

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670372

研究課題名(和文) 大動物を用いた腸管上皮幹細胞の移植技術確立

研究課題名(英文) Establishment of transplantation therapy using intestinal stem cells for large animals.

研究代表者

佐藤 俊朗 (Sato, Toshiro)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：70365245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：炎症腸疾患は慢性腸管炎症を特徴とする疾患であり、免疫統御療法によって治療されている。最近、粘膜治癒が長期寛解を予測する治療ゴールとなっているが、粘膜再生治療の効果については十分な検証がなされていない。我々は新しく開発されたオルガノイド培養技術を利用し、大動物を用いた粘膜再生治療の確立を試みた。大動物飼育施設を利用し、飼育ブタより内視鏡的に採取したサンプルよりオルガノイドを樹立し、上皮損傷後のブタ腸管粘膜への内視鏡的な移植を行った。オルガノイドは7-10日間の生着が内視鏡的に確認された。さらなる移植技術の最適化により、炎症性腸疾患への粘膜再生治療の実現を目指したい。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory bowel disease is characterized by chronic mucosal inflammation and mainly treated with immunomodulatory reagents. Recently it was found that mucosal healing is a therapeutic goal to predict long-term remission. Nonetheless, there is little evidence of efficacy for mucosal regenerative therapy. We developed a novel intestinal stem cell culture system, in which isolated stem cells form stereotypic organoid structures for long-term. Using this technology, we attempted to establish mucosal regenerative therapy for large animals. Taking advantage of our large animal facility, we established pig organoids from endoscopic biopsy specimens. The pig intestinal organoids were endoscopically transplanted on the epithelium-removed mucosa and engraft for 7-10 days. Further optimization may lead realization of regenerative medicine for inflammatory bowel disease.

研究分野：下部消化管学

キーワード：腸管上皮細胞 粘膜再生治療

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患の患者数は日本国内で 10 万人以上であり、その大部分を占める潰瘍性大腸炎は若年者を中心に近年増加傾向にある。近年の免疫統御療法の発展により、従来の治療に抵抗性の潰瘍性大腸炎に対しても、白血球除去療法や免疫抑制剤であるサイクロスポリン A などの投与により病勢をコントロールすることが可能となった。しかしながら、これらの免疫統御療法にも抵抗性を示し、大腸全摘術を施行せざるを得ない難治例の数は減っておらず、このような難治症例に対する治療方法が課題となっている。申請者の研究室は、こうした難治例では粘膜再生障害が遷延していることを見出し、腸管上皮バリアーの破綻が腸内抗原や細菌の粘膜内への侵入と炎症の難治化を引き起こしていると考えた。引き起こされた炎症はさらに腸管上皮細胞の増殖抑制による粘膜再生障害につながり、悪循環となっている。このような悪循環を断ち切るために、腸管上皮幹細胞治療による粘膜再生治療が期待される。

2. 研究の目的

申請者らは世界で初めてマウス腸管上皮幹細胞培養を確立し (Sato T et al. Nature 2009)、腸管上皮幹細胞の微小環境による幹細胞維持機構を解明した (Sato T et al. Nature 2009)。こうした技術を応用し、マウス腸炎モデルに対して培養腸管上皮幹細胞の移植に成功し、治療効果を有することを見出した (Yui S et al. Nature Medicine 2012)。申請者らはヒト腸管上皮幹細胞培養の技術開発 (Sato T et al. Gastroenterology 2011, Jung P, Sato T et al. Nature Medicine 2011)。また、腸管傷害時の幹細胞動態や腸管上皮幹細胞の遺伝子改変技術確立など、周辺技術の開発に成功した (van Es, Sato T et al. Nature Cell Biology 2012, Koo BK et al. Nature Methods 2011)。本研究では粘膜再生治療の臨床応用の最終ステップである大

動物を用いた内視鏡的腸管上皮幹細胞移植技術の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 大動物より内視鏡的に採取した腸管上皮細胞の培養技術確立

マウス・ヒトの腸管上皮細胞培養に準じ、大動物 (ブタ) から採取した腸管上皮細胞培養技術を確立する。既に、マウス・ヒト腸管上皮細胞に対して成功しているウィルスベクターによる蛍光標識をブタ培養腸管上皮細胞に対して行う (Koo BK et al Nature Method 2011)。

(2) 大動物を用いた内視鏡による腸管粘膜傷害と培養腸管上皮細胞の移植技術の確立

我々はマウスに対し、培養腸管上皮細胞の移植技術を開発した (Yui S et al. Nature Medicine 2012)。ただし、大動物に対する腸管粘膜傷害モデルは報告されておらず、本研究ではまず、内視鏡を用いた粘膜傷害モデルの最適化を行う。内視鏡的粘膜切除術、内視鏡ヒートプローブによる焼却、化学物質による粘膜傷害などを試み、オルガノイドの生着に最適な傷害モデルを検討する。マウスと異なり、ブタでは同種移植によっても拒絶反応があるため、本研究は自家移植を用いる。このため、内視鏡的に粘膜採取したブタを飼育し、同一のブタに対し、粘膜傷害を行い、移植する必要がある。従って、粘膜傷害はブタの長期生存に耐えうるものである必要がある。

4. 研究成果

ブタ大腸より腸管上皮を採取し、オルガノイドの樹立に成功した。樹立したオルガノイドは GFP 標識を行い、AFI 内視鏡にてドナー GFP オルガノイドの蛍光を確認できた。内視鏡的オルガノイド移植のため、内視鏡的な粘膜傷害モデルを作製し、生検バイオプシーによる傷害に移植効率が高いことを確認した。移植オルガノイドは生着が確認でき、内視鏡的な再生医療の実現のための大動物実験に

よる Proof of Concept を推進することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

- 1) Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, Sato T. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med*. 2015 Mar;21(3):256-62. doi: 10.1038/nm.3802. Epub 2015 Feb 23. 【査読有】
- 2) Simmini S, Bialecka M, Huch M, Kester L, van de Wetering M, Sato T, Beck F, van Oudenaarden A, Clevers H, Deschamps J. Transformation of intestinal stem cells into gastric stem cells on loss of transcription factor Cdx2. *Nat Commun*. 2014 Dec 11;5:5728. doi: 10.1038/ncomms6728. 【査読有】
- 3) Mizuno S, Mikami Y, Kamada N, Handa T, Hayashi A, Sato T, Matsuoka K, Matano M, Ohta Y, Sugita A, Koganei K, Sahara R, Takazoe M, Hisamatsu T, Kanai T. Cross-talk between ROR t+ innate lymphoid cells and intestinal macrophages induces mucosal IL-22 production in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2014 Aug;20(8):1426-34. doi: 10.1097/MIB.000000000000105. 【査読有】
- 4) Fujii M, Sato T. Culturing intestinal stem cells: applications for colorectal cancer research. *Front Genet*. 2014 Jun 5;5:169. doi: 10.3389/fgene.2014.00169. 【査読有】
- 5) Ohta Y, Sato T. Intestinal tumor in a dish. *Front Med (Lausanne)*. 2014 May 30;1:14. doi: 10.3389/fmed.2014.00014. eCollection 2014. 【査読有】
- 6) Nakaya T, Ogawa S, Manabe I, Tanaka M, Sanada M, Sato T, Taketo MM, Nakao K, Clevers H, Fukayama M, Kuroda M, Nagai R. KLF5 regulates the integrity and oncogenicity of intestinal stem cells. *Cancer Res*. 2014 ;74(10):2882-91. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2574. 【査読有】
- 7) *Huch M#, Bonfanti P#, Boj SF#, Sato T#, Loomans CJ, van de Wetering M, Sojoodi M, Li VS, Schuijers J, Gracanin A, Ringnalda F, Begthel H, Hamer K, Mulder J, van Es JH, de Koning E, Vries RG, Heimberg H, Clevers H. Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. *EMBO J*. 2013 Oct 16;32(20):2708-21. #Equal authorship doi: 10.1038/emboj.2013.204. 【査読有】
- 8) Hayashi A, Sato T, Kamada N, Mikami Y, Matsuoka K, Hisamatsu T, Hibi T, Roers A, Yagita H, Ohteki T, Yoshimura A, Kanai T. A single strain of *Clostridium butyricum* induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute experimental colitis in mice. *Cell Host Microbe*. 2013 12;13:711-22. doi: 10.1016/j.chom.2013.05.013. 【査読有】
- 9) Sato T, Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: eCollection 2014. Review.

mechanism and applications. Science. 2013;340:1190-4. doi: 10.1126/science.1234852. 【査読有】

- 10) Sato T, Clevers H. Primary mouse small intestinal epithelial cell cultures. Methods in Molecular Biology. 2013;945:319-28. doi: 10.1007/978-1-62703-125-7_19. 【査読有】

〔学会発表〕(計 16 件)

- 1) 佐藤俊朗. 腸管上皮幹細胞のニッチ制御機構. 第 14 回日本再生医療学会総会. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市). 2015 年 3 月 19 日
- 2) 佐藤俊朗. 大腸オルガノイド培養系の大腸がん研究へのインパクト. Recent Advance in Tumor Angiogenesis 2015. グランドホテル浜松(静岡県浜松市). 2015 年 1 月 24 日
- 3) Toshiro Sato. The impact of intestinal Organoid culture system on colorectal cancer research. Paradigm shift in colorectal cancer research. 第 73 回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市). 2014 年 9 月 26 日
- 4) Toshiro Sato. Establishment and Applications of Intestinal Stem Cell Culture system; Stem Cell Niche and Cancer. The 33rd Sapporo International Cancer Symposium. Royton Sposso, Sapporo, Japan 2014. 6.27.
- 5) 佐藤俊朗, 太田悠木 細胞外環境による腸管上皮幹細胞制御とがん化機構. Basic Science 4. 第 14 回日本抗加齢医学会総会. 大阪国際会議場(大阪府大阪市). 2014 年 6 月 8 日.
- 6) Toshiro Sato, Yuki Ohta, Ai Takano, Shoichi Date, Mamiko Matano, Mariko Shimokawa. The Self-renewing Mechanism of Intestinal Stem Cell: Niche and Cancer, Symposium 2. 47th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists and Asia Pacific Developmental Biology Network, WINK AICHI, Nagoya, Japan 2014. 5.28.
- 7) Toshiro Sato. Establishment and Applications of Intestinal Stem Cell Culture System. Invited Lecture. Annual International Workshop on Mucosal Immunology and Vaccine for Young Investigators. Organized by The Institute of Medical Science, The University of Tokyo(東京都文京区). 2014. 5.23.
- 8) 佐藤俊朗, Hans Clevers, 金井隆典, 消化管上皮幹細胞培養の基盤と応用. シンポジウム 1, 消化管幹細胞研究の新たな展開. 第 100 回日本消化器病学会総会. 東京国際フォーラム, 東京. 2014 年 4 月 25 日
- 9) 佐藤俊朗, 南木康作, 藤井正幸, 武下達矢, 中里圭宏, 清野隆史, 高野愛, 股野麻未, 下川真理子, 伊達昌一, 太田悠木, 金井隆典. ゲノム編集技術による体外における人工的な大腸がんの再構築. 第 21 回浜名湖シンポジウム. アクトシティ浜松(静岡県浜松市). 2013 年 12 月 21 日
- 10) Toshiro Sato. Molecular mechanism of intestinal stem cell self-renewal: Stem cells and their niche signals. The graduate course in Molecular and Developmental Biology, Cincinnati. U.S.A. 2013.11.13
- 11) Toshiro Sato. Molecular mechanism of intestinal stem cell self-renewal: Stem cells and their niche signals. University of Michigan Center for

- Organogenesis Seminar.
Michigan,U.S.A.2013.11.12
- 12) Toshiro Sato, Ai Takano, Shoichi Date, Mami, Matano, Mariko Shimokawa, Takanori Kanai. Molecular mechanism of intestinal carcinogenesis; Stem cells and their niche signals. Symposia 12, Aberrant signal transduction and therapeutic strategy for molecular target. 第72回日本癌学会学術総会.パシフィコ横浜(神奈川県横浜市). 2013年10月3日
- 13) Toshiro Sato, Mami Matano, Shoichi Date, Ai Takano, Mariko Shimokawa. Molecular mechanism of intestinal stem cell self-renewal:Stem cells and their niche signals. International Symposium 3. Molecular mechanisms for the growth and differentiation of tissue-specific stem cells in mammals. 第86回日本生化学会大会.パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).2013年9月11日
- 14) Toshiro Sato. Establishment of intestinal stem cell culture: basic and application. European Cancer Stem Cells Research meeting. Cardiff Univ. UK Invited Speaker 2013.7.25
- 15) Toshiro Sato. Establishment of patient-derived colorectal cancer/adenoma organoid culture system: an application to tubulology. 1st International Meeting for Epithelial Tubulology (Sapporo)Japan 2013.6.22
- 16) Toshiro Sato. Long-term culture system for human intestinal stem cells and cancer. Methods Workshop: Stem Cells, Enteroids and Organoids: A New Era for In Vitro Models of the

Intestine. American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2013. Philadelphia,U.S.A. 2013.4.6

〔図書〕(計5件)

- 1) 佐藤俊朗. Wnt シグナルによる消化器上皮幹細胞制御. 中外医学社 Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌. 2014:152-155
- 2) 南木康作, 藤井正幸, 佐藤俊朗. 腸の再生機構. 幹細胞研究と再生医療. 中内啓光編. 南江堂 2013年 p61-68
- 3) 股野麻未, 佐藤俊朗. 南江堂 大腸がん幹細胞の機能解析法. がん基盤生物学-革新的シーズ育成に向けて- 清木元治編 2013年 p42-45
- 4) 佐藤俊朗. Wnt シグナルを利用した消化器組織再生技術“オルガノイド培養”の開発. 学研メディカル秀潤社 細胞工学 2013;32:421-424
- 5) 佐藤俊朗. 腸管上皮幹細胞ニッチによる幹細胞制御機構. 先端医学社 分子消化器病 2013;10:17-21

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

- (1)研究代表者
佐藤 俊朗 (Toshiro Sato)
慶應義塾大学・医学部・特任准教授
研究者番号: 70365245
- (2)研究分担者
なし
- (3)連携研究者
なし