

独自の培養技術を用いた大腸上皮細胞機能解析と 臨床応用技術開発

Designing and Developing Innovative Use of Newly
Discovered Colonic Epithelial Culture Method
Applicable to Clinical Medicine

渡辺 守 (WATANABE MAMORU)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授



研究の概要

独自の大腸上皮幹細胞培養技術の応用を図り、「正常上皮細胞機能を解析すること」、「培養大腸上皮細胞の臨床応用技術基盤を確立すること」を目的とした。すでに本法でたった一個の幹細胞から増やした細胞移植で、傷害された腸管上皮が修復・再生可能であることを示した。また、培養腸管上皮が薬剤輸送機構など正常な腸管の上皮機能解析に有用であることを示した。本研究のさらなる成果は、消化管上皮傷害を修復するための再生医療技術の開発に重要な知見を提供すると期待される。また、異なる個人から得る培養細胞を用いて腸管上皮機能を解析することで、個別化診断・治療法へ応用できる可能性をもつと考える。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医・消化器内科学

キーワード：再生医学、幹細胞、大腸上皮細胞、細胞治療、炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

腸管上皮の再生機構を明らかにし、ヒト消化管再生医療に応用することが期待されている。正常な腸管上皮を体外で操作し解析することは技術的に困難とされていたことを背景とし、申請者・渡辺と分担者・中村は、正常マウス大腸由来上皮細胞を長期にわたり無血清培地中で3次元的に培養維持する画期的技術開発に着手した。同時期に正常なマウス小腸上皮が培養可能であることが海外のグループから発表され大きな注目を集めたが、本研究開始の時点で大腸上皮培養は不可能であり、したがって、我々の試みは世界に例のない新規のものであった。

2. 研究の目的

本研究は申請者らの独自の培養手法を先端技術として確立し、1) 培養大腸上皮を用いて「上皮細胞機能を解析」すること、2) および「培養大腸上皮細胞の臨床応用技術基盤を確立」することを目的とした。「上皮細胞機能解析」では、a) 幹細胞の単離・培養と性状解析、b) 大腸上皮細胞がもつ生体防御機能解析を、また、「培養大腸上皮細胞の臨床応用技術開発」では、a) バイオマテリアルとしての応用技術、b) 診断・治療ツール

としての応用技術開発を目指した。

3. 研究の方法

マウス大腸上皮細胞を培養する独自の手法 (Tokyo Medical and Dental University protocol: TMDU 法) を幅広く応用し以下の解析をおこなった。

1) 大腸上皮細胞機能解析

a) 幹細胞単離・培養技術の確立と性状解析

- ・大腸上皮幹細胞を選択的に増やす技術開発。
- ・大腸上皮幹細胞の増殖促進・抑制因子および分化誘導因子の探索とその作用の解明。

b) 大腸上皮による生体防御機構解析

- ・腸管上皮と粘膜間リンパ球の共培養実験系を構築し、上皮-リンパ球間相互作用とこれにおよぼす因子の解析。

2) 培養大腸上皮細胞の臨床応用技術開発

a) 培養大腸上皮を用いる細胞治療技術

- 培養上皮を移植し、レシピエント腸管への生着、組織構築能を評価する。

b) ヒト大腸上皮細胞培養技術確立

- TMDU 法のヒト大腸上皮用技術を確立する。

c) バイオマテリアルとしての応用技術

- ・上皮シート作成技術の開発と物質輸送 (吸収・排出) 評価システムの構築

d) 診断・治療ツールとしての応用技術

- ・上皮機能障害評価システムの構築
- ・薬剤感受性試験への利用

4. これまでの成果

平成24年度までも順調に研究成果が得られ、中でも以下の2つは論文発表をおこなった。

1. マウス大腸幹細胞培養とこれを用いた移植技術の確立

TMDU 法を報告し、さらに、培養腸管上皮細胞移植で傷害大腸上皮が再生可能であることを世界で初めて報告した。すなわち、マウス大腸クリプトを無血清培地で球状オルガノイドとして培養可能であること、および継代操作を経て1年を超す長期培養が可能であることを示した。また、TMDU 法では Lgr5 陽性大腸上皮幹細胞が著増すること、さらには培養幹細胞が Notch シグナルを介した分化能を維持することを明らかにした。

次に、培養大腸上皮細胞を大腸傷害モデルマウスに移植し生着する条件を見いだした。その結果ドナー由来細胞が、短期的には傷害部上皮を被覆し、移植1ヶ月後には全ての分化細胞と増殖細胞を本来の位置に有する正常なクリプト構造を持つ大腸上皮を構築することを明らかにした。さらに、1個の大腸上皮幹細胞から増やした培養大腸上皮を用いた移植によっても、全ての分化細胞と増殖細胞を含む組織学的に正常な大腸上皮が再生することを明瞭にした。

本研究は、今後の大腸上皮幹細胞研究にきわめて重要な知見を提供するものと期待される。また、わずかな数の幹細胞であっても、これを体外で増やし移植することで機能的な大腸上皮再生可能な細胞治療が実現可能であることを提示した本成果は、培養組織幹細胞を利用する再生医療の進歩に重要な知見を供与すると考えた。

2. 正常腸上皮3次元培養を用いた薬剤輸送のリアルタイム解析

新しい腸管上皮培養技術を利用し、p-糖蛋白 (P-gp) による薬剤輸送動態を解析する新技術を構築し得た。すなわち、3次元培養した正常マウス小腸上皮が、P-gp を介して基質である Rh123 を基底側から管腔側へと能動的に輸送することを明らかにした。さらに、Rh123 輸送のリアルタイムイメージングと数理モデル解析を組合せ、正常小腸上皮における P-gp 依存性輸送透過係数を推定し得た。

本システムは、正常腸管上皮における P-gp の誘導剤や阻害剤のスクリーニング、あるいは異なる個人から得られる腸管上皮における P-gp の機能評価など、さまざまな用途へ

応用可能な技術となりうると期待される。

5. 今後の計画

平成 25 年度以降は、以下の研究をさらに継続し進める予定である。

1) 大腸上皮細胞機能解析

a) 幹細胞単離・培養技術の確立と性状解析
マウスおよびヒトの大腸上皮細胞のより効率的な培養技術確立を目指す。

b) 大腸上皮による生体防御機構解析

上皮培養技術を改変し、上皮と免疫担当細胞、上皮と微生物等の相互作用を解析する。

2) 培養大腸上皮細胞の臨床応用技術開発

a) 細胞治療の基礎検討

移植培養細胞のレシピエント腸管への生着、組織構築能を評価する新しい動物モデルの作製し、細胞移入経路、量、回数、時期、腸炎改善効果などを評価する。

b) ヒト大腸上皮細胞培養技術確立

TMDU 法を応用したヒト大腸上皮幹細胞培養技術により、ヒト大腸疾患における上皮異常解析を進める。

c) バイオマテリアルとしての応用技術

大腸上皮細胞の平面培養技術を用いる物質輸送評価システムの構築などを進める。

d) 診断・治療ツールとしての応用技術

ヒト大腸上皮幹細胞培養技術を進め、異なる個人より得る培養上皮による診断技術開発を進める。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Yui S, Nakamura T, 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. **Nat Med.**18:618-623, 2012. 査読有
2. Mizutani T, Nakamura T, Morikawa R, Fukuda M, Mochizuki W, Yamauchi Y, Nozaki K, Yui S, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Real-time analysis of P-glycoprotein-mediated drug transport across primary intestinal epithelium three-dimensionally cultured in vitro. **Biochem Biophys Res Commun.**419:238-243, 2012. 査読有
3. 特許 渡辺 守、中村哲也: 「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」特願 2011-236469