様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ６ 月　 ５ 日現在

機関番号：８２５０２
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2023
課題番号：２０Ｋ１６８０９

研究課題名（和文）腸管オルガノイドによる放射線腸管障害に対する再生治療効果の解析

研究課題名（英文）Regenerative therapy for radiation-induced intestinal injury using intestinal organoids

研究代表者
三浦　太一（Miura, Taichi）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学研究所　放射線規制科学研究部・主任研究員

研究者番号：３０８０３２０９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：放射線腸管障害は放射線療法および被ばく事故の観点から、早急に解決すべき重要課題である。本研究では、体外で培養した腸管オルガノイドや、腸管を構成する各種細胞を投与することで放射線腸管障害部位を再構築できるか検討する。腸管オルガノイド由来の細胞塊を放射線腸管障害モデルマウスに投与すると、短時間の生着は観察されるものの腸管構造の再建は認められなかった。一方で、ヒト由来の間葉系間質細胞の一部が放射線腸管障害部位に生着し、放射線腸管障害に対して一定の治療効果を発揮することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
腸管オルガノイド移植による放射線腸管障害治療を確立するためには、移植したオルガノイド片の生着時間および生着率を改善するために、足場材料の同定・開発が必要であると考えられた。一方で、クリプト周辺の間葉系間質細胞が腸幹細胞をはじめとした腸管構成細胞群の恒常性維持・再生促進に寄与することが知られている。今回、間葉系間質細胞の一部の細胞群が放射線腸管障害に対して高い治療効果を有していることが分かり、この結果は新たな治療法開発につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：Radiation-induced intestinal injury is an important issue that needs to be resolved urgently. In this study, we investigated whether intestinal organoids and various cells that constitute the intestinal tract can be administered to reconstruct the site of radiation intestinal injury. When intestinal organoid-derived cell clusters were administered to a mouse model of radiation-induced intestinal injury, short-term viability of the administered cells was observed, but no reconstruction of intestinal structures was observed. On the other hand, when human-derived mesenchymal stromal cells were administered, some of these cells were found to be viable at the site of radiation-induced intestinal injury and to exert therapeutic effects against radiation-induced intestinal injury.

研究分野：放射線障害治療

キーワード：放射線腸管障害

※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（共通）

１．研究開始当初の背景

高線量(10Gy~)の放射線が腸管に照射された場合、広範囲で上皮幹細胞が死滅し、絨毛構造は崩壊する。また、放射線により急性腸疾患を起こした場合、高確率で晩期障害が起こり、粘膜上皮の障害だけでなく血管の損失や繊維化などの慢性的な複合症状が現れるため、長期にわたる放射線腸管障害に対する再生治療の確立が求められている。放射線腸管障害に対してはこれまで液性因子や化合物などを用いた治療研究が行われてきた。これらの研究は、液性因子や薬剤により障害部位の周囲の上皮幹細胞の分化・増殖を促進させる早期的な治療が目的であり、照射により上皮幹細胞の多くが死滅している場合は治療効果を発揮しないことが多い。このように、液性因子･薬剤療法では治療できるケースに限界があり､慢性的な症状の治療を行うことは難しい。以上より、放射線腸管障害部位に正常な腸管組織や腸管構成細胞群を生着させ、組織を再構築できれば理想的で根本的な再生治療であると考えられるが、そのような趣旨の研究は行われていない。そこで我々は、腸管オルガノイドおよび腸管を構成する各種細胞の投与による治療に着目した。

腸管オルガノイドは体内の腸管と同様の上皮構造と機能を有した小型の臓器である。ヒトの腸管から単離した腸幹細胞、またはヒト胚性幹細胞や人工多能性幹細胞などの多能性幹細胞から in vitro で三次元的に分化誘導することで腸管オルガノイドを作成することができる。腸管オルガノイドを腸管再生の研究に用いる利点は 2 つある。1 つ目に、体内の腸管組織と比べても遜色のない高品質の腸管オルガノイドを作成する簡便な方法が樹立されており、腸管オルガノイドを簡便に作成できる培地類がキットとして販売されていることである。2 つ目に、腸管オルガノイドはマウスに移植でき、腸管の再生治療に用いることができることである。例えば、腸炎モデル免疫不全マウスの肛門からヒト腸管オルガノイド由来の細胞片を注入することにより、絨毛構造が崩壊している部位を足場として腸管オルガノイド片が生着し、その後、正常な絨毛構造を再構築し腸管組織を修復することが報告されている。また、腸管オルガノイド片のマウスへの移植法も確立されており in vivo での腸管再生の研究を行うことができる。注入した腸管オルガノイド片は上皮細胞の壊死などにより絨毛構造が崩壊している部位を足場として生着するため、絨毛構造の崩壊が起きる放射線腸管障害の治療に腸管オルガノイドを利用できる可能性は高いと考えられるが、そのような趣旨の研究は未だ行われていない。

２．研究の目的

本研究の目的は、「放射線腸管障害部位に腸管オルガノイド片を生着させ、組織を修復できるか」という点である。本研究では、放射線腸管障害モデルマウスと腸管オルガノイドを用いて、放射線腸管障害に対する治療応用の可能性を探索する。また、オルガノイドだけでなく体外で培養系が確立されている腸管構成細胞群の移植実験も併せて検討する。

３．研究の方法

（１）腸管オルガノイドの準備と投与

市販のヒト/マウス腸管オルガノイドは、キット化されている維持培地を用いて維持・培養した。樹立した放射線腸管障害モデルマウスの肛門から、マトリゲルを用いて懸濁した腸管オルガノイド片を投与した。投与は麻酔下で実施した。

（２）ヒト間葉系間質細胞の培養

市販のヒト骨髄由来の間葉系間質細胞（hBM-MSC）を、10% FBS、0.1 mg/ml カナマイシ、1 ng/ml ヒト FGF-2 を含む低グルコース DMEM を用いて培養した。

（３）SSEA-3 陽性の間葉系間質細胞の単離・移植

hBM-MSC に含まれる SSEA-3 陽性細胞および SSEA-3 陰性細胞を、FACS によって単離した。hBM-MSC を、5μg/ml ラット抗 SSEA-3 抗体または 5μg/ml ラット IgM アイソタイプコントロールと共に氷上で 1 時間インキュベートし、次いで、10μg/ml FITC 結合抗ラット IgM 抗体と共に氷上で 1 時間インキュベートした。SSEA-3 陽性細胞および SSEA-3 陰性細胞を、FACS Aria II SORP セルソーターを用いて単離した。回収した SSEA-3 陽性細胞および SSEA-3 陰性細胞を CELLBANKER 1 plus に懸濁し、使用するまで-80℃で凍結保存した。凍結細胞を注射などの実験に使用する場合、細胞を 37℃の水浴中で解凍し、予め温めた 10% FBS および 0.1 mg/ml カナマイシンを含有する低グルコース DMEM を添加した。

（４）免疫蛍光染色

組織の免疫蛍光染色のために、組織切片を脱パラフィン化し、10 mM クエン酸緩衝液中　120℃で 15 分間オートクレーブ処理し、0.3%過酸化水素で処理した。細胞の免疫蛍光染色には、細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定した。ブロッキングおよび抗体希釈を、製造業者のプロトコルに従って、Blocking One Histo を用いて実施した。切片を、各種一次抗体と共に 4℃で一晩インキュベートし、洗浄後、切片を室温で 1 時間、適切な蛍光結合二次抗体で染色した。核はヘキスト色素 を用いて染色した。切片は FV3000 を用いて可視化した。

（５）TUNEL 染色

ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit を用いた TUNEL アッセイにより、空腸のパラフィン包埋切片を用いてアポトーシスを評価した。組織切片を脱パラフィン化し、PBS 中の 20μg/ml プロテイナーゼ K および 3% H2O2 で処理した。緩衝液で平衡化した後、組織切片を末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) 酵素で処理し、DNA 断片の 3'-OH 末端をジゴキシゲニンヌクレオチドで標識した。組織切片をペルオキシダーゼ結合抗ジゴキシゲニン抗体と室温で 30 分間インキュベートし、発色剤として DAB を用いて発色させた。

４．研究成果

（１）腸管オルガノイドの放射線腸管障害に対する治療効果

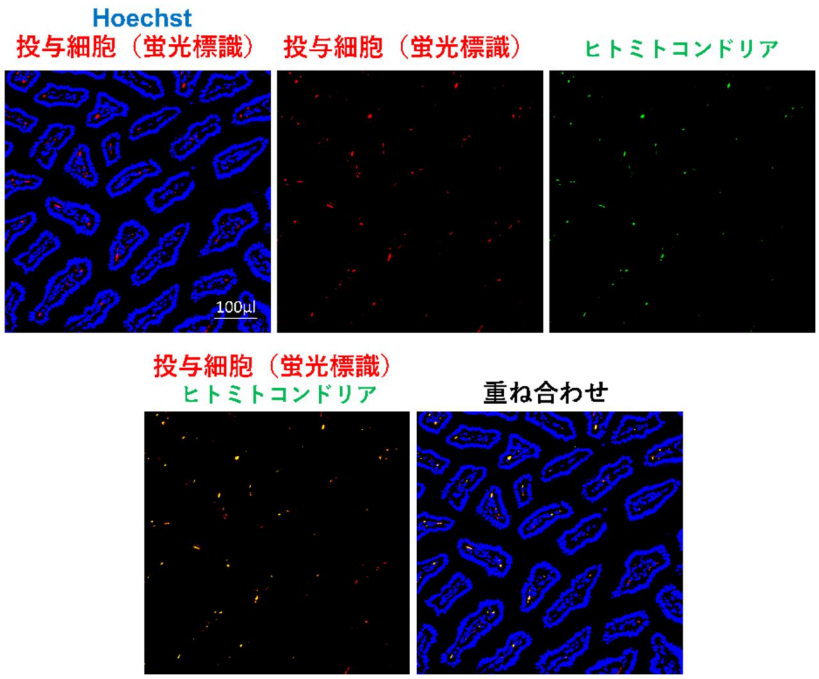
作成したヒト腸管オルガノイドの遺伝子解析を実施し、腸管を構成する各細胞のマーカー遺伝子が発現していることを確認した。特に、腸管の再構築において最重要である Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5（Lgr5）陽性の腸管幹細胞の存在を確認することができた。

作成した放射線腸管障害モデル免疫不全マウスを用いてオルガノイド移植実験を実施した。回収したオルガノイドをピペッティングにより細かく分解し、それらをマトリゲルに混合し肛門より大腸に投与した。しかしながら、いくつか生着したヒト腸管オルガノイド由来の細胞は見受けられたが、それは一時的なものであり、組織の再構築に寄与することはなかった。

（２）間葉系間質細胞の放射線腸管障害に対する治療効果

クリプト周辺の間質細胞が腸幹細胞をはじめとした腸管構成細胞群の恒常性維持・再生促進に寄与することが知られている。そこで、腸管オルガノイド片と一緒に、ヒト骨髄由来の間葉系間質細胞（hBM-MSC）を放射線腸管障害モデルマウスに投与した結果、腸管オルガノイドの生着は依然として認められなかったが、hBM-MSC の一部の生着が認められた。これまでに、hBM-MSC の血管内投与による放射線腸管障害治療に関してはいくつか報告がある。hBM-MSC の一部は放射線腸管障害部位にホーミングする能力を有しており、ホーミングした先でパラクライン作用により障害の修復を促進することが知られている。

hBM-MSC はヘテロな集団であり、様々な細胞群が混在している。放射線腸管障害部位には hBM-MSC の一部のみがホーミングして治癒を促す効果を発揮するが、どのような細胞群が主要因子なのかは同定されていない。近年、hBM-MSC に含まれる SSEA-3 陽性の細胞群（MUSE 細胞）が傷害部位へのホーミング能が優れていることが知られている。そこで、hBM-MSC 中の SSEA-3 陽性細胞こそ放射線腸管障害部にホーミングし治癒を促す主要因子ではないかと考えた。hBM-MSC から FACS を用いて SSEA-3 陽性細胞を単離し、蛍光標識処理を施した後に、放射線腸管障害モデルマウスの尾静脈に投与した。投与は照射後 2 時間以内に実施した。照射後（投与後）3.5 日後に小腸を摘出し組織学的解析を実施した。その結果、投与した SSEA-3 陽性細胞が放射線腸管障害部位にホーミングすることが分かった（図を参照）。SSEA-3 陰性細胞を投与してもごく少量のホーミングが確認されたが、ホーミングする細胞数は SSEA-3 陽性細胞の方が約 10 倍多かった。また、非照射のマウスに SSEA-3 陽性細胞を投与しても腸管にホーミングしなかったので、SSEA-3 陽性細胞は、選択的に放射線照射後の腸にホーミングしていると考えられた。クリプト解析の結果、コントロール（生理食塩水投与）と比較して、SSEA-3 陽性細胞投与マウスではクリプト数が約 2.8 倍に増加した。さらに、照射後（投与後）24 時間後に小腸を摘出し TUNEL 染色をした結果、SSEA-3 陽性細胞投与マウスではクリプトにおける TUNEL 陽性細胞数が有意に減少した。これは SSEA-3 陽性細胞投与により放射線誘導性の細胞死が抑制されたことを意味するものであった。


Hoechst
投与細胞（蛍光標識）
投与細胞（蛍光標識）
ヒトミトコンドリア
100μl
投与細胞（蛍光標識）
ヒトミトコンドリア
重ね合わせ

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 Taichi Miura, Junko Kado, Hirotoshi Takiyama, Mitsuko Kawano, Asako Yamagiri, Shoko Nishihara, Shigeru Yamada, Fumiaki Nakayama	４．巻 -
２．論文標題 Stem cell therapy using bone marrow-derived Muse cells repairs radiation-induced intestinal injury through their intestine-homing via S1P-S1PR2 interaction	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Advances in Radiation Oncology	６．最初と最後の頁 -
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 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4件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 Miura Taichi, Kado Junko, Masuzawa Mikio, Nakayama Fumiaki
２．発表標題 Sustained activation of the FGF1 signaling pathway inhibits proliferation, invasion, and migration and enhances radiosensitivity in mouse angiosarcoma cells
３．学会等名 日本放射線影響学会第66回大会
４．発表年 2023年

１．発表者名 三浦太一、川野光子、湯浅徳行、羽生正人、木村史枝、松﨑祐二、中山文明
２．発表標題 高硫酸化ヒアルロン酸はヘパリンとは異なり血液抗凝固能を有していないが、FGF1に対する強い結合能を有している
３．学会等名 第95回日本生化学会大会
４．発表年 2022年

１．発表者名 三浦　太一，　川野　光子，　高橋　慶子，　湯浅　徳行，　羽生　正人，　木村　史枝，　松﨑　祐二，　中山　文明
２．発表標題 放射線腸管障害に対する高硫酸化ヒアルロン酸の治療効果
３．学会等名 第94回日本生化学会大会
４．発表年 2021年

１．発表者名 三浦太一
２．発表標題 放射線による血管障害の幹細胞を用いた再生治療
３．学会等名 第６回 血管生物医学会 若手研究会
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