

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21425

研究課題名（和文）収縮性オーガノイドを用いた腸蠕動運動の制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of intestinal peristalsis using contractile organoids

研究代表者

高橋 淑子（Takahashi, Yoshiko）

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：10183857

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）：食べ物の消化・吸収にとって重要な腸の蠕動運動では、収縮運動リズムをコントロールするペースメーカーであるカハールの介在細胞（ICC細胞）が重要な役割を果たすと思われているが、その実態はよくわかっていない。本研究では腸収縮オーガノイドという新規の解析モデルを開発し、ICC細胞によるペースメーカーシグナルの分子実態に迫った。トリ胚後腸から調整した筋肉層由来の細胞を培養したところ、規則的な収縮を呈する特徴的な細胞集塊の形成が認められ、これを「腸収縮オーガノイド」と名付けた。そこでは、ICC細胞と平滑筋細胞間の特徴的な相互作用が認められるなど、新規モデルとしての有用性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸の蠕動運動は、食べた物の消化や吸収にとって不可欠な生理機能である。また多くの腸関連疾患では、蠕動不全を伴うことが知られている。しかしながら、蠕動運動を支える細胞機能のしくみはよくわかっていない。その理由として、ペースメーカーICC細胞と平滑筋との相互作用を解析する手立てが限定的であったことが挙げられる。本研究で確立した新規モデル「腸収縮オーガノイド」では、特にICC細胞の機能を高解像度で解析できることから、蠕動運動研究にとって有効な解析系を提供できたことの意義は高い。蠕動不全を伴う腸疾患の治療開発に向けて新たな道を提供できた可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Gut peristalsis plays pivotal roles in digestion and absorption of ingested materials. During peristaltic movements, it has been thought that interstitial cells of Cajal (ICCs) act as a pacemaker, but how ICCs interact with smooth muscle cells (SMCs) remains largely unknown. In this study, we have developed a novel organoid called “gut contractile organoid”, that is derived from the muscle layer of chicken hind gut. In the organoid, ICCs and SMCs communicate to undergo intercellular synchronization of oscillatory rhythm. Our gut contractile organoids are expected to serve as a useful model to understand how the periodic contraction in the gut is regulated at the molecular and cellular level.

研究分野：発生生物学

キーワード：腸蠕動運動 振動波 腸平滑筋 カハール介在細胞 トリ胚

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食べた物の消化・吸収にとって欠かせない腸の蠕動運動では、収縮運動が周期的かつ波状に伝播されるために、器官全体の協働を必要とする。蠕動運動では「カハールの介在細胞」(Interstitial cells of Cajal、中胚葉性：以下「ICC 細胞」) がメッシュ状ネットワークを作りペースメーカーとして働くと考えられているが、従来の研究は主に微小電極を用いた電気生理学的な解析に限定されており、ICC ペースメーカーの細胞機能の実体はほとんどわかっていない。その理由として、ICC 細胞が腸全体にメッシュワーク構造をもって分布するため解析が困難であることなどが挙げられる。このように、ICC 細胞の理解のためには新規の解析系開拓が求められていた。

研究開始の時点において私達は、トリ胚の腸筋肉層 (ICC 細胞を含む) に由来する細胞を培養したところ、特徴的な細胞塊が形成されることを見出していた。それらは腸蠕動運動にみられるリズムと酷似した規則的な収縮を呈していたため、ICC ペースメーカーの細胞レベルでの機能解析に適したモデルになり得ると考えられた。

2. 研究の目的

トリ胚の腸筋肉層由来の細胞塊を、蠕動運動研究の新しいモデルとして確立させることを目的とした。特にペースメーカー ICC 細胞に注目して、蠕動運動にみられる細胞間協調のしくみの理解を目指した。

3. 研究の方法

15日目トリ胚の腸から取り出した筋肉層細胞を解離して、さまざまな細胞外基質でコートした培養皿上にプレATINGし、約1週間後に形成される細胞塊とその規則的な収縮を調べた。また収縮性細胞塊を構成する細胞種の同定には、独自に調整した cKit 抗体 (ICC 細胞のマーカー) と平滑筋アクチン抗体を用いた免疫染色法を用いた。さらにこれらの細胞塊形成細胞をターゲットとして、細胞内 Ca²⁺濃度検出蛍光タンパク質をコードする GCaMP 遺伝子を導入し、Ca²⁺の変動パターンについてコンフォーカル顕微鏡を用いて定量解析した。

4. 研究成果

(1) マトリゲルコートによる収縮性細胞塊形成の効率化

トリ胚15日目の後腸から消化管上皮 (内胚葉) と漿膜を取り除いた後に、トリプシンを用いて細胞を解離しプレATINGした (図1)。さまざまな dish コーティングを試したところ、マトリゲルコートが最も効率よく細胞塊を形成した。プレATING後、5日から7日後において、細胞塊が形成され、それらは規則的な収縮を呈していた。

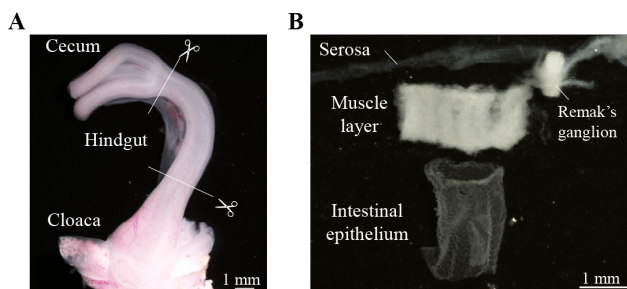


図1
孵卵15日目のトリ胚から後腸を取り出し (A), デイスペーゼを用いて、消化管上皮 (内胚葉) と漿膜を丁寧に除いて筋肉層のみを単離した (B)

(2) 細胞塊が作られる過程のタイムラプス観察

CO₂ インキュベーター内に設置できるタイムラプス観察用顕微鏡 CM20 (エビデント社) を用いて観察したところ、後腸から調整した解離細胞は、プレーティングの翌日よりすでに細長い形状を取り始め、3日後にはいくつかの細胞集団が細長い細胞でつながるといった特徴あるネットワーク構造が認められた (図2)。興味深いことに、これらの細胞クラスターは収縮活動を呈しており、またクラスター同士の振動リズムが同期していた。

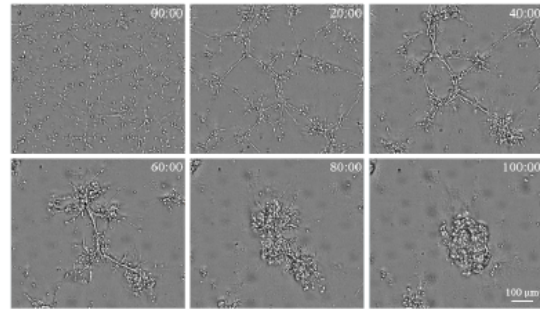


図2
CM20を用いて撮影した動画から抜粋。培養時から2時間インターバルでタイムラプス撮影。

(3) 細胞塊を構成する細胞種の同定

形成された細胞塊を構成する細胞種を調べたところ、中央部にペースメーカーICC細胞が、また周辺部に平滑筋が分布していた。このような明瞭な分離はカドヘリンによるものと想定されたため、さまざまなカドヘリン抗体を用いて染色したところ、中央部ICC細胞ではNカドヘリンの局在が認められたが、平滑筋では検出感度以下であった。神経細胞のマーカで染色した結果、これらの細胞塊には神経細胞はほとんど含まれていないことがわかった。

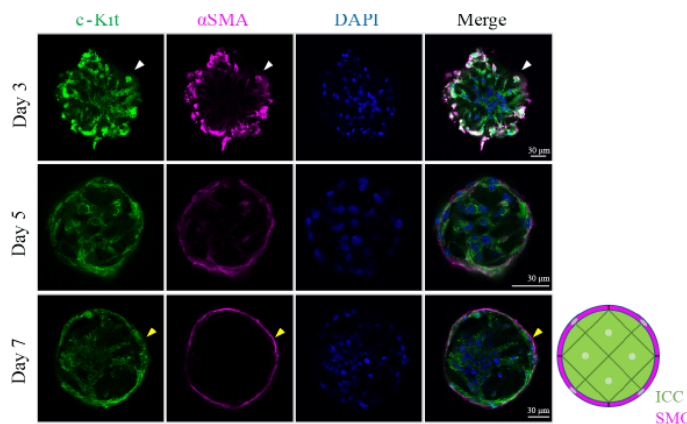


図3
形成された細胞塊を構成する細胞種の同定。cKit抗体とαSMA抗体を用いて、それぞれICC細胞と平滑筋マーカーとして免疫染色した。結果、細胞塊の中央にペースメーカーICC細胞が、周辺部に平滑筋が分布していることが示された。

(4) 上記(1)～(3)の特性に鑑み、本研究で得られた細胞塊を以下「腸収縮オーガノイド」と呼ぶ。腸収縮オーガノイドに外来遺伝子を導入するために、NEON (In Vitrogen社) による電気パルス法とレトロウイルスRCAS法とを試したところ、RCAS法によって高効率の遺伝子導入およびその発現が認められた。

(5) 細胞内Ca²⁺濃度検出蛍光タンパク質をコードするGCaMP遺伝子を腸収縮オーガノイド形成中の細胞に導入し、培養後7日目の腸収縮オーガノイド内でのCa²⁺濃度ダイナミクスを解析したところ、以下の2点の知見を得た。①オーガノイドの収縮リズムに一致して、Ca²⁺シグナルtransientが認められた。②オーガノイドを構成する細胞間で、Ca²⁺シグナルが同期していた。このことからオーガノイドを構成する細胞間で密なコミュニケーションが働いていることがうかがえた (図4)。

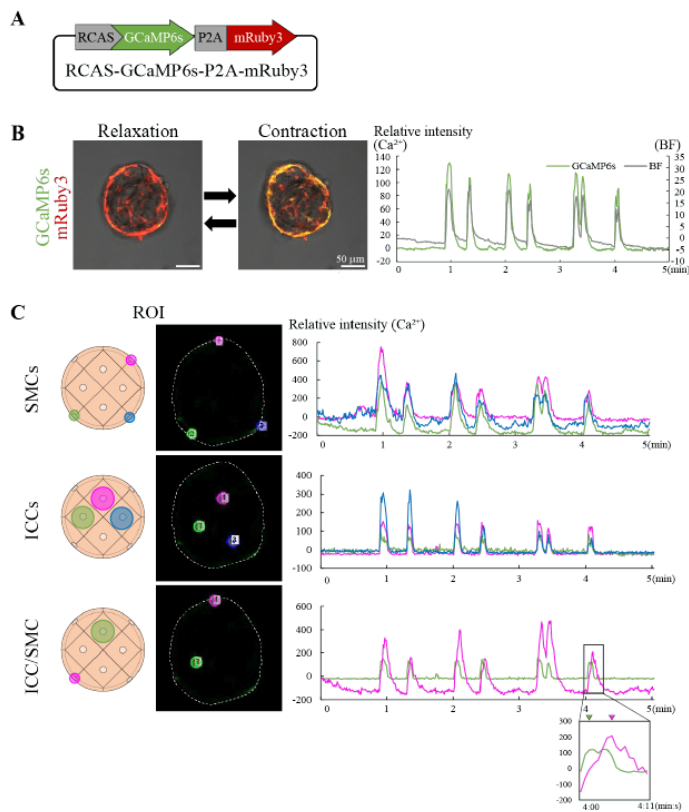


図 4

GCaMP 遺伝子と mRuby レポーター遺伝子を腸収縮オーガノイド形成中の細胞に遺伝子導入した。オーガノイドの収縮リズムに一致して Ca²⁺ transient が認められた。

また、1つのオーガノイド内において、平滑筋間、ICC 細胞間、そして ICC と平滑筋間の Ca²⁺ 変化を定量した。いずれもそのダイナミクスの同期が認められた。ICC における Ca²⁺ の立ち上がりは、平滑筋のそれに先行している様子がみとれる。

(6)

上記 (5) でみられた Ca²⁺ の細胞間同期現象が、ギャップジャンクション (GJ) によるものかを調べるために、GCaMP 遺伝子を導入した腸収縮オーガノイド培養系に GJ 阻害剤を添加したところ、ICC 間や平滑筋間の Ca²⁺ 同期には影響がみられなかったが、ICC-平滑筋間の同期プロファイルに変化が認められた。このことは、“腸の蠕動運動にみられる細胞間相互作用は GJ によるところが大きい”という従来の仮説を覆すものであり、本研究で得られた成果の意義は高い。今後は、ICC 間や平滑筋間の Ca²⁺ 同期を制御するしくみを明らかにする必要がある。

本研究では、腸神経が含まれていないにもかかわらず規則的に収縮する腸収縮オーガノイドを用いることで、ICC-平滑筋間の細胞間コミュニケーションの高解像度解析が可能となり、蠕動運動研究に貢献する新規解析モデルを確立することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Yagasaki Rei, Shikaya Yuuki, Kawachi Teruaki, Inaba Masafumi, Takase Yuta, Takahashi Yoshiko	4. 巻 64
2. 論文標題 Newly raised anti c Kit antibody visualizes morphology of interstitial cells of Cajal in the developing gut of chicken embryos	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 446 ~ 454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12808	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 Saito Daisuke, Tadokoro Ryosuke, Nagasaka Arata, Yoshino Daisuke, Teramoto Takayuki, Mizumoto Kanta, Funamoto Kenichi, Kidokoro Hinako, Miyata Takaki, Tamura Koji, Takahashi Yoshiko	4. 巻 25
2. 論文標題 Stiffness of primordial germ cells is required for their extravasation in avian embryos	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105629 ~ 105629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105629	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 Shikaya Yuuki, Takase Yuta, Tadokoro Ryosuke, Nakamura Ryo, Inaba Masafumi, Takahashi Yoshiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Distribution Map of Peristaltic Waves in the Chicken Embryonic Gut Reveals Importance of Enteric Nervous System and Inter-Region Cross Talks Along the Gut Axis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	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) 10.3389/fcell.2022.827079	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 Kawachi Teruaki, Tadokoro Ryosuke, Takahashi Yoshiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Cell lineage, self-renewal, and epithelial-to-mesenchymal transition during secondary neurulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Korean Neurosurgical Society	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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ito Naofumi、24/28	4. 巻 13
2. 論文標題 Dysfunction of the proteoglycan Tsukushi causes hydrocephalus through altered neurogenesis in the subventricular zone in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 eaay7896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scitranslmed.aay7896	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 Yang Jing、On behalf of the EMT International Association (TEMTIA)、38/48	4. 巻 21
2. 論文標題 Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Reviews Molecular Cell Biology	6. 最初と最後の頁 341 ~ 352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41580-020-0237-9	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 Kawachi Teruaki、Shimokita Eisuke、Kudo Ryo、Tadokoro Ryosuke、Takahashi Yoshiko	4. 巻 461
2. 論文標題 Neural-fated self-renewing cells regulated by Sox2 during secondary neurulation in chicken tail bud	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 160 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2020.02.007	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 Yagasaki Rei、Nakamura Ryo、Shikaya Yuuki、Tadokoro Ryosuke、Hao Ruolin、Wang Zhe、Eiraku Mototsugu、Inaba Masafumi、Takahashi Yoshiko	4. 巻 -
2. 論文標題 The gut contractile organoid: a novel model for studying the gut motility regulated by coordinating signals between interstitial cells of Cajal and smooth muscles	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	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) 10.1101/2024.03.12.584544	査読の有無 無
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 Shikaya Yuuki、Inaba Masafumi、Tadokoro Ryosuke、Utsunomiya Shota、Takahashi Yoshiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Optogenetic control of gut movements reveals peristaltic wave-mediated induction of cloacal contractions and reactivation of impaired gut motility	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Developmental Physiology	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) 10.3389/fphys.2023.1175951	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18件(うち招待講演 13件/うち国際学会 13件)

1. 発表者名 矢ヶ崎 怜
2. 発表標題 腸収縮性オルガノイドを用いた蠕動運動における同調機構の研究
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiko Takahashi
2. 発表標題 Cell communications and inter-region crosstalks during peristaltic movements in the embryonic gut.
3. 学会等名 New Frontiers in Developmental Biology: Celebrating the Diversity of Life (SFB&JSDB) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rei Yagasaki
2. 発表標題 Gut contractile organoids: a novel model system to study the cellular synchronization in gut peristalsis.(Poster)
3. 学会等名 New Frontiers in Developmental Biology: Celebrating the Diversity of Life (SFB&JSDB) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuuki Shikaya
2. 発表標題 Optogenetic manipulation reveals inter-region crosstalks mediated by peristaltic waves in the chicken embryonic gut. (Poster)
3. 学会等名 19th International Congress of Developmental Biology, International Society of Developmental Biologists (ISDB) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋淑子
2. 発表標題 腸蠕動運動における振動波の確立機構
3. 学会等名 第33回日本末梢神経学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rei Yagasaki
2. 発表標題 Reciprocal signals between the pacemaker and smooth muscle cells in the gut contractile organoid.
3. 学会等名 55th JSDB Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiko Takahashi
2. 発表標題 Enteric nervous system is required for suppressing unnecessary waves in embryonic gut peristalsis
3. 学会等名 “Mini-symposium on neural crest and neural crest-derived pathologies” Lund University, Sweden (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋淑子
2. 発表標題 腸の蠕動運動に潜む時計機能の成立メカニズム
3. 学会等名 新学術領域研究「脳構築における発生時計と場の連携」第6回ハイブリット班会議（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshiko Takahashi
2. 発表標題 腸の蠕過程にお動運動の成り立ち Establishment of gut peristalsis during development
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshiko Takahashi
2. 発表標題 Stemness and lineage dynamics of cells participating in secondary neurulation.
3. 学会等名 Neuro surgery Update 2021, Seoul, Korea（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiko Takahashi
2. 発表標題 Contribution of mono-fated neural progenitors to secondary neurulation during axis elongation
3. 学会等名 Neuromesodermal progenitors in development, evolution and regeneration, 2020, Lisbon, Portugal（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiko Takahashi
2. 発表標題 Cellular basis for gut peristalsis
3. 学会等名 Taiwanese Society of Developmental Biology Retreat, 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiko Takahashi
2. 発表標題 Dynamics of the pacemaker cells, interstitial cells of Cajal, in gut peristalsis
3. 学会等名 The 72nd Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiko Takahashi, Daisuke Saito, Yuta Takase, Ryosuke Tadokoro, Kanta Mizumoto
2. 発表標題 Extravasation of primordial germ cells in avian embryos is enabled by dynamic plasticity revealed by high-resolution confocal microscopy.
3. 学会等名 53rd JSDB/APDBN Meeting, Kumamoto (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiko Takahashi
2. 発表標題 Gut peristaltic movements studied using optogenetics and contractile organoids
3. 学会等名 the 11th Avian Model Systems Meeting, University of Portsmouth (UK) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshiko Takahashi
2. 発表標題 Gut peristaltic movements: studies with optogenetics and contractile organoids.
3. 学会等名 The XXIII International Congress of Genetics, Genetics and Genomics, Melbourne Australia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masafumi Inaba, Yuuki Shikaya, Shota Utsunomiya, Yoshiko Takahashi
2. 発表標題 Optogenetic control of gut movements reveals peristaltic wave-mediated induction of cloacal contractions
3. 学会等名 the 56th annual meeting of JSDB (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 稲葉真史、鹿谷有由希、高橋淑子
2. 発表標題 腸ぜん動運動を支えるCa ²⁺ 振動波が生み出されるしくみ
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 安井真奈美、ローレンス・マルソー	4. 発行年 2023年
2. 出版社 臨川書店	5. 総ページ数 336
3. 書名 想像する身体 上巻	

1. 著者名 京都大学大学院理学研究科MACS教育プログラム実行委員会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 京都大学学術出版会	5. 総ページ数 318
3. 書名 京大式サイエンスの創り方	

1. 著者名 女性科学者に明るい未来をの会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本評論社	5. 総ページ数 288
3. 書名 私の科学者ライフ	

1. 著者名 公益財団法人遺伝学普及会	4. 発行年 2023年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 80
3. 書名 生物の科学 遺伝 2023年7月発行号 (Vol.77 No.4)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

動物発生学 高橋グループ –Developmental Biology–
<http://www2.zool.kyoto-u.ac.jp/develop/takahashi.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------