

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670106

研究課題名(和文)小腸・大腸上皮境界維持機構と分化転換機構の解明

研究課題名(英文) Intestinal epithelial stem cells and their regional identity along the gastrointestinal tract

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では小腸-大腸境界における上皮接合境界維持機構を解析した。このために、培養した成体由来小腸上皮幹細胞を大腸組織に異所性に移植する実験システムを構築し、得られた異所性小腸移植片を組織学的および分子生物学的手法を用いて解析した。その結果、成体由来小腸幹細胞が大腸内で上皮組織を再生可能であること、小腸移植片は小腸型吸収上皮細胞、パネート細胞など固有の分化細胞を維持し続けること、さらには移植片組織が形態的にも小腸に特有な絨毛-陰窩構造を形成しうることを見いだした。これらの知見は、成体における上皮境界形成や小腸固有の上皮形質維持が上皮内因性にプログラムされる可能性を示す重要なものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：During development, intestinal epithelia undergo maturation and are specified into distinct phenotypes that share common features but have many unique functions. Although the small and large intestine form a continuous tube and share similar developmental origins, how their regional identity in adults are morphologically and functionally maintained remains unclear. By employing the cell transplantation technique that we developed, we have investigated how adult small intestinal epithelial stem cells (SCs) behave when transplanted onto the colon. We show that cultured murine small intestinal SCs are able to reconstitute self-renewing epithelia in the colon. When stably integrated, the small intestine-derived grafts show many features unique only to the small intestine, but distinct from the colonic epithelium. Our study provides evidence that adult intestinal SCs are able to maintain their identity along the gastrointestinal tract through an epithelium-intrinsic mechanism.

研究分野：消化器内科学

キーワード：腸上皮幹細胞 小腸上皮 大腸上皮 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

消化管は、頭尾軸に沿って食道・胃・小腸・大腸と明瞭な区分を有する複数の臓器から構成される。各々の臓器の領域境界は、発生過程における胚葉間相互作用や体節形成因子の複雑な関与を経て完成し、生後は変化することなく維持されることが知られている。管腔の最内側に配列する各々の臓器の上皮細胞は、区域(臓器)依存性の物質輸送機能や内分泌機能を介し消化管機能に重要な役割を担うことが知られるものの、頭尾軸に沿う上皮細胞が形態的および機能的にその固有性を維持する機構は未だ十分理解されていない。

2. 研究の目的

本研究では、これまで腸管上皮研究を推進してきた申請者が有する技術と知見を基礎とし、消化管上皮境界維持機構、その中でも特に小腸-大腸境界における上皮接合境界での固有性維持機構を解析することを目的とした。

申請者は、これまでに正常マウスから腸管上皮幹細胞を単離し培養する技術を新規に確立し、本法で得られる培養細胞が、再び体内に戻った際に正常上皮組織を再構築できることを明らかにした(Nat Med 2012)。また海外のグループと共同し、胎生期の小腸上皮由来細胞を大腸へ移植することでも生着が得られること、さらにこの場合には小腸由来細胞が大腸組織に適応し、一部大腸上皮の形質を獲得しうることを見いだした。本研究ではこの成果をさらに発展させ、成体マウスより単離・培養した小腸上皮細胞をマウス大腸に異所移植すること、そしてその際の移植片の詳細な解析をおこなうことを目的とした。

具体的には(1)小腸上皮の大腸移植モデルにおける小腸上皮の挙動を詳細に検討し、(2)かかる小腸-大腸境界維持因子の人為的操作による分化転換機構を解明することを目指すこととした。

3. 研究の方法

これまでの研究に利用してきた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、本研究ではまず新規の移植実験システムの構築を目指した。すなわちさまざまな薬剤、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レシピエントマウスモデルの開発をおこなった。また、この新規の腸上皮細胞移植マウスモデルを用い、これに培養した成体由来小腸上皮細胞を移植する実験系を構築した。得られた異所性小腸移植片の粘膜修復過程や、小

腸に固有の分子発現の経時変化について、電子顕微鏡観察、免疫染色、in situ hybridization法を含む組織学的解析、およびレーザーキャプチャーマイクロディセクション法とマイクロアレイ解析を含む分子生物学的解析をおこなった。

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による大腸粘膜処理、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傷害モデルを作成した。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、培養した小腸上皮幹細胞を異所性に大腸に生着させることに成功した。

上記の結果、成体由来の培養小腸幹細胞が大腸組織内で正常な上皮組織を再生可能であることがわかった。また小腸移植片は、移植後4週あるいは4ヶ月の時点においても、小腸型吸収上皮細胞、パネート細胞など小腸に固有の分化細胞を維持し続けることがわかった。このことは、移植片から上皮組織のみを単離し、発現遺伝子群を解析したマイクロアレイの結果でも支持された。さらに、移植片上皮組織は、形態的にも小腸に特有な絨毛-陰窩構造を形成することも明らかとなった。これらの知見は、胎生期小腸上皮細胞を移植した際に見られた上皮の可塑性を示すデータときわめて異なるものであり、したがって、成体における小腸-大腸上皮境界形成には非上皮組織からの誘導シグナルは不要であること、そして小腸および大腸の固有の上皮形質や機能は上皮内因性にプログラムされることを示す重要な成果であると考えた。

本研究で得られた結果は、すでに国際的学術誌に掲載し、また多くの学術会議やプレス発表を通じて公表するなど、成果の公表も積極的におこなった。

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13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回日本内分泌学会学術総会**. 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

〔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