

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：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860524

研究課題名(和文)動物由来因子を使用しないヒト大腸幹細胞培養技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of a xeno-free primary culture method for human colonic epithelial stem cells

研究代表者

水谷 知裕 (MIZUTANI, Tomohiro)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・特任助教

研究者番号：80632588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：内視鏡検体より得たヒト大腸上皮細胞を長期に培養しうる技術を確立した。さらに、培養因子であるリコンビナント蛋白のGMP規格化を進め、全ての培養因子を再生医療での使用を想定したGMP規格への置換に成功した。また、幹細胞増殖に寄与する低分子化合物を添加することで、一定期間の培養が可能となる条件を見いだした。加えて、既存の大腸上皮培養幹細胞移植モデルを発展させ、新規移植モデルを作成し報告した。これらの成果は、動物由来因子を使用しないヒト大腸培養幹細胞による消化管上皮再生医療の実現の基盤技術となるのみならず、今後さらに再生医療実現に向け活発化する多分野における基盤的知見となる研究成果と考える。

研究成果の概要(英文)：We have developed a novel culture method for human colonic epithelial cells that allows long-term maintenance and efficient expansion of stem cells in vitro from tiny biopsy specimens. The factors used in this method were successfully replaced to GMP (Good Manufacturing Practice)-grade recombinant proteins designed to use for clinical regenerative medicine. We also refined the transplantation method for colonic epithelial cells onto colon and developed a new method for epithelial cell transplantation. With this method, we found that cultured small intestinal cells could be heterotopically engrafted onto the colon, which means that the method would be a good model for cultured human colonic cell transplantation. These results would be of significant help to build a basis for regenerative medicine using cultured human colonic epithelial stem cells.

研究分野：消化器内科学

キーワード：腸管上皮培養 低分子化合物 GMP規格 再生医療

1. 研究開始当初の背景

重篤な炎症性腸疾患、放射線腸炎に見られる上皮再生不全、あるいは内視鏡的粘膜切除術に伴う粘膜損傷などに対し、腸管上皮幹細胞を体外で増やし、傷害臓器へ移入し、正常な消化管機能を取り戻すための再生医療技術に期待が寄せられている。しかしながら、再生研究が目覚ましい近年においても、体外幹細胞培養技術を利用した組織再生医療は、一部の限られた臓器や組織での利用にとどまるのみであり、細胞治療による腸管上皮再生の試みはその基礎解析も十分ではない。

申請者のグループは、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、マウス大腸幹細胞の体外培養技術を新規に確立した。さらにこの培養細胞を再び生体内に戻しても、正常大腸上皮組織を再構築しうることを世界に先駆けて報告した (Nature Medicine 2012)。この成果により、腸管上皮幹細胞を体外で増やし、再生医療に用いる技術に期待が寄せられることとなった。再生医療への応用が現実化するなかで、ヒト大腸上皮幹細胞においても、その培養方法を確立するとともに、その一切の過程において動物由来因子を使用しない細胞調製方法を確立するなど、実臨床に則した培養技術への研究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、本研究ではヒト大腸上皮幹細胞培養法を確立するとともに、臨床応用を視野に入れた、より安全で効率的な培養細胞調整法を確立することを目的とした。このために、(1) 既存の方法に比較し、より高い効率で、より多くの幹細胞を増やしうるヒト大腸上皮幹細胞培養技術を確立すること、さらに(2) 単離から培養に至る一切の過程において動物由来因子を全く使用しない培養法を確立すること、とした。

(1)においては、既に確立したマウス腸管上皮培養法を応用し、内視鏡下生検検体より得られるヒト大腸組織から効率の良い上皮幹細胞の単離、培養条件を見出すことを目指した。(2)では(1)で確立した培養法を元に、臨床使用を前提とした、動物由来因子を一切含まない培養法を検討することとした。また、確立された培養法の早期臨床応用への検討として、培養因子の GMP 規格化も検討する。

3. 研究の方法

(1)ヒト大腸上皮幹細胞培養法の最適化

内視鏡検体より得られるヒト大腸上皮細胞を長期培養しうる技術に関する基礎知見は既に得ている。これを最適化するために、用いるリコンビナント蛋白・細胞外基質、培養環境の組合せ・濃度などにつき集中して検討をおこなう。この検討により確立した培養技術は、一定数の臨床検体を用いて検討を重ね、多様な個々のヒト大腸組織からでも安定

して一定期間培養可能であることを目指す。さらに、既知の幹細胞分子マーカーの解析により、in situ hybridization 法を用いて、培養細胞における幹細胞数増加を定量的に評価しうる手法を確立する。

(2)動物由来因子を含まないヒト大腸上皮幹細胞培養法の樹立

既に確立したマウス大腸上皮幹細胞培養法を用いた基礎検討を行う。マウス大腸上皮幹細胞の体外での維持には、Wnt シグナル・Notch シグナル刺激および BMP シグナル阻害が重要であることが知られる。各シグナル経路のアゴニスト・アンタゴニストとして作用する低分子化合物(Nature Biotechnology 2004)の添加が培養細胞に及ぼす影響を、細胞生存、幹細胞数、分化細胞数を指標に検討を行う。この結果に基づき、ヒト大腸上皮幹細胞培養においてもリコンビナント蛋白に代替して細胞増殖に寄与する化合物の条件を見出す。この検討と並行して、1)で得られた培養条件における培養因子の GMP 規格化を検討する。加えて、培養ヒト大腸上皮幹細胞が組織再構築能を有するか否かの検証を、独自に有する上皮幹細胞の移植システムを用いてマウスへの異種移植実験をおこなう。このために、レシピエントマウスにおける大腸上皮傷害モデルの作製を行う。

4. 研究成果

内視鏡生検検体よりヒト大腸上皮細胞を効率良く単離し、長期に培養しうる技術を新規に確立した。既に得られている培養の基礎知見に基づき、用いる増殖因子としてのリコンビナント蛋白の組み合わせ、濃度などを最適化した。さらに既存の細胞培養に用いられる様々な細胞外基質を検討し、ヒト大腸上皮培養に最適と考えられる基質を見いだした。これにより、多様な患者から得られるヒト大腸組織を用いても、安定した大腸上皮幹細胞培養が施行可能となった。また、ヒト腸管上皮における幹細胞の分子マーカーとして知られる OLFM4 に着目し、ヒト腸管上皮培養細胞において in situ hybridization 法を用いた発現評価を可能とした。これにより、培養環境におけるヒト大腸上皮幹細胞集団の解析が可能となった。また、低分子化合物を利用したマウス大腸上皮培養を行なった。既に培養法を確立しているマウス大腸幹細胞培養法を用いて、幹細胞増殖に必要なシグナル経路を基に選択された種々の低分子化合物を添加して、培養に寄与しうるかを検討した。Wnt シグナル増強、BMP シグナル阻害作用を有する低分子化合物を添加することで、リコンビナント蛋白の添加を必要とせず一定期間の培養が可能となる条件を見いだした。この結果に基づき、ヒト大腸上皮培養においてもリコンビナント蛋白の添加を必要とせず一定期間の培養が可能となる条件を見いだした。さらに、上述の培養に最適

化したりコンピナント蛋白の GMP 規格化を進め、培養中に添加する全ての因子に関して、再生医療での使用を想定した GMP 規格への置換に成功した。これらの成果から、GMP 規格化培養因子と今回見出した低分子化合物の組み合わせにより、より強力に臨床使用を想定した培養細胞を増殖させる条件を見出す可能性が期待できるものと考えられる。

また、申請者のグループが以前より取り組んできた大腸上皮培養幹細胞移植モデル (Nature Medicine 2012) を発展させ、新規移植モデルを作成し報告した (Genes Dev. 2014)。この技術は、既存の移植モデルと比較して、より簡便に多様なレシピエントマウスへの移植実験を可能にすることが想定されるため、今後培養したヒト大腸上皮幹細胞をマウスへと移植する、異種移植モデルの実現がより容易になることが期待される。

以上の成果は、動物由来因子を使用しないヒト大腸幹細胞培養技術の実現に必須の基盤技術であり、腸管上皮幹細胞を再生医療に用いる技術の根幹を形成するのみならず、今後さらに再生医療実現に向け活発化する多分野における基盤的知見となる研究成果と考える。

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)

1. Horita N, Tsuchiya K, Hayashi R, Fukushima K, Hibiya S, Fukuda M, Kano Y, Mizutani T, Nemoto Y, Yui S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M. Fluorescent labelling of intestinal epithelial cells reveals independent long-lived intestinal stem cells in a crypt. **Biochem Biophys Res Commun.** 454(4):493-499. doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.091. 2014 査読有
2. 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):1752-7. doi: 10.1101/gad.245233.114. 2014 査読有 (*equal contribution)
3. Shimizu H, Okamoto R, Ito G, Fujii S, Nakata T, Suzuki K, Murano T, Mizutani T, Tsuchiya K, Nakamura T,

Hozumi K, Watanabe M. Distinct expression patterns of Notch ligands, Dll1 and Dll4, in normal and inflamed mice intestine. **PeerJ.** 2:e370. doi: 10.7717/peerj.370. 2014 査読有

4. Murano T, Okamoto R, Ito G, Nakata T, Hibiya S, Shimizu H, Fujii S, Kano Y, Mizutani T, Yui S, Akiyama-Morio J, Nemoto Y, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M. Hes1 promotes the IL-22-mediated antimicrobial response by enhancing STAT3-dependent transcription in human intestinal epithelial cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 443(3):840-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.061. 2014 査読有
5. Ito G, Okamoto R, Murano T, Shimizu H, Fujii S, Nakata T, Mizutani T, Yui S, Akiyama-Morio J, Nemoto Y, Okada E, Araki A, Ohtsuka K, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M. Lineage-specific expression of bestrophin-2 and bestrophin-4 in human intestinal epithelial cells. **PLoS One.** 8(11):e79693. doi: 10.1371/journal.pone.0079693. 2013 査読有

[学会発表](計 2 件)

1. 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
2. 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

[図書](計 1 件)

1. 水谷知裕, 中村哲也, 福田将義, 渡辺守
腸管上皮幹細胞と培養上皮幹細胞を利用した移植技術
実験医学増刊 Vol.33 No.2 「再生医療 2015

幹細胞と疾患 iPS 細胞の研究最前線」羊土社
2015

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）
なし

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

水谷 知裕 (MIZUTANI, Tomohiro)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・特任助教
研究者番号：80632588

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし