

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03746

研究課題名(和文)小腸上皮オルガノイドにより創出した移植グラフトの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of small intestinal epithelial organoid-based transplant graft

研究代表者

杉本 真也(SUGIMOTO, Shinya)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：20626387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：オルガノイド移植技術に手術を組み合わせ、ラットの一部大腸上皮を剥離し、小腸由来オルガノイドの移植により上皮のみ小腸化した大腸グラフトを創出する技術を開発した。オルガノイドや、マウス大腸に移植したヒト小腸上皮、ラットにおける小腸上皮化大腸グラフトの機能解析を行った。小腸上皮オルガノイドにより構築された上皮の小腸機能を示すとともに、短腸症候群モデル小動物に対するオルガノイド治療コンセプトを確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小腸上皮は移植した先の組織の構造を変化させ、小腸としての機能を発揮しうることが明らかになった。大腸の上皮を小腸オルガノイドにより置換した小腸化大腸を移植するという新しい治療戦略は、今回コンセプトが確認された小動物(マウス、ラット)と比較してサイズが大きなヒトにおいても応用可能と考えられる。今後、自己の小腸オルガノイドと大腸組織を用いた自家移植を行うことで、免疫抑制剤を必要としない新規治療法の開発へとつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Combining the organoid transplantation technique with surgery, we developed a technique to create small intestinalized colon grafts by removing a portion of colonic epithelium from rats and transplanting organoids derived from the small intestine. Functional analysis of intestinal organoids, human small intestinal epithelium transplanted into mouse colon, and small intestinalized colon grafts in rats was performed. We successfully demonstrated the small intestinal function of the epithelium constructed by small intestinal epithelial organoids and confirmed the concept of organoid-based therapy for a small animal model of short bowel syndrome.

研究分野：消化器病学

キーワード：短腸症候群 小腸移植 幹細胞 細胞移植 組織修復 上皮置換 潰瘍性大腸炎 炎症性腸疾患

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。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腸管上皮幹細胞をオルガノイドとして永続的に体外培養可能となり、研究ツールとしてのみならず、再生医療への応用も期待されている。とりわけ、十分な治療がなく命を落とす患者の多い短腸症候群などの難治性小腸疾患に対する革新的な治療法の開発が望まれている。しかし、これまで、正常のヒト腸管上皮を *in vivo* で再構築する手段はなく、その形質や機能の解析は *in vitro* での検討に限られていた。最近、研究代表者らは大腸の上皮を剥離し、移植したオルガノイドにより上皮を置換することで、免疫不全マウスの腸管内にヒトとしての形質、幹細胞ヒエラルキーを保持したままヒト腸管上皮を再構築する技術の開発に成功した (Sugimoto et al. *Cell Stem Cell* 2018)。そこで、本技術を難治性小腸疾患に対する治療に応用できないかと考え、本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

オルガノイド移植技術に手術を組み合わせ、ラットの一部分大腸上皮を剥離し、小腸由来オルガノイドの移植により上皮のみ小腸化した大腸グラフトを創出することで短腸症候群モデルラットにおける小腸上皮化大腸グラフトの機能解析を行う。これにより、オルガノイドにより構築された上皮の小腸機能を示すとともに、短腸症候群に対する新規治療戦略を提案することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス腸管内で再構築したヒト腸管上皮細胞の解析

研究代表者らが開発した大腸オルガノイドの移植技術 (同所異種移植) を小腸オルガノイド移植へと応用し、再構築された移植組織の機能を検証した。事前に蛍光標識した細胞を移植し、マウス腸管内における絨毛形成を確認する。小腸特異的な消化酵素 (Sucrase-isomaltase など) や、回腸特異的なレセプターの発現、電子顕微鏡下での微絨毛の形成など、移植片の小腸上皮再構築能を評価する。蛍光コレステロール投与下での Whole-mount staining を行い、脂質吸収能を共焦点レーザー顕微鏡によるイメージング技術を駆使して実証する。コントロールとして、正常大腸オルガノイド移植を行い、比較検証や幹細胞機能解析を行う。

#### (2) ラット小腸オルガノイド移植により創出した小腸グラフトの移植効果の検証

ラットのオルガノイド培養法 (Fuji et al. *Cell Stem Cell* 2018) を用いて、Lewis Luciferase Transgenic ラットから小腸および大腸オルガノイドを樹立、培養する。ラットにおけるオルガノイド移植を行い、移植片は Luciferase 発光により、経時的なモニタリングを行う。手術開発においては、研究分担者と共同し研究を推進する。まず、栄養血管の血流を保ったまま大腸の一部を切離する (図 1 左)。術中に、EDTA を用いた上皮剥離法により、切離した大腸の上皮を剥離する。同部位に小腸オルガノイドを移植し、上皮が成熟するまで腹壁に縫い付けてストマとし、便の通過がない状態を維持する (図 1 中央)。手術を組み合わせることによって、腸閉塞をきたすリスクを軽減しつつ広範な移植が可能となる。上皮が発育した後に、全小腸切除するとともに小腸上皮が移植され発育したグラフトを本来の回腸末端部に移植する (図 1 右) ことで、その小腸グラフトの移植効果、移植粘膜組織を評価する。手術実験における術者によるバイアスを低減するために、移植細胞をラットの小腸/大腸オルガノイドで割付することで術者および観察者への移植細胞のブラインドを行い、客観的に移植効果を検証する。非移植群では生存しえない小腸全切除モデルを使用することで移植片による体重増加、生存という明確なエンドポイントにより比較する。長期観察後、あるいは安楽死を要する基準に到達した際には、体重の推移、血液検査、腸内細菌叢などに加え、回収した組織の病理組織学的検討、吸収能評価を行い、その小腸機能評価を行う。移植細胞が移植された部位でも幹細胞性を維持していることを幹細胞マーカーである *Lgr5 in situ hybridization* で、また、*Luciferase in situ hybridization* と分化マーカーの多重染色によって移植片における多分化能の詳細な検討を行う。

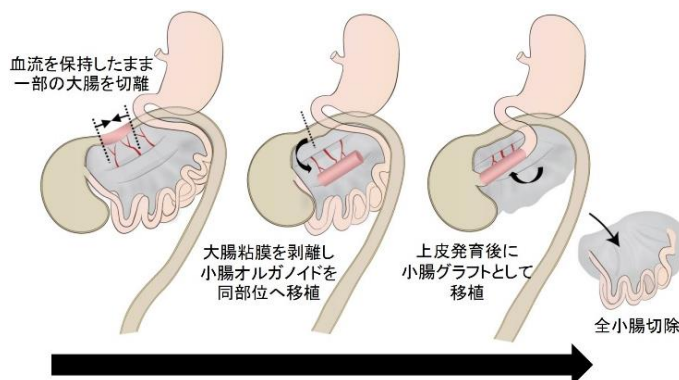


図 1 小腸オルガノイドによるグラフトの創出法 (Sugimoto et al. *Nature* 2021 より引用改変)

#### (3) 移植組織を用いた機能解析と絨毛形成能の評価

糖やペプチド、脂質といった栄養の吸収について、コントロールの回腸や大腸と比較しての小腸上皮化した大腸における吸収能を評価する。乳び管の形成は、LYVE-1 染色や蛍光コレステロ

ールの取り込みとともに評価を行う。

遊離した回腸を一時的にストマとし、食物や便が通過しなくなった状態での絨毛の変化を観察する。また、腸内細菌の関与を検証するために、小腸切除ラットと、オルガノイド移植ラットでの腸内細菌叢解析結果を比較検証する。

ヒト小腸および大腸のシングルセル RNA シーケンス解析データや様々な条件での RNA シーケンス解析データを活用し、絨毛化に関する知見を抽出する。また、ラットにおいても空腸、回腸、大腸のオルガノイドの遺伝子発現パターンからその差異を検証する。

#### 4. 研究成果

マウス腸管内へのヒト小腸オルガノイドの移植

まず、ヒト大腸オルガノイド移植で手法を確立した異種移植系を用いて、EDTA によりマウスの大腸上皮を剥離し、ヒト小腸上皮オルガノイドの移植を試みた。その結果、移植された小腸上皮は、大腸上皮の移植時に形成される陰窩構造とは異なる絨毛様構造を形成し、*Sucrase-isomaltase* などの小腸特有の消化・吸収に関わるタンパク質の発現が確認された。また、吸収に重要な微絨毛の形成も電子顕微鏡像で確認された。大腸ではリンパ管は粘膜固有層には認められないが、小腸では絨毛の中心の粘膜固有層内にリンパ管が伸長し、乳び管と呼ばれる脂質吸収に重要な小腸に特有なリンパ管構造がみられることが知られている。驚いたことに、小腸上皮の移植によって LYVE-1 陽性の乳び管様構造がマウス大腸においてリモデリングされる現象が確認された。経肛門的に注入した蛍光コレステロールは移植した小腸上皮から吸収され、この乳び管様構造を経て粘膜下層のリンパ管へと流入していた。これにより、上皮置換により創出された小腸化大腸は、栄養を消化・吸収し、乳び管様構造を通して体内に運搬できることが明らかとなった。

絨毛形成における管腔の流れの重要性

生体内で再構築したヒト小腸上皮の吸収機能は確認できたものの、マウスの肛門に近い部位の大腸に移植して形成されたヒト小腸上皮の絨毛構造は、本来の小腸絨毛と比較すると未熟であった。大腸の最後の部分にあたる直腸では腸液の「流れ」が乏しいことが一因ではないかと考え、ヒト大腸と小腸のオルガノイドを 2D 培養する手法を用いて「流れ」の影響を検証することとした。培養液をシェーカーで攪拌して人工的に「流れ」を作り、その変化を観察したところ、大腸オルガノイドでは平面のままであった一方、小腸オルガノイドは管腔側に突出する絨毛様の構造を形成した。これにより、「流れ」に依存する小腸上皮に特有の絨毛形成メカニズムが存在することが明らかとなった。「流れ」によって絨毛は経時的に成熟し、RNA シーケンスにおいても、従来の 3D 培養では発現の乏しい吸収上皮マーカーの発現がみられることが確認された。

小腸オルガノイドによる短腸症候群ラット治療を実証

これらの知見をもとに、小腸上皮オルガノイドを用いた短腸症候群の治療コンセプトを実証するラット小動物実験のため、*Luciferase transgenic LEW* ラットの腸管よりオルガノイドを樹立し、自家移植を想定した LEW ラットへの同系移植実験を行った。オルガノイドを移植した「流れ」がないストマ状態では移植上皮は絨毛形成には至らなかった。その後、ラットの全小腸を切除して短腸症候群を再現するとともに、「流れ」が存在する回腸末端部に小腸化大腸をストマから移設したところ、「流れ」によって移植した上皮細胞が徐々に成熟し、絨毛が形成されることが確認された。経時的にバイオイメージングで移植細胞の生着が追跡でき、通常では安楽死が必要になるタイミングでも生存可能な個体を確認できた。手術実験における術者によるバイアスを最低限とするため、術者および観察者らに、移植するオルガノイドが回腸由来か大腸由来かを盲検化した移植実験を行った。その結果、回腸オルガノイド移植群では大腸オルガノイド移植群に比して有意に生存期間が延長し、1 か月以上にわたって生存しうる個体が確認できた。それらの個体では移植細胞の広範な生着、絨毛の形成が確認できた。回腸オルガノイド移植群の移植片では、マウスでの実験結果と同様、乳び管、血管網が形成され、また、脂質、糖、ペプチドなどの吸収能も確認できた。また、蠕動運動もみられ、機能的な小腸化移植片であるということが確認できた。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

以上より、小腸上皮は移植した先の組織の構造を変化させ、小腸としての機能を発揮しうることが明らかになった。大腸の上皮を小腸オルガノイドにより置換した小腸化大腸を移植するという新しい治療戦略は、今回コンセプトが確認された小動物（マウス、ラット）と比較してサイズが大きなヒトにおいても応用可能と考えられる。今後、自己の小腸オルガノイドと大腸組織を用いた自家移植を行うことで、免疫抑制剤を必要としない新規治療法の開発へとつながることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計32件（うち査読付論文 23件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 15件）

1. 著者名 Sugimoto Shinya, Kobayashi Eiji, Kanai Takanori, Sato Toshiro	4. 巻 71
2. 論文標題 In Vivo Intestinal Research Using Organoid Transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Keio Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 73 ~ 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2302/kjm.2022-0019-IR	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 Ishikawa Keiko, Sugimoto Shinya, Oda Mayumi, Fujii Masayuki, Takahashi Sirirat, Ohta Yuki, Takano Ai, Ishimaru Kazuhiro, Matano Mami, Yoshida Kosuke, Hanyu Hikaru, Toshimitsu Kohta, Sawada Kazuaki, Shimokawa Mariko, Saito Megumu, Kawasaki Kenta, Ishii Ryota, Taniguchi Koji, Imamura Takeshi, Kanai Takanori, Sato Toshiro	4. 巻 163
2. 論文標題 Identification of Quiescent LGR5+ Stem Cells in the Human Colon	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1391 ~ 1406.e24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2022.07.081	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 Sugimoto Shinya, Iwao Yasushi, Shimoda Masayuki, Takabayashi Kaoru, Sato Toshiro, Kanai Takanori, Keio IBD Collaborators	4. 巻 162
2. 論文標題 Epithelium Replacement Contributes to Field Expansion of Squamous Epithelium and Ulcerative Colitis-Associated Neoplasia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 334 ~ 337.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2021.09.051	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 Sugimoto Shinya, Sato Toshiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Organoid vs In Vivo Mouse Model: Which is Better Research Tool to Understand the Biologic Mechanisms of Intestinal Epithelium?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 195 ~ 197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2021.06.027	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 Sugimoto Shinya, Sato Toshiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Rebuttal to: In Vivo Studies Should Take Priority When Defining Mechanisms of Intestinal Crypt Morphogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 5~5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2021.09.010	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 Wakisaka Yusuke, Sugimoto Shinya, Sato Toshiro	4. 巻 40
2. 論文標題 Organoid Medicine for Inflammatory Bowel Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 123~132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/stmcls/sxab020	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 杉本 真也	4. 巻 6
2. 論文標題 腸管上皮オルガノイド	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 消化器病学サイエンス	6. 最初と最後の頁 49~49
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 杉本 真也	4. 巻 21
2. 論文標題 オルガノイドを用いた臓器転用アプローチによる短腸症候群治療	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 再生医療	6. 最初と最後の頁 38~41
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 Shinya Sugimoto, Masayuki Fujii, Toshiro Sato	4. 巻 2171
2. 論文標題 Organoid Derivation and Orthotopic Xenotransplantation for Studying Human Intestinal Stem Cell Dynamics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 303 ~ 320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0747-3_21	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 Masayuki Fujii, Shinya Sugimoto, Toshiro Sato	4. 巻 26
2. 論文標題 Linking human intestinal scaffolds and organoids to combat intestinal failure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Medicine	6. 最初と最後の頁 1517 ~ 1518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41591-020-1096-9	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 Shinya Sugimoto, Eiji Kobayashi, Masayuki Fujii, Yuki Ohta, Kazuya Arai, Mami Matano, Keiko Ishikawa, Kentaro Miyamoto, Kohta Toshimitsu, Sirirat Takahashi, Kosaku Nanki, Yoji Hakamata, Takanori Kanai, Toshiro Sato	4. 巻 592
2. 論文標題 An organoid-based organ-repurposing approach to treat short bowel syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 99 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-021-03247-2	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40件(うち招待講演 9件/うち国際学会 16件)

1. 発表者名 Shinya Sugimoto, Takanori Kanai, Toshiro Sato
2. 発表標題 Intestinal research with replacement of colonic epithelium by organoid transplantation
3. 学会等名 The 108th General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本 真也, 金井 隆典, 佐藤 俊朗
2. 発表標題 液流動による細胞分化誘導と小腸絨毛形成への応用
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinya Sugimoto
2. 発表標題 Generation of Functional Small Intestine Tissue by Organoid Transplantation
3. 学会等名 The 10th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本 真也
2. 発表標題 消化管オルガノイド移植の新潮流
3. 学会等名 第43回日本炎症・再生医学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本真也
2. 発表標題 小腸移植と再生医療のクロストーク
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shinya Sugimoto, Eiji Kobayashi, Toshiro Sato
2. 発表標題 Proof-of-principle investigation for organoid-based hybrid intestine in a rat short bowel syndrome model
3. 学会等名 17th Congress of the Intestinal Rehabilitation & Transplant Association (CIRTA 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本 真也
2. 発表標題 小腸上皮オルガノイドによる再生研究
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinya Sugimoto, Eiji Kobayashi, Masayuki Fujii, Yuki Ohta, Keiko Ishikawa, Kosaku Nanki, Yoji Hakamata, Takanori Kanai, Toshiro Sato
2. 発表標題 Development of a treatment for short bowel syndrome using small intestinal organoids
3. 学会等名 The 16th Congress of European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本 真也、金井 隆典、佐藤 俊朗
2. 発表標題 小腸領域におけるオルガノイドを用いた再生医療開発
3. 学会等名 第63回 日本消化器病学会大会 (JDDW 2021)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 杉本 真也
2. 発表標題 オルガノイドを用いた短腸症候群治療のコンセプト検証
3. 学会等名 第12回日本炎症性腸疾患学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本真也、小林英司、袴田陽二、金井隆典、佐藤俊朗
2. 発表標題 短腸症候群に対するオルガノイドによる臓器リモデリング
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉本真也
2. 発表標題 腸管オルガノイドによる上皮置換戦略に基づく再生医療
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本真也
2. 発表標題 オルガノイドを用いた短腸症候群治療アプローチの開発
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本真也
2. 発表標題 自己残存小腸から作るハイブリット再生小腸グラフトの開発
3. 学会等名 第33回日本腸管リハビリテーション・小腸移植研究会（招待講演）
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	袴田 陽二  (HAKAMATA Yoji)  (00218380)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授   (32669)	
研究 分担者	小林 英司  (KOBAYASHI Eiji)  (00245044)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任教授   (32612)	

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