

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19535

研究課題名(和文)位置運命決定因子におけるヒト成体器官機能制御の解明

研究課題名(英文)The regulation of human organ structure by position fate genes

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) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：同一患者の全結腸切除検体から左側の直腸及び右側の上行結腸より大腸オルガノイドをそれぞれ樹立した。増殖、幹細胞分画、炎症刺激応答、炎症刺激耐性を評価し、上皮細胞機能の部位別差異を解析したところ、直腸由来のオルガノイドにおいて増殖能の低下を認めた。それぞれのオルガノイド特異的な遺伝子を抽出し、手術検体の解析からヒトにおいてもその発現が保存されていることを確認した。さらに特異的遺伝子の発現動揺により、オルガノイド機能の変容を確認したことから位置決定機能のみならず、細胞機能に大きな影響をもつことを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在様々な疾患に関して病態解明が行われているが、好発部位を主眼とした病態解明は殆どない。特にIBDは炎症を主眼とした免疫制御破綻の観点からの病態解明が多くされてきており、実臨床においても免疫抑制療法が主流である。しかし、免疫抑制療法のみでは再燃が多く完治しないことが問題となり粘膜再生が重要視されるようになった。粘膜が再生すると上皮細胞による消化管バリアー機能が作動し再燃が抑制されることが提唱され、近年腸管上皮細胞の機能が注目されている。逆に言えば、ある特定の部位の上皮が破綻すればその部位が病変部になることを示しており、IBD好発部位における上皮破綻機能の解明が疾患克服に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：I established human colonic organoids generated from the left rectum and the right ascending colon of colectomy specimens in the same patient, respectively. After evaluating cell function such as cell proliferation, stem cell fraction, inflammatory stimulation response and inflammatory stimulation tolerance, I detected the suppression of cell proliferation in the organoid derived from rectum. I also extracted the gene which was specifically expressed in each organoid. Moreover, I confirmed that the expression was stored in human by the analysis of the operative specimen. Furthermore, I discovered that these genes affect on a cell function as well as a position decision function.

研究分野：消化器内科学

キーワード：位置運命決定因子 病変好発部位 疾患感受性

1. 研究開始当初の背景

左右非対称などの臓器位置決定は発生段階で位置運命決定因子により制御されているが、臓器位置が決定し成体となった後も位置運命決定因子は発現し続けている。しかしながら成体後の位置運命決定因子による制御機能はほとんど解析されておらず、特にヒトにおける作用は全く不明である。申請者が専門としている炎症性腸疾患(IBD)では好発部位が知られており、潰瘍性大腸炎では直腸、クローン病では回腸末端が初発となることが多いが、なぜその部位に発症するか詳細な分子機構は不明である。疾患発症機序解明のため病変部と非病変部を比較する報告が散見されるが、手術検体や内視鏡検体を直接解析することから病変部の炎症による修飾が大きいため病変部の病態は未だ明らかにされていない。そこで申請者は独自に構築したマウス大腸オルガノイド培養をヒトに応用することを考案した。マウス大腸オルガノイドでは大腸上皮初代細胞を3次元にて培養することにより腸内環境を模倣する系であることを確認している。さらにヒト腸管上皮細胞にでも培養可能とし、潰瘍性大腸炎の同一患者手術検体から左側の直腸(病変部)と右側の上行結腸(非病変部)を採取しオルガノイドを樹立したところ、この両部位由来オルガノイドの培養条件は同一のため長期間の継代培養により組織内での炎症環境を排除した状態として解析可能であることが判明した。興味深いことに両部位由来のオルガノイドでは細胞増殖や炎症刺激耐性が全く異なることを確認している。特に、直腸由来オルガノイドは細胞増殖が遅く、炎症刺激に対する細胞死感受性が高いという結果を得たことから直腸由来上皮細胞の炎症に対する脆弱性が潰瘍性大腸炎の好発部位であることの関連性が示唆された。さらに、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現差異において予想しなかった位置運命決定因子群が抽出された。そこで申請者は、位置運命決定因子は発生段階のみならず成体後も臓器位置により発現が制御され、臓器位置特異的な機能制御を行うことで疾患感受性差異を生み出し、病変好発部位が形成されると着想した。

2. 研究の目的

本研究では、腸管の異なる部位由来のオルガノイドでの位置運命決定因子発現を動揺させることにより細胞機能が置換されることを確認し、位置運命決定因子と疾患感受性の関連を明らかにすることで病変好発部位形成の病態を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 位置特異的大腸オルガノイド機能解析

左側の直腸及び右側の上行結腸より大腸オルガノイドを樹立する。増殖、幹細胞分画、炎症刺激応答、炎症刺激耐性を評価し、上皮細胞機能の部位別差異を解析する。

(2) 位置運命決定遺伝子の抽出

両部位オルガノイドのマイクロアレイにより発現差異を認められた遺伝子を抽出する。

(3) 位置運命決定遺伝子の確認

手術検体組織を用いて、生体組織内でも位置運命決定遺伝子の発現差異が維持されているかを確認する。

(4) 位置運命決定遺伝子発現の動揺

上行結腸由来オルガノイドにCrisper/CAS9システムを用いてPITX, HOXB2を欠失させる。もしくは、レンチウイルスを用いて直腸由来オルガノイドにPITX, HOXB2を発現させる。

(5) 位置運命決定遺伝子動揺における細胞機能置換の確認

遺伝子動揺の後、上行結腸由来オルガノイドが直腸由来オルガノイドの細胞機能に置換するか計画(1)に準じて評価する。直腸由来オルガノイドも同様に置換を評価する。特に炎症刺激耐性などIBD病態と関与する機能が置換された場合には病変好発部位との相関を明らかにする。

(6) 小腸オルガノイドによる解析

大腸に準じて同一人物の左側空腸由来オルガノイド及び右側回腸由来オルガノイドを用いて同様に解析を行う。

4. 研究成果

(1) 位置特異的大腸オルガノイド機能解析

同一患者の全結腸切除検体から左側の直腸及び右側の上行結腸より大腸オルガノイドをそれぞれ樹立した。増殖、幹細胞分画、炎症刺激応答、炎症刺激耐性を評価し、上皮細胞機能の部位別差異を解析したところ、直腸由来のオルガノイドにおいて増殖能の低下を認めた。

(2) 位置運命決定遺伝子の抽出

両部位オルガノイドのマイクロアレイにより発現差異を認められた遺伝子を抽出した。右側の上行結腸由来オルガノイドではPITX, HOXB2の発現が左側の直腸由来オルガノイドよりも多いことを確認した。

(3) 位置運命決定遺伝子の確認

手術検体組織を用いて、生体組織内でも位置運命決定遺伝子の発現差異が維持されているかを確認する。手術検体の提供を受け、定量PCR及び免疫染色にて確認を行ったところ、オルガノイドの発現差異が手術検体においても保存されていた。

(4) 位置運命決定遺伝子発現の動揺

上行結腸由来オルガノイドに Crisper/CAS9 システムを用いて HOXB2 を欠失させた。シーケンスにてそれぞれの遺伝子に変異が導入されていることを確認し、機能的な欠失を確認している。また、レンチウイルスを用いて直腸由来オルガノイドに PITX を発現させた。

(5) 位置運命決定遺伝子動揺における細胞機能置換の確認

遺伝子動揺の後、上行結腸由来オルガノイドが直腸由来オルガノイドの細胞機能に置換するか計画(1) に準じて評価した。直腸由来オルガノイドも同様に置換を評価した。

(6) 小腸オルガノイドによる解析

大腸に準じて同一人物の左側空腸由来オルガノイド及び右側回腸由来オルガノイドを用いて同様に解析を行った。小腸では Lefty1 が候補因子として抽出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10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 Otsubo Kana, Maeyashiki Chiaki, Nibe Yoichi, Tamura Akiko, Aonuma Emi, Matsuda Hiroki, Kobayashi Masanori, Onizawa Michio, Nemoto Yasuhiro, Nagaishi Takashi, Okamoto Ryuichi, Tsuchiya Kiichiro, Nakamura Tetsuya, Torii Satoru, Itakura Eisuke, Watanabe Mamoru, Oshima Shigeru	4. 巻 -
2. 論文標題 Receptor Interacting Protein Kinase 3 (RIPK3) inhibits autophagic flux during necroptosis in intestinal epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	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) 10.1002/1873-3468.13748	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 Yuria Takei, Yasuhiro Nemoto, Ryo Morikawa, Shohei Tanaka, Shigeru Oshima, Takashi Nagaishi, Ryuichi Okamoto, Kiichiro Tsuchiya, Tetsuya Nakamura, Mamoru Watanabe	4. 巻 523
2. 論文標題 T cells show amoeboid shape and frequent morphological change in?vitro, and localize to small intestinal intraepithelial region in?vivo.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 328-355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.12.021	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 Shohei Tanaka, Yasuhiro Nemoto, Yuria Takei, Ryo Morikawa, Shigeru Oshima, Takashi Nagaishi, Ryuichi Okamoto, Kiichiro Tsuchiya, Tetsuya Nakamura, Susanne Stutte, Mamoru Watanabe	4. 巻 522
2. 論文標題 High-fat diet-derived free fatty acids impair the intestinal immune system and increase sensitivity to intestinal epithelial damage.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 971-977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.158	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 該当する
1. 著者名 Maiko Motobayashi, Katsuyoshi Matsuoka, Kento Takenaka, Toshimitsu Fujii, Masakazu Nagahori, Kazuo Ohtsuka, Fumihiko Iwamoto, Kiichiro Tsuchiya, Mariko Negi, Yoshinobu Eishi, Mamoru Watanabe	4. 巻 34
2. 論文標題 Predictors of mucosal healing during induction therapy in patients with acute moderate-to-severe ulcerative colitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Gastroenterol. Hepatol.	6. 最初と最後の頁 1004-1010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14565	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 Sho Watanabe, Kiichiro Tsuchiya, Ryu Nishimura, Tomoaki Shirasaki, Nobuhiro Katsukura, Shuji Hibiya, Ryuichi Okamoto, Tetsuya Nakamura, Mamoru Watanabe	4. 巻 17
2. 論文標題 Mutation by CRISPR System Enhances the Malignant Potential of Colon Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol. Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 1459-1467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-18-1195	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 -

1. 著者名 Fukamachi H, Tsuchiya K, Kojima K, Tokino T, Eishi Y, Kim YS, Kim WH, Yuasa Y, Tanaka S.	4. 巻 38
2. 論文標題 A subset of diffuse-type gastric cancer is susceptible to mTOR inhibitors and checkpoint inhibitors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Exp Clin Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13046-019-1121-3	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 -

1. 著者名 Nishimura Ryu, Shirasaki Tomoaki, Tsuchiya Kiichiro, Miyake Yoshihide, Watanabe Yusuke, Hibiya Shuji, Watanabe Sho, Nakamura Tetsuya, Watanabe Mamoru	4. 巻 54
2. 論文標題 Establishment of a system to evaluate the therapeutic effect and the dynamics of an investigational drug on ulcerative colitis using human colonic organoids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 608 ~ 620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-018-01540-y	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 Motobayashi Maiko, Matsuoka Katsuyoshi, Takenaka Kento, Fujii Toshimitsu, Nagahori Masakazu, Ohtsuka Kazuo, Iwamoto Fumihiko, Tsuchiya Kiichiro, Negi Mariko, Eishi Yoshinobu, Watanabe Mamoru	4. 巻 34
2. 論文標題 Predictors of mucosal healing during induction therapy in patients with acute moderate to severe ulcerative colitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1004 ~ 1010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14565	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 Kawamoto A, Nagata S, Anzai S, Takahashi J, Kawai M, Hama M, Nogawa D, Yamamoto K, Kuno R, Suzuki K, Shimizu H, Hiraguri Y, Yui S, Oshima S, Tsuchiya K, Nakamura T, Ohtsuka K, Kitagawa M, Okamoto R, Watanabe M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Ubiquitin D is Upregulated by Synergy of Notch Signalling and TNF- in the Inflamed Intestinal Epithelia of IBD Patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Crohns Colitis.	6. 最初と最後の頁 495-509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ecco-jcc/jjy180	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 Suzuki K, Murano T, Shimizu H, Ito G, Nakata T, Fujii S, Ishibashi F, Kawamoto A, Anzai S, Kuno R, Kuwabara K, Takahashi J, Hama M, Nagata S, Hiraguri Y, Takenaka K, Yui S, Tsuchiya K, Nakamura T, Ohtsuka K, Watanabe M, Okamoto R.	4. 巻 53
2. 論文標題 Single cell analysis of Crohn's disease patient-derived small intestinal organoids reveals disease activity-dependent modification of stem cell properties.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 1035-1047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-018-1437-3	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 土屋輝一郎
2. 発表標題 IBD病態から繙く再生医療研究への展開と臨床応用
3. 学会等名 第3回旭川CDワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土屋輝一郎
2. 発表標題 炎症性腸疾患モデル構築から癌化モデルへの試み
3. 学会等名 第3回 がん三次元培養研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土屋輝一郎
2. 発表標題 小腸からIBDそして再生へ
3. 学会等名 Advanced GI & Liver Forum 15th (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuji Hibiya, Kiichiro Tsuchiya, Ryu Nishimura, Sho Watanabe, Nobuhiro Katsukura, Tomoaki Shirasaki, Ryuichi Okamoto, Mamoru Watanabe
2. 発表標題 Establishment of chronic inflammation model using human small intestinal and colonic organoids
3. 学会等名 UEG Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuji Hibiya, Kiichiro Tsuchiya, Ryu Nishimura, Tomoaki Shirasaki, Sho Watanabe, Nobuhiro Katsukura, Shigeru Oshima, Ryuichi Okamoto, Tetsuya Nakamura, Mamoru Watanabe
2. 発表標題 Long-term inflammation model using human colonic organoids
3. 学会等名 The 7th annual meeting of AOCC (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiichiro Tsuchiya
2. 発表標題 Organoid model for the carcinogenesis process of CAC
3. 学会等名 IMKASID 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuchiya K, Watanabe S, Shirasaki T, Nishimura R, Katsukura N, Hibiya S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M
2. 発表標題 TP53 mutation in human colonic organoids acquires resistance to in vitro long-term inflammation.
3. 学会等名 ECCO2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawamoto A, Nagata S, Anzai S, Takahashi J, Kawai M, Hama M, Nogawa D, Yamamoto K, Kuno R, Suzuki K, Shimizu H, Hiraguri Y, Yui S, Oshima S, Tsuchiya K, Nakamura T, Ohtsuka K, Kitagawa M, Okamoto R, Watanabe M
2. 発表標題 Synergy of Notch signalling and TNF- in the inflamed intestinal epithelia of IBD patients leads to up-regulation of UBD, a ubiquitin-like protein.
3. 学会等名 ECCO2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hibiya S, Tsuchiya K, Nishimura R, Shirasaki T, Watanabe S, Katsukura N, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M
2. 発表標題 Lesion-specific gene expression in the Epithelial cells of Crohn's disease by comparing Small intestinal organoids from active and inactive Lesion in the same patient.
3. 学会等名 UEGW 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shirasaki T, Tsuchiya K, Nishimura R, Watanabe S, Hibiya S, Katsukura N, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M
2. 発表標題 Identification of lesion-specific epithelial function of ulcerative colitis by comparing colonic organoids from lesion and non-lesion parts of same patients.
3. 学会等名 DDW 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----