

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03634

研究課題名(和文) 大腸Label-retaining杯細胞の同定・機能解析と炎症粘膜再生への応用

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of colonic label-retaining goblet cells for the application to regeneration of the inflamed mucosa.

研究代表者

岡本 隆一 (Okamoto, Ryuichi)

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：50451935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウス近位大腸の分泌型細胞(杯細胞)で高発現する遺伝子群として37遺伝子を同定した。直腸の分泌型細胞(杯細胞)で高発現する遺伝子群としては同様にRegファミリー遺伝子等を含む70遺伝子を同定した。さらに同遺伝子発現データのGSEA解析では静止期(Quiescent期)を特徴づける遺伝子群の発現が高いことが示された。またヒト上行結腸由来オルガノイド及びヒト直腸由来オルガノイドについて、それぞれマイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析を行い、特異的遺伝子群の抽出を試みた結果、ヒト直腸由来オルガノイドで高発現を認める43遺伝子及びヒト上行結腸由来オルガノイドで高発現を認める47遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス近位大腸杯細胞を単離・同定するための複数の分子マーカー及び候補遺伝子群及びヒト近位大腸上皮に一定の発現特異性を有する遺伝子群の同定に成功しており、大腸近位に存在する杯細胞が如何なる特性・機能を有し制御・誘導され、大腸粘膜の恒常性に貢献しているのかを解明するための基盤となる知見が獲得された。また、同杯細胞に特異的な機能等を活用し異なる大腸区域に由来する「自家腸上皮オルガノイド」を移植治療に利用しながら、「大腸粘膜の区域特性変換」による炎症粘膜再生治療を開発するための基盤となる知見も併せて獲得された。

研究成果の概要(英文)：We successfully identified 37 highly expressed genes in the mice's proximal colon secretory cells (goblet cells). Also, 70 genes were identified as highly expressed genes in the mice's distal colon secretory cells (goblet cells), including Reg family genes. GSEA analysis of the gene expression profile indicated high expression of the quiescent stage genes in candidate label-retaining goblet cells. We also performed a microarray analysis of human organoids derived from the ascending colon or the rectum. From those data, we identified 43 genes preferentially expressed in the rectum-derived organoids and 47 expressed in the ascending colon-derived organoids.

研究分野：消化器内科学

キーワード：杯細胞 炎症性腸疾患 粘膜再生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国に於いて炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎・クローン病)の患者数は増加の一途であり、これに伴い生物学的製剤を含む既存治療に抵抗性の「難治」症例も増加しており、これら症例の長期寛解が得られる新規治療の開発は急務である。同疾患の治療において、活動性炎症により傷害された粘膜の構造的・機能的再生を指す「粘膜治癒」を達成することは当該患者の長期的治療が成功する為の必須条件であるが、例えば潰瘍性大腸炎患者の遠位大腸に残存する治療抵抗性潰瘍に対し、積極的に組織再生を誘導可能な治療法は未だ存在しない。研究代表者らは上記問題を解決する為、患者自身の非罹患・非活動性大腸区域に内在する幹細胞を「自家腸上皮オルガノイド」として体外で培養・増幅し、これを異なる大腸区域の治療抵抗性潰瘍に移植することで粘膜組織の機能的修復と「粘膜治癒」達成を促進する新規「オルガノイド医療」の開発に取り組んできた(Nat Med, 2012; Exp Opin Biol Ther, 2016)。しかしながら異なる大腸区域に由来する「自家腸上皮オルガノイド」を移植治療に利用することの臨床的な妥当性・有用性については、これまで基盤となる知見が得られて来なかった。研究代表者らは上記「オルガノイド医療」開発のため200例以上の患者由来腸上皮オルガノイドの培養を実施した中で、「患者近位大腸には組織再生能力の高い未知の上皮細胞分画が存在する」可能性について追求・検証を行ってきた。潰瘍性大腸炎の発症・進展に際しては「杯細胞の消失」等の杯細胞を主座とする病的変化が特徴的であり、粘液産生等の同細胞機能の破綻が大腸炎発症に直結する事等から、特に大腸区域依存的な杯細胞(機能)の不均一性に焦点を充てた解析を実施してきた。上記研究にあたり、研究代表者らはAtoh1 遺伝子依存的に任意のタイミングで大腸杯細胞を蛍光標識し系譜追跡可能なマウスを樹立し(Atoh1<sup>+</sup>-tdTomato マウス; Stem Cell Reports, 2017)、解析を実施した。同マウスより独自に得た杯細胞に関する知見から、研究代表者らは近位大腸上皮には独自の細胞傷害抵抗性・迅速な組織再生能・一体となった上皮機能を担保する機構が備わっており、「潰瘍性大腸炎が直腸から近位大腸方向に連続的に進展・波及する」という分布様式を規定しているという仮説を立てている。そこで本研究では上記仮説を検証するため、大腸近位に存在する杯細胞が如何なる特性・機能を有し制御・誘導され、大腸粘膜の恒常性に貢献しているのかを明らかにするため、計画を立案した。

### 2. 研究の目的

本研究ではウス近位大腸に局在する杯細胞を特徴付ける遺伝子マーカーの同定、幹細胞への脱分化制御機構の解明を行い、更に in vitro での分化誘導制御法の開発や生体モデルにおける組織再生機能を明らかにすることを目的とする。また遠位大腸の組織置換等による大腸炎に対する疾患抵抗性・高組織再生能獲得の有無についても追求を行うことを計画した。本研究は研究代表者らが潰瘍性大腸炎等の難治性炎症性腸疾患に対し、「腸上皮オルガノイド」を利用し「粘膜治癒」を促進し得る新規治療の開発を進める中で、独自に見出した杯細胞に関する知見に基づき大腸粘膜の区域的不均一性を示そうとする極めてユニークな試みである。また本研究を遂行することにより、研究代表者らが本来進めている新規「オルガノイド医療」の開発に際し、異なる大腸区域に由来する「自家腸上皮オルガノイド」を移植治療に利用することの前臨床的な妥当性・有用性についての知見(Proof of concept)を獲得・検証することも可能となり、世界に先駆けて炎症性腸疾患に対する腸上皮オルガノイド移植を実施し、さらなる開発・普及を図る上でも重要な意義と発展性を備えた研究計画である。実際、研究代表者らは潰瘍性大腸炎患者の上行結腸より採取した内視鏡生検組織から臨床グレードの「自家腸上皮オルガノイド」を安定して培養・増殖し出荷する技術等を整備済みであり、本研究で得られた知見・技術を細胞移植治療に直結・反映させることが容易に可能な状況にある。本研究が最終的に目指す「大腸粘膜の区域特性変換」による新治療戦略は、炎症性腸疾患の新たな病態理解と治療開発における画期的な新領域を開拓するものである。

### 3. 研究の方法

本研究はマウス杯細胞特異的遺伝子の探索・同定、ヒト近位大腸に局在する杯細胞の特殊性の同定等を主な課題に挙げ、研究計画を遂行した。このため、Atoh1<sup>+</sup>-tdTomato マウスの杯細胞を tdTomato にて標識を行った後、tdTomato<sup>+</sup>細胞を Sorting により回収しマイクロアレイ解析を行った。また免疫組織学的解析により、近位大腸・直腸における Atoh1 陽性細胞の Ki67 発現や BrdU 標識効率等を比較した。また、ヒト上行結腸由来オルガノイド及びヒト直腸由来オルガノイドについて、それぞれマイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析を行い、部位特異的な遺伝子発現について解析を実施した。さらにヒト近位大腸上皮に一定の発現特異性を有する遺伝子群について組織やオルガノイドを用いた免疫組織学的解析等を通じ杯細胞における発現差異の有無等の検討を行った。

### 4. 研究成果

計画に従い研究を実施した結果、以下の様な成果を得ている。

1) 近位大腸における分泌型細胞（杯細胞）の遺伝子発現における特徴を描出するため、Atoh1+/tdTomato レポーターマウスを用い tdTomato+細胞を Sorting により回収しマイクロアレイ解析を行った。この結果、近位大腸の分泌型細胞（杯細胞）で高発現する遺伝子群（近位/直腸の発現比が 8 倍以上）として Reg ファミリー遺伝子等を含む 37 遺伝子を同定した。一方、直腸の分泌型細胞（杯細胞）で高発現する遺伝子群（直腸/近位の発現比が 8 倍以上）としては同様に Reg ファミリー遺伝子等を含む 70 遺伝子を同定した。2) さらに同遺伝子発現データの GSEA 解析では静止期(Quiescent 期)を特徴づける遺伝子群の発現が高いことが示された。実際、免疫組織学的解析により、近位大腸における Atoh1 陽性細胞は、直腸と比較して Ki67 陽性細胞及び BrdU 陽性細胞が有意に少ないことが示された。3) 更に近位大腸に見られる Label-retaining 型杯細胞の一部は c-Kit 陽性細胞である可能性も示された。以上の結果より、マウス近位大腸の Label-retaining 型杯細胞を特徴づける複数の遺伝子発現パターンや特性が明らかとなった。一方、大腸より単離した Label-retaining 型杯細胞を含む細胞群を用いた移植系を確立するため、シングルセルを用いた際の適切な培養条件を検討したところ、Wnt シグナル経路の活性化を強化する CHIR99021 の添加等で培養効率の改善が得られること等が確認された。4) 近位大腸における分泌型細胞（杯細胞）の遺伝子発現における特徴を描出するため、ヒト上行結腸由来オルガノイド(n=8)及びヒト直腸由来オルガノイド(n=8)について、それぞれマイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析を行い、特異的遺伝子群の抽出を試みた。この結果、ヒト直腸由来オルガノイドで高発現(発現差 2 倍以上)を認める 43 遺伝子を同定した。5) 併せてヒト上行結腸由来オルガノイドで高発現(発現差 2 倍以上)を認める 47 遺伝子を同定した。6) 前記 47 遺伝子について、マルチプレックス PCR 法を用いて定量的に発現量を検証した結果、ヒト上行結腸由来オルガノイドにおける高発現遺伝子として 12 遺伝子を同定した。7) 同定した 12 遺伝子について、潰瘍性大腸炎患者由来のヒト上行結腸・直腸オルガノイドと非炎症性腸疾患患者由来の上行結腸・直腸オルガノイドを比較した結果、いずれも上行結腸由来オルガノイドにおける高発現パターンは再現された。以上の結果より、ヒト近位大腸上皮に一定の発現特異性を有する遺伝子群の同定に成功したため組織やオルガノイドを用いた免疫組織学的解析等を通じ杯細胞における発現差異の有無等の検討を行った。この結果、1) 4 つの遺伝子について患者由来大腸上皮オルガノイドにおける発現を確認した。2) 各遺伝子について、通常のオルガノイド培養環境において、杯細胞を含むヒト大腸上皮に発現し得ることが確認された。3) 一方、同条件で患者由来大腸組織を用いて検討を行った場合には、蛍光免疫染色法で発現を確認することは困難であった。以上の結果より、ヒト近位・遠位大腸上皮に一定の発現特異性を有する遺伝子群の同定・選定に成功する一方、同遺伝子に由来する蛋白の杯細胞を含む大腸上皮における発現については、大腸上皮オルガノイドの培養環境(増殖因子・細胞外マトリックス等)に依存した発現調節機構が関与している可能性が示された。同機構の同定や杯細胞分化との関わりに関する詳細の解明等が今後継続して取り組むべき研究課題の一つと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tsuchiya Mao, Ito Go, Hama Minami, Nagata Sayaka, Kawamoto Ami, Suzuki Kohei, Shimizu Hiromichi, Anzai Sho, Takahashi Junichi, Kuno Reiko, Takeoka Sayaka, Hiraguri Yui, Sugihara Hady Yuki, Mizutani Tomohiro, Yui Shiro, Oshima Shigeru, Tsuchiya Kiichiro, Watanabe Mamoru, Okamoto Ryuichi	4. 巻 542
2. 論文標題 Functional analysis of isoflavones using patient-derived human colonic organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 40~47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.01.021	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 Kuno Reiko, Ito Go, Kawamoto Ami, Hiraguri Yui, Sugihara Hady Yuki, Takeoka Sayaka, Nagata Sayaka, Takahashi Junichi, Tsuchiya Mao, Anzai Sho, Mizutani Tomohiro, Shimizu Hiromichi, Yui Shiro, Oshima Shigeru, Tsuchiya Kiichiro, Watanabe Mamoru, Okamoto Ryuichi	4. 巻 25
2. 論文標題 Notch and TNF- signaling promote cytoplasmic accumulation of OLFM4 in intestinal epithelium cells and exhibit a cell protective role in the inflamed mucosa of IBD patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100906~100906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100906	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 Yuria Takei, Yasuhiro Nemoto, Ryo Morikawa, Shohei Tanaka, Shigeru Oshima, Takashi Nagaishi, Ryuichi Okamoto, Kiichiro Tsuchiya, Tetsuya Nakamura, Mamoru Watanabe	4. 巻 523
2. 論文標題 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 Biochem. Biophys. Res. Commun.	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ryuichi Okamoto, Hiromichi Shimizu, Kohei Suzuki, Ami Kawamoto, Junichi Takahashi, Mao Kawai, Sayaka Nagata, Yui Hiraguri, Sayaka Takeoka, Hady Yuki Sugihara, Shiro Yui, Mamoru Watanabe	4. 巻 13
2. 論文標題 Organoid-based regenerative medicine for inflammatory bowel disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regen Ther	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.11.004	査読の有無 無
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 Shohei Tanaka, Yasuhiro Nemoto, Yuria Takei, Ryo Morikawa, Shigeru Oshima, Takashi Nagaishi, Ryuichi Okamoto, Kiichiro Tsuchiya, Tetsuya Nakamura, Susanne Stutte, Mamoru Watanabe	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 Biochem. Biophys. Res. Commun.	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sho Watanabe, Kiichiro Tsuchiya, Ryu Nishimura, Tomoaki Shirasaki, Nobuhiro Katsukura, Shuji Hibiya, Ryuichi Okamoto, Tetsuya Nakamura, Mamoru Watanabe	4. 巻 17
2. 論文標題 Mutation by CRISPR System Enhances the Malignant Potential of Colon Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol. Cancer Res.	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiromichi Shimizu, Kohei Suzuki, Mamoru Watanabe, Ryuichi Okamoto	4. 巻 17
2. 論文標題 Stem cell-based therapy for inflammatory bowel disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intest Res	6. 最初と最後の頁 311-316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5217/ir.2019.00043	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 岡本隆一
2. 発表標題 【Keynote lecture】腸上皮オルガノイドを用いた再生医療の開発
3. 学会等名 ヒューマン・オルガノイド技術の最前線2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本隆一、清水寛路、渡辺 守
2. 発表標題 【消化器疾患と再生医療】炎症性腸疾患に対する再生医療の開発
3. 学会等名 JDDW2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuji Hibiya, Kiichiro Tsuchiya, Ryu Nishimura, Sho Watanabe, Nobuhiro Katsukura, Tomoaki Shirasaki, Ryuichi Okamoto, Mamoru Watanabe
2. 発表標題 Establishment of chronic inflammation model using human small intestinal and colonic organoids
3. 学会等名 UEG Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川井麻央、河本亜美、永田紗矢香、安齋 翔、高橋純一、久野玲子、平栗優衣、鈴木康平、清水寛路、油井史郎、岡本隆一、渡辺 守
2. 発表標題 患者由来腸上皮オルガノイドを用いたイソフラボン類による腸上皮機能調節機構の解析
3. 学会等名 第56回日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本隆一
2. 発表標題 炎症性腸疾患に対する再生医療の開発
3. 学会等名 第103回IBDミニカンファレンス(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本隆一
2. 発表標題 【シンポジウム13：組織再生とオルガノイド】腸上皮幹細胞オルガノイドによる粘膜再生医療
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okamoto R, Watanabe M
2. 発表標題 【Focus Session: Cutting Edge Regenerative Medicine Using Stem Cells】Intestinal Epithelial Stem Cell Organoids and IBD
3. 学会等名 ISSCR2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuji Hibiya, Kiichiro Tsuchiya, Ryu Nishimura, Tomoaki Shirasaki, Sho Watanabe, Nobuhiro Katsukura, Shigeru Oshima, Ryuichi Okamoto, Tetsuya Nakamura, Mamoru Watanabe
2. 発表標題 Long-term inflammation model using human colonic organoids
3. 学会等名 AOCC2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawai M, Hama M, Nagata S, Kawamoto A, Suzuki K, Shimizu H, Anzai S, Takahashi J, Kuno R, Takeoka S, Hiraguri Y, Yui S, Okamoto R, Watanabe M
2. 発表標題 Functional analysis of isoflavones using patient-derived intestinal organoids
3. 学会等名 AOCC2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryuichi Okamoto, Mao Kawai, Minami Hama, Sayaka Nagata, Ami Kawamoto, Kohei Suzuki, Hironichi Shimizu, Sho Anzai, Junichi Takahashi, Reiko Kuno, Sayaka Takeoka, Yui Hiraguri, Shiro Yui, Mamoru Watanabe
2. 発表標題 【The 6th JSGE International Topic Conference Lifestyle-related Diseases in Gastroenterology】Gastrointestinal tract (role of gut microbiome and diet) : Food-bome factors in inflammatory bowel disease
3. 学会等名 The105th General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology (招待講演)
4. 発表年 2019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
研究分担者	油井 史郎  (Yui Shiro)  (00383886)	東京医科歯科大学・統合研究機構・准教授    (12602)	

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
---------	---------