

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390186

研究課題名(和文) 培養大腸上皮幹細胞を用いた再生医療技術基盤の確立

研究課題名(英文) Epithelial regeneration by transplantation of cultured intestinal stem cells

研究代表者

中村 哲也 (Nakamura, Tetsuya)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・寄附講座教授

研究者番号：70265809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腸管上皮幹細胞移植による傷害腸管粘膜修復の基盤技術を確立することを目的とした。その結果、簡便で安定した新規の大腸粘膜傷害レシピエントマウスモデルを確立した。キレート剤処理と機械刺激で遠位大腸に局限した上皮剥離が生じる本モデルを利用し、上皮のrestitutionや陰窩再生など大腸粘膜修復過程の経時変化をとらえることが可能となった。また、本法と組合せた培養上皮細胞移植にも成功し、培養した小腸上皮細胞を異所性に大腸に移植した際の挙動を観察することも可能となった。本研究成果は論文発表、学術会議における発表およびプレス発表を通じ、積極的に社会へ発信した。

研究成果の概要(英文)：To develop stem cell therapy for human intestinal diseases, it is essential to assess whether intestinal stem cells in culture retain their tissue regeneration capabilities. During the term of this grant support, we developed a new mouse recipient model of colonic mucosal injury, which allows us to assess the time-course changes and behaviors of transplanted stem cells. By combining the cell transplantation technique developed in our laboratory, we investigated whether cultured intestinal stem cells are capable of regenerating epithelia in vivo, and how they behave when transplanted onto the colon. We found that stem cells of the adult colon and small intestine and also epithelial progenitors of the fetal small intestine are all capable of reconstituting self-renewing epithelia when transplanted. This study provides evidence that cultured intestinal stem cells could be a source for cell therapy of intestinal diseases.

研究分野：消化器内科学

キーワード：消化管再生医療 腸管上皮幹細胞 幹細胞移植

1. 研究開始当初の背景

重篤な炎症性腸疾患や放射線腸炎における上皮再生不全、あるいは内視鏡的粘膜切除術に伴う粘膜損傷など、上皮再生を促進するための新技術が期待される消化管疾患は多いものの、組織幹細胞を利用した再生医療の試みは例がない。

申請者は消化管、特に大腸の上皮細胞に焦点をあて研究を展開する中で、正常なマウスから大腸幹細胞を単離し、維持し、増やすための培養技術を新規に確立した。そして、本法で得られる培養細胞が再び体内に戻っても、生体内で正常な大腸上皮組織を再構築可能であることを示した (Nat Med 2012)。

このことを受け、これら成果を実際の再生医療へ応用するために、移植細胞が傷害上皮を修復する機構を解析すること、あるいは細胞移植治療効率を高める手法を開発することなど、さらなる研究の展開が期待されることとなった。

2. 研究の目的

上記を背景とし、培養した腸管上皮幹細胞移植による腸管再生医療のための基盤研究をおこなうことを目的とした。このために、(1)新規上皮傷害動物モデル作成とこれを用いた移植片生着効率評価技術の確立、2)生着効率を最大限に高める移植方法の解析を推進することとした。(1)においては、物理化学刺激によりきわめて「短時間に」、「一定範囲に限局する」上皮障害を惹起することで、生体内における大腸上皮再生を時間的・空間的にコントロール可能な動物モデルを作成し、これを用いて移植片の生着が定量的に評価可能なシステムを構築することを目指した。2)では1)のモデルを利用し、幹細胞移植のタイミング、移植時の細胞接着促進技術、移植細胞の生存促進手法を詳細に検討することとした。

3. 研究の方法

(1)新しい上皮傷害動物モデル作成

これまでに確立したDSS (Dextran Sodium Sulfate)大腸炎マウスモデルをレシピエントとする移植実験系に加え、新規の移植実験システムの構築を目指した。さまざまな薬剤、デバイスを組合せた工夫をおこなうことで、細胞移植が可能で、簡便で再現性を有するマウスモデルの開発を目指した。また、かかる新規モデルの作成後には、本モデルにおける大腸粘膜修復過程の経時変化について、組織学的、分子生物学的解析を加えることとした。

(2)生着効率の高い移植方法の検討

(1)で作成する大腸上皮傷害動物モデルを用いて、最大限に移植生着効率を高めるための検討を計画した。すなわち、動物内視鏡観

察による移植片生着評価法を利用し、移植のタイミングが生着に与える影響や、移植細胞の量と生着面積の相関、移植細胞の調整方法による生着効率の変化などを解析することとした。

4. 研究成果

キレート剤であるEDTAの高濃度溶液の短時間注腸、およびこれに続く機械的粘膜剥離術により、遠位大腸にのみ限局性に上皮傷害をきたす新規の大腸粘膜モデルを確立できた。本モデルは、今後大腸上皮修復機構を経時的に解析するのに有用な手法となることが期待される。また、本モデルマウスをレシピエントとする細胞移植実験を構築し、培養上皮幹細胞が組織再生に寄与することを、新規のモデルにおいても示すことが出来た。さらにこの際、移植の適切なタイミングが明らかになるなど、移植生着の成績向上に関わる条件も明らかにできた。移植細胞の量と生着面積の相関、移植細胞の調整方法による生着効率の変化については、現在も継続した解析が続いている。また、蛍光蛋白で標識された移植細胞を、レシピエントを生かしたまま動物内視鏡観察で観察し経時的に評価する手法も確立できたことから、今後の移植片生着評価技術がさらに進むものと考えられる。

これら研究成果は、組織幹細胞を体外で増やし、これを移植することで正常な腸管上皮機能を取り戻すための再生医療の発展に重要な知見を提供するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

1. 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 the colon. **Genes Dev.** 28(16): 1752-1757: 2014. doi: 10.1101/gad.245233.114. 査読有
2. Fordham RP, Yui S, Hannan NRF, Søndergaard C, Madgwick A, Schweiger PJ, Nielsen OH, 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(6): 734-744: 2013. doi: 10.1016/j.stem.2013.09.015. 査読有

[学会発表](計20件)

1. 中村哲也. 培養細胞移植実験を利用する腸管上皮幹細胞解析. **第14回日本再生医療学会**. 2015年3月19日. パシフィ

- コ横浜、横浜
2. 中村哲也. 培養・移植技術を利用する正常腸上皮幹細胞解析. **In vitro 培養系を用いた上皮管腔構造の解析検討会**. 2014年11月28日. 浜松町センタービル、東京
 3. 中村哲也. 培養細胞移植マウスモデルを用いる腸管上皮幹細胞解析. **第8回 In Vivo 実験医学シンポジウム**. 2014年11月13日. 学士会館、東京
 4. 中村哲也. 培養消化管上皮幹細胞の移植と組織再生. **第87回日本生化学会大会**. 2014年10月18日. 京都国際会館、京都
 5. 中村哲也. 培養腸管上皮幹細胞移植と組織再生. **第73回日本癌学会学術総会**. 2014年9月26日. パシフィコ横浜、横浜
 6. Fukuda M, Mizutani T, Mochizuki W, Matsumoto T, Nozaki K, Ichinose S, Watanabe M, Nakamura T. Successful Engraftment of Cultured Small Intestinal Epithelial Stem Cells onto Damaged Colonic Mucosa by Heterotopic Transplantation. **ISSCR 12th annual meeting**. 2014年6月19日.バンクーバー、カナダ
 7. Mizutani T, Fukuda M, Mochizuki W, Matsumoto T, Nozaki K, Ichinose S, Watanabe M, Nakamura T. Successful Engraftment of Cultured Small Intestinal Epithelial Stem Cells onto Damaged Colonic Mucosa by Heterotopic Transplantation. **Digestive Disease Week 2014**. 2014年5月3日. シカゴ、米国
 8. 中村哲也・渡辺守. 培養腸管上皮細胞移植における幹細胞の挙動. **第100回日本消化器病学会総会**. 2014年4月25日. 東京フォーラム、東京
 9. 中村哲也. 培養上皮幹細胞を用いた消化管再生医療の可能性. **第87回日本内分沁学会学術総会**. 2014年4月25日. 福岡国際会議場、福岡
 10. 中村哲也. 組織幹細胞を用いた消化管上皮再生. **第34回日本炎症・再生医学会**. 2013年7月2日. 京都国際会館、京都
 11. Nakamura T. Epithelial regeneration by cultured colonic cells expanded from a single adult Lgr5+ stem cell. **1st International Meeting for Epithelial Tubulology**. 2013年6月22日. 北海道大学、札幌
 12. 中村哲也・渡辺守. 培養大腸上皮細胞による消化管再生へのアプローチ. **第99回日本消化器病学会総会**. 2013年3月23日. 城山観光ホテル、鹿児島
 13. 中村哲也. 培養上皮幹細胞による消化管再生医療の可能性. **第12回日本再生医療学会総会**. 2013年3月22日. パシフィコ横浜、横浜
 14. Nakamura T. Adult Stem Cell Therapy for Gastrointestinal Epithelial Repair. CSI (Cancer Science Institute of Singapore) Seminar. 2013年1月28日. シンガポール、シンガポール
 15. Nakamura T. Successful engraftment of colonic epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell. **9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress. 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes**. 2012年11月27日. 京都国際会館、京都
 16. 中村哲也. 腸管上皮培養技術の進歩 -腸管再生医療とひろがる応用技術-. **東京大学医科学研究所 GCOE 特別セミナー**. 2012年10月24日. 東京大学医科学研究所、東京
 17. 中村哲也. 体外培養した腸管上皮幹細胞による大腸上皮傷害の修復. **日本臨床免疫学会総会**. 2012年9月27日. 慶應ブライザホテル、東京
 18. Nakamura T. Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell. **James W. Freston Single Topic Conference: Gastrointestinal Stem Cell Biology and Pathobiology**. 2012年8月27日. シカゴ、米国
 19. Nakamura T, Yui S, 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. **ISSCR 10th annual meeting**. 2012年6月15日. パシフィコ横浜、横浜
 20. 中村哲也・渡辺守. 単一幹細胞からの大腸上皮大量培養と細胞移植による大腸上皮再生. **第98回日本消化器病学会総会**. 2012年4月19日. 京王ブライザホテル、東京
- 〔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: 中村哲也・渡辺守
権利者: 国立大学法人東京医科歯科大学
種類: PCT 国際出願
番号:
国際出願番号: PCT/JP2012/006897
国際公開番号: W02013/061608
出願年月日:

出願日：2012/10/26（移行日：2014/4/17）
国内外の別：米国、欧州（イギリス、フランス、ドイツ、イタリア）、日本

取得状況（計0件）
なし

〔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・寄附講座教授
研究者番号：70265809

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし