

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05123

研究課題名（和文）消化器系臓器における組織障害エントロピーの解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the entropy of tissue damage in digestive organs and development of new therapeutic approaches

研究代表者

三上 洋平（MIKAMI, YOHEI）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授

研究者番号：80528662

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 31,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、まず腸管組織障害エントロピー研究の障害であるモデル動物の欠如を埋めるため、腸管上皮剥離による腸管線維化モデルを樹立することに成功した。樹立した新規腸管線維化モデル動物とヒト検体を用いて、腸管におけるストローマ細胞のbulk RNA-seqおよびscRNA-seqデータをバイアスのかからない条件で解析し、腸管常在性のストローマ細胞の機能的多様性を明らかにした。さらに、ATAC-seqなどのエピゲノム解析との統合マルチオミクス解析を用いた検討より、腸管線維化に特異的に出現する線維芽細胞集団を同定し、遺伝子発現プロファイルがエピゲノムレベルで制御されていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患を含む広義の自己免疫性疾患の治療法として、分子標的療法は炎症制御に関しては革新的な治療革命をもたらしたものの、炎症収束後の組織レジリエンスには効果が乏しく、未だ炎症性腸疾患の根治療法は得られていない。本研究では、Omics解析を用いて、腸管組織障害に関与する新規のストローマ細胞集団を同定し、その分化経路の一端を明らかとするとともに、新規のストローマ細胞を標的とした革新的抗線維化治療に繋がる基盤的検討を示すことに成功した。ヒト検体およびモデル動物間の相同性相違性を解析することにより、種差を超えた普遍的な腸管組織エントロピー増大機構の一端を明らかとした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we successfully established an intestinal fibrosis model induced by intestinal epithelial detachment to address the lack of model animals in the research of intestinal tissue remodeling or increase in entropy. Using the newly established intestinal fibrosis model animals and human samples, we conducted unbiased analyses of bulk RNA-seq and scRNA-seq data of stromal cells in the intestine, revealing the functional diversity of intestinal resident stromal cells. Furthermore, through integrative multi-omics analysis incorporating transcriptomic and epigenomic analyses such as ATAC-seq, we identified a novel fibroblast population that specifically arises during intestinal fibrosis.

研究分野：消化器病学

キーワード：炎症収束 炎症性腸疾患 肝炎 潰瘍性大腸炎 クローン病

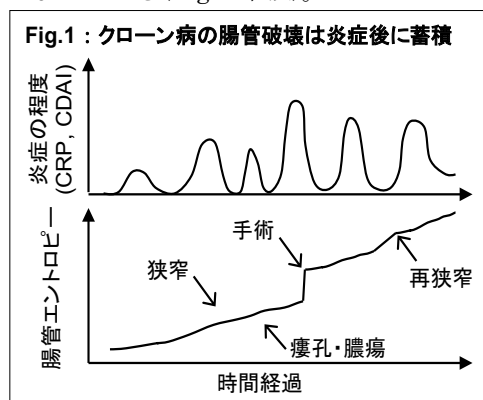
## 1. 研究開始当初の背景

近年、炎症・再生・線維化による腸管および肝臓を含む消化器系の臓器障害は、臨床的に大きな問題となっている。

腸管領域においては、クローン病および潰瘍性大腸炎をはじめとする炎症性腸疾患の患者数は、本邦で急速に増加している。さらに、これらの難病にとどまらず、内視鏡治療後や手術後に続発する腸管線維化は腸管狭窄や腸閉塞の原因となり、腸管の炎症・再生・線維化の克服は急務である。分子標的薬の進歩に伴い、臨床的にクローン病の炎症のコントロールは飛躍的に進歩し、炎症制御は一定の成果を上げた(Fig.1 上段)。治療経過においては、臨床症状、データ上は、炎症収束による正常な回復、すなわち組織修復レジリエンス機能が一見すると正常に働いている。しかし、罹病期間の長期化に伴い、腸管の狭窄による腸閉塞、腸穿孔に伴う腸管切除手術など、腸管のダメージの蓄積が実臨床において大きな問題点となっている(Fig.1 下段)。

この様に、臨床的には一見「収束」したように見える炎症であるが、様々な組織常在性の免疫細胞およびストローマ細胞集団が炎症についての情報を記憶しており、慢性炎症後の腸管内における不可逆的な組織障害エントロピーの存在が示唆される。これまでの多くの研究において、炎症の発症・進展に伴う組織破壊の機能解析により、分子標的薬をはじめとした新規治療薬の開発、臨床応用に結びついてきたが、不十分な組織修復レジリエンスの結果として蓄積する腸管ダメージ、即ち腸管エントロピーに関して、十分な機能解析はなされておらず、腸管エントロピーにアプローチする治療法は存在しない。

一方、肝臓領域においては、自己免疫性肝炎などの免疫介在性疾患に加えて、食生活の西欧化に伴う脂肪肝や非アルコール性脂肪肝(NASH)が大きな社会問題となっている。これら肝疾患の病態形成には、脂肪・糖代謝異常に加えて、腸管からの細菌やその代謝産物が関与していることを示してきた(Mikami Y, *PLoS One* 2014; Nakamoto N, *Cell Rep* 2017; Taniki N, *JCI insight* 2018; Koda Y, *JCI* 2019)。肝臓の慢性炎症であるNASHは、組織障害エントロピーの増大による不可逆的な肝硬変、肝がんへと進展する。しかし、慢性炎症後の肝線維化の改善(resolution)と進展(progression)の分岐を定義する分子細胞生物学的、免疫的、さらに腸肝関連的な機構は不明な点が多い。



## 2. 研究の目的

これまで、粘膜免疫反応や腸管上皮幹細胞の理解が飛躍的に深まったが、粘膜障害に続発する組織修復異常の病態は依然として不明であり、腸管および肝臓の線維化および組織修復に関与する免疫細胞およびストローマ細胞の機能解析についても十分な報告がない。申請者は、臨床教室の強みを最大限に生かし、Deep-sequencing 技術を用いたヒト腸管切除検体由来の腸管のストローマ細胞の1細胞網羅的遺伝子発現解析(scRNA-seq; single cell RNA-seq)データの予備検討から、従来まで同一と考えられていた線維芽細胞が多様な細胞集団の集合体であることがわかってきた。これらのストローマ細胞サブセット特異的に発現する mRNA の機能解析を通じて、線維化惹起性細胞の分化誘導パスウェイと免疫細胞との相互作用連関を解明し、これを標的とした新規治療法の開発を目的とする。

IBD や NASH 疾患を消化器系臓器組織障害のプロトタイプとして研究を行い、腸管および肝臓における組織障害エントロピーの統合的理解を通じて、組織修復におけるブラックボックスに対して、免疫学的、分子生物学的、微生物学的に組織修復誘導性細胞と線維化誘導責任細胞を同定、分化誘導経路を解明したい。

## 3. 研究の方法

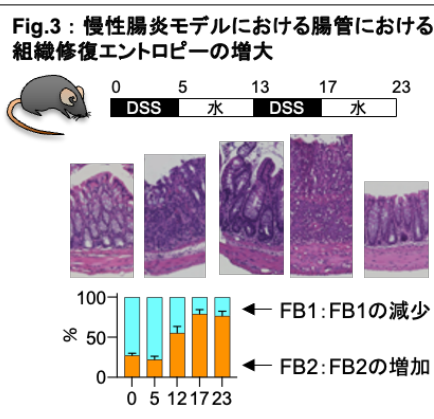
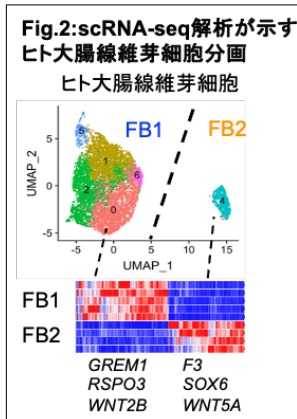
消化管の炎症・収束時におけるストローマ細胞の遺伝子発現パターンを経時的に scRNA-seq 解析を行い、細胞レベルの蓄積性変化を同定する。さらに慢性炎症収束時に増加する組織常在細胞集団のマーカーを scRNA-seq 解析により洗い出し、腸管組織エントロピー増大とともに蓄積する細胞の単離を試みる。そして細胞の遺伝子発現解析から、腸管エントロピーを担うと推定される責任細胞を規定する転写因子を明らかにする。

## 4. 研究成果

我々は、腸管組織常在細胞のうち、まず腸管ストローマ細胞に着目して研究を開始した。ヒト

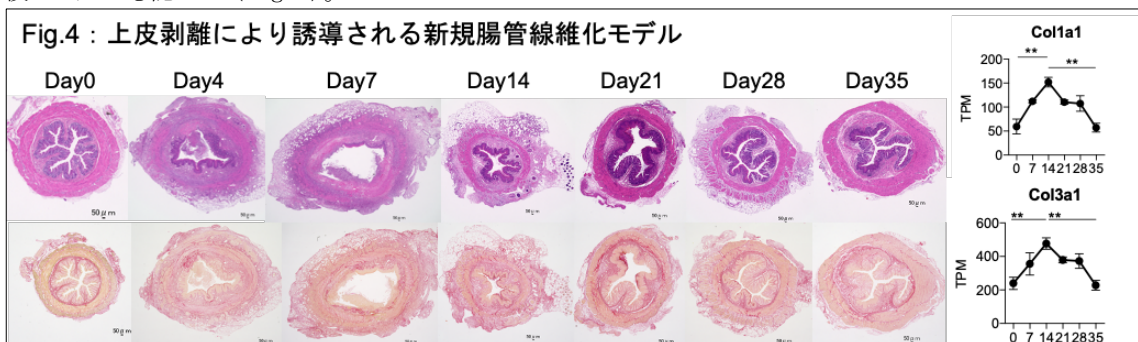
検体を用いて腸管ストローマ細胞のなかでも線維芽細胞に着目して 1 細胞遺伝子発現解析を行なったところ、2つの明確な細胞集団の存在を見出した(fibroblast (FB)1, FB2とする)。さらに、単離したFB1とFB2をBulk RNA-seqにより解析したところ、腸管上皮幹細胞維持に必須の因子である R-spondin や WNT2B などの発現をはじめ、両者は遺伝子発現プロファイルが大きく異なる集団であることを見出した(Fig. 2)。

腸管エントロピーのさらなる理解のために、慢性 DSS モデルを用いて腸管内の組織常在細胞を測定したところ、DSS を 2 サイクル投与後の 23 日目の腸管は、組織学的には正常マウスと明らかな変化は認めないレベルに炎症収束を認めているものの、細胞レベルにおいては、FB1 の割合が FB2 の割合に比して慢性炎症後

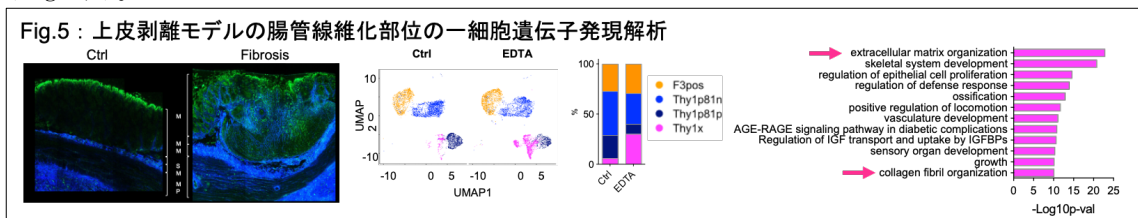


に増加していることを見出した(Fig. 3)。この様に、不十分な組織修復レジリエンスの結果として蓄積する腸管エントロピーが細胞レベルで存在する可能性が示唆された。

組織障害エントロピーの細胞レベル・分子レベルでの解析のために、上皮剥離モデルを作成し、採取した腸管をそれぞれ HE 染色、Sirius Red 染色を行い、腸管における線維化を継続的に病理学的に評価した。本上皮剥離モデルは、粘膜下層から筋層に及ぶ深い潰瘍形成・腸管線維化を認め、漿膜外の脂肪組織増生(Creeping fat)を伴う点で、ヒトクローン病の腸管病理像と高い相同性が認められるものであった。さらに、病理学的評価により、比較的短期間で腸管の線維化の樹立を認め、術後 14 日をピークに Collagen 関連遺伝子の増加を認めた。さらに、線維化病変は術後 35 日にも認めた(Fig 4)。



多光子顕微鏡を用いた健闘により、無染色の状態でも上皮剥離モデル 14 日後における粘膜下層、筋層のコラーゲン沈着を示す第二次高調波形成(SHG)増加は観察可能であった(Fig 5 左)。これを応用して、上皮剥離モデル 14 日後における腸管線維化領域の大腸粘膜固有層細胞から gp38 陽性となる線維芽細胞を単離し、1 細胞遺伝子発現解析法により解析したところ、線維化に伴い出現する線維芽細胞集団 Thy1x を見出した(Fig6 中)。Thy1x は 4 集団の線維芽細胞の中で、GO 解析で ECM 産生関連の遺伝子が Enrich しており、線維化に寛容する細胞であることが示唆された(Fig6 右)。



さらに、遺伝子発現解析より Thy1x に高発現する転写因子とエフェクター因子を同定し、これに対する阻害剤の投与により、上皮剥離モデルの腸管組織障害の改善を認めた。また、ATAC-seq によりこれらの重要な因子が細胞群ごとにエピゲノムレベルで制御されていることを明らかにした。

以上のことより、Omics 解析を用いて、腸管組織障害に関与する新規のストローマ細胞集団を同定し、その分化経路の一端を明らかとするとともに、新規のストローマ細胞を標的とした革新的抗線維化治療に繋がる基盤的検討を示すことに成功した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sunaga Shogo, Tsunoda Junya, Teratani Toshiaki, Mikami Yohei, Kanai Takanori	4. 巻 13
2. 論文標題 Heterogeneity of ILC2s in the Intestine; Homeostasis and Pathology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.867351	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Irie Emi, Ishihara Rino, Mizushima Ichiro, Hatai Shunya, Hagihara Yuya, Takada Yoshiaki, Tsunoda Junya, Iwata Kentaro, Matsubara Yuta, Yoshimatsu Yusuke, Kiyohara Hiroki, Taniki Nobuhito, Sujino Tomohisa, Takabayashi Kaoru, Hosoe Naoki, Ogata Haruhiko, Teratani Toshiaki, Nakamoto Nobuhiro, Mikami Yohei, Kanai Takanori	4. 巻 13
2. 論文標題 Enrichment of type I interferon signaling in colonic group 2 innate lymphoid cells in experimental colitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.982827	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takimoto Yoichi, Chu Po-sung, Nakamoto Nobuhiro, Hagihara Yuya, Mikami Yohei, Miyamoto Kentaro, Morikawa Rei, Teratani Toshiaki, Taniki Nobuhito, Fujimori Sota, Suzuki Takahiro, Koda Yuzo, Ishihara Rino, Ichikawa Masataka, Honda Akira, Kanai Takanori	4. 巻 26
2. 論文標題 Myeloid TLR4 signaling promotes post-injury withdrawal resolution of murine liver fibrosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106220 ~ 106220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsubara Yuta, Kiyohara Hiroki, Teratani Toshiaki, Mikami Yohei, Kanai Takanori	4. 巻 205
2. 論文標題 Organ and brain crosstalk: The liver-brain axis in gastrointestinal, liver, and pancreatic diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 108915 ~ 108915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2021.108915	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Scarno G, Mazej J, Laffranchi M, Di Censo C, Mattioli I, Candelotti AM, Pietropaolo G, Stabile H, Fionda C, Peruzzi G, Brooks SR, Tsai WL, Mikami Y, Bernardini G, Gismondi A, Sozzani S, Di Santo JP, Vosshenrich CAJ, Diefenbach A, Gadina M, Santoni A, Sciumè G.	4. 巻 120
2. 論文標題 Divergent roles for STAT4 in shaping differentiation of cytotoxic ILC1 and NK cells during gut inflammation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2306761120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 三上洋平
2. 発表標題 Single cell analysis to better understand the pathogenesis of IBD
3. 学会等名 The 1st International Symposium of Clinical Immunology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三上洋平
2. 発表標題 消化管粘膜の多様な細胞が織りなす消化器免疫学
3. 学会等名 日本臨床免疫学会 免疫疾患横断セミナーシリーズ第3回 Human Immunology Priming Seminar ~様々な領域の分子標的療法から臨床免疫を理解しよう~ (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三上洋平, 寺谷俊昭, 金井隆典
2. 発表標題 腸炎病態における腸管Th細胞の新規制御機構
3. 学会等名 第46回日本リンパ学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三上洋平
2. 発表標題 腸管FOXP3+制御性T細胞の維持を介した大腸の免疫学的恒常性における非対称的迷走神経制御機構
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yohei Mikami
2. 発表標題 Single-cell sequencing finds cell type-specific immune dysregulation in IBD
3. 学会等名 The 9th annual meeting of AOCC (AOCC 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三上 洋平
2. 発表標題 炎症性腸疾患における 免疫学的病態と臓器連関
3. 学会等名 千葉大学リーディング研究育成プログラム 「希少・難治性疾患に対する革新的治療創生研究」 希少・難治性疾患に対する革新的治療創生研究シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
イタリア	Sapienza University of Rome			
米国	NIH			