

2018年1月9日

報道関係者各位

慶應義塾大学医学部
国立研究開発法人 日本医療研究開発機構

ヒトの正常大腸上皮をマウスの腸内で再現 —大腸の疾患に関する病態理解と治療の開発に期待—

慶應義塾大学医学部内科学（消化器）教室の佐藤俊朗准教授らの研究グループは、ヒトの正常な大腸粘膜から培養した組織幹細胞（注1）をマウス腸管内へ移植後、マウス生体内で生着させ、ヒト正常大腸上皮細胞動態を10ヶ月以上の長期間にわたって観察することに、世界で初めて成功しました。

これまでに、佐藤俊朗准教授らの研究グループは、ヒト大腸粘膜の再生を制御する幹細胞の体外培養に成功し、また、マウス生体内でがんを再構築する技術を開発してきました。

しかし、ヒト成体の正常大腸幹細胞をマウスへ移植する技術は存在せず、腸疾患や大腸がんの病態理解や治療の開発への研究手法が制限されていました。本研究では、体外で培養した幹細胞移植にゲノム編集技術（注2）を応用し、特定のヒト正常大腸上皮細胞の動態をマウスの腸管内で観察する技術を開発しました。これにより、マウス生体内でヒト大腸上皮幹細胞を生きたまま観察することに成功し、マウスでの実験結果から存在すると推測されていた生体内でのヒト正常大腸幹細胞を実証しました。本研究は、ヒトの大腸疾患細胞を研究する新しい手段となり、今後の炎症性腸疾患や大腸がんの根治を目指した正常幹細胞機能の解明と、新規治療法開発へつながることが期待されます。

この研究成果は、2017年12月28日（米国東部時間）に米科学誌『Cell Stem Cell』のオンライン版に掲載されました。

1. 研究の背景と概要

1) 背景

潰瘍性大腸炎は、大腸に慢性の炎症が起こる原因不明の炎症性腸疾患です。日本には現在16万人以上の患者があり、若年者を中心に近年増加の一途をたどっています（厚生労働省「衛生行政報告例」）。また、大腸がんによる死亡者数も年間約5万人と増加の一途にあります（厚生労働省「平成28年人口動態統計の概況」）。これらの原因不明の腸疾患や、大腸がんなどの大腸の病気も、もとをたどると、正常の細胞から起こると考えられます。

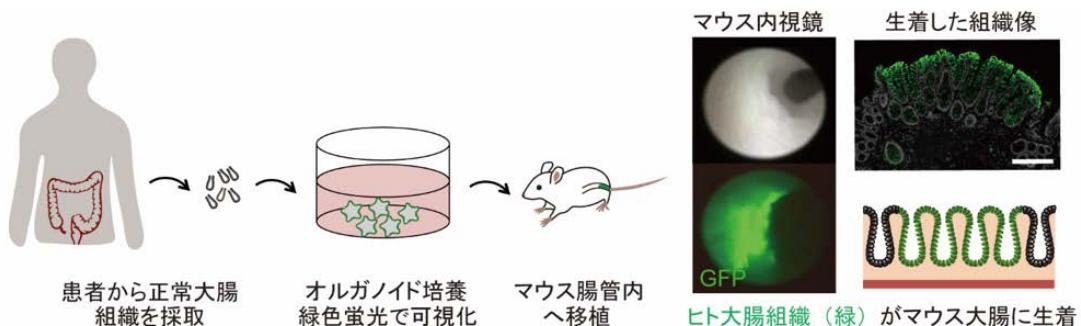
正常の大腸上皮の組織には幹細胞が存在し、自分自身と同じ幹細胞を永続的に生み出す（自己複製）とともに、寿命が短く自己複製できない分化した細胞を次々と産み出することで組織構造を作ります。幹細胞だけが発現する遺伝子としてLGR5が考えられており、このLGR5を発現した腸管上皮幹細胞の機能の解明は、これら腸の病気の病態解明、根治に結びつくと期待されています。

佐藤俊朗准教授らの研究グループは、2011年にヒトの腸管上皮幹細胞を体外で培養する技術（オルガノイド培養技術）（注3）を世界に先駆けて開発し、正常な幹細胞とがん幹細胞の研究をすすめてきました。しかし、体外での培養と、生体内での幹細胞の機能は異なることが予想されるため、生体内での機能解析が重要となります。つまり、LGR5 を発現する幹細胞をマークし、その細胞から生まれる細胞を観察し、機能を解析することが不可欠ですが、実際のヒトに対して、このような機能解析実験を行うことは不可能であるため、マウスへの移植モデルが妥当な実験手法となります。しかし、これまで、がんをマウスへ移植する手法は存在しましたが、正常なヒト組織由来の腸管上皮細胞をマウスへ移植する手法は存在せず、ヒトの腸管上皮幹細胞の生体内での機能解析を行うことは不可能でした。そのため、大腸幹細胞についての理解は、マウスや細胞での実験によるものに限られており、これまで正常なヒト大腸幹細胞の存在は、生体内では実証されていませんでした。

2) 研究の概要

慶應義塾大学医学部の佐藤俊朗准教授、杉本真也助教らと東京医科歯科大学消化管先端治療学講座の中村哲也教授との共同研究グループは、正常なヒト腸管上皮幹細胞をマウスの腸管内へと移植するモデルの確立を目指しました。佐藤准教授らが先行研究において開発したオルガノイド培養技術に、ゲノム編集技術を応用することで、緑色蛍光タンパク質（GFP）を組み込んだ遺伝子改変オルガノイドを作製しました。この GFP 発光するオルガノイドをマウスの腸管内に移植することで、生着成功的確認をマウス内視鏡システムを用いて行うことが可能となりました。マウス大腸の上皮粘膜を剥離させる技術により、同部位に作成した遺伝子改変オルガノイドを長期（10か月以上）にわたり生着させ、ヒトの大腸上皮構造をマウスの腸管内で再構築することに成功しました（図1）。ヒトの大腸上皮は、マウスの腸管内においても、マウスに比較して大きな上皮構造を構築し、産生する粘液のタイプも異なっており、ヒト生体内でのパターンを反映していました。これにより、マウスとヒトの腸上皮の種差は、幹細胞に情報が保存されていることが示唆されました。

【図1】



患者組織から培養したヒト正常大腸幹細胞（オルガノイド）のマウス腸管への移植に成功した。

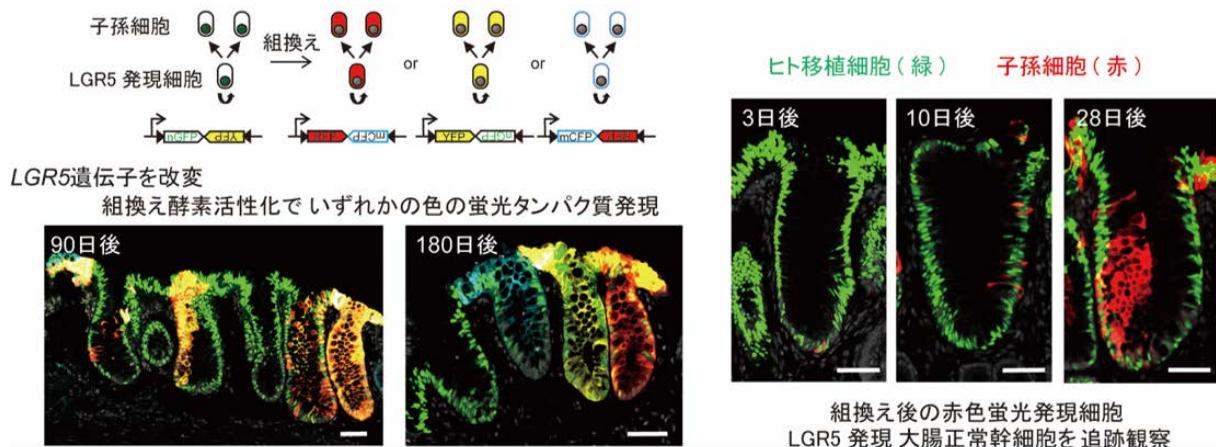
緑色蛍光（GFP）で可視化したヒト移植細胞がマウス内視鏡や病理組織像でも識別される。

白線は 200 μm。

さらに研究グループは、正常大腸幹細胞の機能的な解析のために、LGR5 を発現する細胞をマークし、細胞系譜解析（注4）により LGR5 発現細胞の子孫細胞を異なる蛍光タンパク質で識別（可視化）するゲノム編集をオルガノイドに対して行いました。これにより、特定の細胞の生体内での動態を観察することが可能となります。この解析によって、

たった1つのLGR5発現正常幹細胞が、自分自身を産生とともに、分化した子孫細胞を増やしながら大腸上皮構造を半年以上かけて再構築していく様子を経時的に捉えることができました（図2）。この観察結果によって、これまでマウス細胞組織でしか証明されていなかった生体内での大腸幹細胞の存在を、ヒトの細胞組織において初めて実証しました。

【図2】



移植したヒト正常大腸上皮細胞（緑）の中から、赤くマークされた細胞が出現し、経時的に置き換わっていく。この赤い細胞はLGR5発現正常幹細胞の子孫細胞である。180日の経過で1つの上皮構造が概ね1色になり、1つのLGR5発現幹細胞由来の細胞で置き換わったことを示す。白線は50μm。

2. 研究の成果と意義・今後の展開

本研究では、ヒト大腸上皮細胞の動態をマウスの腸管内で生きたまま観察する技術の開発に成功しました。オルガノイドにゲノム編集技術を組み合わせることによって、正常から多段階的に発がんしていく過程をマウス腸管内で再現するなど、さまざまなヒトの大腸疾患細胞の生体内での動態を研究する新しい実験手法となります。また、ヒトの正常な大腸幹細胞が、正常な機能を保持したまま移植可能で、腫瘍化せずに長期にわたって生着しうることも示されました。この結果は、ヒトの正常腸管上皮オルガノイドの移植治療への応用へ向けた潜在的な可能性を示唆しています。

これらの研究成果は、今後の炎症性腸疾患や大腸がんの根治を目指す上で必要な正常幹細胞機能の解明と、新規治療法開発への新たな糸口となります。

3. 特記事項

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の再生医療実現拠点ネットワークプログラム、JSPS 科研費 JP26115007, JP15J00981 の支援によって行われました。

4. 論文

英文タイトル : Reconstruction of the Human Colon Epithelium In Vivo

タイトル和訳 : 生体内でのヒト大腸上皮の再構築

著者名 : 杉本真也、太田悠木、藤井正幸、股野麻未、下川真理子、南木康作、伊達昌一、錦織伸吾、中里圭宏、中村哲也、金井隆典、佐藤俊朗

掲載誌 : Cell Stem Cell

【用語解説】

(注 1) 幹細胞：大腸上皮の組織に含まれる細胞のなかで、自分自身の複製を無限に繰り返すとともに、分化細胞も生み出す能力を持つ細胞を指す。1つの幹細胞から、上皮組織を再構築でき、再生能力が高い。正常幹細胞の遺伝子に段階的に異常が蓄積していくことが知られており、大腸がんの発がんにおいても、正常幹細胞の機能を理解することが重要である。これまで、ヒトの大腸幹細胞の生体内における機能的な実証はなされていなかった。

(注 2) ゲノム編集技術：細胞の遺伝子の機能を破壊したり、別の遺伝子に置き換えたりする技術を遺伝子改変技術と呼ぶ。本研究では、CRISPR-Cas9 と呼ばれる最新のゲノム編集技術で、遺伝子改変が行われた。CRISPR-Cas9 は遺伝子配列特異的に結合する RNA とその領域を切断するハサミとなる蛋白質から構成されており、効率よくヒトの細胞の遺伝子改変を行うことが可能になっている。本研究では、正常上皮細胞の特定の遺伝子領域をハサミ蛋白で切断し、蛍光蛋白質などのマーカーになる遺伝子を挿入している。

(注 3) オルガノイド培養技術：従来の細胞培養技術では、多くの細胞はシート状に培養されている。オルガノイドは細胞の増殖の足場となるジェルと増殖因子と呼ばれる栄養により、3 次元構造として育てられた培養細胞を指す。1 つの幹細胞から生体内的組織に似た構造を培養皿の中で作り出すことが可能であり、胃、小腸、大腸、膵臓、肝臓などのさまざまな組織の正常およびがん幹細胞を無限に増やすことが可能である。

(注 4) 細胞系譜解析：細胞は分裂すると 1 つの親細胞から 2 つの娘細胞が産まれる。娘細胞はさらに分裂し、孫細胞が産まれる。このような細胞の分裂の繰り返しにより、細胞は家系のように系譜図を描くことができる。特定の細胞とその子孫細胞を観察可能なタンパク質（蛍光タンパク質など）で追跡できるように遺伝子を改変（＝ゲノム編集技術：注 2）することで、細胞系譜解析は可能となる。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、厚生労働記者会、厚生日比谷クラブ、各社科学部等に送信しております。

【本発表資料のお問い合わせ先】

慶應義塾大学医学部内科学（消化器）教室
准教授 佐藤 俊朗（さとう としろう）
TEL : 03-5363-3063 FAX : 03-3353-6247
E-mail: t.sato@keio.jp

【事業に関するお問い合わせ先】

国立研究開発法人日本医療研究開発機構
(AMED)
戦略推進部 再生医療研究課
TEL : 03-6870-2220
E-mail : saisei@amed.go.jp

【本リリースの発信元】

慶應義塾大学
信濃町キャンパス総務課：鈴木・山崎
〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35
TEL : 03-5363-3611 FAX : 03-5363-3612
E-mail:med-koho@adst.keio.ac.jp
<http://www.med.keio.ac.jp/>

※本リリースのカラー版をご希望の方は上記までご連絡ください。