

一般財団法人日本産業科学研究所 令和元年度研究助成
研究成果報告書

研究課題名：独自のオルガノイド移植を用いる腸上皮-非上皮相互作用解析
Study on Functional Interaction between Epithelial and Non-Epithelial
Components of the Intestine Based on Heterotopic Intestinal Organoid
Transplantation Methodology
研究代表者：中村 哲也
所属・職名：順天堂大学医学研究科 オルガノイド開発研究講座 特任教授

【研究背景および目的】

小腸や大腸の多彩な機能には、管腔側に並ぶ上皮組織が主要な役割を果たす。近年、腸上皮を体外培養で増やす『オルガノイド技術』が大きく進んだ。研究代表者は、培養した腸オルガノイドを移植し傷害腸の修復を図るマウス実験に成功するなど、オルガノイド利用腸上皮再生研究を進めてきた。しかしながらオルガノイドとして培養する腸上皮を、由来する部位と異なる領域に移植した際にいかなる変容を示すかの詳細は明らかではない。本研究では、独自のオルガノイド移植技術を利用し、異所移植した腸上皮がいかなる変容を遂げるか、そして非上皮組織から供給される情報がいかに上皮細胞変容に寄与するかを明らかにすることを目的とした。

【研究成果】

1) 新しい近位大腸傷害マウスモデルの作製
マウスを用いて、腸上皮オルガノイドを異所移植する手法を確立した。すなわち、近位大腸内腔に粘膜欠損を作成するマウスモデルを確立し、これをレシピエントとして小腸由来上皮オルガノイドを移植する技術確立を図った。その結果、全麻酔下にマウスを開腹し、近位大腸内腔にキレート剤を作用させることで局所的に上皮剥離が可能であることを確認した。また、本処置に必要なとされる上皮剥離操作を最適化し、安定した大腸粘膜障害が作成可能となるプロトコルを確立できた。

2) 新規大腸傷害マウスモデルへの小腸移植実験

A) 小腸上皮オルガノイド移植技術確立

1) で作成する近位大腸粘膜欠損マウスモデルをレシピエントとし、小腸オルガノイドを異種移植する技術確立を図った。

B) 異なる大腸部位に移植した小腸移植片解析

1) で作成する近位大腸粘膜欠損マウスモデルをレシピエントとし、EGFP トランスジェニックマウスから単離した小腸上皮オルガノイドを移植した。移植片の組織学的検討により、大腸上皮に囲まれる異所性小腸上皮が小腸上皮に固有のトランスポーターや転写因子を限局性に発現することがわかった。また、大腸内小腸移植片をレーザーマイクロダイセクションで回収し、発現する遺伝子群を網羅的に解析した結果でも、小腸上皮が大腸内におかれた際にも固有の分子発現パターンを維持することを見出した。以上のことから、小腸上皮が大腸上皮と異なる形態・機能を示す機構は、上皮内因性にプログラムされることが明瞭に示された。

【研究の意義および展望】

本研究では、研究代表者のもつマウス実験モデルをさらに発展させ、新規の腸上皮移植研究手法を開発した。その結果、腸上皮再生研究のための基礎知見を提供するとともに、小腸上皮が部位特異性を維持する事実とその詳細を明らかにできた。

一方で、小腸上皮が大腸内で固有性を維持する分子機構の詳細は今後の研究課題として残った。頭尾軸に沿って異なる形態・機能を有する腸組織では、位置で規定される上皮内因性プログラムとともに、環境依存性に変化する外的因子も主要な上皮運命決定因子と考えられている。小腸上皮が大

腸内で固有性を維持することは、小腸上皮が大腸における外的環境因子に不応であることを示唆するものの、その詳細は不明である。今後は、腸管内腔の因子（食餌成分や腸内細菌など）や非上皮組織由来のシグナル因子など、大腸上皮の増殖・分化に関わる因子を明らかにすることが重要となる。これら研究が進展することにより、腸上皮の頭尾軸上の各部位における外的環境および非上皮成分との相互作用を明らかにすることが可能となり、腸組織再生機構に新しい知見を提供できるものと考えられる。以上の研究成果は、臨床的視点でも、短腸症候群などヒト難治性小腸疾患に対して大腸上皮を小腸上皮で置換し欠損小腸機能を補完する「機能的腸管再生医療」の技術基盤となる可能性をもつものと考えられた。

【研究発表】

[論文発表]

1. Otsubo K, Maeyashiki C, Nibe Y, Tamura A, Aonuma E, Matsuda H, Kobayashi M, Onizawa M, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Torii S, Itakura E, Watanabe M, Oshima S. Receptor-Interacting Protein Kinase 3 (RIPK3) inhibits autophagic flux during necroptosis in intestinal epithelial cells. **FEBS Lett.** in press 2020
2. Takei Y, Nemoto Y, Morikawa R, Tanaka S, Oshima S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M. CD8 α + T cells show amoeboid shape and frequent morphological change in vitro, and localize to small intestinal intraepithelial region in vivo. **Biochem Biophys Res Commun.** 523(2):328-335: 2020
3. Tanaka S, Nemoto Y, Takei Y, Morikawa R, Oshima S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Stutte S, Watanabe M. High-fat diet-derived free fatty acids impair the intestinal immune system and increase sensitivity to intestinal epithelial damage. **Biochem Biophys Res Commun.** 522(4):971-977: 2020
4. Watanabe S, Tsuchiya K, Nishimura R, Shirasaki T, Katsukura N, Hibiya S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M. TP53 mutation by CRISPR system enhances the malignant potential of colon cancer. **Mol Cancer Res.** 17(7):1459-1467: 2019
5. Nishimura R, Shirasaki T, Tsuchiya K, Miyake Y, Watanabe Y, Hibiya S, Watanabe S, Nakamura T, Watanabe M. Establishment of a system to evaluate the therapeutic effect and the dynamics of an investigational drug on ulcerative colitis using human colonic organoids. **J Gastroenterol.** 54(7): 608-620: 2019
6. Kawamoto A, Nagata S, Anzai S, Takahashi J, Kawai M, Hama M, Nogawa D, Yamamoto K, Kuno R, Suzuki K, Shimizu H, Hiraguri Y, Yui S, Ohshima S, Tsuchiya K, Nakamura T, Ohtsuka K, Kitagawa M, Okamoto R, Watanabe M. Ubiquitin D is up-regulated by synergy of Notch signalling and TNF- α in the inflamed intestinal epithelia of IBD patients. **J Crohns Colitis.** 13(4): 495-509: 2019
7. Nakamura T. Recent Progress in Organoid Culture to Model Intestinal Epithelial Barrier Functions. **Int Immunol.** 31(1): 13-21: 2019

[学会発表]

1. 中村哲也. 「上皮オルガノイド移植による腸機能再生医療に向けて」(シンポジウム講演) 第19回日本再生医療学会総会. 2020. 03. 13 パシフィコ横浜、神奈川
2. 松本有加、平田潤、東貴大、野田幸子、服部信孝、岡田随像、山高篤行、中村哲也「オルガノイド移植による大腸上皮置換術の確立と移植上皮の網羅的遺伝子発現解析」第19回日本再生医療学会総会. 2020. 03. 13 パシフィコ横浜、神奈川