



2022 年 8 月 12 日

報道関係者各位

慶應義塾大学医学部

ヒト大腸の休止期幹細胞を発見 －炎症性腸疾患・大腸がんの治療開発に期待－

慶應義塾大学医学部坂口光洋記念講座（オルガノイド医学）の佐藤俊朗教授、同内科
学教室（消化器）の石渡景子特任助教、杉本真也助教、金井隆典教授らの研究グループ
は、ヒト大腸の増殖を司る幹細胞（注 1）は、マウスと比較して多くが休止期状態（注
2）にあることを発見し、炎症からの再生における重要性を初めて解明しました。これ
まで腸管幹細胞の研究は主にマウスを用いて解明されてきましたが、ヒト大腸で幹細胞
がどのような振る舞いをするかは実験モデルがなく不明でした。今回、研究チームは遺
伝子編集したヒト大腸細胞をマウスの大腸内に移植し、大腸幹細胞が休止期を経てゆっ
くり増殖すること、炎症時にも生き延びて、再生過程で増殖することを明らかにしまし
た。また、ヒト大腸の増殖速度が遅い原因として $TGF-\beta$ シグナルが関与していること
を示しました。本研究は、ヒト大腸幹細胞が定常時および炎症からの再生時に、それぞ
れどのように働くのかを初めて明らかにしたものであり、今後、炎症性腸疾患や大腸が
んの根治を目指す上で新たな治療開発の足掛かりとなることが期待されます。

この研究成果は、2022 年 8 月 10 日（米国東部時間）に米科学誌 *Gastroenterology* 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

細胞は、分裂するたびに複製のエラーである遺伝子変異が起こるリスクが生まれます。
そのため、体が大きく寿命が長いヒトは、体が小さく寿命が短いマウスよりも多くの細
胞分裂を繰り返し、遺伝子変異が蓄積することでがんになりやすいのではないかとと思わ
れますが、不思議なことにそうはなりません。人間が長寿命にも関わらずがんになりに
くいのは、人間の細胞の増殖速度が遅いことが原因と考えられます。一般的に血液や筋
肉など各組織に存在する幹細胞は、ほとんど分裂増殖しない、休止期にある寿命が長い
細胞と考えられており、そのため抗がん剤も効きづらい、あるいは、放射線療法に耐性
があります。一方で、腸管組織は 3～5 日ごとに活発にターンオーバーを繰り返すダイ
ナミックな臓器であり、腸管上皮の増殖を司っているのは、腸管上皮幹細胞です。腸管
上皮幹細胞は *LGR5* 遺伝子を高く発現しており、活発に増殖をしながらも寿命が長く、

自身の複製と、大腸の様々な細胞に分化ができる能力を持ちます。マウスの **Lgr5** 発現幹細胞は活発に増殖しているが故に、上皮が損傷すると死滅しやすく、上皮の再生過程では、普段は分化した細胞が幹細胞に戻る（脱分化）ことで再生に重要な役割を果たします。しかし、ヒトの腸管上皮幹細胞が定常時および炎症からの再生時にどのような動きをみせるのかは、生体内で観察する手段がなく、不明でした。

佐藤俊朗教授らの研究グループは先行研究において、体外でヒトの大腸上皮細胞を無限に増殖させるオルガノイド技術（注 3）を開発しました（参考文献 1）。そして、その技術を応用し、マウスの大腸上皮を剥離した後に、遺伝子編集したヒトの大腸上皮オルガノイドをマウスの大腸に肛門から移植する技術を開発し、ヒト大腸上皮細胞の働きをマウスの腸管内で生きたまま観察することに成功しました（参考文献 2）。本研究ではこれらの技術を用いて、ヒト大腸上皮幹細胞が生体内で定常時および炎症からの再生時にどのような役割を果たすのかを検証しました。

2) 研究の概要

ヒト大腸には休止期幹細胞が多く存在し、TGF- β シグナルが休止期を制御する

研究グループは、ヒト大腸とマウス大腸の 1 細胞 RNA シーケンス法を行い、それぞれの幹細胞の細胞周期を比較したところ、ヒトでは休止期にある幹細胞が多く、マウスでは細胞分裂増殖期にいる幹細胞が多いことを実証しました。組織解析においても、同様の結果でした。そこで、ヒトの休止期にある幹細胞を **p27** というマーカーで可視化し、マウスの生体内でヒト大腸幹細胞の動きを観察することに成功しました。

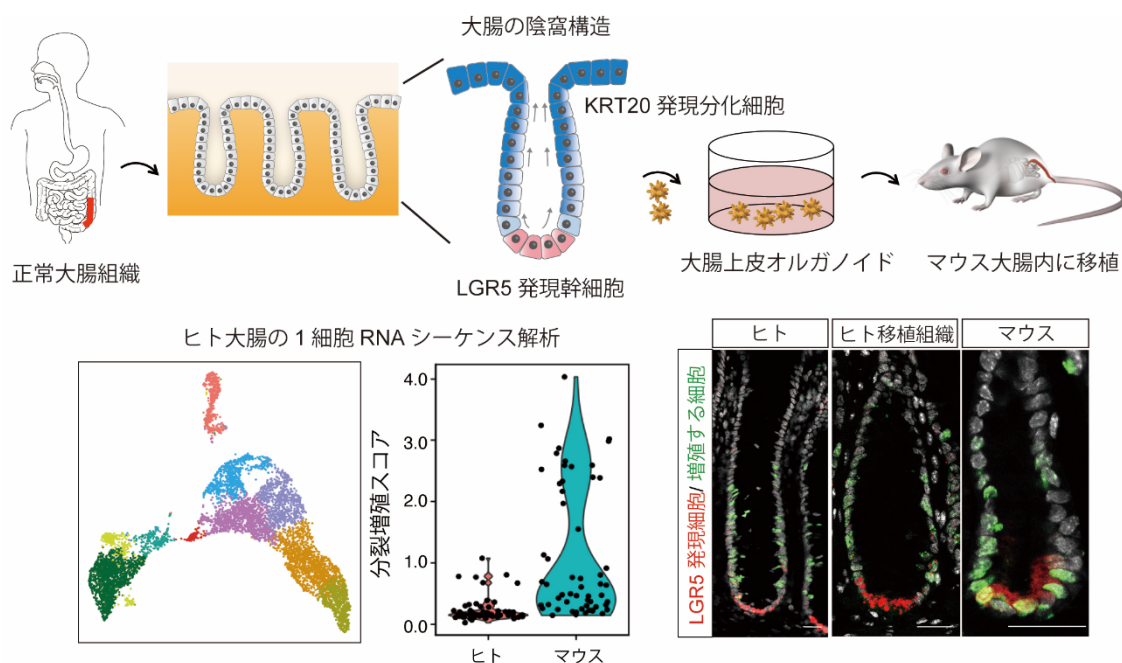


図 1：患者組織から培養したヒト正常大腸幹細胞オルガノイドをマウス大腸内に移植した。1 細胞 RNA シーケンス解析と組織解析において、ヒトは休止期にある幹細胞が多く、マウスは細胞分裂増殖期にある幹細胞が多いことを証明した。白線は 25 μ m。

次に、マウスとヒトの幹細胞の増殖速度の差を決定する因子として、TGF- β シグナルに着目しました。マウスもヒトも上皮の周りの間質組織からの刺激により TGF- β シグナルが活性化されていますが、ヒト幹細胞は TGF- β シグナルへの感受性が高いため、休止期幹細胞が多いことが示唆されました。そこで TGF- β シグナルが休止期に参与しているかを調べるため、ゲノム編集技術（注 4）を使用して大腸上皮オルガノイドの TGFBR2 遺伝子をノックアウトしました。すると、予想通り、TGF- β シグナルが活性化されなくなった大腸上皮幹細胞は増殖が速くなりました。この結果から、休止期の LGR5 幹細胞は TGF- β シグナルによって制御されるというメカニズムを証明できました。

休止期幹細胞は普段はゆっくり増殖するが、上皮損傷に耐え、再生時に増殖が速くなる

研究グループは、休止期にある LGR5 発現細胞が幹細胞であるかを調べるため、“細胞系譜解析”（注 5）により休止期幹細胞の子孫細胞を蛍光タンパク質で可視化し、追跡しました。この解析によって、たった 1 つの休止期 LGR5 発現幹細胞が、自分自身を産生すると共に、分化した子孫細胞を増やしながらかゆっくり増殖する様子を捉えました。興味深いことに、抗がん剤で上皮に損傷を加えても、抵抗性があり死滅せず、かつ、損傷からの再生過程でクローン増殖が速くなることを見出しました。これまでにマウスの Lgr5 発現幹細胞は上皮の損傷で簡単に死滅することが知られていますが、ヒトでは反対の現象が確認されたため、休止期幹細胞は上皮再生の過程においてより重要であることがわかりました。

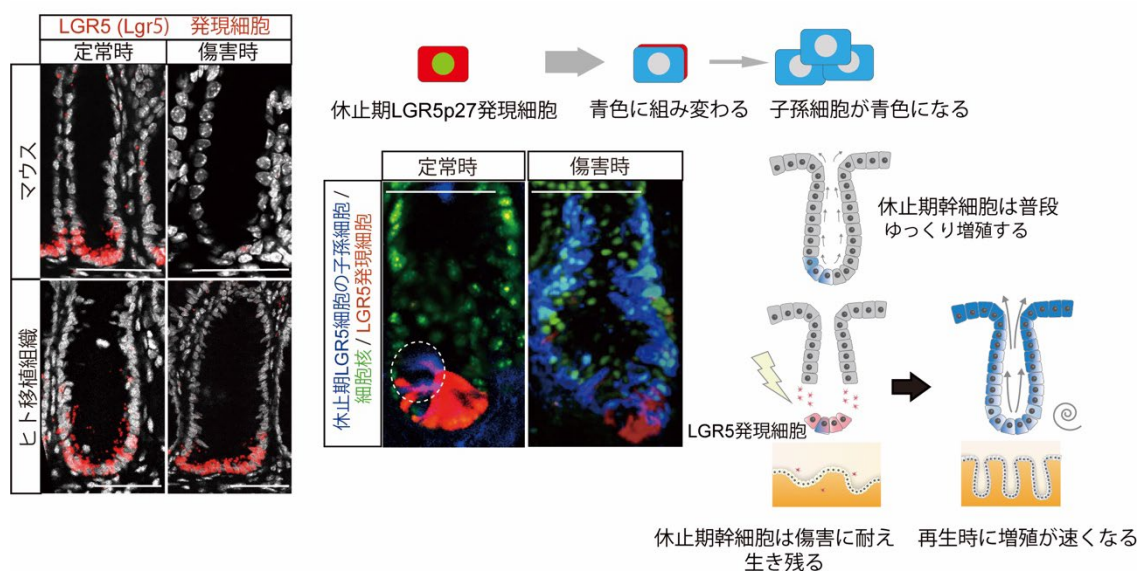


図 2：上皮傷害モデルでマウスの Lgr5 発現幹細胞は死滅するが、ヒトの LGR5 発現幹細胞は生き残ることがわかった。ヒトの休止期幹細胞は普段はゆっくり増殖し、傷害からの再生時には速く増殖することを確認した。白線は 50 μ m。

炎症からの再生には、分化した細胞よりも LGR5 発現幹細胞が重要である

さらに、研究グループは、大腸幹細胞を特異的に殺傷すると、大腸上皮がどのように再生するのかを検証しました。ゲノム編集技術により LGR5 発現細胞だけを選択的に殺傷するモデルを用いて、マウスの生体内でヒト大腸上皮の再生を観察しました。この結果、LGR5 発現細胞を殺しても、5 日後には LGR5 発現細胞が再度出現しており、上皮の再生は問題なく行われていることが分かりました。この観察結果から、上皮の再生には LGR5 発現細胞以外の関与があると考えられました。そこで、分化した細胞を KRT20 で標識し、KRT20 発現細胞が上皮の再生時にどのように関わるのかを検証しました。すると、普段は分化した細胞は増殖せず、消失してしまいましたが、LGR5 発現幹細胞を殺した時だけ、KRT20 発現細胞が LGR5 発現細胞に“先祖返り”（脱分化）して増殖することがわかりました。最後に、抗がん剤で上皮を損傷させた後に分化した細胞が“先祖返り”するのかを検証しました。驚くべきことに、上皮を損傷させても分化した細胞は先祖返りしにくいことがわかりました。これは、マウスとは正反対の現象であり、ヒト LGR5 発現幹細胞が休眠しているが故に、上皮の損傷にも抵抗性があり、損傷からの再生時にも生き延びて幹細胞の席に居座るからだと考えられました。これらの結果を踏まえて、炎症からの再生には休止期の LGR5 発現幹細胞が重要であると結論づけました。

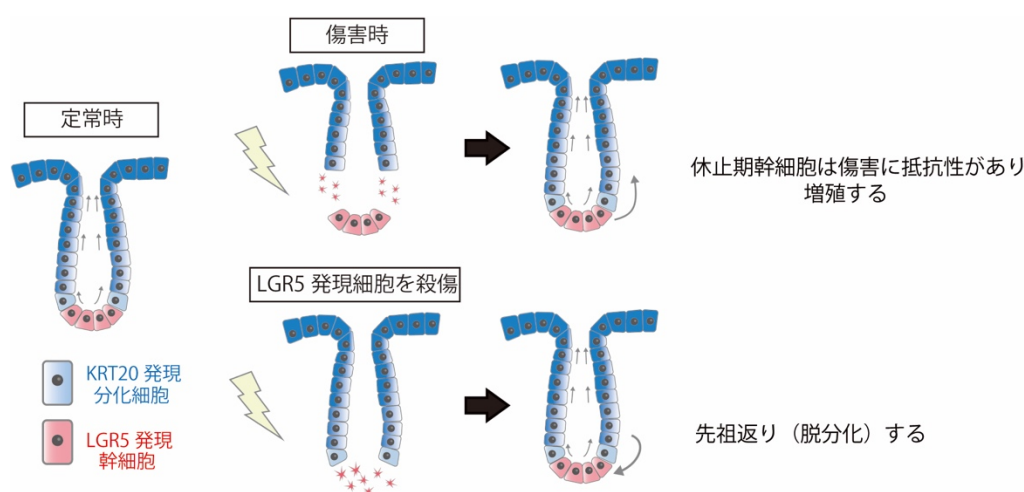


図 3：ヒト大腸の LGR5 発現幹細胞を殺傷すると、上方に存在する KRT20 を発現した分化細胞が LGR5 発現幹細胞に先祖返りし、増殖をし始めることがわかった。しかし、抗がん剤による上皮損傷を加えた場合は、幹細胞が生き残り増殖するため、分化した細胞が先祖返りすることは少ないと証明した。

2. 研究の成果と意義・今後の展開

本研究では、オルガノイド、ゲノム編集技術、移植技術を組み合わせて、ヒトの大腸上皮幹細胞の動きをマウスの生体内で観察することにより、休止期幹細胞の定常時および炎症からの再生過程における役割を初めて解明しました。ヒトは、マウスより体が大

きく、長寿命にも関わらず、ランダムな突然変異が起こりにくく、がんになりにくいとされます。ヒトの細胞周期が遅いことは、生物の進化の過程で理にかなった変化であると言えます。これらの研究成果は、今後、炎症からの再生過程に必要な正常幹細胞機能の解明だけでなく、大腸を含めた様々な臓器に由来するがんの発生・治療や生物の進化をたどる上でも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）の革新的先端研究開発支援事業（AMED-CREST）ユニットタイプ「生体組織の適応・修復機構の時空間的解析による生命現象の理解と医療技術シーズの創出」研究開発領域における研究開発課題「新しい4次元モデルシステムを用いた腸管線維化疾患の病態解明」（研究開発代表者：佐藤 俊朗）・再生医療実現拠点ネットワークプログラム「培養腸上皮幹細胞を用いた炎症性腸疾患に対する粘膜再生治療の開発拠点」・再生医療実現拠点ネットワークプログラム「上皮細胞により腸管を再デザインする研究開発」（研究開発代表者：杉本 真也）・難治性疾患実用化研究事業「絨毛形成を標的とした腸管不全の治療開発」（研究開発代表者：杉本 真也）・革新的先端研究開発支援事業「腸の再生における炎症記憶メカニズムの解明」（研究開発代表者：谷口 浩二）、JSPS 科研費 JP17H06176、JP15K21775、JP20H03758、JP16H06279、慶應義塾学事振興資金の支援により行われたものです。

4. 論文

英文タイトル：Identification of Quiescent LGR5⁺ Stem Cells in the Human Colon

タイトル和訳：ヒト大腸における休止期 LGR5 発現幹細胞の同定

著者名：石川（石渡） 景子、杉本真也、小田真由美、藤井正幸、高橋シリラット、
太田悠木、高野愛、石丸和寛、股野麻未、吉田康祐、羽生ひかる、利光孝太、
澤田和明、下川真理子、齋藤恵、川崎健太、石井亮太、谷口浩二、今村健志、
金井隆典、佐藤俊朗

掲載紙：Gastroenterology

DOI：10.1053/j.gastro.2022.07.081

【参考文献】

1. 英文タイトル：Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche

タイトル和訳：単一の Lgr5 発現幹細胞は間質系ニッチなしに *in vitro* で陰窩絨毛構造を構築する

掲載誌：Nature

DOI：10.1038/nature07935

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

タイトル和訳：In Vivo でのヒト大腸上皮の再構築

掲載誌：Cell Stem Cell

DOI：10.1016/j.stem.2017.11.012

【用語解説】

- (注1) 幹細胞：大腸上皮の組織に含まれる細胞の中で、自分自身の複製を無限に繰り返すと共に、様々な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。
- (注2) 休止期：生体内の細胞は細胞分裂を繰り返しており、細胞周期（G1,S, G2, M 期）を順番に進んでいくことが知られている。一方で、細胞分裂をせず、休止期（G0 期）にとどまる細胞が存在し、p27 というマーカーを発現している。
- (注3) オルガノイド培養技術：従来の細胞培養技術では、多くの細胞は平面状のシートにして培養されている。オルガノイドは細胞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。オルガノイド培養により、1つの幹細胞から生体内の組織に似た構造を培養皿の中で作り出すことが可能となった。つまり、オルガノイド技術によって、様々な組織の幹細胞を無限に増やすことが可能である。
- (注4) ゲノム編集技術：細胞の遺伝子を破壊したり、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。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5) 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。娘細胞は更に分裂し、孫細胞が産まれる。このような細胞分裂の繰り返しにより、細胞は家系のような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で追跡できるように遺伝子を改変（ゲノム編集技術：注 4）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 坂口光洋記念講座（オルガノイド医学）

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"AT"keio.jp ※E-mail アドレスは AT の部分を@に変えてください

<https://organoidmed.org>

【本リリースの配信元】

慶應義塾大学信濃町キャンパス総務課：山崎・飯塚・奈良

〒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

<https://www.med.keio.ac.jp/>