

令和元年5月29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：17K19674

研究課題名(和文)上皮置換による大腸機能改変とその応用

研究課題名(英文)Development of hybrid intestine system and its applications

研究代表者

中村 哲也(Nakamura, Tetsuya)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教授

研究者番号：70265809

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)：本研究では、マウス小腸オルガノイド細胞を大腸組織へ異所性に細胞移植する技術を核とした研究を展開した。その結果、小腸細胞を大腸に移植した手術後にもマウスが致死的とならない手術手技と術後管理法を確立し、長期間経過後にも移植片が解析できる手法が確立できた。本法を用いて、蛍光標識した培養小腸上皮オルガノイド細胞を大腸に移植した際の分子発現変化や、組織学的変化などを解析することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸上皮を異なる上皮組織に置換する本研究の試みは、元来均一である組織内に周囲と異なる組織を生着させ機能させる技術開発として先進性がある。また、小腸の物理的欠損で引き起こされる小腸機能不全に対し、大腸機能を改変し治療する新しい再生医療コンセプトにつながる点で重要である。今後は、大腸の一部にたとえばある種のホルモン産生機能を付加するなど、全く新しい医療技術開発につながる可能性を秘めた有意義な研究であったと考える。

研究成果の概要(英文)：My research group first described that mouse colonic epithelial organoids can regenerate colonic epithelia when transplanted. By extending this study, we have shown that various types of intestinal epithelial organoids, such as those derived from fetal and adult mouse small intestines, can regenerate the intestinal epithelium in vivo. In this research proposal we have further shown the methodology of open abdominal surgery to replace epithelial tissues of various parts of the mouse colon with epithelial organoids obtained from different parts of intestines. By employing this, we have been able to investigate the changes in gene expression patterns and the histology of ectopically-grafted intestinal epithelial cells, which may provide valuable insights into how intestinal epithelia preserve their lineage-specific characteristics throughout isolation, organoid culture and grafting processes.

研究分野：消化器病学、再生医学

キーワード：腸オルガノイド 3次元培養 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまでの腸上皮研究過程において、腸上皮幹細胞移植で大腸組織再生が可能であることを明らかにした (Nat Med 2012)。またこの移植技術の応用により、胎生期小腸上皮由来細胞移植によっても大腸組織再生が可能であること (Cell Stem Cell 2013)、さらには、成体小腸上皮由来細胞も大腸組織へ移植可能であること (Genes Dev 2014) を示した。特にこの成体小腸上皮細胞移植の成果は、2 つの重要な知見を提示した。ひとつは、成体由来小腸細胞が胎児小腸上皮とは大きく異なり、大腸という異所においても長期にわたり小腸形質を維持することにある。この事実は、胎生期には未獲得で、その後の発生・発達過程で完成する臓器特異性決定機構が上皮内因性に存在することを示すものであった。もうひとつは、本研究で新しいレシピエントマウスモデルを新規に作成したことにより、「生きたマウスの任意の大腸上皮を改変できる可能性」を見いだした点にある。本研究はこれらを背景とし、「大腸上皮の生体内エンジニアリングによる大腸機能改変技術」をさらに進めることを目指して開始した。

## 2. 研究の目的

本研究では「上皮置換による大腸機能改変」が動物モデルで確立できる可能性を検証するために、(1) 新しい大腸上皮傷害マウスモデルを作成し、(2) ここへの細胞移植を試み、さらに(3) ここに作成した新規大腸移植マウスモデルを利用する応用研究をおこなうことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 新しい大腸上皮傷害マウスモデルの作製

以下の点に特に留意し、任意の大腸部位に細胞移植が可能となるマウスモデル確立を図る。

- 大腸上皮剥離後もマウスを生存可能とする手術技術確立
- 大腸内の異なる部に確実に上記傷害を作成する技術とすること

### (2) 新規大腸傷害マウスモデルへの細胞移植実験

(1) で作成した大腸傷害モデルへの腸上皮幹細胞移植実験を試みる。

種々のタイプの腸上皮細胞を培養して増やし、(1) の大腸上皮傷害モデルに安定して移植生着させる条件を検討する。

### (3) 新規大腸移植マウスモデルを利用する応用研究

(1) および (2) で確立するマウスモデルを組合せ、複数の研究プロジェクトを展開した。第一には、異種細胞を大腸内に生着させる技術を利用した上皮細胞解析を進めた。ここでは、マウス大腸内に限局的に様々な異種細胞を移植生着させることにより、上皮の増殖・分化に及ぼす上皮内因性因子あるいは外因性因子の関与を解析した。第二には、大腸上皮の小腸化により小腸機能欠損の補完技術に結びつける基礎解析をおこなった。このために、遠位小腸切除による新しい短腸症候群モデルマウスを作成した。

## 4. 研究成果

「新しい大腸上皮傷害マウスモデルの作製」と「新規大腸傷害マウスモデルへの細胞移植実験」では、大腸の任意の部位で限局的に粘膜傷害を作成する手法を確立した。マウスの開腹下に、大腸内腔へチューブを挿入した上で、致死的とならず大腸上皮を剥離することが可能となった。さらに、腸壁の開口部を閉鎖し、閉腹した後、本手術後のマウスが長期にわたって観察・評価しうることも明らかとなった。さらに、本法で上皮剥離をおこなった大腸組織へ種々のオルガノイド細胞を移植した結果、移植細胞が生着しうることも確認できた。さらに、この手術条件が、近位・中位・遠位など、異なる大腸領域に応用可能であることを確認した。これまでにすでに、移植細胞細胞を注入する際の条件を変えると生着向上が得られることなど、新規の知見を見いだした。さらに本研究では、異なる部位の小腸組織から準備し、これを近位大腸へ移植することで形成される移植片において、小腸由来の細胞が、移植先の近位大腸の環境においても固有の表現型を維持するとの興味深いデータが得られつつある。

また、「新規大腸移植マウスモデルを利用する応用研究」では、慶應大学・佐藤俊朗博士と共同研究をおこない、本研究で開発・確立した大腸上皮傷害モデルを用いてヒト大腸細胞をマウス大腸に生着させる実験に成功した。その結果、ヒト大腸上皮の Lgr5 分子発現細胞が長期にわたる自己複製能および多分化能を有する幹細胞であることや、ヒトとマウスにおける腸上皮増殖の相違などを明らかにした。

一方、大腸上皮の小腸化により小腸機能欠損の補完技術に結びつける基礎解析においては、75%の遠位小腸を完全切除する短腸症候群モデルマウスを新規に作成し、その性状を解析した。その結果、本モデルが致死的な小腸機能欠損を示すことがわかり、今後の研究で小腸化大腸による小腸機能補完作用を評価するために有用であることを明らかにできた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Nakamura T<sup>§</sup>. Recent Progress in Organoid Culture to Model Intestinal Epithelial Barrier Functions. **Int Immunol**. 31(1): 13-21: 2019. doi: 10.1093/intimm/dxy065. 査読有
2. 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**. 53(9): 1035-1047: 2018. doi: 10.1007/s00535-018-1437-3. 査読有
3. Sugimoto S, Ohta Y, Fujii M, Matano M, Shimokawa M, Nanki K, Date S, Nishikori S, Nakazato Y, Nakamura T, Kanai T, Sato T. Reconstruction of the human colon epithelium in vivo. **Cell Stem Cell**. 22(2): 171-176: 2018. doi: 10.1016/j.stem.2017.11.012. 査読有
4. 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**. 22(1): 35-49: 2018. doi: 10.1016/j.stem.2017.11.001. 査読有
5. 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**. 10(1): 27-42: 2018. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.11.006. 査読有
6. 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**. 14(2): 347-358: 2018. doi: 10.1080/15548627.2017.1407889. 査読有
7. Nakamura T<sup>§</sup> and Sato T<sup>§</sup>: Advancing intestinal organoid technology toward regenerative medicine. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**. 5(1): 51-60: 2017. doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.10.006. 査読有
8. Matsumoto Y, Mochizuki W, Akiyama S, Matsumoto T, Nozaki K, Watanabe M, Nakamura T<sup>§</sup>: Distinct intestinal adaptation for vitamin B12 and bile acid absorption revealed in a new mouse model of massive ileocecal resection. **Biol Open**. 6(9): 1364-1374: 2017. doi: 10.1242/bio.024927. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 中村哲也. 「オルガノイド移植による未来の腸再生医療」第 31 回小腸移植研究会 (招待講演) 2019 年 3 月 9 日、慶應義塾大学、東京
2. 松本有加、渡辺守、中村哲也. 【消化管】腸オルガノイドによる再生医療を目指した新規小腸機能不全マウスモデルの開発と移植方法の検討. 第 17 回日本再生医療学会総会 2018.03.22 パシフィコ横浜、神奈川県
3. 中村哲也. 「オルガノイド移植による腸再生医療」シンポジウム「腸管不全の現状と未来」第 33 回日本小児外科学会・秋季シンポジウム (招待講演) 2017 年 10 月 28 日、川崎市産業振興会館、神奈川県
4. 中村哲也. 「Intestinal Stem Cell Transplantation」シンポジウム「消化器免疫の再生医療」第 54 回日本消化器免疫学会総会 (招待講演) 2017 年 9 月 29 日、東京

〔図書〕(計 5件)

1. 油井史郎、中村哲也、渡辺守：大腸オルガノイド．大腸クリプト単離とⅠ型コラーゲンによるオルガノイド培養法．実験医学別冊「決定版 オルガノイド実験スタンダード」(佐藤俊朗、武部貴則、永楽元次 編集) 羊土社、東京：234-241, 2019
2. 中村哲也：「特集 3次元臓器構築と外科領域への応用」腸オルガノイドを用いる再生医療の可能性．日本外科学会雑誌：119(4)：401-407, 2018.
3. 松本有加、渡辺守、中村哲也：「特集 周産期再生医療の現状と未来」腸管再生．周産期医学：48(7)：873-877, 2018.
4. 中村哲也：小腸・大腸再生．小児外科：49(5)：470-473, 2017
5. 中村哲也：オルガノイド移植による腸上皮再生と臨床応用．生体バリア 実験医学増刊(清野宏、植松智 編集) 羊土社、東京：160-164, 2017

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

該当なし

6．研究組織

(1) 研究分担者

氏名：松岡 克善  
ローマ字氏名：( MATSUOKA, Katsuyoshi )  
所属研究機関名：東京医科歯科大学  
部局名：大学院医歯学総合研究科  
職名：寄附講座准教授  
研究者番号(8桁)：40307393

(2) 研究協力者

該当なし