

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：10107

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890012

研究課題名（和文） Paneth細胞幹細胞保護因子を用いた培養上皮移植による炎症性腸疾患治療法の開発

研究課題名（英文） The development of therapy for inflammatory bowel disease using cultured epithelial tissue with Paneth cell-protection factors

研究代表者

田邊 裕貴（TANABE HIROKI）

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：50396363

研究成果の概要（和文）：本研究の主目的は、腸管粘膜内のクリプト構造の再生機序を解明し、組織構造を維持した特殊な培養系を確立することである。

マウス小腸から小腸絨毛と小腸クリプトを小腸腸管組織から剥離し、小腸クリプトが豊富なサンプルを集め、培養に用いた。小腸クリプトをマトリゲル中に混濁し、37℃でゲル化した後に、幹細胞選択培地で覆い、インキュベーターで培養する。小腸クリプトを、個々の細胞に分離精製することなくクリプトの培養が可能であった。培養に必至な因子（Noggin, R-spondin, wnt3A）を除去した培地で培養した結果、R-spondinが再生に必須の因子であることが明らかとなった。

中・大型の動物モデルの構築を目指して、イヌ、ブタの小腸粘膜を用いて病理学的な検討を行った。イヌ小腸には顆粒が豊富な Paneth 細胞を認めず、ブタ小腸にはマウスと同様に Paneth 細胞を含む小腸クリプトを認めた。ヒトに近似する動物モデルとしてブタ組織を用いることが可能であることが示唆された。今後の動物モデルの構築に期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this research is to analyze the mechanisms in regeneration of crypt structures in the gut, and to establish novel culture system with maintaining the normal crypt structure.

In this study, intestinal villi and crypt are exfoliated from mouse small intestine and the crypt-rich fractions are collected for the culture. Small intestinal crypts are mixed in Marti-gel at 37 degree, and covered with stem cell selection media. The small intestinal crypts are cultured without cell isolation. Several factors in culture media are checked and R-spondin is found to be a critical factor for culture system.

To establish the animal model, the tissues of dog and pig are analyzed pathologically. Paneth cells with rich granules are observed in the porcine intestine but in the dog. Pig is one of the candidates for animal model alternative to human research. The development of animal model is highly expected in future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：移植・再生医療、移植・再生医療、プロテオーム、生理活性

1. 研究開始当初の背景

クローン病と潰瘍性大腸炎は IBD と称され、若年者に発症し再燃と緩解を繰り返し難治性の経過をたどる。両疾患ともに、厚生労働省の難治性疾患克服研究事業、特定疾患治療研究事業の対象疾患にも指定されているため、精力的に病態の解明がすすめられている。近年、IBD の病態に腸内細菌刺激に対する TNF- α 、IL-6、IL-23 などの炎症性サイトカイン産生が関与することから、それらを主なターゲットとして分子標的治療が臨床応用された。抗 TNF- α 抗体であるインフリキシマブの劇的な有効性はクローン病に対する治療戦略を大幅に変えた。Bench to Bed の典型的な成功例であるが、それでもなおクローン病の再燃は高頻度に見られ、緩解を維持することの難しさを痛感した。

我々は、小腸クリプトの分離法を用いて小腸の Paneth 細胞の自然免疫における役割を検討してきた (Ayabe T. *Nat Immunol* 2000, Tanabe H. *Infect Immun* 2005)。特に Paneth 細胞の分泌顆粒に含まれる抗菌ペプチドの一つ defensin の抗菌活性については、構造解析を含めて検討し、分子内の 3 つのジスルフィド結合によるフォールディングやペプチド末端の塩基性アミノ酸によるチャージの重要性を報告してきた (Tanabe H. *J Biol Chem* 2004, Maemoto A, *J Biol Chem* 2004)。更に、フォールディング構造の維持と蛋白分解酵素への抵抗性、フォールディン

グに関係する分子シャペロンの存在について発見してきた (Tanabe H. *Biochem Biophys Res Commun* 2007)。近年ではシャペロン蛋白の異常がクローン病の発病に関与することが報告され、小胞体ストレスの関与が示唆されており、シャペロンは新たな新規治療法のターゲットとなってきた (Kaser A. *Cell* 2008, Kim L. *Nat Rev Drug Discov* 2008)。

最近では、小腸幹細胞のマーカーの発見に伴い粘膜上皮の再生に関する新たな治験が得られ (Barker N. *Nature* 2007, Sato T. *Nature* 2009)、Paneth 細胞と腸幹細胞のダブルレットを培養することで、クリプト構造の再生が可能となることが報告された (Snippert H J. *Cell* 2010)。この培養系を用いて粘膜再生の機序も解明され、複数の幹細胞からの修復機転も証明された (Sato T. *Nature* 2010)。しかし、Paneth 細胞の分泌顆粒内の蛋白が近傍に位置する幹細胞を保護する因子はまだ十分に解明されていない。

2. 研究の目的

IBD に対する従来治療からの離脱を最終ゴールとして、腸管粘膜内のクリプト構造の再生機序を解明し、組織構造の培養系を確立、上皮再生のメカニズムを解明する。更に、幹細胞保護因子を同定し、その組み合わせから最適な条件を設定し、腸管粘膜の完全修復を補助する組織再生治療法を開発する。その結

果を基に、医薬品開発と培養上皮移植の医療技術を複合させた医薬品・医療機器の開発をすすめる。

3. 研究の方法

齧歯類を用いて、カルシウムのキレート剤で分離した小腸クリプトに Wnt リガンドと BMP アンタゴニストを加えた独自の組織培養系を確立する。更に、コラゲナーゼ処理にて分離した細胞を単離培養しクリプト構造の培養系を既報に従い実施する。それらの微小環境を構成する細胞を解析し、細胞相互間の作用を検討する。In vitro で幹細胞保護作用と分化誘導作用が確認された因子については、培養条件の改善に応用し、細胞・再生医療技術を用いた粘膜上皮移植治療応用への可能性を検討する。

1) マウス小腸クリプト組織培養法の開発

マウス小腸クリプトは EDTA 存在下でアブレーションをおこないクリプトが豊富なフラクションを回収する。更にコラゲナーゼ処理をおこない細胞を分離させ、Sato T らの方法 (*Nature* 2010) に従い Wnt シグナルを活性化させた条件で細胞培養を行い増幅させたクリプト構造を得る。同様に、クリプトフラクションを Wnt 活性化に加えて BMP シグナルを阻害した条件で培養し、クリプトの長期培養系を確率し、*in vitro* 評価系を確立する。

2) ほ乳類動物モデルを用いた小腸クリプトの検討

イヌ、ブタの小腸粘膜を用いて組織培養を試みる。組織学的に HE 染色を行い、Paneth 細胞とその顆粒の有無を確認する。タンパク発現及び遺伝子発現を検討し、組織培養のた

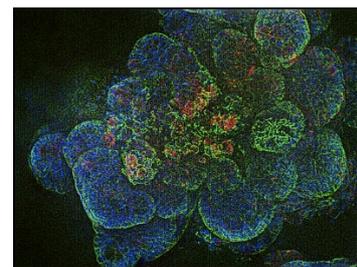
めの予備実験とする。

4. 研究成果

1) マウス小腸腺管の培養と評価

マウスを屠殺後に小腸粘膜から生検鉗子を用いて組織を採取した。カルシウムキレート剤を含む溶液に置換し腺管分離ののちに培養器に入れて培養した (Ayabe T. *Nat Immunol* 2000, Tanabe H. *Infect Immun* 2005)。培養腺管の形態から生存を確認し、Sato T らの方法 (*Nature* 2009) に準じて継代培養に用い、腺管を分離培養した。無血清培地に添加薬剤を調製することで、腺管の長期継代が可能であることを確認できた。顕微鏡的に腺管構造の変化を観察することでバイアビリティを確認することが可能であった。

健全な培養マウス小腸腺管の蛍光顕微鏡像



2) ほ乳類を用いた中・大型動物モデルの作成

イヌおよびブタの小腸粘膜組織を用いて標本作製し、HE 染色にて組織学的な検討を行った。イヌ小腸には Paneth 細胞に特徴的な、クリプト底部のエオジンリッチ顆粒が豊

富な細胞を認めなかった。一方、ブタの組織から得た粘膜にはマウスの Paneth 細胞に酷似した細胞が観察された。ブタの組織を用いることで、中・大型のほ乳類動物のモデルを構築できる可能性が示された。

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)

[図書] (計 1 件)

Trypsin: Structure, Biosynthesis and Functions. Trypsin acts as an activating enzyme in gut innate immunity. Hiroki Tanabe, Mikihiro Fujiya and Yutaka Kohgo. 2012 Nova Scuentific Publishers, inc.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田邊 裕貴 (TANABE HIROKI)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：50396363