

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15287

研究課題名(和文) ヒト腸管上皮幹細胞における1細胞イメージング技術の開発

研究課題名(英文) Single cell imaging in human intestinal stem cell

研究代表者

土屋 輝一郎 (Tsuchiya, Kiichiro)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40376786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光発現遺伝子を腸管上皮初代培養細胞に独自の手法で導入することにより、オルガノイド内の細胞をランダムに蛍光標識した。その中でクリプト内に1細胞のみ蛍光標識された細胞を探索し、単離した。1蛍光細胞からオルガノイドが樹立可能であったことから、幹細胞であることを確認した。そこで、1蛍光細胞の分裂能、分化細胞系譜などを3次元で経時的に観察した。さらに蛍光陰性幹細胞と蛍光幹細胞との相互関係を解析することで、一つの絨毛の形成に対する幹細胞同士の役割分担をマイクロアレイ解析にて評価した。またヒト腸管上皮初代培養を用いて1幹細胞の評価を開始しており、疾患患者由来の1幹細胞との比較検討を行う基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：We did random labeling of fluorescence into the organoid cells by original method. We then found single fluorescence-labeled cell in crypt and isolated it. The organoids could be generated from single fluorescence cell, indicating that single fluorescence cell might be intestinal stem cell. We could therefore observe the cell division of single fluorescence stem cell and lineage tracing of differentiated cell in three dimensions. Moreover, we evaluated the role between stem cells for the formation of one villus by analyzing the mutual relations with the fluorescence-negative stem cell and fluorescence stem cell. In addition, we started the evaluation of single stem cell using human intestinal organoids to estimate the regulation of single stem cell derived from the patients.

研究分野：消化器内科学

キーワード：1幹細胞可視化 Lgr5プロモーター 1幹細胞動態

1. 研究開始当初の背景

これまで申請者は難治性炎症性腸疾患の病態解明のための基盤研究を行い、免疫制御破綻における過剰応答と粘膜障害における腸管上皮再生不全の両面が疾患の本態であることを明らかとしてきた。特に腸管上皮細胞は局所免疫制御及び粘膜バリアー機能の双方に関与することから、上皮細胞再生を主眼とした治療法の確立が炎症性腸疾患患者の生活体系を根本的に改善できると着想した。そこで「腸管炎症における上皮細胞機能の解明」研究を精力的に進め、炎症の成因・維持機構を上皮細胞機能との関連という視点で明確にした。一方で腸管の機能的修復における粘膜治癒の重要性に着目し、上皮再生に関する研究を展開した。腸管上皮細胞内の Wnt/Notch シグナル間の全く新しいクロストーク分子機構が存在し、炎症性疾患における上皮再生破綻機構であることを明らかとするなど世界的に高い評価をうけた。さらに、独自に大腸上皮細胞の初代培養法を確立し上皮幹細胞を同定したのみならず、マウス大腸への移植により全ての分化細胞と増殖細胞を含む組織学的に正常な大腸上皮が再生することを世界で初めて報告した(Nat Med 2012)。以上より、幹細胞機能維持が腸管上皮細胞恒常性維持に深く関わることが示唆されたが、小腸では一つの腺管内に約 14 個の陽性細胞が存在しており、個々の幹細胞の機能判別や、幹細胞同士の相互作用を解析することは困難である。幹細胞マーカーである Lgr5 プロモーター下に GFP を発現する遺伝子組み換えマウスにおいても GFP により可視化される幹細胞が同一腺管内に複数存在するため、同一腺管内の 1 つの幹細胞を区別して可視化・認識することが出来ない。さらにヒト検体においても幹細胞を可視化する手法は未だ確立されていないことから幹細胞の機能を評価する上で幹細胞の分裂能、幹細胞からの分化系譜制御、腸内環境による幹細胞の形質転換など、1 幹細胞の動態を解析することが困難な状況である。

2. 研究の目的

本研究では独自に開発した手法を用いて 1 幹細胞を可視化し、個別の幹細胞解析・機能評価を構築することで、1 幹細胞の運命決定制御機構を明らかとすることを目的とする。さらに正常の腸管上皮幹細胞機能制御を理解した上で消化管疾患特異的な幹細胞病態を明らかとすることで、最終的には幹細胞を標的とした画期的治療法の開発への基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

蛍光発現遺伝子を腸管上皮初代培養細胞に独自の手法で導入することにより、オルガノイド内の細胞をランダムに蛍光標識する。その中でクリプト内に 1 細胞のみ蛍光標識された細胞を探索し、単離する。1 蛍光細胞が

幹細胞であることを確認した上で、蛍光細胞の分裂能、分化細胞系譜などを経時的に観察する事で評価が可能である。さらに蛍光陰性幹細胞と蛍光幹細胞との相互関係を解析することで、一つの絨毛の形成に対する幹細胞同士の役割分担を評価できる。さらに細胞内シグナル動揺による幹細胞動態を経時的に観察・解析可能であることから、シグナルによる幹細胞機能制御を明らかとし、最終的には病態疑似モデルを構築した上で疾患特異的な幹細胞機能異常を同定する。またマウスを用いて評価法を確立した後に、ヒト腸管上皮初代培養を用いて 1 幹細胞の評価を行い、疾患患者由来の 1 幹細胞との比較検討を行う。

4. 研究成果

マウス小腸上皮細胞の初代培養を導入し、mCherry 遺伝子の導入を行った。蛍光発現遺伝子を腸管上皮初代培養細胞に独自の手法で導入することにより、オルガノイド内の細胞をランダムに蛍光標識した。その中でクリプト内に 1 細胞のみ蛍光標識された細胞を探索し、単離した。1 蛍光細胞からオルガノイドが樹立可能であったことから、幹細胞であることを確認した。そこで、1 蛍光細胞の分裂能、分化細胞系譜などを 3 次元で経時的に観察した。さらに蛍光陰性幹細胞と蛍光幹細胞との相互関係を解析することで、一つの絨毛の形成に対する幹細胞同士の役割分担をマイクロアレイ解析にて評価した。またヒト腸管上皮初代培養を用いて 1 幹細胞の評価を開始しており、疾患患者由来の 1 幹細胞との比較検討を行う基盤を構築した。マウス小腸上皮細胞の初代培養は既に確立し、mCherry 遺伝子の導入を行った。以上より、当初の予定通り概ね順調に遂行したと考える。

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 15 件)

1. Tsuchiya K, Hayashi R, Fukushima K, Hibiya S, Horita N, Negi M, Itoh E, Akashi T, Eishi Y, Motoya S, Takeuchi Y, Kunisaki R, Fukunaga K, Nakamura S, Yoshimura N, Takazoe M, Iizuka B, Suzuki Y, Nagahori M, Watanabe M. CDX2 expression induced by leukocytapheresis might be associated with mucosal healing in ulcerative colitis. J Gastroenterol Hepatol. 2017, 32(5), 1032-1039. doi: 10.1111/jgh.13645. 査読有
2. Maeyashiki C, Oshima S, Otsubo K, Kobayashi M, Nibe Y, Matsuzawa Y, Onizawa M, Nemoto Y, Nagaiishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M. HADHA, the alpha

- subunit of the mitochondrial trifunctional protein, is involved in long-chain fatty acid-induced autophagy in intestinal epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017, 484(3), 636-641. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.159. 査読有
3. Fujimoto K, Kinoshita M, Tanaka H, Okuzaki D, Shimada Y, Kayama H, Okumura R, Furuta Y, Narazaki M, Tamura A, Hatakeyama S, Ikawa M, Tsuchiya K, Watanabe M, Kumanogoh A, Tsukita S, Takeda K. Regulation of intestinal homeostasis by the ulcerative colitis-associated gene RNF186. *Mucosal Immunol*. 2017, 10(2), 446-459. doi: 10.1038/mi.2016.58. 査読有
 4. Nakata T, Shimizu H, Nagata S, Ito G, Fujii S, Suzuki K, Kawamoto A, Ishibashi F, Kuno R, Anzai S, Murano T, Mizutani T, Oshima S, Tsuchiya K, Nakamura T, Hozumi K, Watanabe M, Okamoto R. Indispensable role of Notch ligand-dependent signaling in the proliferation and stem cell niche maintenance of APC-deficient intestinal tumors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017, 482(4), 1296-1303. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.031.
 5. Hibiya S, Tsuchiya K, Hayashi R, Fukushima K, Horita N, Watanabe S, Shirasaki T, Nishimura R, Kimura N, Nishimura T, Gotoh N, Oshima S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M. Long-term inflammation transforms intestinal epithelial cells of colonic organoids. *J Crohns Colitis*. 2017, 11 (5), 621-630. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw186. 査読有
 6. Nakata T, Shimizu H, Nagata S, Ito G, Fujii S, Suzuki K, Kawamoto A, Ishibashi F, Kuno R, Anzai S, Murano T, Mizutani T, Oshima S, Tsuchiya K, Nakamura T, Hozumi K, Watanabe M, Okamoto R. Data showing proliferation and differentiation of intestinal epithelial cells under targeted depletion of Notch ligands in mouse intestine. *Data Brief*. 2016, 10, 551-556. doi: 10.1016/j.dib.2016.12.045. 査読有
 7. Kobayashi M, Oshima S, Maeyashiki C, Nibe Y, Otsubo K, Matsuzawa Y, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M. The ubiquitin hybrid gene UBA52 regulates ubiquitination of ribosome and sustains embryonic development. *Sci Rep*. 2016, 6, 36780. doi: 10.1038/srep36780 査読有
 8. Fujii S, Suzuki K, Kawamoto A, Ishibashi F, Nakata T, Murano T, Ito G, Dr. Shimizu H, Mizutani T, Oshima S, Tsuchiya K, Nakamura T, Araki A, Ohtsuka K, Okamoto R, Watanabe M. PGE2 is a direct and robust mediator of anion/fluid secretion by human intestinal epithelial cells. *Sci Rep*. 2016, 6, 36795. doi: 10.1038/srep36795. 査読有
 9. Kojima T, Tsuchiya K, Ikemizu S, Yoshikawa S, Yamanishi Y, Watanabe M, Karasuyama H. Novel CD200 homologues iSEC1 and iSEC2 are gastrointestinal secretory cell-specific ligands of inhibitory receptor CD200R. *Sci Rep*. 2016, 6, 36457. doi: 10.1038/srep36457. 査読有
 10. Hayashi R, Tsuchiya K, Fukushima K, Horita N, Hibiya S, Kitagaki K, Negi M, Itoh E, Akashi T, Eishi Y, Okada E, Araki A, Ohtsuka K, Fukuda S, Ohno H, Okamoto R, Nakamura T, Tanaka S, Chayama K, Watanabe M. Reduced Human α -defensin 6 in Noninflamed Jejunal Tissue of Patients with Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2016, 22(5), 1119-1128. doi: 10.1097/MIB.0000000000000707. 査読有
 11. Tsuchiya K. The significance of infectious disease and microbiota in FGID. *General Medicine*. 2015, 102(1), 23-31. 査読有
 12. Matsuzawa Y, Oshima S, Takahara M, Maeyashiki C, Nemoto Y, Kobayashi M, Nibe Y, Nozaki K, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Averil Ma, Watanabe M. TNFAIP3 promotes survival of CD4 T cells by restricting MTOR and promoting autophagy. *Autophagy*. 2015, 11(7), 1052-1062. doi: 10.1080/15548627.2015.1055439. 査読有
 13. Fukushima K, Tsuchiya K, Kano Y, Horita N, Hibiya S, Hayashi R, Kitagaki K, Negi M, Itoh E, Akashi T, Eishi Y, Oshima S, Nagaishi T, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M. Atonal homolog 1 protein stabilized by tumor necrosis factor α induces high malignant potential in colon cancer cell line. *Cancer Sci*. 2015, 106(8), 1000-7. doi: 10.1111/cas.12703. 査読有
 14. Tsuchiya K. The Effect of TNF- α on the Regulation of Epithelial Function in Inflammatory Bowel Disease. *Front Gastrointest Res*. 2015, 34, 1-8. 査読有
 15. Oshima H, Nakayama M, HanT, Naoi K, Ju X, Maeda Y, Robine S, Tsuchiya K, Sato T, Sato H, Taketo M, Oshima M.

Suppressing TGF- β signaling in regenerating epithelia in an inflammatory microenvironment is sufficient to cause invasive intestinal cancer. *Cancer Res.* 2015, 75(4), 766-76.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2036.
査読有

[学会発表] (計 30 件)

1. Atoh1 protein stability in sporadic colon cancer and colitis-associated cancer, 口頭, Tsuchiya K, BIT's 10th Anniversary of Protein & Peptide Conference-2017, 2017/3/22, Hilton Fukuoka Sea Hawk (福岡県福岡市)
2. バルーン内視鏡生検検体を用いたクローン病病態解析, 口頭, 土屋輝一郎、渡辺守, 第 35 回 Cytoprotection 研究会, 2017/3/10, メルパルク京都 (京都府京都市)
3. 消化管幹細胞研究の最前線, 口頭, 土屋輝一郎, 第 13 回日本消化管学会総会学術集会, 2017/2/17, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
4. Atoh1 protein stabilization in colon tumor acquires the morphological change to signet ring cell carcinoma with cancer stem cell enrichment, ポスター, Tsuchiya K, Hibiya S, Fukushima K, Shirasaki T, Oshima S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M, APDW 2016, 2016/11/3, Kobe convention center, KOBE (JAPAN)
5. Construction of in vitro model of ulcerative colitis using mouse primary colonic organoid, 口頭, Hibiya S, Tsuchiya K, Watanabe S, Shirasaki T, Oshima S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M, UEG Week 2016, 2016/10/18, Vienna (Austria)
6. Stimulation with the ligands of toll like receptors in primary human organoids, ポスター, Shirasaki T, Tsuchiya K, Hibiya S, Nishimura R, Watanabe S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M, AOCC2016, 2016/7/9, Kyoto International Conference Center, Kyoto (JAPAN)
7. Mouse colonic organoid acquires wnt-independent survival property after long-term inflammation, ポスター, Hibiya S, Tsuchiya K, Shirasaki T, Fukushima K, Oshima S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M, AOCC2016, 2016/7/8, Kyoto International Conference Center, Kyoto (JAPAN)
8. Atoh1 protein stabilization in colon tumor acquires the phenotype of signet ring cell carcinoma with cancer stem cell enrichment, ポスター, Tsuchiya K, Hibiya S, Fukushima K, Shirasaki T, Oshima S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M, AOCC2016, 2016/7/8, Kyoto International Conference Center, Kyoto (JAPAN)
9. ATOH1 Protein Stabilization in Tumor Acquires the Morphological Change to Signet Ring Cell Carcinoma With Cancer Stem Cell Enrichment in Colon Cancer, ポスター, Tsuchiya K, Hibiya S, Fukushima K, Shirasaki T, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M, DDW2016, 2016/5/24, San Diego (USA)
10. In Vitro Organoid Model Reveals PGE2 As a Robust Mediator of Chloride & Water Secretion By Human Intestinal Epithelial Cells, 口頭, Fujii S, Suzuki K, Kawamoto A, Ishibashi F, Nakata T, Ito G, Shimizu H, Mizutani T, Tsuchiya K, Nakamura T, Ohtsuka K, Okamoto R, Watanabe M, DDW2016, 2016/5/23, San Diego (USA)
11. Construction of In Vitro Model for Inflammatory Bowel Disease Using Primary Colonic Organoid, ポスター, Hibiya S, Tsuchiya K, Shirasaki T, Fukushima K, Oshima S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M, DDW2016, 2016/5/21, San Diego (USA)
12. Single-Cell Level Analysis Reveals Heterogeneous Expression of Stem-Cell Specific Genes in Human Small Intestinal Organoids, 口頭, Suzuki K, Fujii S, Kawamoto A, Ishibashi F, Nakata T, Ito G, Shimizu H, Tsuchiya K, Nakamura T, Ohtsuka K, Okamoto R, Watanabe M, DDW2016, 2016/5/21, San Diego (USA)
13. 炎症性腸疾患関連大腸がんの形質獲得機構, 口頭, 土屋輝一郎, お茶の水がん学アカデミア 124 回集会, 2016/5/18, 順天堂大学 (東京都文京区)
14. 生検検体が切り拓く IBD 病態解明と臨床展開, 口頭, 土屋輝一郎, 第 14 回広島消化器免疫研究会, 2016/4/28, ホテルグランヴィア広島 (広島県広島市)
15. 長期炎症刺激による大腸上皮培養細胞の非可逆的 NF- κ B シグナル活性, 口頭, 日比谷秀爾, 土屋輝一郎, 白崎友彬, 福島啓太, 大島 茂, 岡本隆一, 中村哲也, 渡辺 守, 第 102 回日本消化器病学会総会, 2016/4/22, 京王プラザホテル (東京都新宿区)
16. 小腸内視鏡生検検体を用いたクローン病における α defensin 発現解析, 口頭, 林 亮平, 土屋輝一郎, 渡辺 守, 第 102 回日本消化器病学会総会, 2016/4/21, 京王プラザホテル (東京都新宿区)
17. 炎症関連大腸がんにおけるがん幹細胞形

- 質獲得機構, 口頭, 土屋輝一郎, 日本がん分子標的治療学会第11回トランスレーショナルリサーチワークショップ, 2016/1/15, 都市センターホテル(東京都千代田区).
18. TNF- α stabilizes Atoh1 protein in colitis-associated colorectal cancer resulting in enhanced malignant potential, ポスター, Shirasaki T, Fukushima K, Tsuchiya K, Hibiya S, Hayashi R, Horita N, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M, UEG Week 2015, 2015/10/28, Barcelona (Spain).
 19. Continuous stimulation with cytokines leads to irreversible accumulation of NF- κ B signaling in colonic epithelial cells by organoid culture, ポスター, Hibiya S, Tsuchiya K, Shirasaki T, Fukushima K, Hayashi R, Horita N, Oshima S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M, UEG Week 2015, 2015/10/27, Barcelona (Spain).
 20. Acquisition of enhanced malignant potential in inflammation associated colon cancer, 口頭, Tsuchiya K, Hibiya S, Watanabe M, 第74回日本癌学会学術総会, 2015/10/9, Nagoya (Japan).
 21. A novel fluorescent labelling system into small intestinal organoid reveals independent long-lived intestinal stem cells in a crypt, ポスター, Horita N, Tsuchiya K, Hayashi R, Fukushima K, Hibiya S, Fukuda M, Mizutani T, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M, The 3rd Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's and Colitis, 2015/6/20, Beijing (China).
 22. Mapping biopsy of entire small intestine is useful to assess the pathogenesis of Crohn's disease, 口頭, Tsuchiya K, Hayashi R, Watanabe M, AOCC2015, 2015/6/19, Beijing (China).
 23. Atoh1 protein stabilized by TNF- α acquires enhanced malignant potential in colitis-associated colorectal cancer, ポスター, Shirasaki T, Fukushima K, Tsuchiya K, Hibiya S, Hayashi R, Horita N, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M, AOCC2015, 2015/6/19, Beijing (China).
 24. 全小腸マッピング生検によるクローン病病態解析, 口頭, 林 亮平, 土屋輝一郎, 渡辺 守, 第89回日本消化器内視鏡学会, 2015/5/29, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市中区).
 25. Continuous stimulation with cytokines leads to irreversible accumulation of NF- κ B signaling in colonic epithelial cells, ポスター, Hibiya S, Tsuchiya K, Fukushima K, Hayashi R, Horita N, Oshima S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M, DDW2015, 2015/5/19, Washington, D.C (U.S.A).
 26. Human alpha-Defensin 6 regulated by the cooperation of beta-catenin and Atoh1, might be the pathogenesis of Crohn's Disease, ポスター, Hayashi R, Tsuchiya K, Hibiya S, Fukushima K, Horita N, Okada E, Araki A, Ohtsuka K, Watanabe M, DDW2015, 2015/5/18, Washington, D.C (U.S.A).
 27. Atoh1 protein expression by TNF- α and the acquisition of malignant potential in colitis-associated colorectal cancer, ポスター, Fukushima K, Tsuchiya K, Hibiya S, Hayashi R, Horita N, Kano Y, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M, DDW2015, 2015/5/17, Washington, D.C (U.S.A).
 28. Notch ligands Dll1 and Dll4 are expressed by distinct population of epithelial cells in the mice intestine, ポスター, Shimizu H, Suzuki K, Fujii S, Nakata T, Ito G, Murano T, Tsuchiya K, Nakamura T, Okamoto R, Hozumi K, Watanabe M, DDW2015, 2015/5/16, Washington, D.C (U.S.A).
 29. 消化器疾患における自然免疫と制御 Human defensin 発現制御によるクローン病病態解析, 口頭, 林 亮平, 土屋輝一郎, 渡辺 守, 第101回日本消化器病学会総会, 2015/4/25, 仙台国際センター(宮城県仙台市).
 30. 炎症性腸疾患付随大腸癌における Atoh1 蛋白発現と癌幹細胞形質獲得機構(パネルディスカッション15:癌幹細胞を標的とした消化器癌治療の最前線), 口頭, 福島啓太, 土屋輝一郎, 渡辺 守, 第101回日本消化器病学会総会, 2015/4/24, 仙台国際センター(宮城県仙台市).
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)
- [その他]
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
土屋 輝一郎 (TSUCHIYA, Kiichiro)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 40376786
 - (2) 研究分担者
渡辺 守 (WATANABE, Mamoru)
東京医科歯科大学・

大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号： 10175127