

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15286

研究課題名(和文) 培養ヒト腸管上皮を用いた消化管ホルモン・ファームの構築

研究課題名(英文) Establishment of enterohormone farm by using cultured human intestinal epithelial cells

研究代表者

岡本 隆一 (Okamoto, Ryuichi)

東京医科歯科大学・再生医療研究センター・教授

研究者番号：50451935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では消化管内視鏡検体から樹立したヒト腸上皮オルガノイドを用い、分泌系細胞への分化誘導法の検討と同細胞を用いた機能解析を実施した。その結果、40症例以上の患者検体より小腸・大腸オルガノイドを樹立し、解析可能なライブラリを構築した。またガンマセクレターゼ阻害剤の短時間曝露と Wnt3a, SB202190, Nicotinamide の減量・除去を組み合わせた培地条件で、ヒト腸オルガノイドの分泌系への分化誘導が可能である事が示された。さらに分泌刺激因子 PGE2 及び消化管ホルモン VIP に対する腸オルガノイドの応答を定量的に評価する系を構築し、両因子が有する生体内体液調節作用を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the method to induce secretory-lineage differentiation of cultured human intestinal organoids, and also performed some functional analyses of those organoids. Consequently, we successfully established over 40-lines of human small intestinal- or colonic-organoids from endoscopic biopsy specimens. Short-term exposure to a gamma-secretase inhibitor, combined with depletion of Wnt3a, SB20190 and Nicotinamide, certainly directed human intestinal organoids towards secretory cell-lineage differentiation. We also established a quantitative analysis system to evaluate the response of human intestinal organoids to a secretagogue, PGE2, or an enterohormone, VIP, and showed their properties to regulate the body-fluid balance.

研究分野：消化器内科学

キーワード：腸上皮 消化管ホルモン

1. 研究開始当初の背景

(1)消化管上皮は消化・吸収のみならず、人体最大の内分泌組織として多くの消化管ホルモンを分泌し、生体の恒常性維持に重要な役割を担っている。同機構は厳密に役割分担された特定の「分泌系」上皮細胞系譜が生体内環境を感知し適切な応答を行うことにより、その機能が制御されている。従って、特定系譜の上皮分泌機能の欠失・破綻は消化管運動不全・吸収機能障害等の消化管特異的機能の破綻に加え、耐糖能異常・肥満といった全身恒常性の破綻とも直結している。

(2)しかしながら、これら消化管内分泌系細胞の機能的破綻に対し、体外で大量に分泌系細胞を調製し疾患治療のリソースとして利用する技術の開発は未だ皆無である。その理由として、1)正常ヒト腸上皮細胞を体外で長期に培養・維持する技術、2)分泌系細胞へと高効率かつ安定して分化誘導する技術が何れも全く未確立であった事、3)個別消化管ホルモンが有する機能を効率よく定量的に評価する方法が未確立であったことが挙げられる。

(3)研究代表者らは腸上皮細胞の増殖・分化機構を追求する過程で、マウス腸管上皮細胞を体外で長期培養・維持する独自の技術を開発した(Nat Med, 2012)。同技術をヒト腸上皮へと展開し、培養・分化誘導に関する以下の項目を既に実証済みである。ヒト生検組織から幹細胞を含む腸上皮細胞を単離し、基底膜側を再外側に向けた一層の上皮細胞から成る球状3次元構造体である「オルガノイド」として培養維持が可能であること。同オルガノイドは十二指腸～直腸に至る消化管全部位から同等に樹立可能であること。

(4)研究代表者らが独自に有する上記成果は、系譜特異的機能を獲得した腸上皮細胞を体外で再構築し、腸上皮の機能解析および治療リソースとして利用することを可能とする画期的な技術であると考えている。

2. 研究の目的

本研究では従って、研究代表者らが有するヒト腸上皮培養技術を発展させ、(1)消化管ホルモン産生に特化した細胞集団を含む消化管分泌系細胞の分化誘導する手法の開発、及び(2)ヒト腸上皮オルガノイドを用いて分泌刺激と成る生理活性補物質や個別消化管ホルモンが有する機能を効率よく定量的に評価する方法の開発、を目的とした。

3. 研究の方法

(1)本学医学部倫理審査委員会の承認を得た臨床研究計画に則り、同意を得た患者より得

られた消化管生検組織を用いて消化管各部位よりヒト腸上皮オルガノイドの樹立を行った。

(2)同オルガノイドを用いることにより、LY411575・DBZ等の分泌系細胞への誘導因子を用いて効率良い分化誘導が可能となる培養条件の探索を行った。

(3)腸上皮の分泌刺激作用を有すると想定される候補物質や個別消化管ホルモンについて、樹立済みのヒト腸上皮オルガノイドを用いることにより、各因子の作用を定量的に評価する手法の開発を行った。開発に際し、培養ウェル内のオルガノイド形状・サイズを迅速に測定可能な3次元スキャナーを用いた手法について主に検討を行った。

4. 研究成果

(1)内視鏡生検組織を開始材料としたヒト腸上皮ライブラリの構築

研究期間において同意を得られた患者が小腸内視鏡あるいは大腸内視鏡を施行された際、複数個の内視鏡生検組織を培養開始材料とし、ヒト腸上皮オルガノイドの樹立を行った。いかなる種類の消化管ホルモンを産生するかは由来する消化管部位により厳密に規定されていることが知られており、従って小腸及び大腸の各部位より複数症例の腸上皮オルガノイドを樹立し解析することが有用と考えられた。これに基づき「ヒト腸上皮ライブラリ」の構築を進めた結果、累計40例以上の症例より腸上皮オルガノイドを樹立し(小腸24例・大腸17例)、保存・解析することが可能であった。

(2)ヒト腸上皮オルガノイドの分泌系細胞への効率良い分化誘導法の探索

前記(1)により樹立したヒト小腸オルガノイドを用い、分泌系細胞への分化誘導に適した培養条件の検討を行った。候補化合物として、ガンマセクレターゼ阻害効果を有するLY411575及びDBZについて検討を行った。これらのうち、DBZについては、DBZ添加(10 μ M)に加えて培地中の組換え型Wnt3aの減量(通常添加量の10%に減量)、SB202190及びNicotinamideの除去それぞれについて効果を比較した。この結果、(i)DBZを添加し(48h)、(ii)SB202190及びNicotinamideを除去した場合に、分泌系への分化の指標となるAtoh1mRNAの発現が最も高く誘導されることが定量PCR解析にて明らかとなった。しかしながら、DBZを48時間持続添加することにより、オルガノイドの形態保持能の低下・生存細胞数の減少も見られたことから、より短時間での薬剤曝露による分化誘導効果についても検討を実施した。このため、上記の条件に加え、(a)DBZ(5 μ M)を96時間持続添加した場合、および(b)DBZ(5 μ M)を3時間のみ添加した場合のそれぞれの分化誘導効

果について比較検討を行った。この結果、及び (a) に加えて (b) DBZ を 3 時間のみ添加した場合に Atoh1 mRNA の発現が最も高く誘導されることが定量 PCR 解析にて明らかとなった。従って Wnt3a の減量、SB202190 (p38 MAPK 阻害薬) 及び Nicotinamide の非存在下に DBZ (5 μ M) を短時間曝露することにより、分泌系への分化誘導が可能となること示された。更に個別の内分泌系細胞に特化した分化誘導については、異なる細胞内シグナル経路の段階的制御等により分化誘導できる可能性が考えられた。

(3) ヒト腸上皮オルガノイドを用いた分泌刺激候補因子・個別消化管ホルモン作用の定量測定系開発

前記 (1) により樹立したヒト小腸オルガノイドを用い、機能的な分泌系細胞に対して分泌刺激因子となり得る生理活性物質・消化管ホルモンの作用を定量的に評価する手法の開発を試みた。候補因子の 1 つである PGE2 をヒト小腸オルガノイドに添加したところ、オルガノイド径の急速な拡大・膨張現象が誘導可能であることが明らかとなった。同現象は Cl^- が欠如した培地条件では全く誘導されなかったことから、 Cl^- 分泌機能を反映した現象であるものと考えられた。同様の現象を誘導する作用を有する生理活性物質等の探索を行ったところ、消化管ホルモンである VIP (血管作動性消化管ペプチド) も同等の作用を有することが明らかとなった。一方、IFN- γ を含むサイトカインやセロトニンには同様の効果は認めなかった。

PGE2 及び VIP が腸オルガノイドの Cl^- 分泌機能を促進する効果を定量的に評価するため、3 次元スキャナーを用いた測定系の構築を行った。適切に設定したスキャン条件で 96-ウェルプレートに播種したヒト腸オルガノイドを撮影・画像解析することにより、経時的に変化するオルガノイド断面積を迅速・容易に定量可能であることが確認された。確立した定量系を用い、ヒト小腸オルガノイドおよびヒト大腸オルガノイドに対して PGE2 及び VIP が有する効果について、定量的な解析を行った。この結果、PGE2 および VIP それぞれについて用量反応曲線を描くことが可能となり、これに基づき $\log EC_{50}$ を算出することが可能であった (ヒト小腸オルガノイド = -8.36、ヒト大腸オルガノイド = -8.53)。また、PGE2 および VIP の最大膨張値は同等であることも示された。また PGE2 および VIP は正常腸管粘膜由来小腸・大腸オルガノイドのみならず、潰瘍性大腸炎患者由来の大腸オルガノイド、およびクローン病患者由来の小腸オルガノイドにおいても同様の活性を発揮し得ることが示された。本解析に用いたオルガノイド急速膨張の測定系を用いることにより、消化管ホルモン等による生体内体液調節機能を迅速・定量的に評価することが可能となった。

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)

(雑誌論文) (計 9 件)

1. Nakata T, Shimizu H, Nagata S, Ito G, Fujii S, Suzuki K, Kawamoto A, Ishibashi F, Kuno R, Anzai S, Murano T, Mizutani T, Oshima S, Tsuchiya K, Nakamura T, Hozumi K, Watanabe M, Okamoto R: Data showing proliferation and differentiation of intestinal epithelial cells under targeted depletion of Notch ligands in mouse intestine. *Data Brief* 10: 551-556, 2017, 査読有, DOI:10.1016/j.dib.2016.12.045
2. Nakata T, Shimizu H, Nagata S, Ito G, Fujii S, Suzuki K, Kawamoto A, Ishibashi F, Kuno R, Anzai S, Murano T, Mizutani T, Oshima S, Tsuchiya K, Nakamura T, Hozumi K, Watanabe M, Okamoto R: Indispensable role of Notch ligand-dependent signaling in the proliferation and stem cell niche maintenance of APC-deficient intestinal tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 482: 1296-1303, 2017, 査読有, DOI:10.1016/j.bbrc.2016.12.031
3. Fujii S, Suzuki K, Kawamoto A, Ishibashi F, Nakata T, Murano T, Ito G, Shimizu H, Mizutani T, Oshima S, Tsuchiya K, Nakamura T, Araki A, Ohtsuka K, Okamoto R, Watanabe M: PGE2 is a direct and robust mediator of anion/fluid secretion by human intestinal epithelial cells. *Sci Rep* 6: 36795- 36795, 2016, 査読有, DOI:10.1038/srep36795
4. Okamoto R, Watanabe M: Investigating cell therapy for inflammatory bowel

- disease. *Expert Opin Biol Ther* 16: 1015-1023, 2016, 査読有, DOI:10.1080/14712598.2016.1177019
5. Hayashi R, Tsuchiya K, Fukushima K, Horita N, Hibiya S, Kitagaki K, Negi M, Itoh E, Akashi T, Eishi Y, Okada E, Araki A, Ohtsuka K, Fukuda S, Ohno H, Okamoto R, Nakamura T, Tanaka S, Chayama K, Watanabe M: Reduced human α -defensin 6 in non-inflamed jejunal tissue of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 22: 1119-1128, 2016, 査読有, DOI:10.1097/MIB.0000000000000707
 6. Okamoto R, Watanabe M: Role of epithelial cells in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 51: 11-21, 2016, 査読有, DOI:10.1007/s00535-015-1098-4
 7. Okamoto R, Watanabe M: Perspectives for Regenerative Medicine in the Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. *Digestion* 92: 73-77, 2015, 査読有, DOI:10.1159/000438663
 8. Matsuzawa Y, Oshima S, Takahara M, Maeyashiki C, Nemoto Y, Kobayashi M, Nibe Y, Nozaki K, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Ma A, Watanabe M: TNFAIP3 promotes survival of CD4 T cells by restricting MTOR and promoting autophagy. *Autophagy* 11: 1052-1062, 2015, 査読有, DOI:10.1080/15548627.2015.1055439
 9. Fukushima K, Tsuchiya K, Kano Y, Horita N, Hibiya S, Hayashi R, Kitagaki K, Negi M, Itoh E, Akashi T, Eishi Y, Oshima S, Nagaishi T, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Atonal homolog 1 protein stabilized by tumor necrosis factor α induces high malignant potential in colon cancer cell line. *Cancer Sci* 106: 1000-1007, 2015, 査読有, DOI:10.1111/cas.12703
- 〔学会発表〕(計 15 件)
1. Tsuchiya K, Hibiya S, Fukushima K, Shirasaki T, Oshima S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M : Atoh1 protein stabilization in colon tumor acquires the morphological change to signet ring cell carcinoma with cancer stem cell enrichment. APDW2016, Kobe (Japan), 2016 年 11 月 3 日
 2. Hibiya S, Tsuchiya K, Watanabe S, Shirasaki T, Oshima S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M : Construction of in vitro model of ulcerative colitis using mouse primary colonic organoid. UEGW2016, Vienna (Spain), 2016 年 10 月 18 日
 3. Hama M, Hayashi A, Mizutani T, Fujii S, Murano T, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe K, Shimizu N, Okamoto R, Watanabe M : Prevalence of viral DNA in the mucosal tissue and cultured organoids of inflammatory bowel disease patients. AOCC2016, Kyoto (Japan), 2016 年 7 月 8 日
 4. Tsuchiya K, Hibiya S, Fukushima K, Shirasaki T, Oshima S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M : Atoh1 protein stabilization in colon tumor acquires the phenotype of signet ring cell carcinoma with cancer stem cell enrichment. AOCC2016, Kyoto (Japan), 2016 年 7 月 8 日
 5. Hibiya S, Tsuchiya K, Shirasaki T, Fukushima K, Oshima S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M : Mouse

- colonic organoid acquires wnt-independent survival property after long-term inflammation. AOCC2016, Kyoto (Japan), 2016 年 7 月 8 日
6. Shirasaki T, Tsuchiya K, Hibiya S, Nishimura R, Fukushima K, Watanabe S, Okamoto R, Nakamura T and Watanabe M : Stimulation with the ligands of Toll like receptors in primary human organoids. AOCC2016, Kyoto (Japan), 2016 年 7 月 7 日
 7. Kawamoto A, Ito G, Nakata T, Fujii S, Suzuki K, Ishibashi F, Shimizu H, Tsuchiya K, Nakamura T, Okamoto R, Watanabe M : OLFM4 and UBD are up-regulated in the inflamed intestinal epithelia of IBD patients by synergy of Notch signaling and TNF- . AOCC2016, Kyoto (Japan), 2016 年 7 月 7 日
 8. Fujii S, Suzuki K, Kawamoto A, Ishibashi F, Nakata T, Ito G, Shimizu H, Mizutani T, Tsuchiya K, Nakamura T, Ohtsuka K, Okamoto R, Watanabe M : In Vitro organoid model reveals PGF2 as a Robust Mediator of chloride & water secretion bt human intestinal epithelial cells. DDW2016, San Diego (USA), 2016 年 5 月 23 日
 9. Fujii S, Okamoto R, Nakata T, Suzuki K, Ishibashi F, Kawamoto A, Ohashi-Segawa S, Mizutani T, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M : Establishment of a 3D cell culture-based screening platform to identify natural products that can regulate trans-epithelial water transport of the human gastrointestinal tract. Pacificchem2015, Hawaii (USA), 2015 年 12 月 17 日
 10. Hibiya S, Tsuchiya K, Shirasaki T, Fukushima K, Hayashi R, Horita N, Oshima S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M : Continuous stimulation with cytokines leads to irreversible activation of NF-kb signaling in colonic epithelial cells by organoid culture . UEGW2015, Barcelona (Spain), 2015 年 10 月 27 日
 11. Horita N, Tsuchiya K, Hayashi R, Fukushima K, Hibiya S, Fukuda M, Mizutani T, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M : A novel fluorescent labelling system into small intestinal organoid reveals independent long-lived intestinal stem cells in a crypt. AOCC2015, Beijing (China), 2015 年 6 月 19 日
 12. Suzuki K, Fujii S, Nakata T, Kawamoto A, Ishibashi F, Ohashi-Segawa S, Mizutani T, Tsuchiya K, Otsuka K, Nakamura T, Okamoto R, Watanabe M : Enrichment of Intestinal Stem Cells by the 3D-Culture of IBD Patient Derived Intestinal Epithelium. AOCC2015, Beijing (China), 2015 年 6 月 19 日
 13. Hibiya S, Tsuchiya K, Fukushima K, Hayashi R, Horita N, Oshima S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M : Continuous Stimulation With Cytokines Leads to Irreversible Accumulation of NF-kB Signaling in Colonic Epithelial Cells. DDW2015, Washington DC (USA), 2015 年 5 月 19 日
 14. Nakata T, Shimizu H, Suzuki K, Fujii S, Ito G, Tsuchiya K, Nakamura T, Okamoto R, Hozumi K, Watanabe M : Distinct Role of Notch Ligands, DLL1

and Dll4, in Normal and in Tumor
Intestinal Epithelium. DDW2015,
Washington D.C. (USA), 2015 年 5 月
19 日

15. Shimizu H, Suzuki K, Fujii S, Nakata T,
Ito G, Murano T, Tsuchiya K,
Nakamura T, Okamoto R, Hozumi K,
Watanabe M : Notch Ligands DLL1
and Dll4 Are Expressed by Distinct
Population of Epithelial Cells in the
Mice Intestine. DDW2015, Washington
D.C. (USA), 2015 年 5 月 16 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 隆一 (OKAMOTO, Ryuichi)
東京医科歯科大学・再生医療研究センタ
ー・教授
研究者番号 : 5 0 4 5 1 9 5 3