

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07479

研究課題名(和文) 炎症性腸疾患の粘膜治癒過程におけるトロンボモジュリンの作用機序の解明

研究課題名(英文) Effects of recombinant thrombomodulin on intestinal mucosal healing

研究代表者

高娃 阿栄 (Gaowa, Arong)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50643805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腸管上皮オルガノイドを用いたin vitro実験系において、遺伝子組換え型可溶性トロンボモジュリン(rsTM)はオルガノイドの成長を有意に促進し、腸管上皮幹細胞と上皮細胞遺伝子群の発現を濃度依存的に上昇した。デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発大腸炎モデルを用いたin vivo実験において、rsTMはマウスの体重回復を促進し、組織学的にも腸炎抑制効果と延命効果を示すことが分かった。また、rsTMがLGR5陽性腸管上皮幹細胞の増殖と上皮分化を増強させ、粘膜治癒を促進することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、腸上皮幹細胞の生体外培養法が確立され、腸上皮の増殖と分化を制御するメカニズムが分子レベルで明らかにされてきた。しかし、炎症性腸疾患において上皮分化・再生がどのような仕組みで制御されているか、まだ不明な点が多い。そこで我々は、腸上皮幹細胞が誘導する上皮再生過程をin vitroで再現するオルガノイドを用い再生応答を司る分子を同定し、炎症性腸疾患の粘膜治癒を目指した検討を進めている。本研究では、リコンビナントトロンボモジュリンの腸管上皮幹細胞増殖・分化誘導を介した粘膜治癒促進効果を検討し、炎症性腸疾患に対する有望な治療薬となる可能性を提示した。

研究成果の概要(英文)：Recombinant soluble thrombomodulin markedly stimulated the growth of intestinal organoids, thereby increasing the surface areas and budding phenotypes of the organoids. A high dose rsTM treatment significantly improved the recovery of body weight, histological outcomes, colon length shortening, and prolonged the survival of mice with colitis. Importantly, rsTM significantly upregulated the LGR5-positive stem cell proliferation and epithelial differentiation both in intestinal organoids and in intestinal tissues in colitis.

研究分野：免疫学

キーワード：上皮再生 粘膜治癒 トロンボモジュリン 炎症性腸疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

クローン病や潰瘍性大腸炎など炎症性腸疾患は、消化管に原因不明の慢性炎症が生じる病気で、長期経過中に発がんリスク上昇も見られる難病である。長らく症状の緩和が治療目標であったが、近年、生物学的製剤の登場により患者の臨床症状と予後も大きく改善され、治療目標がより高く設定できるようになった。「粘膜治癒」と呼ばれる損傷した組織の構造と機能的回復を目指した治療戦略が提唱され、これに伴い、腸粘膜再生を目指した研究が大きく注目されるようになった。その中で、幹細胞の体外培養技術の進展によって、腸管上皮幹細胞の体外培養も可能になり、この数年腸上皮幹細胞を用いた腸管再生機構解明とこれに基づく治療薬開発の研究が急速に進んでいる。

血液凝固系制御糖タンパク質であるトロンボモジュリン (TM) は抗凝固・抗炎症作用以外にも皮膚や粘膜の創傷治癒を促進するなど多面的機能を持つことが知られている。しかしながら、TM の炎症性腸疾患の粘膜治癒に対する効果とその作用機序についてまだ解明不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、腸管上皮オルガノイドを用い、TM の腸管上皮細胞に対する増殖・分化誘導効果を検討する。さらに、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発腸炎マウスモデルを用い、TM の粘膜治癒への促進効果を検証し、炎症性腸疾患の新たな治療薬候補としての可能性を提示する。

## 3. 研究の方法

(1) 腸管上皮オルガノイドを用いた上皮増殖・分化誘導の検討：正常 C57BL/6 マウスの腸組織から Gentle Cell Dissociation Reagent (STEM Cell 社, カナダ) にて腸陰窩を剥離後、マトリゲル (Corning 社, 米国) に懸濁した (細胞懸濁液とマトリゲルの混合比 1:1)。懸濁液を 24 穴マルチウエルプレート (Corning 社) に撒いて、幹細胞増殖維持に必要なシグナル経路活性因子を含むオルガノイド培養溶液 (STEM Cell 社) を添加し、37 度、5%の CO<sub>2</sub> インキュベーターの中培養した。3 日ごとに培地を交換した。オルガノイド成熟の形態学的変化を光学顕微鏡で観察した。

オルガノイドの初期成熟段階に最終濃度が 2 µg/mL または 20 µg/mL の遺伝子組み換え型可溶性 TM (rsTM, 旭化成ファーマより提供) を添加し、オルガノイドの増殖・分化への影響を観察した。また、腸管上皮遺伝子群の発現変化について定量性 PCR 法および免疫蛍光染色法を用いて解析した。

(2) DSS 誘発腸炎モデルを用いた粘膜治癒促進効果の検討：C57BL/6 マウスに 2% DSS を 5 日間自由飲水させ腸炎を誘導した (腸炎進展は体重減少と血便で確認)。6 日目に DSS 投与を中止し、生理食塩水 (対照群) または rsTM (2 mg/kg または 20 mg/kg) を腹腔内投与し、臨床症状 (体重減少・血便) の改善と生存率に対する効果を調べた。また、腸組織を回収し、病理組織学的検査並びに腸上皮遺伝子群の発現変化について確認した。

## 4. 研究成果

(1) 腸管上皮オルガノイドを用いた検討：はじめに、オルガノイド構造形成について光学顕微鏡で観察を行った。陰窩は培養後 6 時間から 1 日に円形構造を形成し始め、培養 3~5 日頃に内腔と器官芽構造、7~10 日頃に複雑な陰窩様構造を形成し、腸組織に類似構造を示すことが確認された (データ省略)。次に、rsTM の正常状態での腸上皮増殖・分化に対する影響を検討した。その結果を図 1 に示す。rsTM は、オルガノイドの成熟 (サイズと陰窩数で評価) を促進し (図 1. A) 腸管上皮幹細胞マーカーである LGR5 を含む上皮遺伝子群

の発現量を濃度依存的に誘導することが確認された (図 1. B)。

(2) DSS 誘発腸炎モデルを用いた検討: まず、DSS 投与マウスでは、体重減少や下痢、大腸萎縮、腸炎スコア増加が観察され、大腸炎病態発症の確認ができた。続いて、rsTM の病態下での粘膜治癒に対する影響を検討した。その結果を図 2 に示す。DSS 誘発腸炎マウスに 2 mg/kg の rsTM 投与群では、体重減少抑制および回復促進効果が認められなかったが、20 mg/kg の rsTM 投与群では、マウスの体重回復が促進され (図 2.

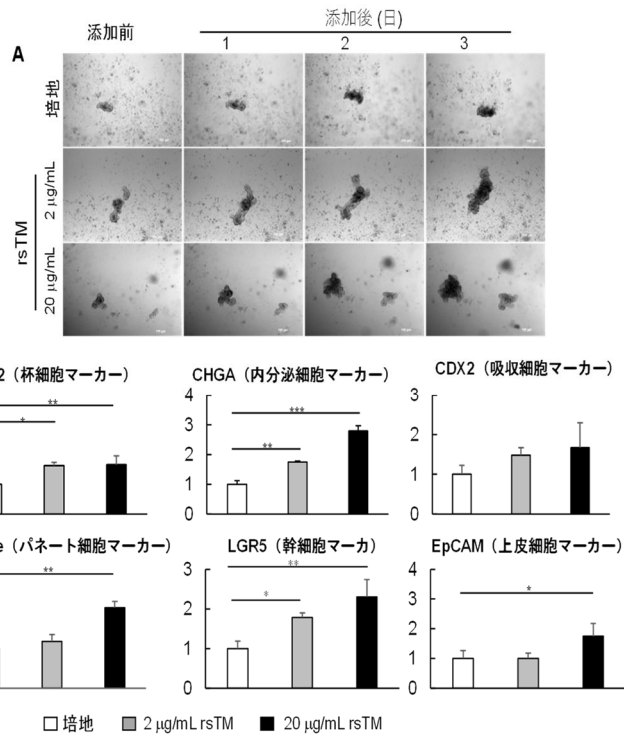


図 1. rsTMはオルガノイドの成長を促進し(A)、腸上皮細胞特異的遺伝子の発現を誘導する(B)。

A) 組織学的にも腸炎が有意に改善され延命効果が確認された (図 2. B-D) また、腸管上皮幹細胞と上皮細胞遺伝子群の発現増加が見られ (図 2. E) 組織修復に重要な因子であるインターロイキン (IL) -22 の発現が有意に上昇することが確認された (図 2. F)。

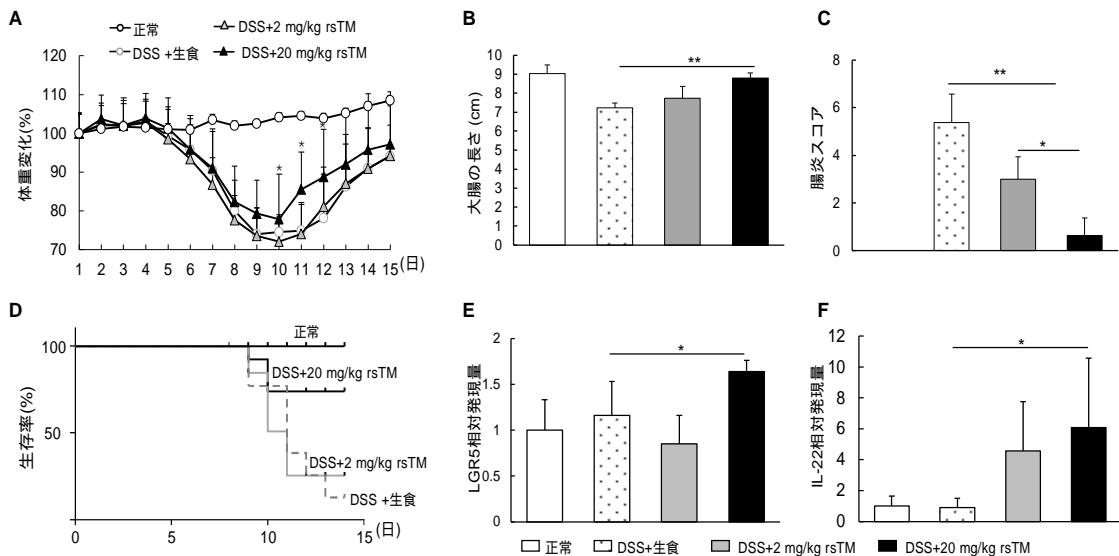


図2. rsTMはDSS腸炎モデルマウスの体重回復を促進し(A)、組織学的にも腸炎を改善し(B, C)延命効果を示す(D)。さらに、腸組織中の腸上皮幹細胞遺伝子と組織修復に重要な遺伝子であるIL-22の発現を増強させる(E, F)。

以上より、rsTM は腸管上皮オルガノイドの成長を積極的に促すこと、また傷害された腸管粘膜の組織再生を促進する点で炎症性腸疾患に対する有望な治療薬となる可能性が示唆される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計20件（うち査読付論文 20件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 阿栄高娃、朴恩正、島岡要	4. 巻 52
2. 論文標題 成体幹細胞マーカーLGR5：構造とシグナル伝達	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 消化器病学サイエンス	6. 最初と最後の頁 47-47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Obeng G, Park EJ, Appiah MG, Kawamoto E, Gaowa A, Shimaoka M.	4. 巻 11
2. 論文標題 miRNA-200c-3p targets talin-1 to regulate integrin-mediated cell adhesion.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	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） 10.1038/s41598-021-01143-3.	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 Gaowa A, Park EJ, Kawamoto E, Qin Y, Shimaoka M.	4. 巻 36
2. 論文標題 Recombinant soluble thrombomodulin accelerates epithelial stem cell proliferation in mouse intestinal organoids and promotes the mucosal healing in colitis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 3149-3157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jgh.15656.	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 Akama Y, Park EJ, Satoh-Takayama N, Gaowa A, Ito A, Kawamoto E, Darkwah S, Appiah MG, Myint PK, Ohno H, Imai H, Shimaoka M.	4. 巻 10
2. 論文標題 The Role of Innate Lymphoid Cells in the Regulation of Immune Homeostasis in Sepsis-Mediated Lung Inflammation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagnostics (Basel)	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） 10.3390/diagnostics10100808.	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 Akama Y, Park EJ, Satoh-Takayama N, Gaowa A, Ito A, Kawamoto E, Darkwah S, Appiah MG, Myint PK, Ohno H, Imai H, Shimaoka M.	4. 巻 55
2. 論文標題 Sepsis Induces Deregulation of IL-13 Production and PD-1 Expression in Lung Group 2 Innate Lymphoid Cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 357-370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000001647.	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 Appiah MG, Park EJ, Darkwah S, Kawamoto E, Akama Y, Gaowa A, Kalsan M, Ahmad S, Shimaoka M.	4. 巻 21
2. 論文標題 Intestinal Epithelium-Derived Luminally Released Extracellular Vesicles in Sepsis Exhibit the Ability to Suppress TNF- $\alpha$ and IL-17A Expression in Mucosal Inflammation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	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) 10.3390/ijms21228445.	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 Myint PK, Park EJ, Gaowa A, Kawamoto E, Shimaoka M.	4. 巻 15
2. 論文標題 Targeted remodeling of breast cancer and immune cell homing niches by exosomal integrins.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagn Pathol.	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) 10.1186/s13000-020-00959-3.	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 Yamaguchi T, Kawamoto E, Gaowa A, Park EJ, Shimaoka M.	4. 巻 22
2. 論文標題 Remodeling of Bone Marrow Niches and Roles of Exosomes in Leukemia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	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) 10.3390/ijms22041881.	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 Park EJ, Myint PK, Appiah MG, Worawattananutai P, Inprasit J, Prajuabjinda O, Soe ZY, Gaowa A, Kawamoto E, Shimaoka M.	4. 巻 26
2. 論文標題 Ligand-competent fractalkine receptor is expressed on exosomes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep.	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) 10.1016/j.bbrep.2021.100932.	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 Myint PK, Ito A, Appiah MG, Obeng G, Darkwah S, Kawamoto E, Gaowa A, Park EJ, Shimaoka M	4. 巻 26
2. 論文標題 Irisin supports integrin-mediated cell adhesion of lymphocytes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep.	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) 10.1016/j.bbrep.2021.100977.	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 Kawamoto E, Nago N, Okamoto T, Gaowa A, Masui-Ito A, Akama Y, Darkwah S, Appiah MG, Myint PK, Obeng G, Ito A, Caidengbate S, Esumi R, Yamaguchi T, Park EJ, Imai H, Shimaoka M.	4. 巻 9
2. 論文標題 The Lectin-Like Domain of Thrombomodulin Inhibits 1 Integrin-Dependent Binding of Human Breast Cancer-Derived Cell Lines to Fibronectin.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	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) 10.3390/biomedicines9020162.	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 Park EJ, Myint PK, Appiah MG, Darkwah S, Caidengbate S, Ito A, Matsuo E, Gaowa a, Shimaoka M. Kawamoto E,	4. 巻 13
2. 論文標題 The Spike Glycoprotein of SARS-CoV-2 Binds to 1 Integrins Expressed on the Surface of Lung Epithelial Cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	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) 10.3390/v13040645	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 Yan Q, Gaowa A, Kawamoto E, Park EJ, Shimaoka M.	4. 巻 5
2. 論文標題 Intestinal Epithelial Organoids: A Platform for Discovering Mucosal Healing Drug Candidates for the Treatment of Inflammatory Bowel Diseases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagn Pathol.	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) なし	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 阿栄高娃、秦 艶、朴恩正、島岡要	4. 巻 46
2. 論文標題 腸上皮オルガノイドを用いた炎症性腸疾患の病態解明と治療展望	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 メディカル・サイエンス・ダイジェスト	6. 最初と最後の頁 38 - 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 阿栄高娃、朴恩正、島岡要	4. 巻 40
2. 論文標題 腸管上皮再生を目指した新規治療法の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 50-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 阿栄高娃、Michael G. Appiah, 朴恩正、島岡要	4. 巻 41
2. 論文標題 腸管上皮由来エキソソームがキャリアーするマイクロRNAによる炎症性サイトカインの発現抑制	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 89-92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 阿栄高娃、朴恩正、島岡要	4. 巻 39
2. 論文標題 腸管上皮幹細胞の増殖促進及び上皮分化誘導に着目した粘膜治癒の新規治療法の開発に向けて	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 37-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Motomu Shimaoka, Eiji Kawamoto, Arong Gaowa, 他2名	4. 巻 11
2. 論文標題 Connexins and Integrins in Exosomes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11010106.	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 該当する

1. 著者名 Park EJ, Appiah MG, Myint PK, Gaowa A, 他2名	4. 巻 25
2. 論文標題 Exosomes in Sepsis and Inflammatory Tissue Injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Pharm Des	6. 最初と最後の頁 4486 - 4495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1381612825666191116125525	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 該当する

1. 著者名 阿栄高娃・朴恩正・島岡要	4. 巻 41
2. 論文標題 SARS-CoV-2のスパイクタンパク質が宿主細胞膜上のインテグリンに結合しウイルスの細胞内侵入に寄与する	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 46-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Gaowa A, Kawamoto E, Park EJ, Shimaoka M.
2. 発表標題 Recombinant soluble thrombomodulin promotes intestinal stem cell-mediated epithelial regeneration
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿栄高娃、秦 艶、朴恩正、島岡要
2. 発表標題 炎症性腸疾患に対するトロンボモジュリンの粘膜治癒促進効果の検討
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿栄高娃、他3名
2. 発表標題 トロンボモジュリンの粘膜治癒過程における効果と作用機序
3. 学会等名 第34回日本Shock学会総会
4. 発表年 2019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
研究分担者	川本 英嗣  (Kawamoto Eiji)  (20577415)	三重大学・医学部附属病院・講師    (14101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	朴 恩正  (Park Eun Jeong)  (20644587)	三重大学・医学系研究科・准教授    (14101)	
研究分担者	島岡 要  (Shimaoka Motomu)  (40281133)	三重大学・医学系研究科・教授    (14101)	

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