

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08092

研究課題名（和文）犬の消化管上皮細胞の新規培養技術の確立と各種消化管疾患ライブラリーの構築

研究課題名（英文）Establishment of novel culture method of canine intestinal organoid and development of organoid library

研究代表者

大田 寛 (Ohta, Hiroshi)

北海道大学・獣医学研究院・講師

研究者番号：50431333

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：健常犬の結腸の内視鏡生検組織を用いて、結腸オルガノイドの培養手法の確立を試みた。健常犬の結腸より内視鏡を用いて生検組織を採取し、生検組織から幹細胞を含む腸陰窩の分離を試みた。試みた手法で腸陰窩は効率よく分離可能であり、分離した腸陰窩を用いて3次元培養を試みた。犬結腸オルガノイドは、3次元培養下で5日間ほど生存可能であり、内腔を有する立体構造を形成した。同様の手法を用いて、炎症性結直腸ポリープ3症例の病変部由来オルガノイド、ならびに結腸腺癌2症例の腫瘍細胞由来オルガノイドの培養および凍結保存を行った。加えて、炎症性結直腸ポリープ症例のSNP解析やマトリクスメタロプロテアーゼ活性の定量も実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医学領域では、オルガノイドを用いた消化管疾患の研究が急速に進展している。一方で、獣医領域においてはこれまで報告がなされて来なかった。本研究では、他の研究施設に先駆けて犬のオルガノイドの培養を試み、犬の結腸由来のオルガノイドの培養手法を確立した。また同手法を用いて、炎症性結直腸ポリープおよび結直腸腺癌由来のオルガノイドの培養にも成功した。本研究で確立した培養手法には改善の余地が多く残されてはいるものの、獣医療におけるオルガノイドを用いた研究の先駆けとなった。

研究成果の概要（英文）：in this study, we tried to establish a novel culture method of canine intestinal organoid. Firstly, we tried to isolate colonic crypt that contain colonic epithelia stem cells. We successfully isolated colonic crypt from about five colonic mucosal biopsy samples obtained by endoscopy. Next, we tried to establish the 3D culture method of canine colonic organoid using these colonic crypt, Matrigel, and several growth factors. We successfully cultured canine colonic organoid for 5 days, and these colonic organoid formed luminal structure. Using same culture methods, we successfully cultured the colonic organoid from three Miniature Dachshund with inflammatory colorectal polyps (ICRPs) and two dogs with colorectal adenocarcinoma. We cryopreserved organoids obtained from normal dogs, ICRPs and dogs with colorectal adenocarcinoma. In addition, we examined the single nucleotide polymorphisms of ICRPs and matrix metalloproteinase activity within the colorectal mucosa of ICRPs.

研究分野：獣医学・臨床獣医学

キーワード：犬 消化管 オルガノイド 3次元培養 ミニチュア・ダックスフンド 炎症性結直腸ポリープ 一塩基多型 MMP

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

消化管疾患、すなわち胃や腸の炎症性疾患や腫瘍性疾患の病態解析や薬剤の治療効果判定には、ヒトやマウスの腫瘍由来の株化細胞や遺伝子改変マウスが用いられてきた。しかし、株化細胞やマウスを用いた研究結果は、必ずしも個々の患者の病態や薬剤感受性を反映しておらず、医学領域においては患者個々の病態を反映した病態解析や治療効果判定を可能にする新たな研究手法の開発が求められてきた。一方で、犬の消化管疾患の病態解析においては、状況は更に深刻であり、臨床応用可能な犬の消化管上皮の培養技術は確立されておらず、また消化管上皮の株化細胞も樹立されていないため、*in vitro*での病態解析や薬剤感受性試験などの実施がこれまで困難であった。

上記の問題を克服する画期的な技術として、医学においては腸管上皮細胞のオルガノイド培養技術が確立された。オルガノイドとは、腸管上皮幹細胞を含む腸陰窩を分離し、試験管内で培養することで腸管上皮細胞が増殖するとともに、腸管上皮細胞の分化も進行し、立体的な組織構造体を形成したものである。この技術は、わずか数個の内視鏡粘膜生検サンプルから効率的に幹細胞を含む腸陰窩を分離し、各種増殖因子と細胞外マトリクスを含むゲルの中で培養することで、管腔構造を形成する「小さな消化管」を作成することを可能にした。

我々は、ヒトやマウスのオルガノイド培養手法を参考に予備実験を実施し、犬の結腸粘膜上皮細胞由来のオルガノイドの培養技術の確立の足がかりを得た。そこで、本研究では、犬の消化管粘膜上皮細胞由来のオルガノイドの培養技術の確立を目指した。

### 2. 研究の目的

本研究では、犬の消化管上皮の新規培養技術の確立と、その培養技術を用いた各種消化管疾患（炎症性疾患、腫瘍性疾患）症例犬の消化管上皮細胞ライブラリーの構築を行うことを目的とした。本研究では、近年ヒトやマウスの消化管粘膜上皮細胞を用いて確立されてきたオルガノイド培養技術を犬に応用し、これまで培養が困難であった犬の消化管上皮の安定的な培養、増殖、長期保存方法の確立を目指す。同時に、この手法を各種消化管疾患の症例犬に応用することで、これまで実施が困難であった上皮細胞をターゲットにした病態解析、犬の消化管疾患ライブラリーの構築を目指す。本研究の主な対象疾患として、犬の代表的な炎症性腸疾患であるリンパ球形質細胞性腸炎、日本国内のミニチュア（M）・ダックスフンドに好発する炎症性結直腸ポリープ（Inflammatory coloproctitis; ICRPs）、大腸腫瘍（結直腸腺癌）を想定している。健常犬の消化管粘膜上皮細胞を用いてオルガノイドの培養技術を確立した後、対象疾患の症例犬の消化管病変部由来のオルガノイドの培養を試みる。

また、ICRPsは犬種特異的な炎症性腸疾患として広く認識されておりその発症に遺伝的な背景が存在することが疑われている。ICRPsのポリープ病変部では、結腸上皮杯細胞の増殖が病理組織学的変化の特徴の1つとして知られている。そのため、ICRPs症例由来のオルガノイドの増殖や立体構造形成にその遺伝的な背景が影響する可能性も考えられた。そのため、ICRPsを発症したM・ダックスフンドが特異的に保有する一遺伝子多型の網羅的な解析も実施した。

加えて、ICRPs症例の病変部では、杯細胞の増殖とともに、粘液を貯留した腸陰窩の拡張とそれらの崩壊が認められ、腸陰窩の崩壊による粘液の漏出が更なる炎症を惹起している可能性も示唆されている。ヒトの炎症性腸疾患において、炎症局所における粘膜上皮などの組織構築の破壊と炎症細胞浸潤にはマトリクスメタロプロテインナーゼ（MMP）が関与することが明らかになっている。そこで、ICRPs症例の病変部におけるMMP活性についても解析を実施した。

更に、犬の炎症性腸疾患に関して臨床的な解析も実施した。犬のリンパ球形質細胞性腸炎では、持続する炎症に伴う腸粘膜の障害により蛋白質の吸収不良を生じて蛋白喪失性腸症を発症する。また、蛋白喪失性腸症の一部の症例では脂肪分を制限した手作り超低脂肪食が著効することが明らかになっている。そこで、蛋白喪失性腸症の症例犬において、手作り超低脂肪食が適応となる臨床的な条件を解析した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 健常犬の結腸粘膜上皮細胞を用いた犬結腸オルガノイドの培養

健常犬の結腸より内視鏡を用いて生検組織を採取し、それを材料として犬結腸オルガノイドの培養を試みた。犬の結腸より内視鏡下で粘膜生検組織（1つあたり10mg程度）を5つ程度採取し、幹細胞を含む腸陰窩を分離する。次に、幹細胞を含む腸陰窩を増殖因子（Wnt、R-spondin、Noggin、HGF、EGFなど）を様々な組み合わせで培地に添加して培養を試みる。この際、腸陰窩は細胞外マトリクスを含有するゲル（マトリゲル）中に埋め込むことで立体構造（管腔様構造）の構築を促す。培養したオルガノイドはマトリゲルごとパラフィン包埋して各種染色を行うことで組織構築の評価を行う。

#### (2) 消化管疾患症例犬の病変部由来オルガノイドの培養

上記(1)で確立した培養方法を用いて、症例犬の病変部の上皮細胞または腫瘍細胞由来のオルガノイドの培養を試みる。

#### (3) ICRPsを発症したM・ダックスフンドの一遺伝子多型の網羅的解析

ICRPs症例ならびに健常ビーグル犬の結腸組織からDNAを抽出する。抽出したDNAを全エクソームシーケンシングで解析し、ICRPsを発症したM・ダックスフンドが特異的に保有する遺伝子変異を探索する。解析したデータは既知のイヌゲノム配列（CanFam2）にマッピングし、

ICRPs に特異的な変異を検出する。

(4) ICRPs 症例の病変部における MMP 活性

ICRPs 症例の病変部における MMP の解析については、ヒトの炎症性腸疾患の病態形成との関連性が示唆されている MMP-2、MMP-9 の活性と局在を解析した。ICRPs 症例の病変部より蛋白質を抽出し、ゼラチンザイモグラフィーによる MMP の活性を定量した。また、MMP-2 および MMP-9 に対する抗体を用いて免疫染色を実施し、それぞれの局在を解析した。

(5) 腸炎に伴う蛋白喪失性腸症における手作り超低脂肪食の適応条件の解析

北海道大学動物医療センターに来院したリンパ球形質細胞性腸炎に伴う蛋白喪失性腸症の症例犬の電子カルテデータをもとに、手作り超低脂肪食が著効する症例の臨床的特徴の回顧的研究を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 健常犬の結腸粘膜上皮細胞を用いた犬結腸オルガノイドの培養

(2) 消化管疾患症例犬の病変部由来オルガノイドの培養

健常犬の結腸より分離した腸陰窩を増殖因子ならびにマトリゲルを用いて培養したところ、培養開始から 5 日間ほど増殖しながら生存し、円形から類円形のスフェロイド様の構造を形成した(図 1)。培養したオルガノイドをマトリゲルと共にパラフィン包埋してブロックを作成し、HE 染色、PAS 染色などの組織染色と、上皮細胞のマーカーであるサイトケラチンの免疫染色を実施した。HE 染色の結果、培養したオルガノイドでは内部に管腔様構造の形成が認められた(図 2)。PAS 染色の結果、オルガノイドを形成する上皮細胞の表面に粘液様物質が認められ、上皮細胞での粘液産生の可能性が示された(図 3)。また、サイトケラチンの免疫染色では、管腔構造を内張りする細胞層はサイトケラチン陽性であり、上皮細胞としての

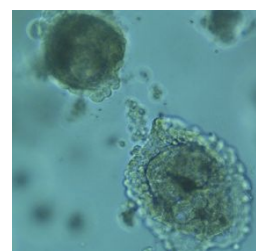


図 1 健常犬結腸オルガノイドの外観

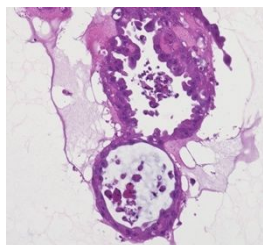


図 2 健常犬結腸オルガノイドの HE 染色

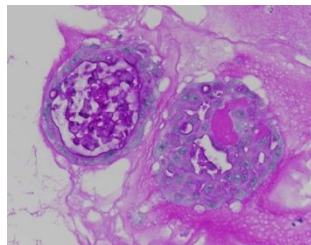


図 3 健常犬結腸オルガノイドの PAS 染色

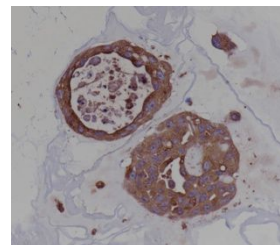


図 4 健常犬結腸オルガノイドのサイトケラチン染色

形質を維持していることが示された(図 4)。

同様の手法を用いて、消化器疾患の犬の臨床例の消化管生検サンプル由来のオルガノイドの培養も試みた。現在までに、ICRPs 症例の 3 症例の結直腸ポリープ病変部由来オルガノイドならびに結直腸腺癌の 2 症例の病変組織に由来するオルガノイドの作成と凍結保存を実施した。図 5 は ICRPs 症例の結直腸ポリープ病変部から分離した上皮細胞に由来するオルガノイドの外観を示している(図 5)。

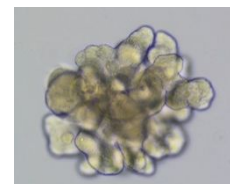


図 5 ICRPs 症例由来オルガノイドの外観

(3) ICRPs を発症した M・ダックスフンドの一遺伝子多型の網羅的解析

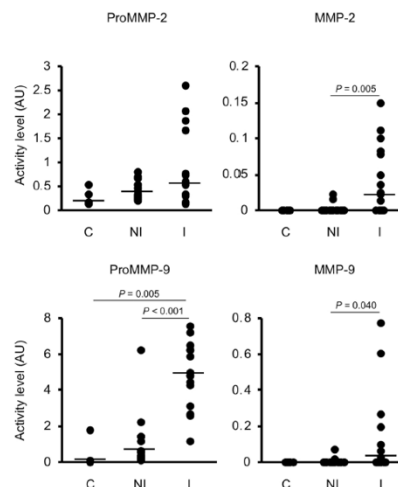
現在までに ICRPs を発症した M・ダックスフンドの 2 症例、ビーグル犬 2 頭分について全エクソームシーケンシングによる網羅的な遺伝子変異解析を終了し、イヌゲノム配列にマッピング済みである。現時点では各 2 頭分のデータであるが、全エクソームシーケンシングを用いて ICRPs 発症犬に特異的な遺伝子変異を探索した結果、エクソン領域には 8,833 変異が認められ、その中で、以下の 3 条件、アミノ酸置換またはフレームシフトを生じる変異、ICRPs の M・ダックスフンドに特異的な変異、相同染色体においてホモ接合体で認められた変異、の 3 条件を満たす 24 変異が抽出された。今後は、ICRPs を発症した M・ダックスフンドと、ICRPs を発症していない M・ダックスフンドの各 40 頭分の血液を用いて、抽出された 24 候補遺伝子の遺伝子変異頻度を 2 群間で比較し、ICRPs 発症との関連性を解析していく。

(4) ICRPs 症例の病変部における MMP 活性

ICRPs 症例の病変部における MMP-2 および MMP-9 の活性をゼラチンザイモグラフィーにより定量した。MMP-2 および MMP-9 は、非炎症組織では非活性化型の proMMP-2、pro-MMP-9 として存在しており、炎症反応により活性化型である MMP-2、MMP-9 に変化しプロテアーゼとして機能する。解析の結果、ICRPs 症例の病変部では、MMP-2、proMMP-9、MMP-9 の活性が健常犬の結腸組織より有

意に増加していた(図6)。また、免疫染色の結果、MMP-2は病変部の炎症細胞および線維芽細胞で、MMP-9は主に炎症細胞に発現していることが明らかになった。結直腸粘膜におけるこれらのMMP活性の増加が、ICRPs病変部における細胞外基質の分解や炎症細胞浸潤を誘導することで病態形成に関与していることが示唆された。

図6 ゼラチンゼイモグラフィによる proMMP-2、MMP-2、proMMP9、MMP9の活性の定量化。C: 健常犬の結腸組織、NI: ICRPs症例の病変部ではない肉眼的に正常な結腸組織、I: ICRPs症例の病変部の組織。ICRPs症例の病変部において、MMP-2、proMMP9、MMP9の活性が有意に増加していた。(雑誌論文2より引用)



#### (5) 腸炎に伴う蛋白喪失性腸症における手作り超低脂肪食の適応条件の解析

犬のリンパ球形質細胞性腸炎に伴う蛋白喪失性腸症の症例で、手作り超低脂肪食に良好な治療反応を示す症例の臨床的特徴を明らかにし、手作り超低脂肪食の適応症例の条件を明らかにするために回顧的研究を行った。北海道大学動物医療センターに来院して、リンパ球形質細胞性腸炎に伴う蛋白喪失性腸症と診断された33例のカルテ情報を用いて、手作り超低脂肪食に良好な反応を示す臨床的指標を統計学的に探索した。超低脂肪食に対して良好な治療効果が認められた群(反応群)と認められなかった群(非反応群)の2群に分けて群間で比較したところ、反応群において臨床症状のスコア(CCECAI)が有意に低いことが明らかになった(図7)。また、ROC解析の結果、臨床症状のスコア(CCECAI)は反応群と非反応群を判別する有用な指標であることも明らかになった。

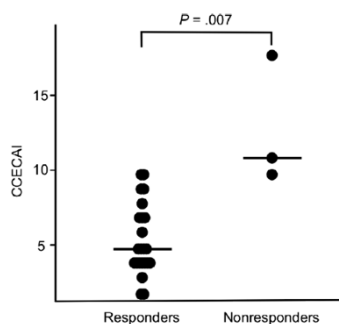


図7 蛋白喪失性腸症の症例における反応群と非反応群の臨床スコア(CCECAI)の比較。超低脂肪食に治療反応を示した群を反応群(Responders)、治療反応が認められなかった群を非反応群(Nonresponders)として2群間比較したところ、反応群においてCCECAIは有意な低値を示した。(雑誌論文3より引用)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ohta H, Yamazaki J, Jelinek J, Ishizaki T, Kagawa Y, Yokoyama N, Nagata N, Sasaki N, Takiguchi M	4. 巻 -
2. 論文標題 Genome-wide DNA methylation analysis in canine gastrointestinal lymphoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.19-0547	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Nagata N, Ohta H, Yamada A, Teoh YB, Ichii O, Morishita K, Sasaki N, Takiguchi M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Activities of matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9, and serine proteases in samples of the colorectal mucosa of Miniature Dachshunds with inflammatory colorectal polyps.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Vet Res	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagata N, Ohta H, Yokoyama N, Teoh YB, Nisa K, Sasaki N, Osuga T, Morishita K, Takiguchi M.	4. 巻 34
2. 論文標題 Clinical characteristics of dogs with food-responsive protein-losing enteropathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Vet Intern Med	6. 最初と最後の頁 659-668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jvim.15720	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永田矩之、大田寛、横山望、佐々木東、大菅辰幸、森下啓太郎、滝口満喜
2. 発表標題 蛋白喪失性腸症の犬40例からの腸リンパ管拡張症の診断と治療に関する考察
3. 学会等名 日本獣医師会 獣医学術学会 年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永田矩之、大田寛、横山望、田村昌大、笹岡一慶、Romaneeya Leela-Arporn, Angkhana Dermlim, Khoirun Nisa, 森田智也、大菅辰幸、佐々木東、森下啓太郎、滝口満喜
2. 発表標題 全エクソームシーケンスを用いたミニチュア・ダックスフントの炎症性結直腸ポリープ感受性遺伝子の探索
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	永田 矩之  (Nagata Noriyuki)	北海道大学・獣医学研究院・大学院生  (10101)	
連携研究者	市居 修  (Ichii Osamu)  (60547769)	北海道大学・獣医学研究院・准教授  (10101)	