

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17425

研究課題名(和文) 腸管上皮幹細胞における炎症塑性リセット機構の解明

研究課題名(英文) The regulation of the plasticity by long-term inflammation in intestinal stem cells

研究代表者

日比谷 秀爾 (Shuji, Hibiya)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：20801963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎・クローン病に代表される炎症性腸疾患( IBD )の特徴は、治療により一旦は症状が改善するも再燃を繰り返し最終的には手術により切除されることである。それは IBD 寛解後の病理では炎症細胞浸潤は認めないものの、腺管の配列異常や杯細胞減少などの上皮細胞機能異常を認めることから長年の炎症により元に戻らないことを示唆している。本研究では、長期炎症を体外で再現し、炎症前後の同じヒト細胞を比較することにより、個人差ではなく炎症による差異の描出に成功しています。その結果、長期炎症による非可逆因子を同定し、その因子を標的とすることで一部の形質は元に戻ることを示しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長期炎症による非可逆機構を初めて明らかとした。非可逆因子を標的とすることで、炎症塑性の一部可塑性変化を認め上形質の改善を認めたことから、再燃予防を見据えた新規炎症性腸疾患の治療薬開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：The characteristic of inflammatory bowel disease (IBD) represented by ulcerative colitis and Crohn's disease is that relapse is repeated. Although inflammatory cell infiltration is not observed in the pathology after IBD remission, epithelial cell dysfunction such as crypt distortion and goblet cell depletion is observed, which suggests that it cannot be recovered by long-term inflammation. In this study, we have succeeded in delineating differences due to inflammation but not individual differences by comparing the same human cells before and after long-term inflammation. We identified an irreversible factor due to long-term inflammation and showed that targeting that factor restores some traits.

研究分野：消化器内科学

キーワード：炎症塑性 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

潰瘍性大腸炎・クローン病に代表される炎症性腸疾患 (IBD) の特徴は、治療により一旦は症状が改善するも再燃を繰り返し最終的には手術により切除されることである。再燃の一因としては、炎症を標的とした治療により腸炎を一時的に抑えても腸管上皮細胞の完全な機能回復にまで至らず、腸管上皮幹細胞の形質転換・塑性が示唆されている。事実として IBD 寛解後の病理では炎症細胞浸潤は認めないものの、腺管の配列異常や杯細胞減少などの上皮細胞機能異常を認める。一方短期的な感染性腸炎などの寛解後では腺管の配列異常などは認められず完全に修復されていることから、長期的な炎症刺激が不可逆的な上皮細胞形質転換・塑性を誘導し、再燃に大きく寄与することが考えられる。申請者はこれらの破綻機構は腸管上皮幹細胞での長期間による炎症ストレス蓄積が IBD 再燃機構の根幹であると構想し、炎症ストレス蓄積機構の解明及びその機構を解除し幹細胞塑性をリセットすることで、再燃抑制に大きな効果が期待できると着想した。そこで、申請者の教室で独自に構築したマウス大腸オルガノイドを用いて体外にて炎症環境を模倣したモデルの構築を試みた。興味深いことに 1 年以上の炎症刺激により炎症シグナルである NFκB シグナルの経時的亢進を認め、長期炎症特異的な標的遺伝子を同定した。さらに、炎症刺激物質を除去しても上皮細胞応答・酸化ストレスは完全にリセットできないことから、長期炎症における上皮幹細胞塑性の確立に成功した。しかし、長期炎症暴露による腸管上皮細胞の塑性獲得機構および塑性を解除する機構は未だ不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒト腸管上皮幹細胞の長期炎症刺激モデルを構築し、炎症シグナル蓄積機構による幹細胞塑性病態を明らかとすること、幹細胞塑性をリセットする機構を解明することを目的とする。

IBD 治療は抗炎症効果のみでは再燃をきたすことから、近年の治療目標は粘膜治癒に移行している。しかし粘膜治癒を直接の標的とした治療薬は開発されておらず、再生医療においても粘膜を覆うという物理的修復のみであり、機能的修復をゴールとした治療は存在しない。上皮細胞を主眼としたこれまでの研究はマウスを用いた *in vivo* の系が多い。上皮や免疫担当細胞を含めた総合的な評価が可能である利点はあるものの、腸炎モデルマウスは 2-3 ヶ月と短期であり、経時的な解析はその都度マウスを屠殺する必要があることから同一個体での長期間のシーケンシャルな解析は難しい。申請者が独自に構築した体外モデルでは上皮細胞を継続的に培養することにより、同一細胞集団に対して炎症刺激期間中に連続して解析することが可能である。さらに無血清培地を使用していることから炎症刺激物質の種類・量を調節可能であること、一定の強度で刺激を行うことから、*in vivo* の系よりもプログラムされた炎症モデルを構築している。本研究ではヒト細胞、患者由来細胞を用いることから疾患を念頭に置いた解析が可能である。以上より、IBD 体外モデルを用いて上皮幹細胞に特化して炎症塑性を解析することは世界的観点からも独創的であり、マウスではなくヒト初代培養細胞を用いた塑性リセット機構の解明は将来的に IBD 機能的修復を標的とした治療開発に直結する。さらに炎症塑性は再燃のみならず IBD 発がんにも強く関連するため、発がん予防・抗がん剤開発まで発展することが期待できることから十分意義があると考えられる。

### 3. 研究の方法

#### 1) ヒト IBD 擬似モデルの構築

##### ・慢性炎症刺激条件の確立

慢性炎症及び炎症塑性モデルはマウスで既に確立済みであり、その条件を基盤としてヒト慢性炎症モデルを確立する。ヒトオルガノイド炎症応答レセプター発現を確認し、マウス大腸オルガノイドでは発現していない TLR3 の発現及び Poly(I:C) 刺激応答を確認する。刺激物質カクテルを選定し炎症環境を模倣した培養条件を決定する。

・慢性炎症特異的遺伝子発現系譜解析 それぞれのフェーズにおけるオルガノイドから RNA を抽出しマイクロアレイにて網羅的遺伝子発現解析を行い、フェーズ特異的遺伝子の抽出、パスウェイ解析によるシグナル変遷を明らかとする。

・慢性炎症特異的幹細胞遺伝子発現系譜解析 Lgr5 プロモーター下に GFP を結合したレンチウイルスベクターを各フェーズのオルガノイドに導入する。GFP 陽性細胞を単離し、幹細胞網羅的遺伝子発現解析を行い、フェーズ特異的遺伝子を抽出する。

#### 2) 長期炎症による腸管上皮幹細胞の炎症塑性獲得機構解析

・炎症塑性獲得条件検討 慢性炎症体外モデルと並行して炎症塑性モデルの構築を行う。60 週間炎症刺激の後、炎症刺激物質を培地から除去し、除去 2 ヶ月後以降の炎症応答遺伝子の発現亢進維持などで塑性形質を評価する。また、重症長期罹患 IBD 患者の手術となった検体を用い、病変部由来のオルガノイドがすでに炎症塑性を獲得しているかを確認する。

##### ・炎症塑性形質解析

炎症塑性オルガノイドの炎症シグナル制御、細胞増殖、細胞死機構について解析を行う。

・炎症塑性特異的発現遺伝子解析

マイクロアレイ解析により炎症塑性オルガノイド特異的に発現・消失する遺伝子を抽出する。

### 3) 腸管上皮幹細胞炎症塑性リセット機構解析

- ・炎症塑性形質阻害によるリセット

計画2)にて明らかとなる炎症シグナル亢進・細胞死制御を、阻害剤などにて抑制し炎症塑性が解除されるか検討する。

- ・炎症塑性特異的発現遺伝子動揺によるリセット

計画2)にて明らかとなる炎症塑性特異的遺伝子を強制発現、もしくは CRISPR にて消失させることにより炎症塑性が解除されるか検討する。

- ・炎症塑性リセット評価

オルガノイドでの遺伝子発現プロファイル・増殖能・分化能にて評価する。さらに NOG マウス腸管に移植し、腺管構造・透過性・バリア能を *in vivo* にて評価する。リセットが確認された場合、IBD 患者由来オルガノイドでのリセットを確認し、治療標的候補を同定する。

## 4. 研究成果

### 1) ヒト IBD 擬似モデルの構築

- ・慢性炎症刺激条件の確立

慢性炎症及び炎症塑性モデルはマウスで既に確立済みであり、その条件を基盤としてヒト慢性炎症モデルを確立した。ヒトオルガノイド炎症応答レセプター発現を確認し、マウス大腸オルガノイドでは発現していない TLR3 の発現及び Poly(I:C) 刺激応答を確認した。刺激物質カクテルを選定し炎症環境を模倣した培養条件を決定した。本研究では 60 週間の持続刺激を確立した。また、5 週炎症刺激時点でのマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析では GSEA にて炎症応答遺伝子群の発現上昇を認め、さらに IBD 患者で発現上昇している遺伝子群との比較でも相同性が確認されたことから IBD 環境を模倣していることを確認した。

- ・慢性炎症特異的遺伝子発現系譜解析 それぞれのフェーズにおけるオルガノイドから RNA を抽出しマイクロアレイにて網羅的遺伝子発現解析を行い、フェーズ特異的遺伝子の抽出、パスウェイ解析によるシグナル変遷を明らかとした。

- ・慢性炎症特異的幹細胞遺伝子発現系譜解析 Lgr5 プロモーター下に GFP を結合したレンチウイルスベクターを各フェーズのオルガノイドに導入した。

### 2) 長期炎症による腸管上皮幹細胞の炎症塑性獲得機構解析

- ・炎症塑性獲得条件検討 慢性炎症体外モデルと並行して炎症塑性モデルの構築を行った。60 週間炎症刺激の後、炎症刺激物質を培地から除去し、除去 2 ヶ月後以降の炎症応答遺伝子の発現亢進維持などで塑性形質を評価した。60 週間持続刺激後のオルガノイドは炎症刺激物質を除去しても炎症応答が持続しており炎症塑性を獲得したことを確認した。通常オルガノイドと炎症除去後の炎症塑性オルガノイドは培養条件が同一であることから、塑性形質の差異を直接比較検討が可能であった。また、重症長期罹患 IBD 患者の手術となった検体を用い、病変部由来のオルガノイドがすでに炎症塑性を獲得していることを確認した。

- ・炎症塑性形質解析

炎症塑性オルガノイドの炎症シグナル制御、細胞増殖、細胞死機構について解析を行った。炎症塑性オルガノイドにおいては、NFκB シグナルの恒常的活性化、アポトーシスによる細胞死を認めていた。

- ・炎症塑性特異的発現遺伝子解析

マイクロアレイ解析により炎症塑性オルガノイド特異的に発現・消失する遺伝子を抽出した。

### 3) 腸管上皮幹細胞炎症塑性リセット機構解析

- ・炎症塑性形質阻害によるリセット

計画2)にて明らかとなる炎症シグナル亢進・細胞死制御を、阻害剤などにて抑制し炎症塑性が解除されるか検討したが、明らかなりセット効果を認めなかった。

- ・炎症塑性特異的発現遺伝子動揺によるリセット

計画2)にて明らかとなる炎症塑性特異的遺伝子を強制発現、もしくは CRISPR にて消失させることにより炎症塑性が解除されるか検討した。炎症塑性特異的に発現している遺伝子を CRISPR にて消失させると、一部の形質がリセットされることを明らかとした。

- ・炎症塑性リセット評価

オルガノイドでの遺伝子発現プロファイル・増殖能・分化能にて評価した。さらに NOG マウス腸管に移植し、腺管構造を *in vivo* にて評価したところ、生着率の改善を認めた。

## 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 2件）

1. 著者名 Sho Watanabe, Kiichiro Tsuchiya, Ryu Nishimura, Tomoaki Shirasaki, Nobuhiro Katsukura, Shuji Hibiya, Ryuichi Okamoto, Tetsuya Nakamura, Mamoru Watanabe	4. 巻 17
2. 論文標題 Mutation by CRISPR System Enhances the Malignant Potential of Colon Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol. Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 1459-1467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-18-1195	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 Ryu Nishimura, Tomoaki Shirasaki, Kiichiro Tsuchiya, Yoshihide Miyake, Yusuke Watanabe, Shuji Hibiya, Sho Watanabe, Tetsuya Nakamura, Mamoru Watanabe	4. 巻 54
2. 論文標題 Establishment of a system to evaluate the therapeutic effect and the dynamics of an investigational drug on ulcerative colitis using human colonic organoids.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 608-620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-018-01540-y	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 Watanabe Sho, Nishimura Ryu, Shirasaki Tomoaki, Katsukura Nobuhiro, Hibiya Shuji, Kirimura Susumu, Negi Mariko, Okamoto Ryuichi, Matsumoto Yuka, Nakamura Tetsuya, Watanabe Mamoru, Tsuchiya Kiichiro	4. 巻 inpress
2. 論文標題 Schlafen 11 is a novel target for mucosal regeneration in Ulcerative Colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Crohn's and Colitis	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) 10.1093/ecco-jcc/jjab032	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 Katsukura Nobuhiro, Watanabe Sho, Shirasaki Tomoaki, Hibiya Shuji, Kano Yoshihito, Akahoshi Keiichi, Tanabe Minoru, Kirimura Susumu, Akashi Takumi, Kitagawa Masanobu, Okamoto Ryuichi, Watanabe Mamoru, Tsuchiya Kiichiro	4. 巻 112
2. 論文標題 Intestinal phenotype is maintained by Atoh1 in the cancer region of intraductal papillary mucinous neoplasm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 932 ~ 944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14755	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 Takenaka Kento, Fujii Toshimitsu, Suzuki Kohei, Shimizu Hiromichi, Motobayashi Maiko, Hibiya Shuji, Saito Eiko, Nagahori Masakazu, Watanabe Mamoru, Ohtsuka Kazuo	4. 巻 18
2. 論文標題 Small Bowel Healing Detected by Endoscopy in Patients With Crohn's Disease After Treatment With Antibodies Against Tumor Necrosis Factor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1545 ~ 1552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cgh.2019.08.024	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0件

〔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
---------	---------