

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05480

研究課題名(和文) 腸管オルガノイドを用いた新しい安全性評価系の構築

研究課題名(英文) Establishment of novel safety evaluation system using enteroids

研究代表者

服部 一夫 (HATTORI, Kazuo)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：10385495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、より生体に近い系である腸管オルガノイドを用いて、デオキシニバレノール(DON)やニバレノール(NIV)の幹細胞や腸管バリア機能に対する影響を調べた。その結果、基底膜側からのDONやNIVの暴露は幹細胞に負の影響を及ぼすことを示した。また、DONは管腔側からの暴露では影響はなかったが、基底膜側からの暴露において幹細胞数や腸管バリア機能を有意に低下することを初めて示した。さらにマウスにDONを経口投与し、調製した腸管オルガノイドは、オルガノイドの形成効率や増殖が低下しており、*in vivo*での結果がオルガノイドを用いた*in vitro*系でも反映されている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、これまでに報告のなかった腸管幹細胞に対するDONやNIVの影響を明らかにした点、そしてDONに関しては管腔側からの暴露よりも基底膜側からの暴露の方が、幹細胞や腸管バリアへの影響が大きいことを明らかにした点である。これにより、DONやNIVの毒性評価をする際の有用な情報となることが考えられる。また、マウスにDONを経口投与後に作成した腸管オルガノイドは、形成効率や増殖が低下したことから、*in vivo*での現象が腸管オルガノイドを用いた*in vitro*系でも反映されていることが考えられ、腸管オルガノイドでの安全性評価が動物での評価に変わりうる系である可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of deoxynivalenol (DON) and nivalenol (NIV), which contaminate grain such as wheat, barley, and corn, on stem cells and intestinal barrier function using small intestinal organoids (enteroids), a system closer to the living body. As a result, the basolateral exposure of DON or NIV negatively affected stem cells in enteroids. We have also shown for the first time that the DON exposure from the luminal side did not largely affected, but that from the basolateral side significantly reduced the number of stem cells and intestinal barrier function in enteroids. In addition, enteroids prepared after oral administration of DON to mice showed low enteroid forming efficiency and proliferative capacity, suggesting that the *in vivo* results may be reflected in the *in vitro* system using enteroids.

研究分野：食品機能学、毒性学

キーワード：デオキシニバレノール ニバレノール 腸管オルガノイド 幹細胞 腸管バリア機能 管腔側 基底膜側 タイトジャンクション

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

腸管は、体内への栄養素や水分の吸収、粘液分泌や抗菌物質の産生による有害物質の侵入阻止、腸管内容を認識して消化液を分泌するなど、多様な機能を併せ持っている器官である。このような多様な機能は、一つの幹細胞から生じる腸管上皮細胞（吸収上皮細胞、杯細胞、内分泌細胞、パネート細胞など）により担われている。これら腸管上皮細胞のほとんどは、腸管内腔に突出した絨毛と呼ばれる部分に存在しており、パネート細胞と幹細胞は腸管内腔の凹んだ部分である陰窩（クリプト）に存在している（Fig. 1）。幹細胞は一生を通じて自己複製し続けるとともに、全ての腸管上皮細胞への分化能を持つ細胞と定義されている。しかしながら、腸管機能を *in vitro* にて解析する実験系は限られており、これまで用いられてきた Caco-2 細胞など大腸がん由来株化細胞も必ずしも生体内の腸管上皮細胞の機能を発現していない。また、腸管幹細胞の機能を探るための実験系も確立されておらず、新しい実験系が待ち望まれていた。そのような中、2009年に腸管幹細胞の三次元幹細胞培養系（オルガノイド培養系）が開発された（Sato et al. Nature 459, 262-5 (2009)）。この培養法で培養された腸管細胞は、生体内と同様に幹細胞の自己複製と全ての腸管上皮細胞の産生が可能であり、まさにミニ腸管と呼べるものである。これにより、これまで困難であった *in vitro* での腸管幹細胞実験が可能となり、種々の因子が腸管上皮細胞に与える影響を解析できる道が開かれた。

しかし、腸管オルガノイドを用いた食品成分、有害菌、毒素の影響を評価した研究は未だ少ないのが現状である。そこで、我々がこれまでに研究してきたトリコテセン系カビ毒のデオキシニバレノール（DON）およびニバレノール（NIV）に着目した。これまでに、生体を反映した適切な *in vitro* 評価系が存在しなかったことから、腸管を担う細胞の起点となる幹細胞に対して DON や NIV がどのような影響を及ぼすのかは未だ明らかになっていない。また、DON などがタイトジャンクションに影響を及ぼし、透過性を変化させることは知られている（Pinton and Oswald. Toxins 6, 1615-43 (2014)）が、腸管オルガノイドでの報告はない。そこで本研究では、ミニ腸管とも言われる腸管オルガノイドを用いることにより、より生体に近い系で幹細胞や腸管バリア機能に対する DON や NIV の影響を評価できるのではないかと考えた。また、現在の動物実験の環境は、3R（Replacement: 代替法への置換、Reduction: 使用動物数の削減、Refinement: 苦痛の軽減）が求められている。腸管オルガノイド評価系の有用性を示すことができれば、3R の問題を解消した動物に替わる新たな安全性評価系の構築につながると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、

- (1) DON や NIV が腸管の幹細胞やタイトジャンクションに対する影響を明らかにする
- (2) *in vitro* のオルガノイド評価系での結果と、DON を投与したマウスから調製した腸管オルガノイドにおける変化の結果を比較することで、腸管オルガノイドを用いた安全性評価系の有用性を検討することである。

3. 研究の方法

経口投与された DON は、腸管からも吸収されるが、胃で 88.5% が検出されたとの報告（Danicke et al. Arch Anim Nutr 58, 169-80 (2004)）があることから、胃から吸収され血液中に移行し、腸管の基底膜側から暴露することも考えられた。したがって、経口摂取した DON および NIV の暴露は、基底膜側と管腔側の両経路を考慮する必要がある。本研究では、腸管オルガノイドが独自構造（内側が管腔側、外側が基底膜側）を有するため（Fig. 2）、培地にカビ毒を添加する（基底膜側からの暴露）系とマイクロインジェクションによりカビ毒を投与する（管腔側からの暴露）系を用いて、幹細胞や腸管バリア機能への影響を調べた。さらに、DON を経口投与したマウスから調製した腸管オルガノイドにおける変化の結果と、*in vitro* オルガノイド系での結果を比較し、腸管オルガノイドが動物に替わりうる安全性評価系であるのかを検討する。具体的な研究方法は以下に示す。

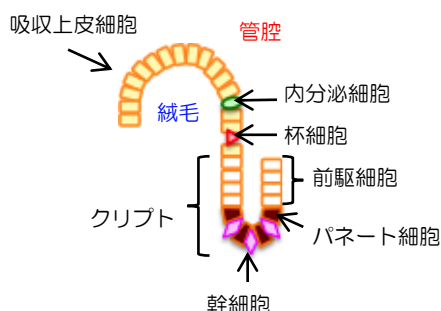


Fig. 1 小腸の構造と構成する細胞

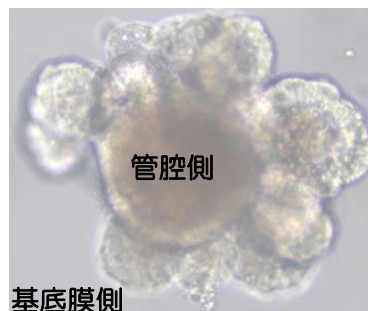


Fig. 2 腸管オルガノイドの構造

(1) 基底膜側からの DON および NIV の暴露に対する腸管オルガノイドへの影響

C57BL/6 マウスから回収した空腸のクリプトをマトリゲルに包埋し、オルガノイド培養を行った。培養から 3 日目に DON あるいは NIV を培地に添加し、24 時間後にオルガノイド自身の増殖活性 (EdU assay)、幹細胞への影響 (Lgr5-EGFP マウス (幹細胞マーカーの Lgr5 が発現する細胞が EGFP という蛍光タンパク質で標識されるマウス) から調製したオルガノイドを用いて蛍光強度の変化を測定する) を調べた。

(2) 管腔側と基底膜側からの DON の暴露に対する腸管オルガノイドへの影響の比較

(1) と同様に培養した腸管オルガノイドに、DON (1 μM) をマイクロインジェクションにて投与した。また、基底膜側からの暴露と比較するために、(1) と同様の実験系を設け、同濃度の DON を培地に添加した。その後、オルガノイド自身の増殖活性 (EdU assay)、幹細胞数への影響 (Lgr5-EGFP マウスから調製したオルガノイドを用いて幹細胞数の変化を解析する) を調べた。また、DON に暴露させた腸管オルガノイドのタイトジャンクションに関わるタンパク質の発現変化を蛍光免疫染色により解析した。さらに、バリア機能を評価するために、蛍光デキストランの流入をモニタリングした。

(3) DON を経口投与したマウスから調製した腸管オルガノイドにおける変化の解析

C57BL/6 マウスに、溶媒であるリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (コントロール (Con) 群)、あるいは 50 mg/kg body weight の DON (DON 群) を経口投与した。24 時間後、当該マウス由来の空腸オルガノイドを作製し、4 日間の培養後にオルガノイド形成効率 (4 日目のオルガノイドの数 / 0 日目のクリプト数) の変化ならびに増殖活性 (EdU assay) を調べた。以上の結果を、(2) で行った *in vitro* のオルガノイド系の結果と比較検討した。

4. 研究成果

(1) 基底膜側からの DON および NIV の暴露に対する腸管オルガノイドへの影響

腸管オルガノイドにおける細胞生存率は、DON、NIV とともに 1 μM 以上の濃度で有意に低下した。また、DON は 1 μM 以上、NIV は 0.05 μM 以上の濃度で、腸管オルガノイドの増殖活性を低下した。さらに、Lgr5-EGFP マウスから調製した腸管オルガノイドを用いて当該カビ毒を添加後、Lgr5 に由来する蛍光をタイムラプスで追跡した結果、DON (0.1 μM) で 18 h 後、NIV (0.05 μM) で 15 h 後に蛍光強度の低下が認められ、幹細胞に負の影響を及ぼすことが示唆された。

(2) 管腔側と基底膜側からの DON の暴露に対する腸管オルガノイドへの影響の比較

管腔側からの DON (1 μM , 72 h) の暴露では、ほとんど影響は認められなかったのに対し、基底膜側からの DON (1 μM , 72 h) の暴露により、タイトジャンクションなどに関連したタンパク質が崩壊し、腸管上皮の完全性が失われていた (Fig. 3)。また、蛍光デキストランを用いた流入試験の結果、腸管バリア機能の低下が認められた (Fig. 4)。

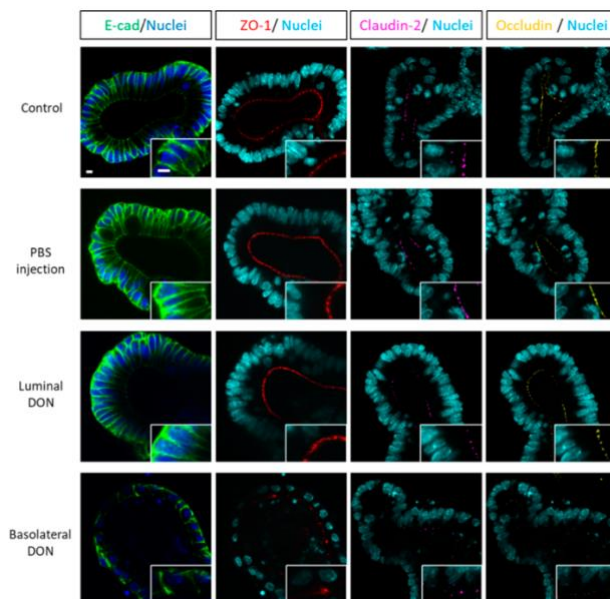


Fig. 3 管腔側あるいは基底膜側から DON を暴露させた際の腸管上皮の完全性の変化

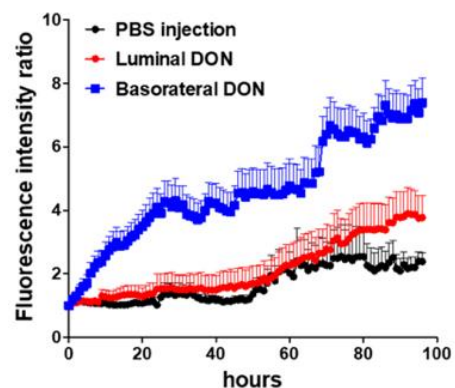


Fig. 4 管腔側あるいは基底膜側から DON を暴露させた際に流入した蛍光デキストランの蛍光強度比 (0 h に対する) の経時変化

さらに、Lgr5-EGFP マウス由来の空腸オルガノイドを管腔側あるいは基底膜側から DON (1 μ M, 24 h) に暴露させた後、Lgr5 に由来する蛍光をモニタリングした。その結果、基底膜側からの暴露後に、蛍光の減弱が認められた (Fig. 5)。また、0 時間目と 24 時間後の幹細胞数を測定し、その割合を求めたところ、基底膜側からの暴露により有意な減少が認められた (Fig. 6)。加えて、基底膜側からの暴露により、腸管オルガノイドの増殖活性も有意に低下した (Fig. 7)。

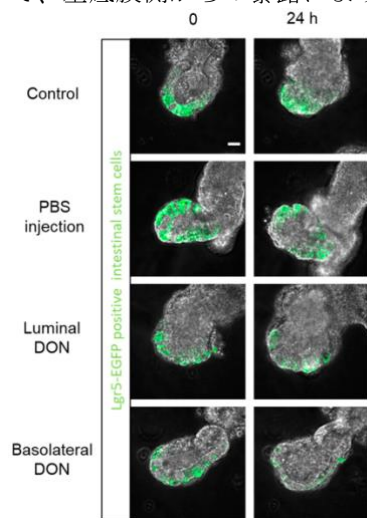


Fig. 5 管腔側あるいは基底膜側から DON を暴露させた際の Lgr5 由来の蛍光の変化

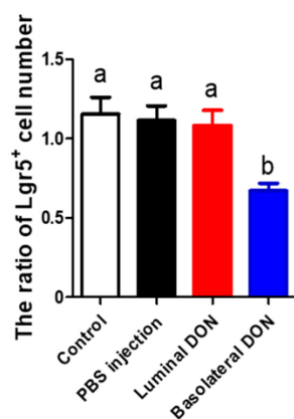


Fig. 6 管腔側あるいは基底膜側から DON を暴露させた際の幹細胞数の割合 (24h 後/0 h 後) の変化

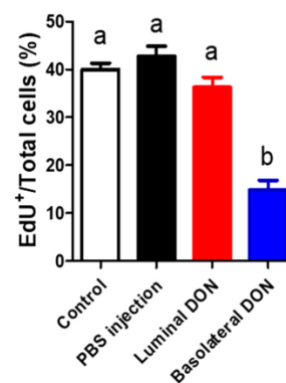


Fig. 7 管腔側あるいは基底膜側から DON を暴露させた (24 h 後) 腸管オルガノイド中の増殖細胞の割合

以上の結果から、なぜ基底膜側からの暴露の影響が大きいのかという理由を探るため、RNA-sequence 解析を行った。その結果、発現変動遺伝子 (DEGs) のヒートマップが明確に異なっており、変動した発現変動遺伝子の数も多かった。さらに、DAVID を用いたエンリッチメント解析の結果、Focal adhesion pathway が最も変動が大きかった。

(3) DON を経口投与したマウスから調製した腸管オルガノイドにおける変化の解析

DON を経口投与したマウスから調製した腸管オルガノイドは、4 日後に成長が低下しているように観察された (Fig. 8)。そこでオルガノイド形成効率を求めた結果、Con 群よりも DON 群において有意に低下していた (Fig. 9)。また、4 日目の増殖応答を EdU assay により調べた結果、Con 群よりも DON 群において有意に低下していた (Fig. 10)。この結果を、(2) で得られた in vitro オルガノイドでの結果と比較した。その結果、基底膜側からの暴露で認められた幹細胞数の減少や増殖活性の低下という結果と、今回の結果が一致していた。DON は胃や十二指腸で多く吸収されるという報告 (Dänicke et al. Arch Anim Nutr 58, 169-80 (2004)) があることを踏まえると、今回、経口投与した DON は、管腔側からの暴露よりも、吸収後に血液を介して基底膜側から暴露した可能性が高く、DON を経口投与した際に生じた現象が腸管オルガノイドを用いた in vitro 系でも反映されていたと考えられた。以上より、腸管オルガノイドを用いた安全性評価系の有用性が部分的に示唆された。

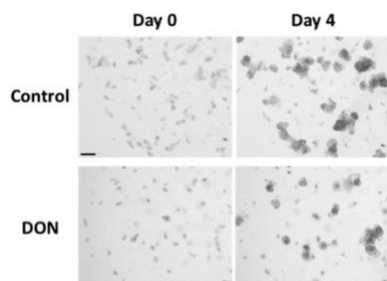


Fig. 8 DON を経口投与したマウスの空腸より調製したオルガノイドの変化

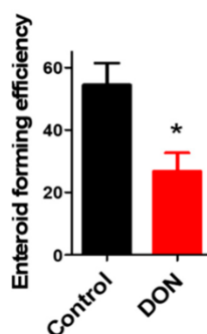


Fig. 9 DON を経口投与したマウスの空腸より調製したオルガノイドの形成効率

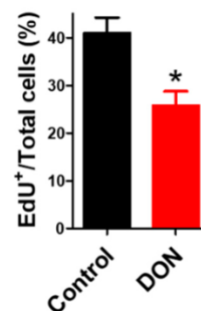


Fig. 10 DON を経口投与したマウスの空腸より調製したオルガノイド中の増殖細胞の割合

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato Mika, Inaba Akihiko, Iwatsuki Ken, Saito Yuki, Tadaishi Miki, Shimizu Makoto, Kobayashi-Hattori Kazuo	4. 巻 84
2. 論文標題 Identification of Reg3 ⁻ -producing cells using IL-22-stimulated enteroids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 594 ~ 597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1695575	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 Hanyu Hikaru, Yokoi Yuki, Nakamura Kiminori, Ayabe Tokiyoshi, Tanaka Keisuke, Uno Kinuko, Miyajima Katsuhiko, Saito Yuki, Iwatsuki Ken, Shimizu Makoto, Tadaishi Miki, Kobayashi-Hattori Kazuo	4. 巻 12
2. 論文標題 Mycotoxin Deoxynivalenol Has Different Impacts on Intestinal Barrier and Stem Cells by Its Route of Exposure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins12100610	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 Saito Yuki, Iwatsuki Ken, Inaba Akihiko, Sato Mika, Tadaishi Miki, Shimizu Makoto, Kobayashi-Hattori Kazuo	4. 巻 72
2. 論文標題 Interleukin-4 suppresses the proliferation and alters the gene expression in enteroids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 479 ~ 488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10616-020-00395-7	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 羽生ひかる、大塚琴絵、佐藤みちる、岩槻 健、齋藤由季、只石 幹、清水 誠、服部一夫
2. 発表標題 小腸オルガノイドを用いたデオキシニバレノールの新規評価系の確立
3. 学会等名 日本マイコトキシン学会 第84回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 羽生 ひかる、岩槻 健、齋藤 由季、輿石 沙織、丹野 星亜、只石 幹、清水 誠、服部 一夫
2. 発表標題 小腸オルガノイドを利用したデオキシニパレノールの影響評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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

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