

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02867

研究課題名(和文)小腸幹細胞移植による大腸上皮置換と小腸不全動物モデルに対する再生医療の試み

研究課題名(英文)Transplantation of small intestinal organoids onto the colon and its potential as a novel therapeutic approach for intestinal failure

研究代表者

中村 哲也(Tetsuya, Nakamura)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：70265809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では大腸上皮を剥離し小腸上皮へ置換する技術開発を目指した。その結果、開腹したマウスの一定腸の大腸内腔を操作し、キレート剤で上皮を解離し、ここへ培養オルガノイドを生着させる大腸上皮置換技術を確立した。また、別に用意した小腸オルガノイドを注入し、ここへ移植することも可能となった。異所性に移植生着させた小腸上皮移植片解析の結果、小腸組織に由来する移植片内上皮細胞は小腸固有の分子発現パターンを保持することが明らかになった。短腸症候群モデルマウスを作成し、これに大腸上皮小腸置換をおこなうと、移植片内小腸上皮にもアダプテーション反応が見られることなど、新しい知見も得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

広汎な小腸切除などで生じる腸管不全に対する新規治療開発が切望されてきた。本研究では、マウス大腸上皮を安全に剥離し、培養オルガノイド移植によりこれを小腸上皮に置換する技術を提示した。また、異所性に移植生着させた小腸上皮移植片は、小腸上皮固有の分子発現パターンを保持することも明らかになった。本研究結果と今後のさらなる進展により、重篤なヒト腸管不全に対し、既存の大腸組織を足場として利用することにより、血流確保術を必要とせず広大な小腸粘膜を創出する全く新しい腸再生医療技術を提供できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Extensive resection of the small intestine (SI) leads to severe short bowel syndrome (SBS). To explore a new approach for regenerative medicine for this condition, we have developed in this study a mouse model of local replacement of the colon epithelium with the SI one, by removing the colonic mucosa with chelating agents and subsequently transplanting SI organoids. We found that adult SI organoids regenerate new epithelia that morphologically preserve mature SI phenotypes even in the colonic environment after engraftment. Molecular as well as histological analyses confirmed the preservation of gene and protein expression patterns of SI epithelial cells in the ectopically grafted tissue. The results of our study suggest that the mesenchymal component of the remnant colon in SBS patients would provide a scaffold for the SI organoid transplantation, which may compensate for the loss of function of the SI in SBS patients.

研究分野：外科学一般および小児外科学関連

キーワード：腸オルガノイド 腸上皮幹細胞 腸管不全 再生医療 オルガノイド移植

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

消化吸収に関わる分子異常を呈する遺伝性疾患、あるいは種々の要因により広汎な小腸切除を余儀なくされた結果の短腸症候群では、長期にわたる小腸機能不全がQOLの低下と生存期間短縮を引き起こす。本研究開始時点において、小腸移植治療は十分確立した根本的治療法とはいえない状況にあり、新規治療開発が切望されていたが、その状況は2021年現在においても変わりはない。

研究代表者は、本研究開始以前に、正常なマウス大腸上皮を長期培養する独自の技術を確認し、得られた培養細胞の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)。またこの移植技術を応用した海外のグループとの共同研究で、胎生期小腸上皮由来の培養細胞移植でも大腸組織再生が可能であることを報告した(Cell Stem Cell 2013)。さらにその後新しい大腸粘膜傷害モデルマウスを作成し、これをレシピエントとする移植実験で、成体小腸上皮由来の培養細胞も大腸組織へ移植可能であることを示した。その結果、培養小腸細胞が個体内で上皮組織を構築可能であるだけでなく、胎児小腸上皮とは大きく異なり、成体小腸細胞が異所において長期にわたり小腸形質を維持することを見いだした(Genes Dev 2014)。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とともに、成体小腸上皮幹細胞移植によって、解剖学的大腸の一部に小腸機能を賦与できる可能性を示唆する重要なものと考えられたものの、さらなる技術開発と検証が必要とされる状況にあった。

### 2. 研究の目的

上記を背景とし、体外培養で増やす小腸上皮幹細胞を大腸へ異所性に移植し、これにより欠失した小腸機能補完を試みる新しい考えに基づいて、本研究では『大腸上皮を人為的に剥離し小腸上皮へ置換する技術開発を図ること』を目的とした。具体的には

- (1) 生きたままのマウスにおいて、近位・中位・遠位など任意の大腸領域の上皮を安全に剥離し、ここへ小腸上皮を移植生着させる技術を開発し、
- (2) 大腸内小腸移植片における分子発現とその機能の詳細な解析をおこない、
- (3) 大腸上皮小腸化による小腸機能補完の可能性を動物個体レベルで検証することを目的とした。

上記目的を掲げる本研究では、小腸上皮が大腸の異なる部位におかれた際に、小腸としての性質をいかに保持するか、逆に異所環境でいかなる分子群の発現を変容させるかを明らかにすることができる。これにより、小腸固有の形質を保持するための上皮内因性プログラムと、頭尾軸上の部位ごとに異なる環境因子との両方で調節をうける腸上皮機能の理解が進むことが期待されると考えた。また、異なる大腸部位への小腸移植片解析の成果は、例えば栄養素や薬物の吸収などの小腸固有の機能が、距離の離れた遠位大腸においても機能するのか、あるいは解剖学的に小腸近傍にある近位部大腸においてのみ機能するのかなど、これまでの研究アプローチでは得られなかった情報を提供するものと考えた。さらに、限局的に大腸に生着させる小腸上皮が欠損小腸機能を補完しうる可能性の検証は、ヒト腸管不全の病態に対し、小腸上皮が機能すべき「場」を大腸という異なる臓器の一部で補い治療するという、新しいコンセプトの治療技術基盤となる可能性をもつものと考えた。

### 3. 研究の方法

大きく3つの項目につき、以下の方法で研究を進めた

#### (1) マウス大腸上皮剥離と小腸上皮移植技術の開発

マウスを深麻酔下で開腹し、任意の部位で一定腸の大腸内腔操作を可能とする手術技術開発を図るとともに、その最適化を目指した。また、挿入したチューブを通して一期的に小腸上皮オルガノイドを注入して移植する技術開発も進めた。さらに、術後マウスが長期にわたり生存し、観察・評価可能となるプロトコル確立を図った。

#### (2) 大腸内小腸移植片の性状解析

1)の方法で大腸に異所性に移植生着させた小腸上皮移植片を詳細に解析した。このために、移植片の免疫染色、in situ hybridization、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションとこれに続くマイクロアレイ解析などにより、移植片内上皮細胞の発現分子解析とその移植部位による変化の詳細を明らかにした。

#### (3) 大腸上皮小腸化による小腸機能補完機能の検証

成体マウス遠位小腸を盲腸とを広汎に一括切除し端々吻合することで、重篤な短腸症候群モデルを作成した。これに大腸への小腸移植を組合せ、臨床所見の観察および解析をおこなった。

#### 4. 研究成果

3年の研究期間において以下の成果を得た。

##### (1) マウス大腸上皮剥離と小腸上皮移植技術の開発

マウス大腸の近位、遠位など任意の部位で大腸管腔側の粘膜表層にキレート剤を作用させて上皮を解離し、ここへ培養細胞を生着させうる大腸上皮置換技術を再現性の高い安定した技術として確立した。全身麻酔下にマウスを開腹し、大腸内腔操作用チューブを2カ所で挿入し、致死的とならずに大腸上皮解離をおこなう技術を開発した。このために、低分子キレート化合物であるEDTAを注入し、大腸上皮組織を一定時間これに暴露した。キレート剤を吸引回収後、処置大腸内腔を液体灌流することにより、上皮層のみが剥離できる条件の詳細を安定化させることが可能となった。本大腸上皮剥離処置後、別に用意しておいた小腸オルガノイドを注入し、上皮解離部への移植を行う手技も確立した。

続いてチューブ挿入部を閉鎖し閉腹した後、抗生物質投与などの動物術後管理を工夫し、本手術後のマウスが長期にわたり生存し、観察・評価可能となるプロトコルを確立した。また、本法により上皮解離をおこなった大腸組織が、より広大な面積で移植細胞生着を許容する条件も確立した。さらに本法を用いて、近位・中位・遠位など、異なる小腸に由来するオルガノイドを移植させることが可能となった。

##### (2) 大腸内小腸移植片の性状解析

(1)の方法で大腸に異所性に移植生着させた小腸上皮移植片を詳細に解析した。その結果、EGFP(enhanced green fluorescent protein)など蛍光タンパク発現により識別できる成体マウスの小腸組織に由来する細胞を移植した際には、移植片内上皮細胞に見られる分子発現パターンはこれが由来する小腸組織のものと同様になることが明らかになった。すなわち、移植された小腸上皮細胞は、大腸という異所にあってもアミノ酸、胆汁酸、ビタミンなどの栄養素吸収に関わるトランスポーター分子群、あるいは小腸に特異的な分化細胞種として知られるパネート細胞に発現する分子群を有意に高く発現することが示された。一方、大腸上皮に発現が高いことが知られるCA2(carbonic anhydrase 2)などの分子群は、移植生着後の小腸上皮細胞では低発現のままにとどまることなども明らかとなった。

さらに、近位小腸・遠位小腸など、小腸の中でも部位別に採取した小腸上皮細胞を大腸へ移植し、移植片の形態や分子発現を解析する実験をおこなった。その結果、小腸上皮が移植生着後にも、これら小腸内の部位依存性分子発現パターンを広く維持することの詳細も明らかとなった。一方で、移植生着した小腸由来上皮においては、異所環境に応じて発現を変動させる遺伝子群も一定数存在することが明らかとなり、オントロジー解析などから、小腸上皮細胞で発現する遺伝子群においては、小腸固有性を維持するためにhard-wiredな発現制御を受ける分子とplasticな制御を供する分子が混在する可能性が示唆された。

##### (3) 大腸上皮小腸化による小腸機能補完機能の検証

成体マウスの広範囲遠位小腸と盲腸を切除する短腸症候群モデルを作成し、この大腸上皮を一部小腸上皮移植で置換したマウスモデルを作成し解析した。現時点において、大腸上皮小腸移植群と対照群において、生存率、体重変化、および小腸における栄養吸収機能に関し、有意な差を示すデータは得られていないが、移植片内小腸上皮におけるアダプテーション反応が見られることなど、新しい知見も得られつつある。また本結果を受けて、大腸上皮組織置換による小腸機能補完を確認することを目的とし、体サイズの大きなラットへの技術移行にも着手した。ラットでの研究が進むことにより、本技術と小腸切除による腸管不全モデルを組み合わせたことが可能となり、新規の小腸機能再生医療技術開発につながるものと考えている。

なお、上記1)-3)の研究過程において、生きたままのマウス大腸上皮を剥離する実際の操作を今後臨床応用して実用化するには、より安全なキレート化合物開発が必要であることが新たな課題として顕在化した。これを受け、腸管内腔に注入した場合に、EDTAよりも吸収されにくく安全性の高い高分子キレート剤で、しかも上皮剥離作用を保持する化合物開発に着手した。その結果、考案した候補化合物を合成し、さらにそのキレート作用とマウスにおける安全性を検証することができた。本成果は企業との特許共同出願にまで至った。

研究代表者と分担者は、2019年度より研究機関を変えたが、動物実験を含むさまざまな研究活動をスムーズに展開することができた。また、本研究の最終年度である2020年度においては、複数の国内学会でこれら成果の公表も積極的におこなった。今後の本研究の進展により、重篤な腸管不全に対し、経口摂取した栄養を生理的状況に近い残存大腸で吸収可能とする新しい治療開発が期待できるものと考えている。数センチメートルでもより長い残存小腸を確保するため多大な実験的・臨床的努力が払われてきた短腸症候群、機能欠損による単一栄養素吸収障害が生涯にわたり問題となるヒト小腸疾患群に対し、本研究で提案する技術は、既存の大腸組織を足場として利用することにより、血流確保術を必要とせず広大な小腸粘膜を再生できる可能性を有する点において独創的なものであり、今後も引き続き研究を継続していきたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Watanabe S, Nishimura R, Shirasaki T, Katsukura N, Hibiya S, Kirimura S, Negi M, Okamoto R, Matsumoto Y, Nakamura T, Watanabe M, Tsuchiya K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Schlafen 11 is a novel target for mucosal regeneration in Ulcerative Colitis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Crohns Colitis. 2021	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) 10.1093/ecco-jcc/jjab032.	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 Morikawa R, Nemoto Y, Yonemoto Y, Tanaka S, Takei Y, Oshima S, Nagaishi T, Tsuchiya K, Nozaki K, Mizutani T, Nakamura T, Watanabe M, Okamoto R.	4. 巻 11
2. 論文標題 Intraepithelial lymphocytes suppress the intestinal tumor growth by cell-to-cell contact via CD103/E-cadherin signal.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2021	6. 最初と最後の頁 1483 ~ 1503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2021.01.014.	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 Aonuma E, Tamura A, Matsuda H, Asakawa T, Sakamaki Y, Otsubo K, Nibe Y, Onizawa M, Nemoto Y, Nagaishi T, Tsuchiya K, Nakamura T, Uo M, Watanabe M, Okamoto R, Oshima S.	4. 巻 542
2. 論文標題 Nickel ions attenuate autophagy flux and induce transglutaminase 2 (TG2) mediated post-translational modification of SQSTM1/p62.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun. 2021 Jan 19;542:17-23.	6. 最初と最後の頁 17 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.01.023.	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 Otsubo Kana, Maeyashiki Chiaki, Nibe Yoichi, Tamura Akiko, Aonuma Emi, Matsuda Hiroki, Kobayashi Masanori, Onizawa Michio, Nemoto Yasuhiro, Nagaishi Takashi, Okamoto Ryuichi, Tsuchiya Kiichiro, Nakamura Tetsuya, Torii Satoru, Itakura Eisuke, Watanabe Mamoru, Oshima Shigeru	4. 巻 594
2. 論文標題 Receptor Interacting Protein Kinase 3 (RIPK3) inhibits autophagic flux during necroptosis in intestinal epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1586 ~ 1595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13748	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 Takei Yuria, Nemoto Yasuhiro, Morikawa Ryo, Tanaka Shohei, Oshima Shigeru, Nagaishi Takashi, Okamoto Ryuichi, Tsuchiya Kiichiro, Nakamura Tetsuya, Watanabe Mamoru	4. 巻 523
2. 論文標題 CD8 + T cells show amoeboid shape and frequent morphological change in?vitro, and localize to small intestinal intraepithelial region in?vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 328 ~ 335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.12.021	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 Tanaka Shohei, Nemoto Yasuhiro, Takei Yuria, Morikawa Ryo, Oshima Shigeru, Nagaishi Takashi, Okamoto Ryuichi, Tsuchiya Kiichiro, Nakamura Tetsuya, Stutte Susanne, Watanabe Mamoru	4. 巻 522
2. 論文標題 High-fat diet-derived free fatty acids impair the intestinal immune system and increase sensitivity to intestinal epithelial damage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 971 ~ 977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.158	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 Nishimura R, Shirasaki T, Tsuchiya K, Miyake Y, Watanabe Y, Hibiya S, Watanabe S, Nakamura T, Watanabe M	4. 巻 54
2. 論文標題 Establishment of a system to evaluate the therapeutic effect and the dynamics of an investigational drug on ulcerative colitis using human colonic organoids.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 608 ~ 620
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 Watanabe Sho, Tsuchiya Kiichiro, Nishimura Ryu, Shirasaki Tomoaki, Katsukura Nobuhiro, Hibiya Shuji, Okamoto Ryuichi, Nakamura Tetsuya, Watanabe Mamoru	4. 巻 17
2. 論文標題 TP53 Mutation by CRISPR System Enhances the Malignant Potential of Colon Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1459 ~ 1467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-18-1195	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 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	4. 巻 53
2. 論文標題 Single cell analysis of Crohn's disease patient-derived small intestinal organoids reveals disease activity-dependent modification of stem cell properties	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1035 ~ 1047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-018-1437-3	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 Nakamura Tetsuya	4. 巻 31
2. 論文標題 Recent progress in organoid culture to model intestinal epithelial barrier functions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 13 ~ 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy065	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 Kawamoto Ami, Nagata Sayaka, Anzai Sho, Takahashi Junichi, Kawai Mao, Hama Minami, Nogawa Daichi, Yamamoto Kouhei, Kuno Reiko, Suzuki Kohei, Shimizu Hiromichi, Hiraguri Yui, Yui Shiro, Oshima Shigeru, Tsuchiya Kiichiro, Nakamura Tetsuya, Ohtsuka Kazuo, Kitagawa Masanobu, Okamoto Ryuichi, Watanabe Mamoru	4. 巻 13
2. 論文標題 Ubiquitin D is Upregulated by Synergy of Notch Signalling and TNF- in the Inflamed Intestinal Epithelia of IBD Patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Crohn's and Colitis	6. 最初と最後の頁 495 ~ 509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ecco-jcc/jjy180	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中村哲也
2. 発表標題 オルガノイド 小児外科分野における可能性
3. 学会等名 第57回日本小児外科学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本有加、山高篤行、中村哲也
2. 発表標題 小腸オルガノイド移植による大腸上皮置換技術を用いた小腸機能不全治療の開発
3. 学会等名 第57回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木啓介、古村眞、古村浩子、鈴木完、藤代準、松本有加、中村哲也、中山泰秀
2. 発表標題 小腸再生を目指した小腸上皮オルガノイドのbiotubeへの接着の研究
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本有加、野田幸子、渡辺守、服部信孝、山高篤行、中村哲也
2. 発表標題 大腸への小腸上皮オルガノイド移植による腸管不全治療技術開発
3. 学会等名 第120回日本外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木啓介、古村眞、古村浩子、鈴木完、藤代準、松本有加、中村哲也、中山泰秀
2. 発表標題 小腸再生を目指した小腸上皮オルガノイドのbiotubeへの接着の研究
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本 有加、平田 潤、東 貴大、野田 幸子、服部 信孝、岡田 随像、山高 篤行、中村 哲也
2. 発表標題 オルガノイド移植による大腸上皮置換術の確立と移植上皮の網羅的遺伝子発現解析
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 哲也
2. 発表標題 オルガノイド移植による未来の腸再生医療
3. 学会等名 第31回小腸移植研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 化合物、組成物、生体組織脆化剤、生体組織表面の剥離方法及び生体組織剥離キット	発明者 中村 哲也、松本 有加、村上雄太、中井 健一朗、太田のぞ	権利者 学校法人順天堂、三洋化成工業株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、2020-216704	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

#### 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
研究分担者	松本 有加  (Matsumoto Yuka)  (50813672)	順天堂大学・医学部・助教    (32620)	

#### 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
---------	---------