

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09083

研究課題名(和文) 小児小腸組織から樹立する上皮オルガノイドの組織構築能解析

研究課題名(英文) Regenerative potential of human infant small intestinal organoids obtained from surgical specimens

研究代表者

古賀 寛之 (Koga, Hiroyuki)

順天堂大学・大学院医学研究科・先任准教授

研究者番号：30468574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、手術によって切除されたヒト新生児・乳児の小腸検体から腸上皮細胞を単離するプロトコルを確立した。本技術を用いて単離した腸上皮細胞をオルガノイドとして体外培養する条件の検証を行った。その結果、血清を含まず、幹細胞維持に重要なWnt 3aとR-spondin-1の濃度が明らかなdefined mediumを用いてオルガノイドを培養し、増幅可能であることを見出した。この条件において、オルガノイドは幹細胞と全ての分化細胞を含むことを確認した。また、切除直後の腸組織を処理したのち、簡易な方法で2日間保存した検体からでも、腸上皮細胞を単離しオルガノイドとして培養を樹立できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既知濃度因子のみを含む無血清培地を用いた培養方法は、オルガノイドを用いた実験の再現性を向上する。また添加因子濃度のカスタマイズが可能であることから細胞分化・増殖などの細胞挙動を開発する研究を可能とする点で学術的意義を持つ。本研究で確立した検体処理・保存方法を用いることで、手術施設で切除した腸組織を別の研究施設に移送してオルガノイドを作製し研究に利用することができる。本研究成果は、新生児・乳児の腸上皮成機構の解明や新生児・乳児期の腸疾患の病態研究の礎の技術になると考える。

研究成果の概要(英文)：We established a protocol for isolating epithelial cells from surgically resected human intestinal specimens from neonates and infants and culturing them as 3D organoids over multiple passages. We found that the organoids can be grown in serum-free media with defined concentrations of Wnt3a and R-spondin 1 which are essential for maintenance of intestinal stem cells. We confirmed that organoids maintained by our protocol are composed of intestinal stem cells and all type of differentiated cells. Furthermore, we also demonstrated that infant small intestinal tissues can generate expandable organoids even after storage for up to 2 days post-resection. This could offer an option of using surgical intestinal specimens from infants to generate organoids when the specimens are expected to be processed within two days, which would broaden the opportunity for the study of human infant intestinal epithelia and their relevance to pediatric diseases.

研究分野：小児外科

キーワード：ヒト腸上皮オルガノイド 新生児腸疾患 腸再生医療 defined medium

## 1. 研究開始当初の背景

腸上皮は、胎生後期から出生後にかけて、構造的にも機能的にも劇的に変化し、消化吸收機能を備えた成熟腸上皮へと移行する。この時期にさまざまな疾患が原因となり小腸切除を余儀なくされて生じる小児短腸症候群（以下 SBS）は、残存腸による機能代償が不十分な場合には成長発達の阻害や致命的な病態を引き起こす。現在、SBS に対して様々な治療が行われているものの課題も多くあり、小腸機能を補填する新しい治療の開発が期待されている。

腸上皮研究の発展により、腸上皮幹細胞を含む細胞集団を単離し、幹細胞維持に重要な増殖因子を添加して三次元培養を行うことで、腸上皮幹細胞と全ての腸上皮分化細胞を含んだオルガノイドとして腸上皮細胞の長期培養と増幅が可能となった。この腸上皮オルガノイド培養技術は、腸上皮研究のツールだけでなく、ヒト疾患の治療に用いる技術として注目されている。

腸上皮オルガノイドは、損傷した腸に生着し、腸組織を修復することが動物実験で明らかとなり、この知見をもとに腸上皮オルガノイドをヒト大腸疾患に利用する研究も進められている。小児 SBS に対しても、切除小腸に含まれる腸上皮幹細胞を回収し、オルガノイドとして培養できれば、自家細胞移植により小腸機能補填治療に用いることができる可能性がある。しかし、発生過程にある新生児・乳幼児期の異なる時期の小腸組織、しかも種々の組織ダメージの結果として外科切除が必要となった小腸組織から、安定してヒト腸オルガノイドを作製する技術の報告はない。さらに、出生後の各時期における小腸組織より得たヒト腸オルガノイドを用いて、その組織構築能を検証した研究はない。

## 2. 研究の目的

上記を背景とし、腸上皮オルガノイドを用いた小児 SBS に対する小腸機能補填を行う腸再生医療に向けた基礎研究として

- (1) 小児腸疾患において外科切除した小腸検体から viable な腸上皮細胞を単離し、腸上皮オルガノイドを作製する手法を確立すること
- (2) (1)で得るヒト腸上皮オルガノイドを免疫不全マウスへ移植し組織構築能を検証することを目的とした。

小児 SBS の原因疾患は、出生直後に問題となることの多い腸閉鎖や中腸軸捻転、あるいは出生後しばらく期間をおいて症状が顕著になる腸回転異常症や壊死性腸炎など、生後の発症時期がさまざまである。また、たとえば早産児に多い壊死性腸炎では、器官発生の時間軸上、腸上皮がまだ胎生後期に相当する時期で発症する例もあり、切除腸上皮の成熟度は個々の症例で大きく異なる。しかも実際に切除される小腸は、虚血、細菌感染、あるいは栄養障害などにより、さまざまに異なる程度の組織傷害を受けており、成人腸から採取し得られる健全な生検組織とはまったく異なる状況にある。そこで、新生児・乳幼児期の異なる時期の小腸組織、しかも種々の組織ダメージの結果外科切除が必要となった小腸組織から、ヒト腸上皮オルガノイドを安定作製する技術確立を目指す。

さらに、作製した腸上皮オルガノイドを免疫不全マウスへ移植することにより、オルガノイドが保持する組織構築能を検証する。研究分担者はマウスの腸上皮オルガノイドを、別のマウスの大腸に移植する技術を世界に先駆けて開発し、オルガノイドが損傷した大腸に生着し、腸組織を再構築することを報告した。この技術を用い、様々な異なる時期のヒト新生児・乳幼児小腸組織由来のオルガノイドを移植し、その組織構築能を比較検証するとともに、生着後の移植腸上皮の構造的、機能的成熟度を評価する。

## 3. 研究の方法

外科切除した小腸から腸上皮オルガノイドを作製し、得られる腸上皮オルガノイドのマウスへの異種移植研究を進めるため、以下を順次計画し、実施した。

### (1) 臨床研究計画の策定

順天堂大学小児外科での手術症例を対象とする臨床研究として研究計画を策定し、倫理審査委員会の承認をえた。

### (2) 腸上皮単離の条件検討

種々の原疾患で手術となった症例の切除小腸からの腸上皮オルガノイド作製技術開発を試みた。切除した同一小腸内で、複数の異なる領域（十二指腸、近位・遠位空腸、近位・遠位回腸など）や異なる傷害度の組織を含む場合は、それぞれの領域からオルガノイドの作製を試みた。ひとつの領域から 1 センチメートル四方程度の組織小片を複数採取し、異なる条件（組織洗浄法、破砕法、キレート・酵素処理の濃度・時間など）で処理し、その上皮回収効率から条件最適

化を図った。同じ領域から得る検体の一つは組織解析用とし、腸上皮組織構造や原疾患による虚血・感染にともなう組織破壊状態の参照に用いた。

#### (3) 腸上皮オルガノイド培養の検討

マウス胎生期小腸上皮細胞の培養技術は確立された技術があるが、出生前後期のヒト腸上皮培養技術の報告はない。基礎培地成分、Wnt3a、R-spondin1、Noggin、EGF など幹細胞・腸上皮細胞の維持・増殖に関わる添加因子の種類や量の検討をおこない、(2) で得た腸上皮細胞をオルガノイドとして三次元培養する条件を探索した。培養が可能になったのち、これを継代培養操作の検討と、それぞれの継代方法・培地組成で継代培養した場合の増幅効率の比較をおこなった。

#### (4) 小腸上皮オルガノイドの性状解析

異なる培地組成で培養したヒト小腸上皮オルガノイドから RNA を抽出し、腸上皮幹細胞、分化細胞の分子マーカーについて定量 PCR により遺伝子発現解析をおこなった。

#### (5) 切除後に保存した腸組織検体からのオルガノイド培養

手術により切除された腸組織について、切除直後に腸上皮単離を行わず、一定期間保存した。保存後の組織からでも、オルガノイドとして培養可能な腸上皮細胞が単離可能かを検討した。このとき、切除後の検体処理方法、保存液組成、保存方法などについて条件を変えて検証した。

## 4. 研究成果

本研究期間において、以下成果を得た。

### (1) 切除腸組織からのヒト乳児腸上皮オルガノイド培養技術の確立

本研究に用いた腸組織は早産児を含め生後 12 ヶ月までの患者から得た。切除された腸の領域は、近位空腸から遠位回腸までであった。これらの検体を用いた腸上皮細胞の単離条件検討により、早産児から生後 12 ヶ月の患者、空腸・回腸からでも、体外培養下でオルガノイドを形成可能な腸上皮幹細胞を、陰窩という腸上皮構造単位で単離するプロトコルを確立した。

培養方法の検討においては、血清を含まず、幹細胞維持に必須の増殖因子である Wnt3a と R-Spondin 1 を異なる濃度で組み合わせた培地でそれぞれ培養を行い、オルガノイド形成数、サイズを比較した。その結果、たとえ高濃度であっても一方の因子のみでは培養維持できないこと、しかし両方の因子を含む培地であれば、それぞれが比較的低い濃度でも培養維持、増殖が可能であることを見出した。

両方の因子を低濃度、高濃度で含む培地で培養したオルガノイドから RNA を抽出し、遺伝子発現解析をおこなった結果、腸上皮幹細胞と全ての終末分化細胞を含むことを確認した。

### (2) 保存腸組織からの腸上皮オルガノイドの樹立

切除後すぐに腸上皮単離操作をおこなわず、一定期間を保存したあとの腸組織を用い、組織学的解析と、(1) で確立した腸上皮細胞の単離をおこなった。その結果、腸上皮幹細胞と増殖細胞が数日の経過をへて徐々に消失すること、これに一致して、これらの細胞を含む陰窩の単離数が減少した。保存後組織から単離した陰窩について、(1) で確立したオルガノイド培養技術を適用すると、保存 2 日以内の腸組織由来陰窩であれば、オルガノイドが形成することがわかった。さらに、2 日保存腸組織由来オルガノイドについて培養を継続すると、切除直後腸組織由来のオルガノイドと同様に増幅可能であった。

ここまでの成果について、国際雑誌論文（査読付き）国際学会、国内学会において発表に至った。免疫不全マウスへの移植については、本研究期間内では完了しなかったが、今後引き続き研究をおこない、ヒト新生児・乳児オルガノイドの腸組織再構築能について評価し、小児 SBS の腸再生医療への発展につながる基礎研究を達成することを目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Matsumoto Yuka, Koga Hiroyuki, Takahashi Mirei, Suda Kazuto, Ochi Takanori, Seo Shogo, Miyano Go, Miyake Yuichiro, Nakajima Hideaki, Yoshida Shiho, Mikami Takafumi, Okazaki Tadaharu, Hattori Nobutaka, Yamataka Atsuyuki, Nakamura Tetsuya	4. 巻 37
2. 論文標題 Defined serum-free culture of human infant small intestinal organoids with predetermined doses of Wnt3a and R-spondin1 from surgical specimens	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1543 ~ 1554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-021-04957-4	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松本有加、須田一人、三上敬文、古賀寛之、服部 信孝、岡崎 任晴、山高篤行、中村哲也
2. 発表標題 無血清・既知組成培地を用いた外科切除腸組織からの小児小腸オルガノイド培養
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本有加、須田一人、三上敬文、古賀寛之、服部 信孝、岡崎 任晴、山高篤行、中村哲也
2. 発表標題 無血清培地による切除腸組織由来小児小腸オルガノイド培養方法の確立
3. 学会等名 第37回日本小児外科学会秋季シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuka Matsumoto, Kazuto Suda, Takafumi Mikami, Hiroyuki Koga, Nobutaka Hattori, Tadaharu Okazaki, Atsuyuki Yamataka, Tetsuya Nakamura
2. 発表標題 ESTABLISHMENT OF ORGANOID CULTURE SYSTEM FOR THE INFANT SMALL INTESTINE IN SERUM-FREE DEFINED MEDIUM
3. 学会等名 22nd European Paediatric Surgeons' Association Congress (国際学会)
4. 発表年 2021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	山高 篤行 (Yamatoka Atsuyuki)  (40200703)	順天堂大学・医学部・教授  (32620)	
研究分担者	松本 有加 (Matsumoto Yuka)  (50813672)	順天堂大学・医学部・助教  (32620)	
研究分担者	中村 哲也 (Nakamura Tetsuya)  (70265809)	順天堂大学・大学院医学研究科・特任教授  (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
---------	---------