

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591857

研究課題名(和文) マウス、ヒト食道の *in vitro* 長期臓器培養法の確立

研究課題名(英文) Intestinal epithelial culture under an air-liquid interface

研究代表者

横堀 武彦 (Yokobori, Takehiko)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60420098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では Ootani らが報告したマウス小腸管幹細胞培養の手法が食道扁平上皮でも応用可能かを検証することが目的であった。その結果、本研究で用いた培養手技によりマウス食道を *in vitro* で長期間培養することが可能であった。ヒト食道はマウスと同様の培養メディウムでは培養できなかったが、メディウムを ES 細胞培養メディウムに変更することで 30 日間、増殖能を保った状態で培養が可能であり、形態学的に食道扁平上皮粘膜層、ケラチンを *in vitro* で形成していた。現時点で得られたマウス、ヒト食道 *in vitro* 培養手技の確立に関する論文を作成し現在、国際英文雑誌に投稿中である。

研究成果の概要(英文)：Our study led to two new findings: (1) The intestinal epithelial culture method of Ootani et al. (Nat Med. 2009 Jun;15(6):701-706) can be applied to mouse and human esophageal cultures. (2) Esophageal organoids are rod-like luminal structures lined with fibroblasts, and regeneration of the esophageal mucosal surface can be almost completely achieved *in vitro*. The method described in the generation of long-term cultures of human esophageal cells without the need for gene transfer for immortalization. Due to autologous myofibroblasts from a collected specimen are used as a niche, feeder cells are not required for plating. In addition, the matrix gel, in which cells are embedded, and the culture medium are commercially available. These merits are important for clinical application of our method. Therefore, we believe that this new method has the potential to be an important tool to advance research in intestinal biology, carcinogenesis, and regenerative medicine in both mice and humans.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：食道 再生 培養

1. 研究開始当初の背景

食道は重層扁平上皮細胞からなる管腔臓器であり、手術、炎症、誤飲、内視鏡治療などの粘膜損傷後に狭窄を来すことがある。特に早期食道癌に対して近年、内視鏡的粘膜下層切除術 (ESD ; endoscopic submucosal resection) が積極的に行われるが、全周性または亜全周性の食道癌のESD後に難治性の狭窄を来すことは臨床的に問題である。そのような食道狭窄の予防のために食道粘膜の再生技術の進歩、臨床応用に期待が集まっている。

一方、腸上皮 (小腸、大腸) は5-7日のターンオーバーで急速に自己複製する臓器であり、その自己複製能は陰窩底部に存在するLgr5+細胞が腸管幹細胞として機能することで保たれていることが明らかとなった。しかし腸管幹細胞が同定できても *in vitro* では腸管細胞の分化能、増殖能を維持することは容易ではなく、その培養システムの構築に多くの試みがなされてきた。その最大の問題点は腸管ニッチから取り除かれた腸管上皮は数時間以内に急速なアポトーシスを誘導され元の腸管上皮形態を維持することはできないことある。そのため、従来は腸管細胞の形態を保ったまま分化能、増殖能を維持する *in vitro* 培養法は困難と考えられていた。

2009年、Ootaniらはマウス小腸、大腸の腸管幹細胞を *in vitro* で培養維持することが可能であることを明らかにした(Ootani et al. Nature med. 2009)。この培養法の特徴は大きく2つあり、1つ目は腸管ニッチとして機能する筋線維芽細胞と腸管を一緒に3次元培養すること、2つ目は幹細胞シグナルとして注目されているWntのアゴニストであるRSPO-1を投与することである。この培養

技術をヒト食道再生技術に応用し、臨床応用することができれば、ESD後の狭窄予防や難治性食道狭窄に対する画期的な治療ツールとなることが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的はOotaniらによって報告されたマウス小腸・大腸の *in vitro* 長期培養法が小腸・大腸ではない管腔臓器のマウス食道に応用可能か、その手法がヒト食道にも応用可能か、以上の2点を明らかにすることである。この研究によりヒト食道再生、食道疾患モデル研究が *in vitro* において飛躍的に進歩し、将来的に再生臓器を臨床応用するための重要な基礎データになりうると考えている。

3. 研究の方法

3-1 マウス食道の採取、plating、培養手技の確立

- 1) 生後2日以内のマウスから重層扁平上皮である食道、前胃を採取する、
- 2) 清潔な培養皿、ハサミを用いて採取した腸管をペースト状になるまで細かくし、腸管幹細胞と腸管ニッチ (筋線維芽細胞) を一緒にマトリゲルに包埋する。その際、細胞を混ぜたマトリゲルを下面がメッシュ構造のチャンバー (innder dish) に plating する。
- 3) Culture medium (F12 medium + 20% FBS + antibiotics) を outer dish に加え培養する。

3-2 培養食道の形態、分化能、増殖能の評価

マウス食道を上記の手法で長期培養したあとは

扁平上皮の形態を保っているかを検証

免疫染色を用いて分化能、増殖能、上皮マーカー発現、幹細胞マーカー発現を

検証

3 - 3 ヒト食道での in vitro 培養法の確立

1) ヒト正常食道粘膜の採取、plating、培養手技の確立

ヒト食道癌手術検体から正常食道を採取し、マウスと同様の手技で培養する。その際にマウスと同様の medium では長期培養が困難であったため ES 細胞培養 medium に変更した。

2) 培養食道の形態、分化能、増殖能の評価

扁平上皮の形態を保っているかを検証

免疫染色を用いて分化能、増殖能、上皮マーカー発現、幹細胞マーカー発現を検証

4 . 研究成果

1) マウス食道を用いて in vitro 腸管培養法を施行した結果、キノコ型のオルガノイドを形成し、内腔は扁平上皮、ケラチンが存在。

2) 食道癌手術検体の正常食道を用いて in vitro ヒト食道培養を施行したがマウスと同様の手技ではオルガノイドの維持、成長は困難であった。

3) マウス用メディウムを ES 細胞用培養メディウムに変更した結果、ヒト食道オルガノイドは 1 か月間成長を続けた。またその形態はマウスと同様にキノコ型で内腔には扁平上皮、ケラチンが存在し食道粘膜の形態を維持していた。

上記研究成果を以下に示す学会で発表、報告

してきた。また、本研究の手法を応用し食道癌、肺癌における癌細胞株における遺伝子機能解析実験を行いその成果も報告している。

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 5件)
(下記すべて査読あり)

1. **Yokobori T**, Yokoyama Y, Mogi A, Endoh H, Altan B, Kosaka T, Yamaki E, Yajima T, Tomizawa K, Azuma Y, Onozato R, Miyazaki T, **Tanaka S**, **Kuwano H**. FBXW7 mediates chemotherapeutic sensitivity and prognosis in NSCLCs. Mol Cancer Res. 2014 Jan;12(1):32-7.

2. Altan B, **Yokobori T**, Mochiki E, Ohno T, Ogata K, Ogawa A, Yanai M, Kobayashi T, Luvsandagva B, Asao T, **Kuwano H**. Nuclear karyopherin- α 2 expression in primary lesions and metastatic lymph nodes was associated with poor prognosis and progression in gastric cancer. Carcinogenesis. 2013 Oct;34(10):2314-21.

3. **Yokobori T**, Suzuki S, **Tanaka N**, **Inose T**, Sohda M, Sano A, Sakai M, Nakajima M, **Miyazaki T**, Kato H, **Kuwano H**. MiR-150 is associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma via targeting the EMT inducer ZEB1. Cancer Sci. 2013 Jan;104(1):48-54.

4. **Yokobori T**, Mimori K, Iwatsuki M, Ishii H, Tanaka F, Sato T, Toh H, Sudo T, Iwaya T, Tanaka Y, Onoyama I, **Kuwano H**, Nakayama KI, Mori M. Copy number loss of FBXW7 is related to gene

expression and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. Int J Oncol. 2012 Jul;41(1):253-9.

5. Hadisaputri YE, Miyazaki T, Suzuki S, **Yokobori T**, Kobayashi T, Tanaka N, Inose T, Sohda M, Kuwano H. TNFAIP8 overexpression: clinical relevance to esophageal squamous cell carcinoma. Ann Surg Oncol. 2012 Jul;19 Suppl 3:S589-96.

〔学会発表〕(計 4件)

1. 発表代表者：横堀武彦
食道の *in vitro* 培養法・マウスへの移植手
技確立にむけて
第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014
年 4 月 3 日 5 日 京都

2. 発表代表者：横堀武彦
マウス肺組織の *in vitro* 培養法、移植法の
確立にむけて
第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013
年 4 月 11 日 13 日 福岡

3. 発表代表者：横堀武彦
マウス、ヒト食道組織の *in vitro* 培養法の
確立 - 先進的再生医療にむけて -
第 112 回日本外科学会定期学術集会 2012
年 4 月 12 日 14 日 幕張 シンポジウム

4. 発表代表者：横堀武彦
食道組織の *in vitro* 培養
第 8 回日本消化管学会 2012 年 2 月 10 日
11 日 仙台 シンポジウム

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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
なし

6. 研究組織
(1)研究代表者
横堀 武彦 (YOKOBORI TAKEHIKO)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60420098

(2)研究分担者
宮崎 達也 (MIYAZAKI TATSUYA)
群馬大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70372349

田中 成岳 (TANAKA NARITAKA)
群馬大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30546726

桑野 博行 (KUWANO HIROYUKI)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90186560

猪瀬 崇徳 (INOSE TAKANORI)
群馬大学・医学部・助教
研究者番号：90609968

(3)連携研究者
()

研究者番号：