

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03455

研究課題名（和文）炎症性腸疾患の腸管上皮再生過程における大腸幹細胞ニッチの分子基盤の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of the colonic stem cell niche during intestinal epithelial regeneration in inflammatory bowel disease.

研究代表者

佐々木 伸雄（Sasaki, Nobuo）

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：30777769

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：大腸上皮は優れた再生能力を有しており、通常は炎症などの障害を受けたとしても、Lgr5+幹細胞を始め、休止期幹細胞の再活性化や分化細胞の脱分化などの様々なイベントを開始させることで上皮再生を促す。しかし、炎症性腸疾患の患者の腸管上皮ではこの修復機能が障害されているが、その実体は未だ不明である。我々は、障害によって破壊された幹細胞微小環境の再生過程を遺伝子改変マウスとオルガノイドの両システムを用いて、腸管上皮幹細胞のニッチ細胞が再生起点細胞であることを見出した。本研究成果により、炎症障害を受けた大腸上皮細胞における再生起点細胞の同定は、炎症性腸疾患の新規治療標的細胞になることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患は難治性疾患の一つであり、一旦寛解しても完治せずに再燃する罹病期間が長期になることが知られている。これまでも治療薬としてステロイドや免疫調節薬などがあるが、その全てが効果があるわけではない。そこで本研究では炎症障害を受けた腸管上皮細胞の再生メカニズムの分子基盤を明らかにすることで、新しい治療法の開発を目指してきた。本課題研究では、炎症によってダメージを受けた腸管上皮幹細胞の微小環境が再生過程の起点になることを新たに見出した。今後は、この幹細胞微小環境を標的とした粘膜再生治療が炎症性腸疾患の画期的な治療法になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The colonic epithelium has the excellent regenerative capacity. Even though it is usually damaged by inflammation, it initiates various events such as reactivation of Lgr5+stem cells, quiescent stem cells, and plasticity that promote epithelial regeneration. This repair function is impaired in the intestinal epithelium of patients with inflammatory bowel disease, but the nature of this impairment remains unclear. Using both genetically modified mouse model and organoid systems, we found that epithelial niche cells of intestine are the starting cells for regenerating microenvironment disrupted by injury. Those results will identify the regenerative origin cells in inflammation impaired colonic epithelial cells, which are expected to become novel therapeutic target cells for inflammatory bowel disease.

研究分野：幹細胞学

キーワード：オルガノイド 組織幹細胞 潰瘍性大腸炎 幹細胞ニッチ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

潰瘍大腸炎 (Ulcerative colitis : UC) は日本国内でも患者数が年々増加傾向にあり、早急な対応が求められている疾患の1つである。UC患者の粘膜上皮は慢性的に炎症障害を受けており、そこからの再生が不十分であるため、粘膜バリアーとしての機能が発揮できず、持続した粘膜免疫制御異常を誘発すると考えられている。近年の臨床研究により、上皮再生の指標である粘膜治癒が患者再燃のリスクと大きく相関していることが分かり、腸管上皮の再生コントロールは本疾患において極めて重要な因子であることが認知されるようになった。また、成体腸管上皮の幹細胞が同定されたことから、腸管上皮の恒常性維持機構の理解が一気に深まり、腸管上皮幹細胞やニッチ細胞など幹細胞微小環境を標的とした粘膜再生治療が、UCの新しい治療法として大きな注目が集められている。

通常腸管上皮細胞は、腸管陰窩基底部に存在する Lgr5 陽性(+)幹細胞による永続的な上皮細胞の供給によって恒常性が保たれている。そのため、慢性炎症による粘膜再生障害は、Lgr5+幹細胞の機能異常に起因している可能性が考えられる。実際に、炎症後の再生過程において Lgr5+幹細胞は再活性化することが知られているが、“この炎症障害を受けた幹細胞は、正常な幹細胞に比べ細胞分裂の速度が低下する”ことも明らかにされた。したがって、この腸管幹細胞の増殖能の低下が粘膜上皮の再生の不十分性の原因となり、UC発症につながると予測されるが、具体的な『炎症障害を受けた腸管幹細胞の分裂速度が低下する理由』や『疾患発症との関連性を説明するための分子メカニズム』については依然不明なままである。

2. 研究の目的

本課題研究は、遺伝子改変マウスやオルガノイド培養技術を利用してUCの新規治療標的細胞の同定を目指すことを目的としている。粘膜上皮は腸管陰窩底部に存在する Lgr5+腸管上皮幹細胞によって永続的に供給されている。UC患者における腸管上皮幹細胞は、慢性炎症により障害を受けているため、再生過程が不十分になり発症すると考えられているが、その詳細は未だ不明である。そこで我々の研究グループは、腸管上皮幹細胞やその微小環境(ニッチ)を人為的に操作可能な遺伝子改変マウスや、ヒトUC患者由来の腸管オルガノイドを組み合わせながら、従来の基礎研究とは一線を画す疾患生物学を推進する。その中で本研究課題では粘膜上皮細胞の恒常性維持に重要な機能を果たすニッチ細胞に着目し、粘膜再生過程における幹細胞ニッチシグナルの分子基盤を解明することでUCの新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究は上記の学術的背景を基に、腸管上皮幹細胞ニッチの異常がUC発症の原因となる科学的検証を行い、研究期間内に達成を見込む以下の3つの課題を基に、新規治療法開発に向けた基盤研究の確立を戦略的に目指した。

(1) 炎症による幹細胞微小環境障害とUC病態の関連性の検証

本研究では、既にマウス実験系においてUCモデルとして確立されているデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導性腸炎モデルを選択した。これまでの研究の多くは、炎症障害を受けた直後の腸管上皮を観察するものであり、再生途中過程の上皮組織の動態についてはブラックボックスなままであった。そこで、我々はDSSで誘導された腸炎マウスの回復期における腸管上皮の形態や構成する腸管上皮細胞マーカー(幹細胞、ニッチ細胞、杯細胞)遺伝子の発現を免疫化学染色法やin situ hybridization法を用いて観察した。

(2) 炎症障害をうけた幹細胞微小環境の再生に重要な分子基盤の理解

腸管上皮細胞の再生過程における腸管上皮幹細胞の機能を解析するために、腸管上皮幹細胞(Lgr5-DTR)、またはニッチ細胞(Reg4-DTR)を時期特異的に除去できる遺伝子改変マウスを用いて(1)と同様のマウス大腸上皮細胞障害試験を行った。再生過程の様々な時期において幹細胞やニッチ細胞を取り除くことで、炎症障害から上皮組織を回復させるために必要な細胞、またはその機能の理解を図った。また再生過程の腸管上皮を回収し、RNA-seqを実施することで再生過程

における上皮細胞の遺伝子発現変動を時系列的に検証，評価した。

(3) ヒト疾患オルガノイド培養を用いた機能性低分子化合物のスクリーニング

炎症障害を受けた大腸上皮の再生過程における幹細胞，ならびにニッチ細胞の機能を詳細に観察するために，本研究では *ex vivo* モデルであるオルガノイドを用いた。マウス大腸から大腸上皮オルガノイドを樹立し，疑似腸炎モデルを作成することで，シャーレ上での炎症障害からの回復過程の遺伝子発現パターンなどを詳細に確認した。また，これまでの古典的なヒト大腸オルガノイド培地の適正化を図ることで，ヒト UC 患者からのオルガノイド樹立法の確立を試みた。樹立された UC 患者オルガノイドを利用して，腸炎病態と密接な関係のある分泌型 IgA の腸管粘膜バリア輸送活性を ELISA 法により検証した。

4. 研究成果

(1) 我々の研究室では，マウスに 2%DSS を含む水を 5 日間与えることで大腸炎を誘発させ，その後通常水に変更し通常飼育を続けた。通常水に変更後，0，3，5，7，14 日後の大腸組織を回収し，組織学的解析をおこなった。その結果，回復期 5 日後までは幹細胞微小環境が乱れており，7 日後から再構築される様子が観察された。回復期 5 日後までは腸管上皮構造が異常になっていることが確認されたが，回復期 7 日後あたりから，炎症障害を受けていない（腸管陰窩構造が正常状態）部分から正常上皮細胞が供給されている様子が見られた。以上のように，我々はこれら DSS 誘導性腸管炎症モデルにおける腸管上皮が回復する過程において，腸管幹細胞やニッチ細胞の発現動態の変動パターンを *in vivo* で観察することに成功した。また，本条件においては，DSS 含有飲水を終了してから 5 日間におけるマウス大腸上皮は大腸炎の活動期にあたり，その後寛解期に入ることが分かった。また，本モデルにおいては最長 30 日間の追跡実験をおこなったが，腸炎が再燃することは見られなかった。

(2) 次に，炎症障害を受けた腸管上皮細胞の回復過程における幹細胞の役割を調べる為に，ジフテリア毒素依存的に腸管幹細胞を特異的に除去できる *Lgr5-DTR* マウスを用いて，同様の DSS 誘導性の大腸炎誘導，ならびに回復試験を実施した。この回復過程において，DSS 含有水から通常水に切り替えてから 3～7 日後（寛解導入期）までの間ジフテリア毒素を 2 日ごと注射し，さらに 14 日後の安定期において大腸組織を回収した。この寛解導入時期特異的に *Lgr5+* 幹細胞を除去すると，大腸上皮のその後の回復が極端に遅延することが明らかになった。この結果は，既報とは異なる結果であったが，我々は DSS による大腸炎誘導時期から解析までの時期を詳細に調べることで，他のグループとの差異を見出すことに成功した（図 1）。

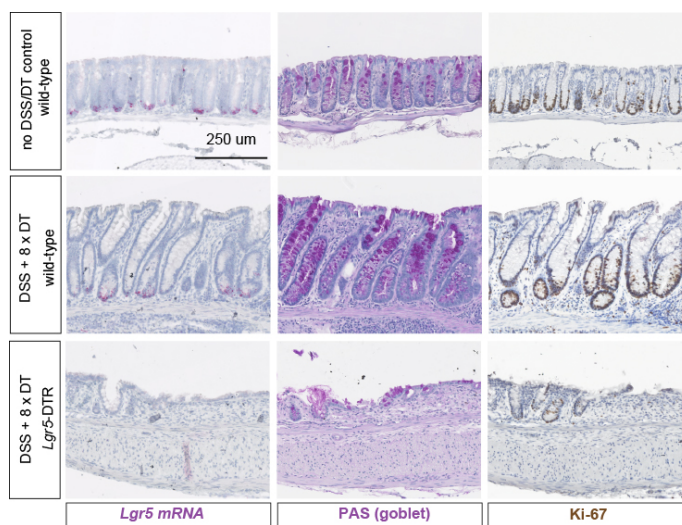


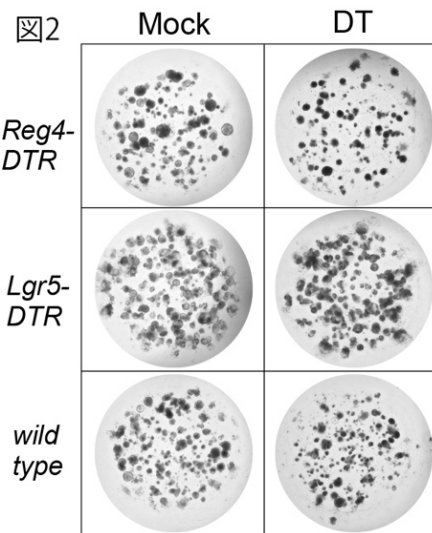
図 1 : *Lgr5-DTR* マウスを用いた DSS 腸炎実験

さらに，炎症障害を受けた腸管上皮再生には *Lgr5+* 幹細胞が重要であるという我々の作業仮説をより強固にするために，ジフテリア毒素依存的に幹細胞ニッチ細胞を除去できる *Reg4-DTR* マウスを用いて同様の試験を行った。その結果，*Lgr5-DTR* マウス同様に，DSS 含有水から通常水に交換してから 3～7 日後までの間，ジフテリア毒素を注射したマウス大腸では顕著に再生過程の遅延が観察された。以上の結果から，DSS によって誘発されたマウス大腸炎モデルにおける腸管上皮再生過程においては，*Lgr5+* 幹細胞が起点となることが示唆された。

我々は，炎症障害を受けたマウス大腸上皮の再生時に活性化，または抑制されるシグナル伝達系について網羅的に調べる為に，再生過程の様々なタイムポイントにおいて腸管上皮を回収し，RNA-seq 解析を実施した。その結果，炎症誘導期，活動期，寛解期のそれぞれにおいて顕著に活性化が見られるシグナル伝達系の炙り出しに成功した。これら異常な活性化が観察されたシグナル伝達系と腸管上皮再生過程の関係性を調べるために，シグナル伝達系の主要な構成因子のノックアウトマウスを導入した。

(3) これまでのマウス *in vivo* 試験において観察された，炎症障害とそこからの再生過程における幹細胞ダイナミクス，ならびにその幹細胞の恒常性を制御するシグナル伝達系の分子基盤を明らかにするために，野生型，*Lgr5-DTR*，*Reg4-DTR* マウスのそれぞれから大腸オルガノイドを樹立した。まず，オルガノイドを利用した *ex vivo* システム上で，疑似大腸炎誘導モデルを構

築することにした。適切な濃度の二種類のサイトカインをオルガノイド培地に添加し、この条件下で 48 時間培養すると、オルガノイドは死滅せず、しかし炎症マーカー遺伝子の発現が顕著に誘導されることが分かった。この時点で、通常のオルガノイド培地に変更し、再度培養を続けると、活性化が観察された炎症マーカー遺伝子群の発現が徐々に低下していくことが分かった。このように、我々はオルガノイドを利用し、シャーレ上においても大腸炎を再現するモデル培養系の構築に成功した。このオルガノイドにおける大腸炎モデル実験系を利用して、Lgr5+幹細胞、または Reg4+ニッチ細胞を除去すると、炎症障害をうけたオルガノイドの再増殖は抑制されることが明らかになった (図 2)。さらに、炎症誘導期から再生過程における様々なタイムポイントにおける遺伝子発現変動を詳細に調べた。その結果、時系列に沿って観察される特定のシグナル伝達系は、in vivo で観察されたシグナル伝達と一致していた。



また、研究協力者の佐藤俊朗先生 (慶應大オルガノイド医学) らは、UC 患者の検体からオルガノイドを樹立することに成功した (Nanki et al. Nature 2019)。UC 患者由来オルガノイドは、慢性炎症などの腸内環境変化に適応するために、IL-17 シグナル経路に関連した遺伝子変異を獲得するだけでなく、腸内細菌を制御する分泌型 IgA 抗体を輸送するために必須な PIGR 遺伝子にも変異が蓄積していることが分かった。そこで私は、この UC 患者由来オルガノイドと対照群として正常な大腸上皮オルガノイドを利用して、分泌型 IgA の輸送機構の評価系を作成した。通常、オルガノイド培養は細胞外基質を豊富に含んでいるハイドロゲル中で培養するため三次元構造体を作成します。しかし、私はボイデンチャンバーを利用した腸管オルガノイドの二次元培養法を開発した。ボイデンチャンバーを利用していることから、腸管上皮基底膜側 (チャンバーの下層) に分泌型の IgA を添加しておくことで、腸管上皮の頂端側 (チャンバーの上層) から IgA が検出 (ELISA kit 使用) することができた。このオルガノイド二次元培養法は、今後腸内細菌を標的とした新規 UC 患者の治療法を開発する上での非臨床試験プラットフォームとして活用されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 佐々木 伸雄, 小田 司, 佐藤 俊朗	4. 巻 75(1)
2. 論文標題 腸内細菌-宿主細胞の相互作用メカニズムを紐解く新規共培養系の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 77-81
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 無
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 Sasaki Nobuo, Miyamoto Kentaro, Maslowski Kendle M., Ohno Hiroshi, Kanai Takanori, Sato Toshiro	4. 巻 159
2. 論文標題 Development of a Scalable Coculture System for Gut Anaerobes and Human Colon Epithelium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 388 ~ 390.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2020.03.021	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 該当する

1. 著者名 Nanki K, Fujii M, Shimokawa M, Matano M, Nishikori S, Date S, Takano A, Toshimitsu K, Ohta Y, Takahashi S, Sugimoto S, Ishimaru K, Kawasaki K, Nagai Y, Ishii R, Yoshida K, Sasaki N, Sato T, et al	4. 巻 577
2. 論文標題 Somatic inflammatory gene mutations in human ulcerative colitis epithelium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 254 ~ 259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-019-1844-5	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 佐々木 伸雄	4. 巻 75
2. 論文標題 腸内細菌-宿主細胞の相互作用メカニズムを紐解く新規共培養系の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 77 ~ 81
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 無
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 Nakamoto N, Sasaki N, Aoki R, Miyamoto K, Suda W, Teratani T, Suzuki T, Koda Y, Chu P.S., Taniki N, Yamaguchi A, Kanamori M, Kamada N, Hattori M, Ashida H, Sakamoto M, Atarashi K, Narushima S, Yoshimura A, Honda K, Sato T, Kanai T	4. 巻 4
2. 論文標題 Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver T helper 17 cell immune response in primary sclerosing cholangitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Microbiology	6. 最初と最後の頁 492 ~ 503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41564-018-0333-1	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 Bolhaqueiro A.C.F., Ponsioen B., Bakker B., Klaasen S., Kucukose E., van Jaarsveld R.H., Vivie J., Verlaan-Klink I., Hami N., Spierings D.C.J., Sasaki N., Dutta D., Boj S.F., Vries R.G.J., Lansdorp P.M., van de Wetering M. van Oudenaarden A., Clevers H., Kranenburg O., Foijer F., Snippert H.J.G., Kops G J. P. L.	4. 巻 51
2. 論文標題 Ongoing chromosomal instability and karyotype evolution in human colorectal cancer organoids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 824 ~ 834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41588-019-0399-6	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 Han S, Fink J, Jorg DJ, Lee E, Yum MK, Chatzeli L, Merker SR, Josserand M, Trendafilova T, Andersson-Rolf A, Dabrowska C, Kim H, Naumann R, Lee JH, Sasaki N, Mort RL, Basak O, Clevers H, Stange DE, Philpott A, Kim JK, Simons BD, Koo BK	4. 巻 25
2. 論文標題 Defining the Identity and Dynamics of Adult Gastric Isthmus Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 342 ~ 356.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2019.07.008	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 van Es Johan H., Wiebrands Kay, Lopez-Iglesias Carmen, van de Wetering Marc, Zeinstra Laura, van den Born Maaïke, Korving Jeroen, Sasaki Nobuo, Peters Peter J., van Oudenaarden Alexander, Clevers Hans	4. 巻 116
2. 論文標題 Enteroendocrine and tuft cells support Lgr5 stem cells on Paneth cell depletion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 26599 ~ 26605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1801888117	査読の有無 無
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10件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐々木 伸雄
2. 発表標題 オルガノイドが切り拓く腸内細菌研究の新時代
3. 学会等名 第7回内分泌・代謝シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木 伸雄
2. 発表標題 オルガノイドが切り拓く腸内細菌研究
3. 学会等名 第20回生体機能研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木 伸雄
2. 発表標題 オルガノイドが切り拓く腸内細菌研究
3. 学会等名 2021年度第4回生活習慣病予防のための機能性食品開発に関する研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木 伸雄
2. 発表標題 オルガノイドが切り拓く腸内細菌研究
3. 学会等名 第一回腸内デザイン学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nobuo Sasaki
2. 発表標題 The study of epithelial crosstalk at the host-microbes interface using organoid
3. 学会等名 8th Global Network Forum on Infection and Immunity: Microbiome (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木 伸雄
2. 発表標題 Developing of the organoid system for applied researches in gut microbiota
3. 学会等名 第43回 分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nobuo Sasaki
2. 発表標題 Organoid unravels the interaction mechanism between mucosal barrier and bacteria
3. 学会等名 Keio International Symposium, The Crossroads of Intestinal Microbiology, Mucosal Immunology and Epithelial Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木 伸雄
2. 発表標題 大腸がんにおいて1細胞レベルで明らかにされた単一腫瘍内における不均一性の網羅的解析
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木 伸雄
2. 発表標題 オルガノイドが切り拓く腸内細菌研究の新時代
3. 学会等名 日本乳酸菌学会2019年度秋季セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木 伸雄，佐藤 俊朗
2. 発表標題 オルガノイドが切り拓く次世代の腸内細菌研究
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐々木 伸雄，金井 隆典，佐藤 俊朗	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 372
3. 書名 決定版 オルガノイド実験スタンダード（佐藤，武部，永楽/編）	

〔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
---------	---------