

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15918

研究課題名（和文）ヒト小腸・大腸運命決定因子の同定による人工的腸管長制御の開発

研究課題名（英文）Identification of Fate Determinants in Human Small and Large Intestine

研究代表者

日比谷 秀爾（Shuji, Hibiya）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：20801963

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では小腸と大腸の運命分岐機構を解明することで、小腸上皮の大腸化及び大腸上皮の小腸化を目指す。同一人物の小腸・大腸内視鏡検体及び小腸・大腸オルガノイドを駆使して小腸上皮と大腸上皮の差異を抽出し、分化制御に関連する運命分岐遺伝子を同定することを目的とした。既存生検検体や初代培養細胞を用いて解析をすすめ、小腸及び大腸に特異的に発現する遺伝子を抽出した。候補遺伝子について異なる人物由来の検体を用いて検討を行い、異なる人物間でも共通する候補遺伝子1個を同定している。同定した遺伝子に対して、大腸オルガノイドに対してlentivirusにて強制発現させ、小腸形質を獲得するか確認を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器再生に関するこれまでの研究は、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞から臓器を形成する、組織幹細胞から臓器に分化させる、ブタなど動物内にヒト臓器を作成する、などが検討されているが、一方でヒト体内に存在する臓器を別の臓器に転換するという概念を前提とした研究は少ない。本研究の成果により小腸と大腸への運命制御機構を解明することにより、ヒト体内臓器転換による機能補完という新規治療への概念を提唱することが期待できる。

研究成果の概要（英文）： This study aims to elucidate the mechanism of fate divergence between small and large intestine, and to convert small intestinal epithelium into colon and colonic epithelium by making full use of small and large intestinal endoscopic specimens and small and large intestinal organoids from the same individuals, and to identify fate branching genes related to the regulation of differentiation.

We analyzed existing biopsy specimens and primary cultured cells to extract genes specifically expressed in the small and large intestine. Candidate genes were examined using specimens from different individuals, and one candidate gene that was common among different individuals was identified. The identified gene is being forced to be expressed in colon organoids by lentivirus to see if it acquires the small intestinal trait.

研究分野：消化器内科学

キーワード：小腸大腸形質転換

## 1. 研究開始当初の背景

腸管は主に小腸と大腸に分類され、その機能も大きく異なる。小腸では主に栄養の消化・吸収を司り、小腸上皮細胞から抗菌物質を大量に産生することにより腸内細菌の量を抑制している。一方大腸においては水分を吸収し、便を貯留させるのみならず豊富な腸内細菌により生体恒常性に関わる腸内環境を維持している。しかしながら腸管が疾患などで切除されると、機能不全となりその機能の補完が必要となる。例えば、潰瘍性大腸炎や家族性大腸腺腫症などでは大腸を全摘出するが、便の貯留機能を喪失するため肛門側の小腸をパウチ状にして再建する。しかし、便貯留や水分吸収機能に乏しく便形状が維持できていないなどその機能は不十分である。小腸では全摘出では生命の維持ができず、クローン病などでの頻回の小腸切除において短腸症候群を引き起こす。つまり、腸管機能の補完が必要であるが、有効な治療法は存在しない。小腸では移植もまれに行われるが拒絶反応により生着率が低く、汎用性のある治療ではない。そこで小腸切除の際に、小腸を大腸化することで機能の補完が可能ではないかと着想した。

自己の大腸および小腸を形質転換することに機能を補完することが可能ではないかと考えた。特に、小腸と大腸における上皮細胞の構成細胞は異なることから小腸と大腸の機能差異は上皮細胞の依存が高いと思われる。しかし腸管上皮細胞の分化制御機構は小腸と大腸において共通の機構が多く、これまでの研究においても小腸と大腸を明確に区別して分化メカニズム差異を検討した報告は未だ少ない。腸管上皮幹細胞は CDX2 を発現することにより腸管上皮細胞への分化を運命づけられ、分泌系細胞への分化に Atoh1 が関与することは小腸と大腸の共通に認められる機構である。しかし小腸と大腸へ運命を決定的に分岐させる幹細胞メカニズムは不明である。粘膜再生の観点からは小腸及び大腸粘膜からそれぞれオルガノイドを樹立することは既に確立された手法であるが、臨床実用としてオルガノイドを培養・増殖させることや粘膜を移植する技術は未だ確立しておらず、実用化までの道のりが遠い。また iPS 細胞から小腸上皮細胞への樹立も行われているが、形質発現が不十分であり、大腸への分化は確立されていない。さらに腸管上皮細胞の培養を樹立しても他家移植の場合は拒絶反応による生着率の低下も懸念される。そこで、自己小腸及び大腸を形質転換することにより機能を補完することが可能ではと考えた。小腸・大腸間の形質転換については、大腸全摘後の小腸パウチでは経過により杯細胞が増加し大腸化することが知られている。また、潰瘍性大腸炎の大腸ではパネート細胞化生を認めるなど小腸形質を獲得していることから、実臨床においてもそれぞれ形質相互転換が可能であることを示唆している。そこで、学術的「問い」として、ヒト小腸上皮は大腸上皮に、大腸上皮は小腸上皮に転換可能か?となる。

## 2. 研究の目的

本研究ではヒト小腸・大腸上皮細胞の差異を明らかとし、形質・機能に關与する小腸・大腸特異的因子を同定することを目的として研究を行った。1) 同一人物由来の小腸・大腸検体から発現差異を認める遺伝子の抽出 2) 同一人物由来小腸・大腸オルガノイドから発現差異を認める遺伝子の抽出 を行った。

## 3. 研究の方法

本研究では、同一人物由来小腸・大腸検体及び小腸・大腸オルガノイドから特異的発現因子を同定し、オルガノイドにて機能検証を行い、小腸オルガノイドが大腸形質を獲得する因子、大腸オルガノイドが小腸形質を獲得する因子を同定するまでを明らかとする。

### 1) 同一人物由来の小腸・大腸検体から発現差異を認める遺伝子の抽出

当施設では以前より、小腸バルーン内視鏡による全消化管マッピング生検を行っており、同一人物の小腸、大腸検体を豊富に保存している。RNA later に保存している検体から RNA を抽出して小腸及び大腸のマイクロアレイ解析を行う。小腸及び大腸に特異的に発現する遺伝子を抽出する。

### 2) 同一人物由来小腸・大腸オルガノイドから発現差異を認める遺伝子の抽出

計画 1) と同時に、同一人物由来の小腸及び大腸からオルガノイドを樹立する。それぞれマイクロアレイ解析にて小腸・大腸オルガノイドに特異的に発現する遺伝子を抽出する。

#### 4 . 研究成果

バルーン内視鏡による全消化管マッピング生検を行っており、同一人物の小腸、大腸検体を豊富に保存している。保存検体を用いて、RNA 同一人物由来の小腸・大腸検体から発現差異を認める遺伝子の抽出を、内視鏡生検検体を用いて行った。 RNA later に保存している検体から RNA を抽出して小腸及び大腸のマイクロアレイ解析を行い、小腸及び大腸に特異的に発現する遺伝子を抽出した。また、樹立したオルガノイド細胞から抽出した検体についても遺伝子発現を検討した。結果、いくつかの小腸と大腸で異なる候補遺伝子が抽出され、まず候補遺伝子について異なる人物由来の検体を用いて検討を行い、異なる人物間でも共通する候補遺伝子 1 個を同定した。臨床検体を用いた免疫染色にて蛋白発現が小腸・大腸特異的か確認を行った。

今後、同定した遺伝子に対して、大腸オルガノイドに対して lentivirus にて強制発現させることにより小腸形質を獲得するか確認することを予定している

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Sho Watanabe, Shuji Hibiya, Nobuhiro Katsukura, Sayuki Kitagawa, Ayako Sato, Ryuichi Okamoto, Mamoru Watanabe, Kiichiro Tsuchiya	4. 巻 16
2. 論文標題 Importance of telomere shortening in the pathogenesis of ulcerative colitis: A new treatment from the aspect of telomeres in intestinal epithelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Crohn's and Colitis	6. 最初と最後の頁 109-121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ecco-jcc/jjab115	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 Ami Kawamoto, Kento Takenaka, Shuji Hibiya, Kazuo Ohtsuka, Ryuichi Okamoto, Mamoru Watanabe	4. 巻 20
2. 論文標題 Ami Kawamoto, Kento Takenaka, Shuji Hibiya, Kazuo Ohtsuka, Ryuichi Okamoto, Mamoru Watanabe	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 e1196-e1200
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cgh.2021.06.036	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 Kento Takenaka, Toshimitsu Fujii, Ami Kawamoto, Kohei Suzuki, Hiromichi Shimizu, Chiaki Maeyashiki, Osamu Yamaji, Maiko Motobayashi, Akira Igarashi, Ryoichi Hanazawa, Shuji Hibiya, Masakazu Nagahori, Eiko Saito, Ryuichi Okamoto, Kazuo Ohtsuka, Mamoru Watanabe	4. 巻 7
2. 論文標題 Deep neural network for video colonoscopy of ulcerative colitis: a cross-sectional study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Lancet Gastroenterol Hepatol	6. 最初と最後の頁 230-237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/S2468-1253(21)00372-1	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 Shuji Hibiya, Kazuo Ohtsuka, Kento Takenaka, Ami Kawamoto, Yusuke Matsuyama, Yumi Udagawa, Maiko Motobayashi, Hiromichi Shimizu, Toshimitsu Fujii, Eiko Saito, Masakazu Nagahori, Ryuichi Okamoto and Mamoru Watanabe	4. 巻 22
2. 論文標題 Mucosal healing of small intestinal stricture is associated with improved prognosis postdilation in Crohn's disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12876-022-02300-2	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0件

〔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
---------	---------