

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成29年度研究進捗評価用〕

平成26年度採択分
平成29年3月10日現在

独自の培養系を用いた腸管上皮幹細胞における
生体恒常性維持機構の解明

The elucidation of homeostasis regulated by
intestinal epithelial stem cells

課題番号：26221307

渡邊 守 (WATANABE MAMORU)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授



研究の概要

炎症性腸疾患では腸管上皮細胞の機能不全による腸内環境破綻が難治性の原因と示唆される。申請者は腸管上皮幹細胞運命を人為的に制御し、腸内環境を改善させることが生体恒常性までもリセットすることにより炎症性腸疾患を根本的に解決できると着想した。疑似腸管環境モデル構築による腸管上皮幹細胞及び免疫・内分泌制御を含めた生体恒常性への関与を解明する。

研究分野：消化器内科学

キーワード：腸内環境、共培養、幹細胞機能評価、疑似モデル構築、全身制御

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確認した（Nature Med 2012）。さらにマウス腸炎モデルへの上皮細胞移植により腸炎の改善を認めたことから、細胞移植による上皮再生医療の臨床応用へ十分期待できるものであり、Nature, Science 各誌にトピックスとして取り上げられるなど世界的にも大きな評価を得ている。しかしながら、腸管上皮細胞の機能は非常に多彩で緻密に制御されているがその詳細は未だ明らかではなく、細胞移植における物理的な組織修復は可能でも真の機能的修復までされるか不明である。

2. 研究の目的

本研究では申請者が独自に構築した初代培養系と移植モデルをさらに発展させ、腸管上皮幹細胞の運命決定機構による腸管機能の多様性獲得及び生体恒常性維持機構の解明を目的とする。すでに申請者らは幹細胞の運命決定機構が生体恒常性と連動すること

を世界で初めて示しており、腸内環境疑似モデルにおける幹細胞運命変動を解析することで生体恒常性を腸管からコントロールするという画期的なモデルを提唱する。

3. 研究の方法

申請者ら独自に開発したマウス大腸上皮幹細胞初代培養法をさらに発展させ、ヒト・マウス腸管上皮オルガノイドを用いた腸内環境モデル化を行う。さらに移植効率を改善させたマウスによる全身への影響を探索する。

1) 初代培養オルガノイドによる疑似腸内環境モデルの構築

・樹状細胞・上皮間リンパ球と腸管上皮細胞共培養による相互作用解析系の樹立

2) 腸管上皮幹細胞機能評価法の確立

・1幹細胞可視化による幹細胞動態解析

・腸管上皮幹細胞内シグナル解析

3) 全身疾患での腸管上皮異常機構解析と治療標的探索

・高効率上皮細胞移植モデルの構築

・慢性疾患モデルマウスにおける腸管上皮幹細胞の機能異常解析

4. これまでの成果

1) 初代培養オルガノイドによる疑似腸内環境モデルの構築

・マウス小腸上皮オルガノイドと上皮間リンパ球をそれぞれ単離し、3次元培養にて培養を行った。リンパ球が長期間上皮細胞と共培養される条件を発見した。さらにリンパ球の遊走を可視化し、リンパ球活性化を定量的に評価するシステムを開発した（J. Gastroenterol. 2016）。体外での異なる2種類の初代培養法は独創的であり（特許申請

中)、腸内環境擬似モデル確立への大きな発展となった。

・マウス大腸上皮オルガノイドを用いてサイトカイン、細菌菌体成分添加による上皮応答を確認した。さらに、1年以上の持続的な炎症刺激を行い、炎症刺激時間依存的に上皮オルガノイドの炎症シグナル応答が増幅・蓄積されることを発見した (J Crohns Colitis. 2016)。上皮細胞を体外で経時的に解析可能な系は世界で初めてであり、独創的である。

2) 腸管上皮幹細胞機能評価法の確立

・幹細胞マーカーである *Lgr5* は1陰窩内に14個存在するとされており、1幹細胞の挙動に関しては未知である。*mCherry* 遺伝子をレンチウイルスにてマウス小腸オルガノイドに導入したところ、一部の細胞に蛍光発色を認めた。1年以上の培養にても蛍光は維持され、1細胞のみ蛍光を有するオルガノイドの同定に成功した (BBRC 2014)。

・ヒト小腸・大腸の内視鏡生検検体により、ヒト腸管上皮オルガノイドを安定的に樹立する技術を構築した。

・前述の1幹細胞可視化により、経時的観察にて上皮細胞の供給過程を追跡が可能となった。ライブイメージングにより、1幹細胞が静止期から分裂期に移行し陰窩に細胞を供給する系動態を世界で初めてを報告した (BBRC 2014)。これは蛍光有無の2種類の幹細胞が1陰窩内で細胞供給を補完する現象であり、1陰窩内で幹細胞同士の相互作用が存在することを初めて示唆した。

3) 全身疾患での腸管上皮異常機構解析と治療標的探索

・腸管上皮幹細胞による全身への影響を解析するためには、効率の良い腸管粘膜の置換が必要である。そこで、バルーンカテーテルを用いて腸管内に EDTA を標的の部位に固着させることに成功し広範囲の粘膜脱落モデルを確立した。さらに、このマウスにオルガノイドを散布すると大腸の広範囲にオルガノイドが移植可能であった。この系を利用して広範囲の大腸粘膜脱落部位に小腸オルガノイドを移植したところ、腺管及び分化した細胞は小腸組織と同等であることを発見した。つまり、大腸環境であっても小腸上皮幹細胞は小腸上皮細胞に分化することであり、小腸上皮幹細胞運命決定は周囲の環境に依存しないことを世界で初めて明らかとした (Genes Dev. 2014)。

・計画 2) で確立させた持続炎症モデルにより幹細胞形質転換を評価した。その結果、炎症物質を除去しても炎症シグナルが遷延し不可逆状態となることを発見した (J Crohns Colitis. 2016)。これは長期炎症の細胞形質転換を初めて明らかとしたものであり、炎症性腸疾患患者 (IBD) の長期病歴を模倣していると考えられ、再発機序解明に期待できる。

5. 今後の計画

1) 初代培養オルガノイドによる擬似腸内環境モデルの構築

・マウス共培養系を応用し、ヒト同一人物によるオルガノイド・IEL共培養系を樹立する。
・菌体成分の添加による上皮応答は既に確認しており、管腔内への菌体成分注入の必要性を検討中である。IBD 特異的菌体成分による上皮応答を計画 2) で確立した評価法にて解析し、腸内細菌と上皮細胞の相互作用病態を明らかとする。

・高脂肪食負荷マウスからオルガノイドを樹立し、上皮細胞病態を解析すると共に、上記共培養系を用いて「リンパ球・腸内細菌・上皮細胞」の高脂肪負荷による相互作用を明らかとする。

2) 腸管上皮幹細胞機能評価法の確立

・IBD モデルにおける幹細胞病態を明らかとする。今後確立する高脂肪負荷モデルなど、各種疾患擬似モデルの幹細胞評価を行う。

・評価系をヒト細胞に応用し、IBD・生活習慣病における幹細胞病態を明らかとする。

3) 全身疾患での腸管上皮異常機構解析と治療標的探索

・これまで樹立した IBD モデルオルガノイドをマウスに移植し、消化管腺管配列異常を評価すると共に、全身免疫系の変化を in vivo にて評価する。

・生活習慣病患者からもこれまで確立した評価手法を用いて、ヒト上皮オルガノイドの幹細胞機能・トランスポーター能などの生活習慣病病態を明らかとする。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Hibiya S, Tsuchiya K, Hayashi R, 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. [Epub ahead of print], 2016.

2. Fukuda M, Mizutani T, Mochizuki W, Matsumoto T, Nozaki K, Sakamaki Y, Ichinose S, Okada Y, Tanaka T, Watanabe M, Nakamura T: Small intestinal stem cell identity is maintained with functional paneth cells in heterotopically grafted epithelium onto colon. Genes Dev. 28:1752-1757,2014.

3. Horita N, Tsuchiya K, Hayashi R, Fukushima K, Hibiya S, Fukuda M, Kano Y, Mizutani T, Nemoto Y, Yui S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Fluorescent labelling of intestinal epithelial cells reveals independent long-lived intestinal stem cells in a crypt. Biochem Biophys Res Commun. 454:493-499,2014.

ホームページ等

なし