

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 1 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20851

研究課題名（和文）炎症性腸疾患の腸上皮障害・再生反復モデルを用いた再生制御機構の解析

研究課題名（英文）Investigating Human Intestinal Epithelial Regeneration with a Novel 2D Culture Model

研究代表者

藤井 悟（Fujii, Satoru）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・プロジェクト助教

研究者番号：00964751

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：マウス大腸上皮細胞で確立したair-liquid interface (ALI) 培養法を応用し、患者由来ヒト大腸上皮細胞を用いたALI培養法を確立した。培地条件を検討することで、恒常状態のヒト大腸上皮細胞に類似した円柱上皮を再現可能な培養条件を見出した。ALI培養開始時の細胞は扁平状であり、潰瘍性大腸炎の炎症部でしばしば見られる扁平化上皮細胞を再現していると考えられた。扁平状の培養細胞の遺伝子発現パターンは、潰瘍性大腸炎の炎症大腸上皮や胎児期の腸粘膜の遺伝子発現パターンと類似していることを確認した。この培養系をさらに応用することで、炎症性腸疾患の病態解明や新規治療法開発への貢献が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸上皮細胞の3次元培養法が初めて報告されて以降、3次元培養法は腸上皮細胞の生理機能や腸疾患の病態の解明、および新規治療薬の開発等に大きな貢献をしてきた。しかし、従来の3次元培養法では炎症性腸疾患で繰り返される「傷害 再生 治癒」過程を再現することは困難であった。それに対し、我々が開発した2次元培養モデルは、ヒト腸粘膜の「傷害 再生 治癒」過程を再現し、その過程を経時的に解析することも可能である。よって、この培養モデルをさらに応用することで、ヒト腸上皮の再生メカニズムの解明が期待されるだけでなく、炎症性腸疾患の病態解明、新規診断法や治療法の開発等にも貢献できると期待される。

研究成果の概要（英文）：We established an air-liquid interface (ALI) culture method for patient-derived human colonic epithelial cells by adapting a technique originally developed for mouse colonic epithelial cells. Through optimization of the culture medium, we identified conditions that can replicate the columnar epithelium characteristic of normal human colonic epithelial cells. At the start of ALI culture, the cells exhibited a flattened morphology, similar to the flattened epithelial cells frequently observed in inflamed regions of ulcerative colitis. Furthermore, we confirmed that the gene expression patterns of these flattened cultured cells were comparable to those of inflamed colonic epithelium in ulcerative colitis and fetal intestinal mucosa. Further application of this culture system holds promise to expand our understanding of the pathogenesis of inflammatory bowel disease and to develop new therapeutic approaches.

研究分野：消化器内科学

キーワード：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。

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患は腸管に慢性炎症と潰瘍を起こす難病の一つであり、同疾患の発病要因は未だ不明である。寛解と再燃を繰り返すことが特徴で、その過程で腸管の最表面を覆う腸管上皮細胞は「傷害 再生 治癒」過程を繰り返し経験している。しかし、炎症性腸疾患患者の腸管内で、再生・治癒がどのように制御されているかは未だ不明である。

2. 研究の目的

研究代表者らは炎症性腸疾患における腸上皮機能の役割に着目し、患者由来ヒト腸上皮細胞の3次元培養技術を用いた独自の病態解明研究を展開してきた。しかしながら、従来の3次元培養法では腸上皮細胞の「傷害 再生 治癒」過程を再現するのは困難であるため、新しい培養モデルの構築が望まれていた。そこで研究代表者らは、気管支上皮細胞の培養で用いられている air liquid interface (ALI) 培養技術を応用し、マウス大腸上皮細胞の恒常状態、および、炎症性腸疾患の疑似モデルであるマウス DSS 腸炎の「傷害 再生 治癒」過程を in vitro で再現することに成功した。そして、傷害時の細胞は各種分化マーカーの発現が低下すると共に、胎児期遺伝子群を高発現すること(細胞の「胎児化」)を見出した。

本研究では、マウス細胞用に樹立された2次元培養法を患者由来ヒト大腸上皮細胞用に最適化し、恒常状態のヒト大腸上皮の細胞形態を再現すると共に、「傷害 再生 治癒」過程を in vitro で反復可能な新規2次元培養モデルの構築を試みる。その結果として、炎症性腸疾患患者の腸上皮再生・治癒がどのように制御されているかの解明を目指す。

3. 研究の方法

1) ヒト大腸上皮細胞の新規2次元培養モデルの確立

マウスとヒトの大腸上皮3次元培養では、必要な培養因子が異なる。すなわち、マウス大腸上皮の3次元培養には Wnt3a、Rspodin、Noggin の3種類のタンパクが必須であるのに対し、ヒトの場合は、これらのタンパクに加え、Rock 阻害剤と TGF 阻害剤の添加が必須である。これらの差異に着目しながら、マウス大腸上皮細胞を用いて確立した2次元培養法を、患者由来ヒト大腸上皮細胞用に最適化する。患者由来ヒト大腸上皮細胞は、所属研究室が保有するライブラリを使用する。組織学的解析、免疫組織学的解析、遺伝子発現解析等を用いて、培養細胞の評価を行う。

2) 患者由来大腸上皮細胞の再生過程と「胎児化」の関連性の解明

傷害時と恒常状態の細胞形態・遺伝子発現パターンを再現可能な培養条件を設定し、それぞれの培養細胞を比較解析することで、傷害時から恒常状態へと細胞が経時的に変化していく過程を、組織学的解析および遺伝子発現解析などを用いて評価する。各種分化マーカーや胎児期遺伝子の発現変化を解析すると共に、Gene Set Enrichment 解析 (GESA) などを用いて各培養条件における遺伝子発現パターンの特徴を明らかにする。最終的には患者由来大腸上皮細胞の再生過程と細胞の「胎児化」の関連性を解明することを目指す。

4. 研究成果

1) ヒト大腸上皮細胞の新規2次元培養モデルの確立

マウス大腸上皮細胞で確立した ALI 培養法を応用し、患者由来ヒト大腸上皮細胞の ALI 培養法の条件検討を行った。3次元培養法で用いる培地条件 (Wnt3a、Rspodin、Noggin、Rock 阻害剤、TGF 阻害剤) と比較し、Rock 阻害剤と TGF 阻害剤を除いた培地条件の方が、ヒト大腸上皮の in vivo 形態に近いことを見出した。また、マウス細胞は in vivo 形態と類似した円柱上皮構造になるのに14日以上培養日数を要したのに対し、ヒト細胞はより短い期間で円柱上皮構造を呈することが分かった。組織学的解析、免疫組織学的解析、電子顕微鏡による解析を通じて、成熟した吸収上皮細胞、杯細胞、腸内分泌細胞が自律的に誘導されることを確認した。また RNA シークエンスによる網羅的遺伝子発現解析でも、in vivo の正常大腸上皮細胞に似た遺伝子発現パターンを呈することを確認した。

2)患者由来大腸上皮細胞の再生過程と「胎児化」の関連性の解明

マウス大腸上皮の ALI 培養と同様に、ALI 培養開始時のヒト大腸上皮細胞は扁平状であり、潰瘍性大腸炎の炎症部でしばしば見られる扁平化上皮細胞を再現していると考えられた。GSEA を用いた解析によって、扁平状の培養細胞は潰瘍性大腸炎の炎症粘膜の遺伝子発現パターンと類似した遺伝子を発現していることが明らかとなった。また、いくつかの胎児期に特異的な遺伝子を高発現していることを確認すると共に、GSEA による解析でも、扁平化した培養細胞は胎児期上皮と同様な遺伝子発現パターンを示すことを確認した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1 . 著者名 Satoru Fujii, Yi Wang, Shanshan Meng, Ryan J. Musich, Scott T. Espenschied, Kevin Newhall, Yi Han, Shuhei Sekiguchi, Ryoma Matsumoto, Matthew A. Ciorba, L. David Sibley, Ryuichi Okamoto, Thaddeus S. Stappenbeck	4 . 巻 NA
2 . 論文標題 Long-Term Monolayer Cultivation Captures Homeostatic and Regenerative Features of Human Colonic Epithelial Cells	5 . 発行年 2024年
3 . 雑誌名 bioRxiv	6 . 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2024.01.01.573838	査読の有無 無
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 該当する

〔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
---------	---------