

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590803

研究課題名（和文） リアルタイムイメージングを用いた初代大腸上皮培養細胞の増殖・分化機構解析

研究課題名（英文） Real-time imaging analysis of proliferation/differentiation of colonic epithelial cells in primary culture

研究代表者

中村 哲也（NAKAMURA TETSUYA）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教員

研究者番号：70265809

研究成果の概要（和文）：新規の培養技術確立により、正常大腸上皮の増殖・分化を可視化するシステムを構築した。この方法で得られた培養大腸上皮細胞は上皮傷害を惹起した大腸の上皮欠損部位に生着したのみならず、機能的大腸上皮を再生した。重要なことに、1個のLgr5+大腸幹細胞から培養し増やした細胞群の移植でも同様の上皮再生を確認できた。本培養技術とイメージング技術は、大腸上皮幹細胞研究の新しいツールとなることが期待される。また、体外培養幹細胞で大腸上皮再生が可能であることを示した本成果は、新しい再生医療の可能性を示すものと考えた。

研究成果の概要（英文）：We have developed a novel culture method for colonic epithelial cells that allows long-term maintenance and efficient expansion of stem cells *in vitro*. Colonic crypts from normal adult mice were isolated and three-dimensionally cultured in serum-free medium supplemented with a combination of growth factors. The crypt cells formed a round cystic organoid consisting of epithelial monolayer of multi-lineage cells, continuously grew with increasing size of organoid structure, and could be propagated for months without losing their properties. Importantly, Lgr5+ colonic stem cells were constantly maintained for a long time period in our culture. In order to test transplantability of these cultured cells, GFP+ colonic cells were re-introduced into the lumen of mouse colon superficially damaged by DSS treatment. As observed 4 weeks post-transplantation, the infused organoids readily integrated into the epithelium to form self-renewing GFP+ epithelial patches that were histologically normal. Similar results were obtained with colon organoids that were derived from a single Lgr5+ colon stem cell after extensive *in vitro* expansion.

The techniques that we have developed would be of significant help to build a basis to develop a novel colon stem cell therapy based on *in vitro* expansion of a single adult colonic stem cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：消化管上皮幹細胞/ライブセルイメージング/初代培養技術/細胞移植治療

## 1. 研究開始当初の背景

腸管上皮組織は、上皮性幹細胞を由来とし、陰窩を一単位とする細胞群の秩序正しい増殖と分化の調和のもと、生涯を通じ再生を繰り返す。一方この調節機構の破綻は、ヒト疾患で見られる重篤な消化管組織再生不全や消化器癌における細胞癌化機構と深く関わっている。

申請者はこれまで、腸管上皮細胞研究に従事し、細胞内シグナル分子発現を上皮細胞分化との関与という視点でとらえる独創的な成果をあげてきた (Mol Cell Biol 2004, FEBS Lett 2005)。またその後においては、腸管上皮細胞内で活性化された Wnt シグナルと Notch シグナルをリンクするクロストーク機構を見いだした (Gastroenterology 2007, BBRC 2008)。

しかしながら腸管上皮研究手法が、ヒト組織やモデル動物（遺伝子操作動物を含む）を用いた組織レベルでの静的な解析、あるいはヒト大腸癌由来の株化細胞を用いた解析にとどまり、正常腸管上皮の増殖・分化に関わる分子機構については未だ解決されない問題が数多く存在するのも事実であった。これらを背景とし、申請者は正常腸管上皮細胞の体外培養技術開発に着手した。その結果、上皮細胞単離技術、細胞外マトリックスの使用条件、および蛋白因子添加条件の組み合わせにより、正常マウス大腸組織由来上皮細胞がきわめて純度の高いまま、数週間にわたって、しかも無血清培地中で維持可能であることを見出すことができた。さらにこれら細胞が、長期にわたり上皮細胞マーカーを発現する未分化細胞群で、かつ DNA 複製能を維持した細胞集団であることを見出した。

これらを背景とし、本研究を申請する着想にいたった。

## 2. 研究の目的

本研究においては、独自の大腸上皮細胞培養技術を発展させ、これを独自に有するイメージング技術と組み合わせることで、正常腸管上皮細胞の増殖・分化過程をリアルタイムに可視化するシステムを構築することを目的として開始された。

## 3. 研究の方法

### 1) 正常マウス由来大腸上皮細胞の性状解析

#### 1-A) マウス大腸上皮細胞培養法の最適化

本研究開始後には、申請者が既に確立した

培養技術をさらに改良し、3次元培養のための細胞外マトリックスの利用の検討、および培地組成に必須の因子の同定をおこない、長期培養技術の効率化を図った。

#### 1-B) マウス大腸上皮細胞の発現因子解析

本技術で培養可能となった正常大腸上皮細胞の性状解析のため、RT-PCR および免疫細胞染色法で E-cadherin、MUC2、ChromograninA、Carbonic Anhydrase II (CAII)、COX-1、Ki-67 などの発現と局在を解析した。また、透過電子顕微鏡観察により上皮細胞としての微細構造を解析した。

#### 1-C) マウス大腸上皮細胞の in vitro での分化誘導の検討

培養大腸上皮幹細胞の in vitro 分化能を検討するため、Notch シグナル阻害剤を培地中へ添加し、幹細胞マーカーや分化細胞マーカー発現の経時変化を解析した。

## 2) 大腸上皮幹細胞の増殖プロセスのリアルタイム可視化システム構築

大腸上皮細胞の増殖過程の長時間イメージングをおこなうため、単離直後の大腸陰窩が3次元構造をとりながら増殖していく全プロセスを、微分干渉法を用いてタイムラプス観察をおこなう条件を設定した。また、幹細胞マーカーである Lgr5 のプロモーター下流に EGFP を組み込んだノックインマウス (Lgr5-EGFP-ires-CreERT2) から得た大腸上皮を培養し、幹細胞の挙動を 150 時間以上の長時間にわたり観察した。

## 3) 培養大腸上皮幹細胞移植による上皮再生過程の解析

培養大腸上皮細胞の移植により傷害大腸上皮を修復することを試みた。このために、EGFP トランスジェニックマウスより単離し培養した上皮をドナー細胞とし、一方 DSS 経口投与で大腸炎を惹起したマウスをレシピエントとした移植実験の条件検討をおこなった。

## 4) 単一の大腸上皮幹細胞の体外増幅と、これを用いた移植実験

ただ 1 個の大腸上皮幹細胞を単離し、これを体外で培養し増やした後に移植する実験を構築した。このため、Cre リコンビナーゼ

による組換え依存性に Rosa26 座に蛍光タンパクを発現するマウスと Lgr5-EGFP-ires-CreERT2 マウスを交配したマウスを利用し、タモキシフェン投与で Cre による組換えを誘導したのちに、大腸上皮を単離した。EGFP かつ RFP 陽性の大腸上皮幹細胞を単離し、限界希釈法によって1個の幹細胞に由来する上皮細胞を増やし、DSS 経口投与で大腸炎を惹起したマウスに移植した。

#### 5) 培養正常小腸上皮細胞の薬物輸送機能解析

本研究より派生したプロジェクトとして、正常小腸上皮細胞による薬物輸送動態をリアルタイムで観察し解析する実験技術を構築した。すなわち、正常マウスより単離した小腸上皮細胞が薬物トランスポーターを発現することを利用し、これを小腸上皮による薬物排出機構解析に利用するための基礎検討をおこなった。

#### 4. 研究成果

##### 1) 正常マウス大腸上皮細胞培養技術の確立

マウス大腸クリプトをI型コラーゲンゲルに包埋し、Wnt シグナル活性化因子(Wnt3a および Rspo1)、BMP シグナル阻害因子(Noggin)、EGF、HGF および牛血清アルブミン(以下 BSA)を含む無血清培地で培養すると、球状オルガノイドとして培養可能であることを見出した。オルガノイドの回収・分散後に同一条件で培養すると球状オルガノイドの再形成が見られ、この継代操作により1年を超す長期培養が可能であった。

##### 2) 培養大腸上皮細胞の性状解析

培養可能となった大腸上皮オルガノイドは、単層の上皮細胞から成り、アルシアンブルー陽性杯細胞、CgA 陽性神経内分泌細胞、CAII 陽性吸収上皮細胞、COX1 陽性タフト細胞、KI67 陽性未分化細胞を含んでいた。透過型電子顕微鏡観察により、これらオルガノイドが上皮細胞に特徴的な微絨毛・密着結合に加え、内腔に粘液顆粒を有する杯細胞、基底膜側に電子密度の高い分泌顆粒を有する神経内分泌細胞、および分裂期染色体を示す増殖細胞を含むことが示された。

##### 3) 本培養技術による Lgr5+上皮幹細胞の挙動解析

発現遺伝子解析により、幹細胞マーカー Lgr5 が培養開始1週間で著増し、以後維持されることが示された。Lgr5-EGFP-ires-CreERT2 マウスの大腸上皮

を単離し、その培養過程をリアルタイムで観察した結果、Lgr5+細胞数が培養過程、特に培養開始後数日間に著増することが明らかになり、本培養法が上皮幹細胞を体外で増加させるものであることがわかった。

さらに詳細な解析により、Lgr5 遺伝子発現増加には Wnt・Notch・BMP シグナルが関与することが明らかになるとともに、 $\gamma$ セクレターゼ阻害剤による Notch シグナル阻害により幹細胞から杯細胞への分化が促進されることも示された。

##### 4) 培養大腸上皮幹細胞移植による傷害上皮の修復

EGFP トランスジェニックマウス由来培養大腸上皮細胞がレシピエントマウス大腸の上皮欠損部位に生着する移植条件を見いだした。ドナー細胞は、移植1週間には主として潰瘍部を平坦な面として被覆し、欠損上皮を補充することが明らかとなった。さらに移植1ヶ月後にも移植片がレシピエント内に存在しうること、しかもこの中には全ての分化細胞と増殖細胞を含んだ正常クリプト構造を有する大腸上皮が構築されることを明らかにした。

また、移植成功群(N=6)と偽移植群(N=6)の比較の結果、移植成功群では移植後の体重増加が速やかであることから、急性腸炎モデルマウスに対する培養細胞移植が臨床的有用性をもつ可能性が示唆された。

##### 5) ただ1個の Lgr5+幹細胞に由来する細胞移植と大腸上皮再生

本培養法により、単一の Lgr5+大腸幹細胞から大腸上皮細胞を大量に増やすことが可能であった。得られた培養細胞を用いて移植実験をおこなった結果、全ての分化細胞と増殖細胞を含む組織学的に正常な大腸上皮が再生した。さらに、移植後半年を経過したレシピエントマウスにおいても、増殖細胞および全ての分化細胞を含むクリプトが複数認められることから、本培養技術において、正常の組織構築能を維持し長期にわたって幹細胞性を維持する細胞が数的増大を伴いつつ維持できることが明瞭となった。

##### 6) 培養小腸上皮細胞がもつ薬剤輸送能の解析

本プロジェクトの遂行中、大腸ではなく小腸上皮細胞の体外培養技術が報告された(Sato et al, Nature 2009)。申請者は大腸上皮培養技術をすでに確立し有することから、報告された小腸上皮培養を直ちに再現可

能であった。さらに培養正常小腸上皮を用いて、腸管上皮における薬物吸収を制御する薬剤排出トランスポーター(P-gp)の機能解析をおこなった。その結果、3次元的に培養される小腸上皮が閉鎖腔をもち嚢状構造を呈とる中で、P-gpの遺伝子と蛋白が生理的レベルで発現することを確認した。また、培地にP-gpの基質を加えると、その蛍光が細胞の基底側から管腔側へと輸送され内腔に集積することを見だし、この全過程をリアルタイムで観察するシステムを構築した。得られた画像データを数理解析することで、培養小腸上皮による薬物輸送動態のパラメーターを算出することが可能となった。

## 7) 結論

本研究では、これまで困難とされてきた腸管上皮細胞の培養技術を確立し、イメージング実験と組み合わせることで、正常腸管上皮細胞の増殖・分化過程をリアルタイムに可視化することを目指した。その結果、マウス大腸上皮細胞を長期に培養する新規培養法を確立した。この方法では、Lgr5+大腸上皮幹細胞を増やすことが可能であり、培養大腸上皮細胞は上皮傷害大腸の上皮欠損部に生着した。さらにこれらドナー上皮が、機能的な大腸上皮を再生し長期にわたりレシピエント体内で維持されることも明らかとした。重要なことに、1個のLgr5+大腸幹細胞から培養し増やした細胞群の移植によっても同様の上皮再生を確認できた。これらの結果は、大腸上皮幹細胞をその幹細胞性を維持したまま体外で増やすことが可能であること、および幹細胞移植治療が実現可能であることを示すものと考えられた。

本研究の意義は第一に、腸管上皮幹細胞の*in vitro*操作を可能にした点にある。本培養技術は、大腸上皮幹細胞研究の新しいツールとして、分子生物学的および生化学的解析の進展に大きく寄与するであろう。

第二の意義は、培養大腸上皮細胞を用いた同種間上皮移植に世界で初めて成功し、移植上皮が別の個体内で機能的な大腸上皮を再生すること、上皮移植が急性腸炎の回復に一定の治療効果を有すること、更にはただ一個の幹細胞であってもこれを体外で増やし移植することで同様の機能的な大腸上皮の再生が可能であることを示した点にある。これら一連の結果は、微小な検体から増やした培養幹細胞であっても、腸管上皮再生に利用しうるの重要なかつ画期的な知見を供与するものであり、意義の高いものであると考える。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

1. Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Clevers H, and Watanabe M: Functional engraftment of colon epithelium expanded *in vitro* from a single adult Lgr5+ stem cell. **Nature Medicine**. 2012 doi: 10.1038/nm.2695
2. Mizutani T, Nakamura T, Morikawa R, Fukuda M, Mochizuki W, Yamauchi Y, Nozaki K, Yui S, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, and Watanabe M: Real-time analysis of P-glycoprotein-mediated drug transport across primary intestinal epithelium three-dimensionally cultured *in vitro*. **Biochem Biophys Res Commun**. 419(2): 238-243: 2012
3. Zhao R, Nakamura T, Fu Y, Lazar Z, and Spector DL: Gene bookmarking accelerates the kinetics of post-mitotic transcriptional activation. **Nature Cell Biology**. 13(11): 1295-1304: 2011
4. Zheng X, Tsuchiya K, Okamoto R, Iwasaki M, Kano Y, Sakamoto N, Nakamura T, Watanabe M: Suppression of *Hath1* gene expression directly regulated by *Hes1* via Notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis. **Inflamm Bowel Dis**. 17(11): 2251-2260: 2011
5. Iwasaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, Zheng X, Kano Y, Okamoto E, Okada E, Araki A, Suzuki S, Sakamoto N, Kitagaki K, Akashi T, Eishi Y, Nakamura T, Watanabe M: Longitudinal cell formation in the entire human small intestine is correlated with the localization of *Hath1* and *Klf4*. **J Gastroenterol**. 46(2): 191-201: 2011
6. Prasanth KV, Camiolo M, Chan G, Tripathi V, Denis L, Nakamura T, Hubner M, and Spector DL: Nuclear organization and dynamics of 7SK RNA in regulating gene expression. **Mol Biol Cell**. 21(23): 4184-4196: 2010

7. Bernard D, Prasanth KV, Tripathi V, Colasse S, Nakamura T, Xuan Z, Zhang MQ, Sedel F, Jourdren L, Couplier F, Triller A, Spector DL, and Bessis A: A long nuclear retained non-coding RNA regulates synaptogenesis by modulating gene expression. **EMBO J.** 29(18): 3082-3093: 2010
8. Akiyama J, Okamoto R, Iwasaki M, Zheng X, Yui S, Tsuchiya K, Nakamura T, and Watanabe M. Delta-like 1 expression promotes goblet cell differentiation in Notch-inactivated human colonic epithelial cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 393(4): 662-667: 2010
9. Onizawa M, Nagaishi T, Kanai T, Nagano KI, Oshima S, Nemoto Y, Yoshioka A, Totsuka T, Okamoto R, Nakamura T, Sakamoto N, Tsuchiya K, Aoki K, Ohya K, Yagita H, Watanabe M. Signaling pathway via TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 296(4): G850-859: 2009
10. Okamoto R, Tsuchiya K, Nemoto Y, Akiyama J, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 296(1): G23-35: 2009

〔学会発表〕(計 26 件、うち国際学会 13 件、国内学会 13 件)

1. Tetsuya Nakamura (Invited Speaker): Epithelial regeneration by cultured colonic cells expanded from a single adult LGR5+ stem cell. **The 6th Korea-Japan IBD Symposium.** Jan 28, 2012, Tokyo, Japan
2. Shiro Yui, Tetsuya Nakamura, Toshiro Sato, Yasuhiro Nemoto, Tomohiro Mizutani, Xiu Zheng, Shizuko Ichinose, Takashi Nagaishi, Ryuichi Okamoto, Kiichiro Tsuchiya, Hans Clevers, and Mamoru Watanabe. Regeneration of damaged colon epithelium by transplanted colon Lgr5+ stem cells maintained and expanded in vitro. **The 5th Japan & US Collaboration Conference**

**in Gastroenterology.** Nov 10, 2011, Tokyo, Japan

3. Tsuchiya K, Zheng X, Kano Y, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Flagellin via TLR5 on basolateral membrane of primary intestinal epithelial cells(IEC) shows the role of IEC in the response to bacteria. **United European Gastroenterology Week 2011,** Oct 26, 2011, Stockholm, Sweden
4. Yui S, Nakamura T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Nagaishi T, Tsuchiya K, Watanabe M, Okamoto R, Ichinose S, Sato T, Clevers H : Regeneration of damaged colonic tissue by transplanted colonic epithelial stem cells maintained and expanded in vitro. **GI Research Academy 2011** Jun 17, 2011, Kyoto, Japan
5. Shiro Yui, Tetsuya Nakamura, Yasuhiro Nemoto, Tomohiro Mizutani, Xiu Zheng, Shizuko Ichinose, Takashi Nagaishi, Ryuichi Okamoto, Kiichiro Tsuchiya, Toshiro Sato, Hans Clevers, and Mamoru Watanabe: Regeneration of Damaged Colonic Tissue by Transplantation of Colonic Epithelial Stem Cells Maintained and Expanded In Vitro. **Basic Science Plenary Symposium, Digestive Disease Week 2011,** May 7- 10, 2011, Chicago, USA
6. Yui S, Nakamura T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M : A well-defined culture system for colonic epithelial cells that allows efficient enrichment of LGR5+ stem cells. **The 1st JSGE International Topic Conference -Stem Cells in Digestive Organs-** Sep 26, 2010, Kamakura, Japan
7. Akiyama J, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M : Up-regulation of DELTA1 expression is required for goblet cell differentiation in human intestinal epithelial cells. **The 1st JSGE International Topic Conference -Stem Cells in Digestive Organs-** Sep 26, 2010, Kamakura, Japan
8. Zheng X, Tsuchiya K, Okamoto R, Okamoto E, Iwasaki M, Kano Yoshihito,

Nakamura T, Watanabe M: HES1 via notch signaling directly suppresses ATOH1/HATH1 gene transcription, resulting in the undifferentiated state of intestinal epithelial cells. **The 1st JSGE International Topic Conference -Stem Cells in Digestive Organs-** Sep 26, 2010, Kamakura, Japan

9. Murano T, Okamoto R, Shimizu H, Akiyama J, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: TNF- $\alpha$  and notch signaling synergistically up-regulate OLFM4 expression in human intestinal epithelial cells. **The 1st JSGE International Topic Conference -Stem Cells in Digestive Organs-** Sep 26, 2010, Kamakura, Japan

10. Tetsuya Nakamura (Invited speaker), Watanabe M: A long-term, fully-defined culture system for colonic epithelial cells that allows efficient expansion of stem cell compartment **The 1st JSGE International Topic Conference -Stem Cells in Digestive Organs-** Sep 25, 2010, Kamakura, Japan

11. Zheng X, Tsuchiya K, Okamoto R, Iwasaki M, Kano Y, Nakamura T, Watanabe M: Hes1 via Notch signaling directly suppresses Atoh1/Hath1 gene transcription, resulting in the goblet cell depletion of Ulcerative Colitis. **Digestive Disease Week 2010**, May 3, 2010, New Orleans, USA

12. Tetsuya Nakamura, Shiro Yui, Tomohiro Mizutani, Yasuhiro Nemoto, Ryuichi Okamoto, Kiichiro Tsuchiya, Shizuko Ichinose, and Mamoru Watanabe: A long-term, mesenchyme-free in vitro culture system of colonic epithelial cells retaining stem cell compartment with proliferation/differentiation properties. **Digestive Disease Week 2010**, May 1- 5, 2010, New Orleans, USA

13. Tsuchiya K, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: GSK3 inhibitor induces the intestinal differentiation by the protein stabilization of Atoh1. **Digestive Disease Week 2009**, Jun 2, 2009, Chicago, USA  
〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：大腸上皮幹細胞の単離・培養技術とこれを用いた大腸上皮移植技術

発明者：渡辺守・中村哲也

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学

種類：特願

番号：2011-236469

出願年月日：平成 23 年 10 月 27 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 哲也 (NAKAMURA TETSUYA)

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 寄附講座教員

研究者番号：70265809

(2) 研究分担者

渡辺 守 (WATANABE MAMORU)

東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 教授

研究者番号：10175127

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：