

令和元年6月3日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19513

研究課題名(和文) ヒト小腸を大腸化する運命決定因子の同定

研究課題名(英文) Identification of critical factor to generate human colon from small intestine

研究代表者

渡辺 守 (Watanabe, Mamoru)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10175127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はヒト大腸上皮幹細胞の運命制御を明らかにすることにより、小腸上皮幹細胞を大腸上皮幹細胞に転換することで、ヒト小腸上皮から大腸上皮を作成することを目的としています。そこで、患者さんの内視鏡生検検体から小腸と大腸を少量採取し、遺伝子発現の違いを検討しました。その中から大腸にのみ発現している遺伝子を発見しました。今後は、その遺伝子の機能解析することで小腸から大腸に転換する仕組みがわかることが期待されます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患、中でも潰瘍性大腸炎は若年者に多く、日本でも患者数が増加している難治性の病気です。潰瘍性大腸炎では粘膜の再生が治療のゴールとなっており、大腸上皮細胞を体外で培養し移植する治療も将来的に考えられています。しかし、潰瘍性大腸炎では病変が大腸全域に渡るため、大腸再生医療では培養すべき正常大腸上皮細胞が確保できないことも心配されます。そのため、小腸細胞を大腸細胞に変換させることで、再生医療の移植に使用できるのではと考えています。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the mechanism of the transformation from the stem cell in human small intestine to the stem cell in colon. We therefore collected biopsy specimens from both small intestine and colon in a same patient. We then assessed the difference of gene expression between small intestine and colon, resulting in the identification of a gene specifically expressed only in colon. Further analysis for the function of this gene might help to understand the mechanism of stem cell fate to generate human colon.

研究分野：消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患 再生医療 幹細胞運命制御 大腸オルガノイド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで炎症性腸疾患 (IBD) の臨床及び研究に従事してきた。これまで IBD は炎症を中心とした免疫制御破綻が原因であると考えられ、リンパ球などの免疫担当細胞が研究の中心であった。しかし申請者は上皮細胞機能に着目し、炎症の成因・維持機構との関連を明確にした。一方で、申請者は腸管の機能的修復によるバリアー能の重要性にいち早く着目し、上皮再生に関する研究を展開した。IBD における上皮再生破綻機構を明らかとするなど、現在の IBD 治療目標が抗炎症から粘膜治癒へと移行している現状に先駆けたものであり、世界的に高い評価をうけた。さらに、独自に大腸上皮細胞の初代培養法を確立したのみならず、オルガノイドとして継代培養の後にマウス大腸への移植を行い、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。そこで申請者はこの大腸への移植技術は大腸上皮細胞の運命制御解析に有用であると着想した。まず、マウス胎児の原腸を成体マウス大腸に移植した所、正常の大腸腺管を構築した。一方で、成体マウスの小腸由来のオルガノイドを大腸に移植しても小腸絨毛を維持することを明らかとした。つまり、胎児期より小腸・大腸上皮の運命は決定されており、腸内環境や間質との相互作用では運命変化はしないと考えた。IBD 特に潰瘍性大腸炎では病変が大腸全域に渡るため、大腸再生医療では培養すべき正常大腸上皮細胞が確保できないことが危惧される。そのため、大腸機能保持のために小腸細胞を移植しても無効の可能性が高い。以上より、小腸から大腸への運命転換機構を明らかとすることで大腸上皮細胞を確保できることから、大腸再生医療への発展につながると考えている。

### 2. 研究の目的

本研究はヒト大腸上皮幹細胞の運命制御を明らかにすることにより、小腸上皮幹細胞を大腸上皮幹細胞に転換することで、ヒト小腸上皮から大腸上皮を作成することを目的とする。

申請者は以前より炎症性腸疾患 (IBD) の臨床・研究に従事している。IBD は慢性・難治性の炎症疾患であり、小腸・大腸に潰瘍を形成し、下痢・出血など重篤な症状を引き起こす。若年者に多く、本邦で患者数が急増していることから根本的な対策が急務の状況である。これまでは、慢性炎症疾患であることから、免疫制御を中心とした治療・研究が行われてきた。しかし、免疫を標的とした治療のみでは粘膜が修復せず症状は一時的に改善しても再燃を繰り返すことから新しい治療法の開発が望まれている。申請者はいち早く粘膜修復を念頭に置いた腸上皮細胞の機能に着目し、上皮細胞における粘膜免疫制御や腸内細菌防御などの粘膜バリアー制御機構などを明らかとしてきた。さらに、上皮細胞幹細胞に着目し、世界で初めてマウス大腸上皮細胞の幹細胞同定、及び幹細胞初代培養を基盤とした大腸オルガノイドの持続的な継代培養に成功している。大腸オルガノイドをマウス大腸潰瘍に移植すると大腸組織として生着するのみならず、潰瘍治癒促進効果を認めたことから、大腸上皮幹細胞移植による再生医療は IBD の大腸粘膜治癒を目標とした次世代治療として確立できると考えた。移植には大量のヒト大腸上皮幹細胞の確保が必要だがその供給源としては ES 細胞、iPS 細胞、大腸上皮体性幹細胞自体が考えられる。現時点ではヒト ES 細胞の使用には倫理的な問題が解決できていない。iPS 細胞は癌化の危険性がいまだ排除できず、また iPS 細胞から小腸上皮の樹立は報告されている一方で大腸上皮の樹立は未だ成功していない。以上の状況から体性幹細胞である大腸上皮幹細胞を培養、増殖することが最善と思われ、さらに他家移植では拒絶反応の可能性もあるため自家移植が最も安全で有効な手段であると考えた。正常粘膜からのヒト大腸上皮幹細胞の初代培養及び大腸オルガノイドの樹立は既に成功しているが、IBD 特に潰瘍性大腸炎は全大腸が病変となるため、正常な大腸上皮幹細胞を採取できない可能性が危惧される。一方潰瘍性大腸炎では小腸上皮は正常であることが多く、小腸上皮幹細胞は大腸幹細胞と同じ Lgr5 陽性細胞であることから、小腸上皮幹細胞が大腸上皮の供給源となる可能性に関して探索した。マウス小腸幹細胞の初代培養及び小腸オルガノイドの継代培養により小腸上皮を増殖させた後、マウス大腸潰瘍に移植した。大腸に生着はしたが、小腸粘膜の状態であり小腸の細胞構成を全て保持していた。つまり、小腸幹細胞は大腸環境においても小腸幹細胞性質を維持することが判明した。そこで大腸上皮幹細胞運命制御を明らかとし、小腸幹細胞から大腸幹細胞への人工的な転換技術を構築することで自家大腸上皮細胞の供給が可能となると着想した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 同一人物の小腸・大腸差異を検討

小腸内視鏡を用いて、経肛門的に内視鏡を挿入する。小腸・大腸からそれぞれ 3 個生検を行い、病理組織、RNA 抽出、初代培養に使用する。

同一人物内視鏡生検検体による小腸・大腸の差異解析

5 症例の小腸・大腸生検検体から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行う。同一人物での小腸・大腸の発現差異を網羅的に検討し、大腸のみ発現している遺伝子群を抽出する。

同一人物オルガノイドによる小腸・大腸の差異解析

上記の同一人物内視鏡検体から小腸・大腸上皮細胞の初代培養を行い、オルガノイドを樹立する。オルガノイドは組織よりもより未分化な状態で維持することから、より幹細胞成分に近い差異の検出が期待できる。オルガノイドから RNA を抽出し、マイクロアレイを行い同様に小腸と大腸で発現差異の大きい遺伝子を抽出する。

同一人物オルガノイドによる小腸・大腸幹細胞差異解析

上記の小腸・大腸オルガノイドに共通の幹細胞マーカーである Lgr5 プロモーター下に GFP を結合したレポータープラスミドを導入する。Lgr5 陽性細胞をソーティングにて単離した後に RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行う。同様に小腸上皮幹細胞と大腸上皮幹細胞で発現差異の大きい遺伝子を抽出する。

大腸化へ運命制御する候補遺伝子の決定

上記 - の解析により共通する遺伝子群を抽出する。さらに組織の免疫染色により大腸のみに発現していることを確認し、大腸上皮細胞への運命制御に必須の候補遺伝子群を決定する。

#### (2) ヒト小腸から大腸化への形質転換評価解析

小腸オルガノイドに大腸化候補遺伝子を導入

大腸化候補遺伝子群のレンチベクターウイルスを作成し、小腸オルガノイドへ導入する。導入したオルガノイドの大腸化をマイクロアレイによる解析にて大腸オルガノイドと一致するか検討を行う。

小化合物スクリーニングによる大腸化検討

大腸特異的発現遺伝子のプロモーター部位を抽出し GFP と結合したレポータープラスミドを作成する。ヒト小腸オルガノイドに導入し、発現を可視化することで大腸化の評価を行う。本学の医療機能分子開発室（ケミカルバイオロジクスクリーニングセンター）所有の 1 万種類以上の DMSO 溶解性、低細胞毒性を確認済みの低分子化合物を用いて発現蛍光の強度を確認する。

大腸化オルガノイドの組織評価解析

上記 , にて小腸の大腸化を確認したオルガノイドに CMV プロモーター GFP プラスミドをレンチウイルスにて導入し、全ての細胞を GFP 蛍光発色させる。免疫不全マウスに大腸潰瘍を形成させ、大腸化オルガノイドを注腸にて移入し生着させる。生着した組織を固定し病理評価を行い、ヒト小腸オルガノイドから大腸組織が構築されるかを確認する。

### 4 . 研究成果

#### (1) 同一人物の小腸・大腸差異を検討

倫理審査委員会に申請し、承認された。小腸内視鏡を用いて、経肛門的に内視鏡を挿入する。小腸・大腸からそれぞれ 3 個生検を行い、病理組織、RNA 抽出、初代培養に使用した。

同一人物内視鏡生検検体による小腸・大腸の差異解析

小腸・大腸生検検体から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。同一人物での小腸・大腸の発現差異を網羅的に検討し、大腸のみ発現している遺伝子群を抽出した。

同一人物オルガノイドによる小腸・大腸の差異解析

上記の同一人物内視鏡検体から小腸・大腸上皮細胞の初代培養を行い、オルガノイドを樹立した。オルガノイドから RNA を抽出し、マイクロアレイを行い同様に小腸と大腸で発現差異の大きい遺伝子を抽出した。

同一人物オルガノイドによる小腸・大腸幹細胞差異解析

上記の小腸・大腸オルガノイドに共通の幹細胞マーカーである Lgr5 プロモーター下に GFP を結合したレポータープラスミドを導入する。共焦点蛍光顕微鏡にて Lgr5 陽性細胞の分布を確認した。

大腸化へ運命制御する候補遺伝子の決定

上記 - の解析により共通する遺伝子群を抽出した。さらに組織の免疫染色により大腸のみに発現していることを確認し、大腸上皮細胞への運命制御に必須の候補遺伝子群を決定した。

#### (2) ヒト小腸から大腸化への形質転換評価解析

小腸オルガノイドに大腸化候補遺伝子を導入

大腸化候補遺伝子群のレンチベクターウイルスを作成し、ヒト細胞株にて遺伝子、蛋白の発現を確認した。現在、小腸オルガノイドへ導入し、発現を検討している。

小化合物スクリーニングによる大腸化検討

大腸特異的発現遺伝子のプロモーター部位を検索し、特異的な転写活性部位を決定した。現在プロモータープラスミドを作成中である。プラスミド作成後に小化合物スクリーニングを行う。

大腸化オルガノイドの組織評価解析

免疫不全マウスに大腸潰瘍を形成させ、大腸オルガノイドを注腸にて移入し生着を確認した。生着した組織を固定し病理評価を行い、正常腺管であることを確認した。今後、大腸化オルガノイドの移植により組織学的解析を行う予定である。

### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 58 件) 全て査読有

1. Nishimura R, Shirasaki T, Tsuchiya K, Miyake Y, Watanabe Y, Hibiya S, Watanabe S, Nakamura T, Watanabe M. Establishment of a system to evaluate the therapeutic effect and the dynamics of an investigational drug on ulcerative colitis using human colonic organoids. **J Gastroenterol**. 2019, Jan 1. doi:10.1007/s00535-018-01540-y. [Epub ahead of print]
2. Kawamoto A, Nagata S, Anzai S, Takahashi J, Kawai M, Hama M, Nogawa D, Yamamoto K,

- Kuno R, Suzuki K, Shimizu H, Hiraguri Y, Yui S, Oshima S, Tsuchiya K, Nakamura T, Ohtsuka K, Kitagawa M, Okamoto R, Watanabe M. Ubiquitin D is Upregulated by Synergy of Notch Signalling and TNF- in the Inflamed Intestinal Epithelia of IBD Patients. **J Crohns Colitis**. 2019, 13(4):495-509. doi:10.1093/ecco-jcc/jjy180.
3. Motobayashi M, Matsuoka K, Takenaka K, Fujii T, Nagahori M, Ohtsuka K, Iwamoto F, Tsuchiya K, Negi M, Eishi Y, Watanabe M. Predictors of mucosal healing during induction therapy in patients with acute moderate-to-severe ulcerative colitis. **J Gastroenterol Hepatol**. 2018, doi: 10.1111/jgh.14565. [Epub ahead of print]
  4. Oshima S, Watanabe M. Genetic and environmental factors drive personalized medicine for Crohn's disease. **J Clin Invest**. 2018, 128(11):4758-4760. doi:10.1172/JCI124303.
  5. Suzuki K, Murano T, Shimizu H, Ito G, Nakata T, Fujii S, Ishibashi F, Kawamoto A, Anzai S, Kuno R, Kuwabara K, Takahashi J, Hama M, Nagata S, Hiraguri Y, Takenaka K, Yui S, Tsuchiya K, Nakamura T, Ohtsuka K, Watanabe M, Okamoto R. Single cell analysis of Crohn's disease patient-derived small intestinal organoids reveals disease activity-dependent modification of stem cell properties. **J Gastroenterol**. 2018, 53(9):1035-1047. doi:10.1007/s00535-018-1437-3.
  6. Watabe T, Nagaishi T, Tsugawa N, Kojima Y, Jose N, Hosoya A, Onizawa M, Nemoto Y, Oshima S, Nakamura T, Karasuyama H, Adachi T, Watanabe M. B cell activation in the cecal patches during the development of an experimental colitis model. **Biochem Biophys Res Commun**. 2018, 496(2):367-373. doi:10.1016/j.bbrc.2018.01.053.
  7. Yui S, Azzolin L, Maimets M, Pedersen MT, Fordham RP, Hansen SL, Larsen HL, Guiu J, Alves MRP, Rundsten CF, Johansen JV, Li Y, Madsen CD, Nakamura T, Watanabe M, Nielsen OH, Schweiger PJ, Piccolo S, Jensen KB. YAP/TAZ-Dependent Reprogramming of Colonic Epithelium Links ECM Remodeling to Tissue Regeneration. **Cell Stem Cell**. 2018, 22(1):35-49.e7. doi: 10.1016/j.stem.2017.11.001.
  8. Ishibashi F, Shimizu H, Nakata T, Fujii S, Suzuki K, Kawamoto A, Anzai S, Kuno R, Nagata S, Ito G, Murano T, Mizutani T, Oshima S, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M, Okamoto R. Contribution of ATOH1(+) Cells to the Homeostasis, Repair, and Tumorigenesis of the Colonic Epithelium. **Stem Cell Reports**. 2018, 10(1):27-42. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.11.006.
  9. Nibe Y, Oshima S, Kobayashi M, Maeyashiki C, Matsuzawa Y, Otsubo K, Matsuda H, Aonuma E, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Nakada S, Watanabe M. Novel polyubiquitin imaging system, PolyUb-FC, reveals that K33-linked polyubiquitin is recruited by SQSTM1/p62. **Autophagy**. 2018, 14(2):347-358. doi: 10.1080/15548627.2017.1407889.
  10. An J, Nagaishi T, Watabe T, Naruse TK, Watanabe M, Kimura A. MKL1 expressed in macrophages contributes to the development of murine colitis. **Sci Rep**. 2017, 7(1):13650. doi: 10.1038/s41598-017-13629-0.
  11. Hibiya S, Tsuchiya K, Hayashi R, Fukushima K, 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**. 2017, 11(5):621-630. doi:10.1093/ecco-jcc/jjw186.
  12. Maeyashiki C, Oshima S, Otsubo K, Kobayashi M, Nibe Y, Matsuzawa Y, Onizawa M, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M. HADHA, the alpha subunit of the mitochondrial trifunctional protein, is involved in long-chain fatty acid-induced autophagy in intestinal epithelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 2017, 484(3):636-641. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.159.
  13. Tsuchiya K, Hayashi R, Fukushima K, Hibiya S, Horita N, Negi M, Itoh E, Akashi T, Eishi Y, Motoya S, Takeuchi Y, Kunisaki R, Fukunaga K, Nakamura S, Yoshimura N, Takazoe M, Iizuka B, Suzuki Y, Nagahori M, Watanabe M. Caudal type homeobox 2 expression induced by leukocytapheresis might be associated with mucosal healing in ulcerative colitis. **J Gastroenterol Hepatol**. 2017, 32(5):1032-1039. doi: 10.1111/jgh.13645.
  14. Fujimoto K, Kinoshita M, Tanaka H, Okuzaki D, Shimada Y, Kayama H, Okumura R, Furuta Y, Narazaki M, Tamura A, Hatakeyama S, Ikawa M, Tsuchiya K, Watanabe M, Kumanogoh A, Tsukita S, Takeda K. Regulation of intestinal homeostasis by the ulcerative colitis-associated gene RNF186. **Mucosal Immunol**. 2017, 10(2):446-459. doi: 10.1038/mi.2016.58.
  15. Nakamura T, Watanabe M. Intestinal stem cell transplantation. **J Gastroenterol**. 2017, 52(2):151-157. doi: 10.1007/s00535-016-1288-8.
  16. Akiyama S, Mochizuki W, Nibe Y, Matsumoto Y, Sakamoto K, Oshima S, Watanabe M, Nakamura T. CCN3 Expression Marks a Sulfomucin-nonproducing Unique Subset of Colonic Goblet Cells in Mice. **Acta Histochem Cytochem**. 2017, 50(6):159-168. doi:

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Tsuchiya K, Watanabe S, Shirasaki T, Nishimura R, Katsukura N, Hibiya S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: TP53 mutation in human colonic organoids acquires resistance to in vitro long-term inflammation. ECCO2019, 2019.
2. Watanabe M: Regeneration of intestinal epithelial cell and IBD, Falk symposium 2018, 2018.
3. Matsumoto Y, Watanabe M, Nakamura T: Development of a new mouse model of short bowel syndrome that may allow for the assessment of therapeutic efficacy of heterotopic transplantation of small intestinal organoids. 5th TERMIS World Congress 2018, 2018.
4. Yui S, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Fetalization of colonic epithelium medicated by YAP/TAZ links ECM remodeling to tissue regeneration. GI Research Academy 2018, 2018.
5. Suzuki K, Kuwabara K, Takahashi J, Anzai S, Kuno R, Kawamoto A, Ishibashi F, Nagata S, Hiraguri Y, Yui S, Tsuchiya K, Nakamura T, Ohtsuka K, Okamoto R, Watanabe M: Single-cell level analysis of organoids derived from CD patients reveals disease-status related modifications of small intestinal stem cells. DDW 2018, 2018.
6. Watanabe M: Organoids as a therapy resource from clinical trial in a dish to engraftment. International Cluster Symposium, 2018.
7. Watanabe M: Stem Cell Therapy for IBD: Promise and Challenge. GZDDW2017, 2017.
8. Watanabe M: Intestinal Epithelial Stem Cells for the Treatment of GI Disease. Digestive and Liver Diseases Conference, 2017.

〔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

<http://www.tmd.ac.jp/grad/gast/index.html>

## 6 . 研究組織

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。