

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2010～2014

課題番号：22229005

研究課題名(和文)独自の培養技術を用いた大腸上皮細胞機能解析と臨床応用技術開発

研究課題名(英文) Designing and Developing Innovative Use of Newly Discovered Colonic Epithelial Culture Method Applicable to Clinical Medicine.

研究代表者

渡辺 守 (Watanabe, Mamoru)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：10175127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 152,600,000円

研究成果の概要(和文)：腸管上皮の再生機構を明らかにし、ヒト消化管再生医療に応用することが期待されている。正常な腸管上皮を体外で操作し解析することは技術的に困難とされていたことを背景とし、申請者・渡辺と分担者・中村は、正常マウス大腸由来上皮細胞を長期にわたり無血清培地中で3次元的に培養維持する画期的技術開発に着手し、かつ独自の大腸上皮幹細胞培養技術の応用を図り、「正常上皮細胞機能を解析すること」、「培養大腸上皮細胞の臨床応用技術基盤を確立すること」を目的とした。

研究成果の概要(英文)：It has been expected that the elucidation of the mechanism for the regenerative regulation of intestinal epithelial cells would be applied to the gastrointestinal regenerative medicine. It has however been technically impossible to assess the normal intestinal epithelial cells ex vivo. In this study, we therefore aimed to assess the function of normal intestinal epithelial cells and to establish the technical basis of clinical application for the primary culture of colonic epithelial cells by developing the long-term, serum-free, 3-dimensional culture system of mice normal colon.

研究分野：消化器病学

キーワード：幹細胞移植 再生医療 大腸炎創傷治療 大腸上皮 組織幹細胞 体外培養技術 細胞治療

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症性腸疾患 (IBD) に対する新規診断・治療法の確立は急務である。中でも、腸管上皮が増殖・分化のバランスを保ち再生するメカニズムを解析し、IBD における上皮異常の診断や新しい上皮再生促進治療に応用することが期待されている。しかしながらこれまでの腸管上皮研究は、ヒト組織や動物組織を用いた静的な解析、あるいは大腸癌由来株化細胞を用いた解析にとどまり、正常腸管上皮の増殖・分化のダイナミクスとこれに関わる分子機構を解析したものはほとんどない。このことは腸管上皮を体外で維持し、操作し、解析することが技術的に困難であったこと、すなわち正常腸管上皮細胞培養技術が未確立であったことに起因する。これら背景のもと申請者・渡辺と分担者・中村は、腸管、中でも特に大腸上皮細胞培養技術確立を目指したプロジェクトを開始し、3 年におよぶ検討の結果、正常マウス大腸由来上皮細胞を効率よく単離し、細胞外基質内での 3 次元環境において複数の因子を加えた特殊培地を使用することにより、きわめて純度の高いまま、数週間を超え、無血清培地中で、しかも継代操作を経て維持可能であるとの画期的知見を見出した。本プロジェクト進行中のごく最近、マウス小腸上皮が増殖・分化能を有したまま培養可能であることが海外のグループから発表され大きな注目を集めた (Nature 2009)。しかしながら我々は、報告された方法での大腸上皮培養は不可能であることをすでに確認しており、したがって、純化した大腸上皮を小腸上皮と異なる条件で培養する我々の技術が現時点で世界に例のない新規のものであると同時に、大腸上皮の増殖・分化制御が組織特異的制御のもとにあることを示す重要な知見と考えている。

つまり、本研究は我々が世界に先駆け独自に確立した正常大腸上皮培養技術をさらに発展させるものである。我々の用いる 3 次元培養法では、完全に閉鎖した単層細胞が嚢状構造を形成し、その増大を伴いながら細胞増殖を繰り返す。現在までに我々は、これら単層細胞が極性をもった大腸上皮細胞であること、増殖・分裂能をもつ細胞が含まれること、幹細胞マーカーあるいは分化マーカーを発現する種々の細胞が含まれることを見出している。したがって、本システムを用いて大腸上皮細胞の「機能解析」と「臨床応用技術確立」を図ることは現実的に可能である。本研究で得られる成果は、これまで不可能であった大腸上皮幹細胞の *in vitro* 操作を可能とし、正常大腸上皮の増殖・分化機構の解明に寄与するとともに、IBD を含むヒト疾患における上皮障害機構にも大きな知見を提供することが期待できる。また上皮細胞がもつ生体防御機能、

中でもサイトカイン産生、食餌抗原や微生物成分への応答、オートファジーを介する腸管上皮のバリアー機構などの詳細が明らかになり、IBD の病態に関わる上皮機能の重要性が一層明確になる。さらに、培養大腸上皮細胞を移植治療のリソースとして利用する技術、あるいは異なる個人から得られる培養細胞を利用し薬剤感受性試験や腸管上皮機能を個別に評価する技術開発が見込まれ、ヒト消化管疾患領域における再生医療およびオーダーメイド医療の進展にも大きなインパクトを与えるものである。

2. 研究の目的

本研究ではこの独自の先端技術を応用し、(1) 培養大腸上皮を用いて「上皮細胞機能の詳細を解析」すること、(2) および「培養大腸上皮細胞の臨床応用技術基盤を確立」することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 大腸上皮細胞機能解析

幹細胞単離・培養技術の確立

現時点で我々が用いる培養法では、大腸上皮幹細胞に加え複数の分化系列細胞を含む細胞群が培養される。ここでは、このうち特に幹細胞のみを選択的に培養・維持しうる条件を確立する。

a) 幹細胞可視化のためのレポーターウイルスシステム構築

大腸幹細胞マーカー遺伝子である *Lgr5* 遺伝子プロモーター下流に EGFP を配したレポーター遺伝子を作成し、レンチウイルスベクターを用いて培養大腸上皮細胞に導入することで幹細胞可視化システムを構築する。

b) レポーターウイルス導入細胞を用いた幹細胞単離・培養技術確立

上記幹細胞可視化システムを利用し、幹細胞のみの培養維持法を確立するため、蛋白因子・低分子化合物、細胞外基質 (蛋白・ペプチドを含む) 培養環境の工夫 (低酸素培養など) の各々につき、大規模なスクリーニングを集中的におこなう。

大腸上皮による生体防御機構解析

大腸上皮細胞が有する生体防御機構を明らかにする目的で、特に培養大腸上皮細胞を用いたオートファジー解析に焦点をあてる。

a) 培養大腸上皮細胞におけるオートファジー関連分子発現解析

マイクロアレイ、*in situ* hybridization、免疫染色法などを組合せ、大腸上皮細胞におけるオートファジー関連分子発現を、細胞分化形質との関連とともに明らかにする。

b) 培養大腸上皮細胞における抗菌物質産生制御解析

大腸上皮細胞での抗菌物質産生プロファイルを明らかにする。これら因子の発現・分泌誘導機構を飢餓・酸化ストレス・細菌成分添加等の条件で検討する。また、すでに作成済

みである腸管特異オートファジー欠損マウス(ATG5欠損)を利用し、抗菌物質発現に対する影響を比較解析する。

(2) 培養大腸上皮細胞の臨床応用技術開発
臨床応用技術開発として掲げた複数の項目のうち、初年度においては、「培養大腸上皮細胞を用いた大腸炎に対する細胞移入治療の基礎検討」、および「ヒト大腸上皮細胞培養技術確立」を集中的におこなう。

培養大腸上皮細胞を用いた細胞治療の基礎検討

すでに所有するEGFPトランスジェニックマウスの大腸上皮細胞をin vitroで培養し大量に調整する。DSS腸炎などの腸炎モデルマウスへ移入し、培養大腸上皮細胞のレシピエント腸管での生着、生存、増殖能を評価する。細胞移入経路(注腸など)、量、回数、時期などによる移植効率を解析する。また、個体レベルでの腸炎改善効果につき評価を行う。

ヒト大腸上皮細胞培養技術確立

臨床応用技術開発のため、手術検体あるいは内視鏡検体より得られる大腸上皮細胞を長期にわたって培養しうる条件を明らかにする。マウス細胞の培養技術確立時に得られた知見に基づき、用いるリコンビナント蛋白・細胞外基質、培養環境の組合せにつき集中して検討をおこなう。さらに、今後の臨床応用を考慮して、血清および血清由来因子の排除を最優先し、低分子化合物の添加を中心とした培養条件を探索する。

4. 研究成果

(1) 大腸上皮細胞機能解析

幹細胞単離・培養技術の確立

正常マウス大腸上皮の長期培養技術の確立に成功した。マウス大腸クリプトをコラーゲンゲルに包埋し、複数の蛋白因子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。さらに継代操作により1年を超す長期培養が可能であった。本法はTMDU法(Tokyo Medical and Dental University Protocol)としてNature Medicineに成果を公表し、Nature, Scienceで紹介されるなど世界的に大きな評価を得た。この培養技術を駆使して培養オルガノイドの性状を解析した。培養オルガノイドが単層上皮細胞から形成され、すべての終末分化細胞とKI67陽性未分化細胞を含むことが明らかになった。継代による長期培養後もオルガノイドの性状に変化はなく、染色体数は正常であった。

a) 幹細胞可視化のためのレポーターウイルスシステム構築

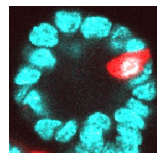
まず、Lgr5レポーター導入マウスを用いて本培養を行い、大腸オルガノイドにおけるLgr5+上皮幹細胞の増加を確認した。RT-PCR、およびライブイメージング実験により、Lgr5陽性大腸上皮幹細胞の著増を認めた。また、セクレターゼ阻害剤によるNotch

シグナル阻害で幹細胞から杯細胞への分化が促進されることから、培養幹細胞が生体内と類似した機構を介して自己複製能と分化能を維持することが示された。

レンチウイルスによる遺伝子導入法も確立し、現在Lgr5レポーター-GFP遺伝子を組み込んだレンチウイルスを作成し導入を開始している。

b) レポーターウイルス導入細胞を用いた幹細胞単離・培養技術確立

小腸オルガノイドにレンチウイルスにてmCherry蛍光遺伝子を導入したところ、幹細胞を含んだ一部の細胞のみ蛍光を認めた。長期培養にて陰窩内に1細胞のみ蛍光を認め、継時的な追跡にてそれぞれの上皮細胞に分化することから1幹細胞の可視化に成功しその成果を公表した。(上図)

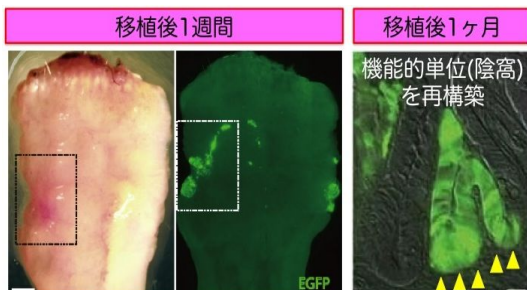


大腸上皮による生体防御機構解析

まず、オートファジー機能を解析するため、腸管上皮細胞特異的にオートファジー機能(ATG5)が欠損するマウスを作成した。この小腸上皮を同様に初代培養し、オルガノイドの機能を解析したところ、菌体成分であるFlagellin添加によりATG5欠損オルガノイドではケモカイン産生の過剰応答を認めた。これは、クローン病の疾患感受性遺伝子とも関連することから上皮細胞における腸内細菌の過剰応答が炎上惹起の原因であることが示唆された。今後、大腸オルガノイドにおいても同様の解析を予定している。

(2) 培養大腸上皮細胞の臨床応用技術開発

培養大腸上皮細胞を用いた細胞治療の基礎検討においては、EGFP tg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。その結果ドナー由来細胞が、まずは傷害部上皮を主に平坦な面として被覆し、移植1ヶ月後には全ての分化細胞と増殖細胞を本来の位置に有する正常なクリプト構造を持つ大腸上皮を構築しうることを明らかにした。(下図)



さらに単一の大腸上皮幹細胞に由来する培養細胞移植での大腸上皮再生を試みた。本培養法により、ただ1個のLgr5+大腸上皮幹細胞から大腸上皮細胞を大量に増やすことに成功し、単一Lgr5+細胞由来の培養大腸上皮を用いた移植によっても、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、移植半年経過後もドナー由来幹細胞が正常な幹細胞として移植片内で機能することが明らかとなった。

この移植系を応用させマウス胎児期の腸管上皮幹細胞が出生直後に成人上皮幹細胞へ運命変換することを明らかとし(Cell Stem Cell)、幹細胞の運命決定機構が生体恒常性と連動することを世界で初めて示した。

また、移植効率をさらに向上させるため、腸炎モデルを改善させ、特定の部位に全周性に粘膜欠損作成し、小腸上皮細胞の大腸移植にも成功している。Adult マウスの小腸では大腸環境でも小腸の細胞、絨毛構造を維持することも新しい知見として報告している。

ヒト大腸上皮細胞培養技術確立

倫理審査承認のもとインフォームドコンセントを行い同意の得られた患者の内視鏡生検検体からヒト大腸上皮を単離し、培養条件の検討を行った。その結果小腸上皮、大腸上皮とも内視鏡検体、手術検体からの初代培養に成功し、長期間における継代培養も可能としている。小腸内視鏡など本邦で開発された最先端の内視鏡技術を駆使し、現在では同一人物の小腸、大腸の同時培養にも成功しており、消化管全体の評価が可能となっている。また、大腸ポリープ、大腸がん、炎症性腸疾患などの難治性消化管疾患患者からの培養も開始しており、病態解明、再生医療への基盤を構築することに成功している。

以上より本研究で示した独自の腸管上皮幹細胞培養・増幅技術は、「体内で大腸上皮を再生できる真の大腸上皮幹細胞」を体内での性質やふるまいにきわめて近い状態のまま体外で詳しく調べる有用なツールとして汎用され、本研究領域の進展を加速できる。また、培養幹細胞の移植によって傷害された腸管上皮が修復・再生可能であるとの本研究成果は、培養腸管上皮幹細胞を用いる再生医療技術が理論的に可能であることを示す重要な基礎知見になるものと考えられる。さらに、たった一つの幹細胞から増やした細胞の移植で大腸上皮を再生できるとの本研究成果は、さまざまな原因で生じる消化管上皮傷害を、同じひとの健康部分から採取したわずかな腸管上皮幹細胞を体外で大量に増やし、広範囲の傷害上皮を治療するという、iPS 細胞や ES 細胞による再生医療とは異なる視点に立った再生医療技術の開発に重要な知見を提供するものと期待される。

実際、ヒト内視鏡で得る微小生検検体から大腸上皮細胞を培養する手法も確立しており、傷害腸管への自己細胞移植の技術基盤として「Adult Tissue Stem Cell Therapy」の実現性が高いと考える。

また、異なる個人から得る内視鏡検体から培養した細胞により、腸がもつ吸収、排泄、分化、ホルモン産生などの解析は、腸疾患のみならず生活習慣病、老化などに対する新しい個別化診断・治療法へ応用できる可能性をもつ。日本における内視鏡の有利な点を利用

することで、この技術が汎用性のある技術として広汎な関連分野は波及することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 50 件)

Fukuda M, Mizutani T, Mochizuki W, Matsumoto T, Nozaki K, Sakamaki Y, Ichinose S, Okada Y, Tanaka T, Watanabe M, Nakamura T: Small intestinal stem cell identity is maintained with functional paneth cells in heterotopically grafted epithelium onto colon. *Genes Dev.* 28: 1752-1757, 2014. 査読有.
DOI: 10.1101/gad.245233.114.

Fordham RP, Yui S, Hannan NRF, Madgwick A, Vallier L, Pedersen RA, Nakamura T, Watanabe M, Jensen KB: Transplantation of expanded fetal intestinal progenitors contributes to colon regeneration after injury. *Cell Stem Cell.* 13: 734-744, 2013. 査読有.
DOI: 10.1016/j.stem.2013.09.015.

Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Clevers H, Watanabe M: Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell. *Nat Med.* 18: 618-623, 2012. 査読有.
DOI: 10.1038/nm.2695.

〔学会発表〕(計 10 件)

Watanabe M: Challenges of IBD in Asia - Stem cell therapy .APDW2014, 2014 年 11 月 23 日, Bali (Indonesia) .

Watanabe M: Stem cell transplantation in IBD, are we there yet? TSIBD2014, 2014 年 11 月 8 日, Kaohsiung (Taiwan) .

Watanabe M: Novel Therapies for Inflammatory Bowel Disease Stem cell therapy: what, when, and how? SIDDS2014, 2014 年 10 月 27 日, Seoul (Korea) .

Watanabe M: Gut as a second brain to regulate human whole body? Cluster Lectures, 2014 年 10 月 14 日, Hamburg (Germany) .

Watanabe M: Stem cell as a promising target for IBD: From the bench to the

bedside. AOCC2014, 2014年6月20日,
Seoul (Korea) .

Watanabe M, Yoshimura N, Motoya S,
Tominaga K, Iwakiri R, Watanabe K,
Hibi T: AJM300, an oral α 4 integrin
antagonist, for active ulcerative
colitis: a multicenter, randomized,
doubleblind, placebo-controlled
phase 2a study. DDW2014, 2014年5月
4日, Chicago (U.S.A) .

Watanabe M: JGF Marshal & Warren
Lecture: Adult tissue stem cell
therapy for gastrointestinal
diseases. GASTRO 2013, 2013年9月23
日, Shanghai (China) .

Watanabe M: Colonic Stem Cell Culture
and Transplantation-Application in
Mucosal Immunology. ICMI 2013, 2013
年7月19日, Vancouver (Canada) .

Watanabe M: State-of-the-Art
lecture: Stem cell therapy in IBD?
Falk Symposium 2013, 2013年6月8日,
Stuttgart (Germany) .

Watanabe M: Stem Cells. Meet the
Investigator-Luncheons in DDW2012,
2012年5月22日, San Diego (U.S.A) .

〔産業財産権〕

取得状況 (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：東京医科歯科大学
種類：特許
番号：W02013/061608 A1
出願年月日：2011年10月27日
取得年月日：2013年5月2日
国内外の別：国際

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

中村哲也 (NAKAMURA TETSUYA)
東京医科歯科大学医歯学総合研究科・教授
研究者番号：70265809

(3) 連携研究者

()
研究者番号：