Toyonaga T, [Nagaishi K](#), [Arimura Y](#), Fujimiya M, Uede T, [Nakase H](#). Osteopontin attenuates acute gastrointestinal graft-versus-host disease by preventing apoptosis of intestinal epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 査読有, 485, 2017, 468-475.

Hirayama D, Iida T, [Nakase H](#). The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. Int J Mol Sci. 査読有, 19(1), 2017, pii: E92.

Iida T, Wagatsuma K, Hirayama D, [Nakase H](#). Is Osteopontin a Friend or Foe of Cell Apoptosis in Inflammatory Gastrointestinal and Liver Diseases? Int J Mol Sci. 査読有, 19, 2017, pii: E7

〔学会発表〕（計 2 件）

川上賢太郎, 一色裕之, 有村佳昭, 小野寺馨, 永石歓和, 山下健太郎, 藤宮峯子, 仲瀬裕志. ラット大腸 3 次元培養における間葉系幹細胞のニッチ作用 JDDW 2016 11 月 05 日 神戸国際展示場 (兵庫県, 神戸市)

小野寺馨, 有村佳昭, 榮浪洋介, 横山佳浩, 山本至, 一色裕之, 川上 賢太郎, 久保俊之, 山下健太郎, 仲瀬裕志. パーソナルゲノム解析を通じた日本人クローン病感受性遺伝子の探索 JDDW 2016 11 月 05 日 神戸国際展示場(兵庫県, 神戸市)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

有村佳昭 (ARIMURA Yoshiaki)

札幌医科大学医学部

消化器内科学講座・研究員

研究者番号：80305218

(2)研究分担者

永石歆和 (NAGAISHI Kanna)

札幌医科大学医学部

解剖学第二講座・准教授

研究者番号：30544118

山下健太郎 (YAMASHITA Kentaro)

札幌医科大学医学部

消化器内科学講座・講師

研究者番号：90381269

仲瀬裕志 (NAKASE Hiroshi)

札幌医科大学医学部

消化器内科学講座・教授

研究者番号：60362498