

令和元年6月10日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06524

研究課題名（和文）小腸オルガノイドを用いたクローン病におけるパネート細胞形態異常の機能解析

研究課題名（英文）Analysis of Paneth cell function using intestinal organoid derived from Crohn's disease patients

研究代表者

内藤 健夫（Naito, Takeo）

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：80808197

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では小腸上皮オルガノイドの樹立を試みた。様々な手法を用いたが結果的には長期培養が困難であった。しかし大腸腺腫や大腸癌由来のオルガノイドの作成に成功した。これらの培養上清から超遠心法によるエクソソーム分画の抽出を行った。オルガノイドおよび培養上清中のエクソソーム分画からtotal RNAを抽出。腺腫及び癌から抽出したエクソソームmiRNAに関して網羅的発現解析を行った。癌群で193個、腺腫群で129個のmiRNAが確認された。細胞内miRNAと共通して発現を認めたものの中で、癌群で3個のmiRNAの発現が亢進、12個が減少していた。そのうちmiR-1246が有意であることが明らかとされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は大腸癌、腺腫からオルガノイドを作成することに成功し、長期培養することが可能であることを実証した。さらには、培養上清からエクソソームを生成し、大腸癌由来エクソソームにはmir-1246が高発現していることが明らかとした。大腸癌の生存や浸潤に関与していることが推定され、mir-1246の機能が明らかとなれば、治療や診断への応用へ期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we try to establish small intestinal derived organoid. But culture was not successful. Therefore, we have produced colon adenoma and cancer-derived organoids easier to culture. Exosomes, are extracellular vesicles having containing a lipid bilayer, and they are known to play an important role in cell-to-cell communication by transmitting exosomal microRNA (miRNA). Therefore, the aim of this study was to clarify Colorectal Cancer characterize colorectal cancer (CRC) -specific exosomal miRNA by using patient-oriented derived organoids. We established a novel exosome extraction method using To this end, Among the miRNAs conserved in CRC and colorectal adenoma (CRA) organoids, the miR-1246 expression of miR-1246 was increased in the and exosome.

研究分野：消化管疾患

キーワード：大腸癌 腸管上皮オルガノイド エクソソーム解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患は主にクローン病と潰瘍性大腸炎の2つからなるとされる疾患群である。複雑で膨大な遺伝的背景が明らかになるにつれ、単純に2つに分類できない多様な病態の存在が示唆される。そのため、その病因や表現型によって疾患のサブタイプを決定し、新しい個別化された医療を展開していく必要がある。そのためには、比較的容易に解析が可能で、有用なバイオマーカーが必要であるが、その候補の一つに小腸パネート細胞がある。小腸パネート細胞はディフェンシンやリゾチームなどの抗菌ペプチドを含んだ分泌顆粒を持ち、それらを腸管腔内に分泌することで、腸内細菌叢の恒常性を保ち、腸管免疫に対して重要な役割を果たしている。さらに、腸上皮の幹細胞に近接して存在することから、上皮機能の更新や維持にも重要な役割を果たすことが示唆されている。これまでの解析で、クローン病の発症原因には腸管免疫が重要な役割を担っていることが示されており、腸管免疫の主役であるパネート細胞がクローン病に果たす役割の大きさが示唆される。欧米人クローン病感受性遺伝子で、オートファジーに関連する ATG16L1 や NOD2 遺伝子について、その低発現マウスでは小腸パネート細胞の分泌顆粒の細胞質内における分布・形態異常(パネート細胞形態異常)を認めた(Gastroenterology, 2014 Jan;146(1):200-9)。この分泌顆粒の形態異常はそれらの遺伝子多型を持つ、クローン病患者のパネート細胞においても確認されている。さらに、パネート細胞形態異常が多い症例は術後の再燃率が高いことも示唆されている。本申請者は近年、日本人においてもパネート細胞形態異常はオートファジーに関連するクローン病感受性遺伝子(LRRK2)と相関を示し、さらに術後の再燃率と相関することを示した(JCI Insight. 2017 Mar 23;2(6):e91917)。このようにパネート細胞の分泌顆粒形態異常は、遺伝的背景の異なる人種間でも共通したクローン病におけるバイオマーカーとして認識されてきている。パネート細胞形態異常が多い症例では積極的な治療を行うなど、比較的容易に解析できる小腸パネート細胞によって、クローン病の個別化医療が可能であることを示唆している。

パネート細胞形態異常と遺伝的因子の解析は行われてきているが、外的因子との関係についての報告はまだない。これまでの報告ではパラフィン固定した小腸手術標本を使用しており、外的因子によってどのように生体内でパネート細胞形態異常が変化するかは解析が困難であった。近年、小腸組織からオルガノイドと呼ばれる3次元構造培養が可能となり、生体内に近い環境での解析が可能となった。このオルガノイドを使用して、パネート細胞形態異常と外的因子との解析も可能と推定された。クローン病患者由来の小腸オルガノイドを用い、パネート細胞分泌顆粒量だけでなく、パネート細胞の分泌顆粒形態異常を分析することで、さらに病態に近い治療標的を発見することができる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、クローン病患者の小腸検体から作成したオルガノイドを用いて、日本人パネート細胞形態異常と機能異常を *in vitro* で解析するツールを開発することである。個別化医療の足掛かりとなる基礎研究を行う。

3. 研究の方法

(1)ヒト腸管上皮細胞の単離と長期培養

標本から単離した細胞をコレゲナーゼ処理後にマトリゲル内に包埋し、すべてのニッチ因子を添加する事で、様々なニッチ要求性を示す腸管上皮細胞でも培養可能であることを確認する。また、培養したオルガノイドを継代し、長期培養可能であることを確認する。

(2)樹立したオルガノイドの病理学的評価

樹立したオルガノイドを HE 染色し、樹立元の腸管上皮細胞との相同性を確認する。

研究計画発案当初、小腸オルガノイドを作成に成功した報告はごくわずかしかなかった。後述するが、当科でも様々な手法を用いて腸管上皮オルガノイドの樹立を試みたが、結果として樹立成功には至らなかった。また、大腸正常上皮オルガノイドの作成も困難であった。WNT/R-spondin に対するニッチ要求性が低下している大腸腺腫・癌からのオルガノイド培養のみが成功した。そのため、大腸腫瘍オルガノイドを用いた機能解析をする方針とした。オルガノイドは周囲組織と密接な関係性を保ち生存していることがわかっており、我々は腸管癌幹細胞の新たなニッチ形成因子として大腸癌から分泌される EV(extracellular vesicle)に注目し、研究の目的に追加した。EVとは100nmの小胞顆粒で、様々な種類の細胞から分泌され、脂質二重膜を有し顆粒の内部には蛋白質、核酸(mRNA、miRNA、DNA)、脂質を含み、細胞外に分泌され別の細胞に移動する事が可能で、受容体や酵素と全く異なった細胞間伝達機構、細胞の恒常性維持機構として注目されている。オルガノイドにおけるニッチ因子とEVの関与についての検討を目的に追加した。

4. 研究成果

(1)ヒト腸管上皮細胞の単離と長期培養

正常腸管上皮細胞をマトリゲルを用いて3次元オルガノイド長期培養株の樹立を試みた。すなわち、過去の報告にある通り、Matrigel, Advanced DMEM/F12, GlutaMAX-I,

Penicillin/Streptomycin, N2 supplement, B27 supplement, N-Acetylcysteine, mouse recombinant EGF, mouse recombinant noggin, human recombinant R-spondin, mouse recombinant Wnt-3A, Nicotinamide, [Leu15]-Gastrin I, A-83-01, SB202190, HEPES を用いて培地を作成し、樹立を試みた、しかしながら長期培養株の作成は困難であった。Recombinant WNT/ R-spondin では樹立が困難であるという報告もあったことから、コンディショナルメディアムを作成し樹立を試みたがやはり困難であった。しかしながら大腸腺腫・癌からのオルガノイド樹立は成功したため、この腺腫オルガノイドを用いた機能解析を主眼に置いた研究を追加することとした。

(2) 樹立したオルガノイドの病理学的評価

樹立した腺腫オルガノイドを HE 染色し、樹立元の腸管上皮細胞との相同性を確認した。樹立したオルガノイドを iP gelI を用いてパラフィン固定した。オルガノイドは腺管用構造を呈しており、樹立元の病理組織像と同様の形態で増殖していた。9 検体で長期培養に培養に成功し、臨床検体からも大腸癌が長期培養可能である事を示した。

(3) エクソソーム miRNA の抽出

オルガノイド培養上清から超遠心法によるエクソソーム分画の抽出を行った。抽出されたエクソソーム分画では透過型電子顕微鏡で 100nm 前後の小胞が観察された。ナノ粒子解析システムでエクソソーム分画中の微粒子は 100nm 前後に最頻値を認めた。ウエスタンブロットではエクソソーム膜蛋白質である CD9、CD63 が陽性であった一方、培養液のみの場合は CD9、CD63 共に陰性だった。

(4) 癌-腺腫群間における miRNA の網羅的発現解析

オルガノイドおよび培養上清中のエクソソーム分画からそれぞれ total RNA を抽出した。得られた RNA は電気泳動を行い、リボソーム RNA の混入がないことを確認した。腺腫 3 検体及び癌 3 検体から抽出した細胞内 miRNA およびエクソソーム miRNA に関して、網羅的発現解析を行った。まず、細胞内に関しては、癌群で 348 個、腺腫群で 344 個の miRNA が確認された。共通して発現がみられる 319 個の miRNA に関して発現差を比較したところ、腺腫を基準として癌群で 4 個の miRNA の発現が亢進しており、10 個が減少していた。次に、エクソソームに関しては、癌群で 193 個、腺腫群で 129 個の miRNA が確認された。共通して発現を認めた 122 個の miRNA に関して発現差を比較したところ、癌群で 3 個の miRNA の発現が亢進しており、12 個が減少していた。癌群において細胞内及びエクソソームで共通して発現が亢進した miRNA は miR-1246、miR-7107-5p の 2 つであった。一方共通して発現が減少した miRNA は認めなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

(1) Clinical and genetic risk factors for decreased bone mineral density in Japanese patients with inflammatory bowel disease.

Naito T, Yokoyama N, Kakuta Y, Ueno K, Kawai Y, Onodera M, Moroi R, Kuroha M, Kanazawa Y, Kimura T, Shiga H, Endo K, Nagasaki M, Masamune A, Kinouchi Y, Shimosegawa T. J Gastroenterol Hepatol. 2018 Nov;33(11):1873-1881 doi: 10.1111/jgh.14149 (査読あり)

(2) A genome-wide association study identifying RAP1A as a novel susceptibility gene for Crohn's disease in Japanese individuals.

Kakuta Y, Kawai Y, Naito T, Hirano A, Umeno J, Fuyuno Y, Liu Z, Li D, Nakano T, Izumiyama Y, Ichikawa R, Okamoto D, Nagai H, Matsumoto S, Yamamoto K, Yokoyama N, Chiba H, Shimoyama Y, Onodera M, Moroi R, Kuroha M, Kanazawa Y, Kimura T, Shiga H, Endo K, Negoro K, Yasuda J, Esaki M, Tokunaga K, Nakamura M, Matsumoto T, McGovern DPB, Nagasaki M, Kinouchi Y, Shimosegawa T, Masamune A. J Crohns Colitis. 2018 Nov 29. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjy197. (査読あり)

(3) NUDT15 codon 139 is the best pharmacogenetic marker for predicting thiopurine-induced severe adverse events in Japanese patients with inflammatory bowel disease: a multicenter study.

Kakuta Y, Kawai Y, Okamoto D, Takagawa T, Ikeya K, Sakuraba H, Nishida A, Nakagawa S, Miura M, Toyonaga T, Onodera K, Shinozaki M, Ishiguro Y, Mizuno S, Takahara M, Yanai S, Hokari R, Nakagawa T, Araki H, Motoya S, Naito T, Moroi R, Shiga H, Endo K, Kobayashi T, Naganuma M, Hiraoka S, Matsumoto T, Nakamura S, Nakase H, Hisamatsu T, Sasaki M, Hanai H, Andoh A, Nagasaki M, Kinouchi Y, Shimosegawa T, Masamune A, Suzuki Y; MENDEL study group.

J Gastroenterol. 2018 Sep;53(9):1065-1078 doi: 10.1007/s00535-018-1486-7. (査読あり)

(4) LRRK2 but not ATG16L1 is associated with Paneth cell defect in Japanese Crohn's disease patients.

Liu TC, Naito T, Liu Z, VanDussen KL, Haritunians T, Li D, Endo K, Kawai Y, Nagasaki M, Kinouchi Y, McGovern DP, Shimosegawa T, Kakuta Y, Stappenbeck TS.

JCI Insight. 2017 Mar 23;2(6):e91917 doi: 10.1172/jci.insight.91917 (査読あり)

(5) A coding variant in FTO confers susceptibility to thiopurine-induced leukopenia in East Asian patients with IBD.

Kim HS, Cheon JH, Jung ES, Park J, Aum S, Park SJ, Eun S, Lee J, Rütther U, Yeo GSH, Ma M, Park KS, Naito T, Kakuta Y, Lee JH, Kim WH, Lee MG.

Gut. 2017 Nov;66(11):1926-1935 doi: 10.1136/gutjnl-2016-311921 (査読あり)

〔学会発表〕(2件)

(1) Naito T, Liu TC, Kakuta Y, Moroi R, Kuroha M, Kimura T, Kanazawa Y, Kinouchi Y, Stappenbeck TS, Shimosegawa T. Smoking negatively affects disease course regardless of smoking amount and may be associated with Paneth cell phenotype in Japanese Crohn's disease patients. CCC, Las Vegas 2018 January

(2) Naito T, Liu TC, Kakuta Y, Liu Z, Haritunians T, Li D, Endo K, Kawai Y, Nagasaki M, Kinouchi Y, McGovern DP, Stappenbeck TS, Shimosegawa T. Paneth Cell Phenotype is Associated with Novel Genetic Determinants and Clinical Outcome in Japanese Crohn's Disease Patients. AOCC, Seoul May 2017.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

〔その他〕

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。