

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08378

研究課題名(和文) ヒトクローン病モデル構築による粘膜治癒機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mucosal healing mechanisms through the construction of a human Crohn's disease model

研究代表者

大塚 和朗 (Kazuo, Ohtsuka)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00338443

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)：本研究では申請者独自のクローン病患者層別化と体外モデルを融合させ、小腸特異的障害に関する新規知見を得ることを目的とした。当該期間の研究を通じ、ヒト小腸より腸管上皮細胞を単離し、3次元初代培養法にて小腸上皮細胞を培養しオルガノイドを樹立した。オルガノイドでの炎症刺激受容体の発現を確認し、炎症惹起物質を決定し培養条件を確立した。12週間の炎症刺激後にオルガノイドを回収しRNAを抽出すると共に添加3時間後のオルガノイドと比較検討し、NF-κBシグナルの蓄積を確認した。また、内視鏡生検組織よりオルガノイドを樹立する際に適切な培養条件等についてマトリックス等の観点から検討を行い、新たな知見を蓄積した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた知見・成果を基に、治療薬や病型等により層別化を行ったクローン病患者由来の小腸オルガノイドについて解析を進めることで、炎症環境のみならず生物学的製剤等による治療応答やLRG等の既存の血清バイオマーカー等と小腸上皮障害維持機構・粘膜治癒を規定する因子がいかなる関係を有するのかが明らかとなることが期待できる。さらに同疾患において小腸病変の成立・局在を規定する要因の解析・新規バイオマーカーの同定を進めることも可能となり、小腸粘膜の全層性の寛解を規定する因子等も明らかとなることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to integrate applicant-specific Crohn's disease patient stratification and in vitro models to obtain novel insights into small intestine-specific mucosal damage. During the study period, we isolated intestinal epithelial cells from the human small intestine and established organoids by culturing the small intestinal epithelial cells using a three-dimensional primary culture method. We confirmed the expression of inflammatory stimulus receptors in the organoids and determined pro-inflammatory factors to establish the culture conditions. After 12 weeks of inflammatory stimulation, we recovered the organoids, extracted RNA, and compared them with organoids treated with the stimulus for 3 hours, confirming the accumulation of NF-κB signaling. Furthermore, we examined the appropriate culture conditions, including matrices, from the perspective of obtaining organoids from endoscopic biopsy tissues and accumulated new findings.

研究分野：消化器病学

キーワード：クローン病 オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

独自に構築したヒト細胞での体外 IBD モデルを小腸に応用し、種々のクローン病モデルを構築することで特異的障害機構が解明できると着想した。申請者独自のクローン病患者層別化とクローン病体外モデルを融合させることにより、小腸特異的障害に関する鍵分子の同定を目的とする。将来的には鍵分子を標的とした治療法の開発により、小腸粘膜を直接の標的とした治療の確立が期待でき、クローン病以外の小腸難病にまで展開させることが可能である。小腸内視鏡を多く施行することで小腸粘膜評価法を構築し、且つ豊富な生検検体を活用して基礎研究まで発展させてきた申請者のみに遂行可能であり、独創的で世界的な評価に耐えうる研究と考える。

2. 研究の目的

炎症性腸疾患は難治性の慢性の腸疾患である。クローン病は小腸・大腸に難治性の潰瘍病変を有し、出血・狭窄・瘻孔などが生じたため QOL が著しく低下する。治療の問題点として、一旦寛解しても再燃を来し狭窄・瘻孔を生じること、病変部位を切除しても残存小腸から再燃すること、小腸は大腸と異なり全摘出ができないため手術を繰り返した結果、短腸症候群を引き起こすことが挙げられる。申請者は独自に構築したクローン病小腸粘膜評価法により小腸に病変が残存している症例が多いことを発見し、小腸特異的に粘膜障害機構が存在することが予想された。そこで独自に構築したヒト細胞での体外 IBD モデルを小腸に応用し、種々のクローン病モデルを構築することでこの特異的障害機構が解明できると着想した。本研究では申請者独自のクローン病患者層別化とクローン病体外モデルを融合させることにより、小腸特異的障害に関する鍵分子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

概略としては、2 種類のヒトクローン病モデルを構築し、小腸上皮障害機構を明らかとする。さらに大腸炎モデルと比較することにより小腸特異的障害機構、および鍵分子候補を抽出する。候補鍵分子の臨床検体における発現および鍵分子機能を阻害した際の粘膜治癒効果を確認することによりヒト小腸特異的粘膜障害鍵分子を同定することである。

令和 2 年度

- 1) ヒト小腸オルガノイド炎症刺激によるモデル構築ではヒト小腸より腸管上皮細胞を単離し、3 次元初代培養法にて小腸上皮細胞を培養しオルガノイドを樹立する。
- 2) 独自に層別化したクローン病由来オルガノイド樹立においては独自に確立した小腸病変評価により、クローン病患者を A) 小腸・大腸共に病変が残存する症例、B) 小腸に病変が残存しているが大腸病変は粘膜治癒の症例、C) 小腸・大腸共に粘膜治癒をきたした症例の 3 群に層別化する。

令和 3 年度

長期刺激後に炎症惹起物質を培地から除去した後に 2 か月後以降の発現遺伝子を網羅的に解析し、炎症刺激にて形質転換した遺伝子群を抽出する。また前年度に層別化患者群から B 群と C 群において共通する遺伝子群を小腸特異的粘膜障害因子候補として抽出する。

令和 4 年度

前年度までに計画 1)2)にて抽出された候補因子の中で全てに共通する因子を同定し、小腸特異的粘膜治癒に対する鍵分子候補とする。

4. 研究成果

- 令和 2 年度) ヒト小腸より腸管上皮細胞を単離し、3 次元初代培養法にて小腸上皮細胞を培養しオルガノイドを樹立した。オルガノイドでの炎症刺激受容体の発現を確認し、炎症惹起物質を決定し培養条件を確立した。12 週間の炎症刺激後にオルガノイドを回収し RNA を抽出すると共に添加 3 時間後のオルガノイドと比較検討し、NF- κ B シグナルの蓄積を確認した。
- 令和 3 年度) クローン病小腸病変の粘膜治癒機構について、内視鏡を用いた独自のクローン病粘膜評価法に基づき、粘膜治癒との関係について検証を行った。この結果、血清における LRG 濃度が小腸粘膜治癒の有無を反映するバイオマーカーとなり得ることが明らかとなった。一方、既存の生物学的製剤においては高い濃度を維持することが粘膜治癒の達成に必要であることが示された。
- 令和 3 年度) クローン病小腸病変より得られた内視鏡生検組織よりオルガノイドを樹立する際に適切な培養条件等について、再度検討を実施した。この結果、適切なマトリックスや Wnt アゴニストを用いることにより、効率的な培養が可能となる可能性が示された。

- 令和4年度)クローン病小腸病変の粘膜治癒機構について、内視鏡およびMRI等を用いた独自のクローン病粘膜評価法に基づき、粘膜深層との関係について検証を行った。この結果、既存の生物学的製剤においては高い濃度を維持することで、粘膜全層における炎症の解除が得られること、これにより予後の改善が得られることが示された。
- 令和4年度)クローン病小腸病変等より得られた内視鏡生検組織よりオルガノイドを樹立する際に適切な培養条件等について、最適化に関する検討を進めた。この結果、適切なレベルで Wnt シグナルを維持すること、マトリゲルに類似したマトリックス環境を維持することが重要であることが確認された。一方、大腸由来生検組織からオルガノイドを樹立する際と類似した培養環境では初期培養の継続が困難となる例があることが確認された。

本研究で得られた知見・成果を基に、治療薬や病型等により層別化を行ったクローン病患者由来の小腸オルガノイドについて解析を進めることで、炎症環境のみならず生物学的製剤等による治療応答や LRG 等の既存の血清バイオマーカー等と小腸上皮障害維持機構・粘膜治癒を規定する因子がいかなる関係を有するのかが明らかとなることが期待できる。さらに同疾患において小腸病変の成立・局在を規定する要因の解析・新規バイオマーカーの同定を進めることも可能となり、小腸粘膜の全層性の寛解を規定する因子等も明らかとなることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takenaka Kento, Fujii Toshimitsu, Kawamoto Ami, Suzuki Kohei, Shimizu Hiromichi, Maeyashiki Chiaki, Yamaji Osamu, Motobayashi Maiko, Igarashi Akira, Hanazawa Ryoichi, Hibiya Shuji, Nagahori Masakazu, Saito Eiko, Okamoto Ryuichi, Ohtsuka Kazuo, Watanabe Mamoru	4. 巻 7
2. 論文標題 Deep neural network for video colonoscopy of ulcerative colitis: a cross-sectional study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Lancet Gastroenterology & Hepatology	6. 最初と最後の頁 230 ~ 237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/S2468-1253(21)00372-1	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 Takenaka Kento, Kawamoto Ami, Hibiya Shuji, Suzuki Kohei, Fujii Toshimitsu, Motobayashi Maiko, Shimizu Hiromichi, Nagahori Masakazu, Saito Eiko, Okamoto Ryuichi, Watanabe Mamoru, Ohtsuka Kazuo	4. 巻 54
2. 論文標題 Higher concentrations of cytokine blockers are needed to obtain small bowel mucosal healing during maintenance therapy in Crohn's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Alimentary Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1052 ~ 1060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/apt.16551	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 Takenaka Kento, Ohtsuka Kazuo, Fujii Toshimitsu, Oshima Shiori, Okamoto Ryuichi, Watanabe Mamoru	4. 巻 160
2. 論文標題 Deep Neural Network Accurately Predicts Prognosis of Ulcerative Colitis Using Endoscopic Images	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 2175 ~ 2177.e3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2021.01.210	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 Kawamoto Ami, Takenaka Kento, Hibiya Shuji, Ohtsuka Kazuo, Okamoto Ryuichi, Watanabe Mamoru	4. 巻 20
2. 論文標題 Serum Leucine-Rich 2 Glycoprotein: A Novel Biomarker For Small Bowel Mucosal Activity in Crohn's Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 e1196 ~ e1200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cgh.2021.06.036	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 Shimizu Hiromichi, Fujii Toshimitsu, Kinoshita Kenji, Kawamoto Ami, Hibiya Shuji, Takenaka Kento, Saito Eiko, Nagahori Masakazu, Ohtsuka Kazuo, Watanabe Mamoru, Okamoto Ryuichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Intravenous tacrolimus is a superior induction therapy for acute severe ulcerative colitis compared to oral tacrolimus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12876-021-02043-6	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 Kudo Shin ei, Maeda Yasuharu, Okumura Taishi, Matsudaira Shingo, Ishigaki Tomoyuki, Sasanuma Seiko, Mori Yuichi, Kudo Toyoki, Hayashi Takemasa, Wakamura Kunihiko, Miyachi Hideyuki, Baba Toshiyuki, Ohtsuka Kazuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Combined endocytoscopy with pit pattern diagnosis in ulcerative colitis associated neoplasia: Pilot study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestive Endoscopy	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) 10.1111/den.13964	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 Takenaka Kento, Ohtsuka Kazuo, Fujii Toshimitsu, Oshima Shiori, Okamoto Ryuichi, Watanabe Mamoru	4. 巻 -
2. 論文標題 Deep Neural Network Accurately Predicts Prognosis of Ulcerative Colitis Using Endoscopic Images	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology	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) 10.1053/j.gastro.2021.01.210	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 Kitazume Yoshio, Takenaka Kento, Ohtsuka Kazuo, Kimura Koichiro, Ogihara Yusuke, Fujioka Tomoyuki, Tsuchiya Junichi, Fujii Toshimitsu, Watanabe Mamoru, Tateisi Ukihide	4. 巻 -
2. 論文標題 Crohn disease: magnetic resonance enterocolonography features of endoscopic ulcer stages reclassified with the healing process and the relationships to prognoses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Radiology	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) 10.1007/s11604-020-01082-5	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 Kitazume Yoshio, Tsuchiya Junichi, Takenaka Kento, Ohtsuka Kazuo, Kimura Koichiro, Watanabe Ryosuke, Fujioka Tomoyuki, Fujii Toshimitsu, Watanabe Mamoru, Tateisi Ukihide	4. 巻 133
2. 論文標題 High b-value computed diffusion-weighted imaging for differentiating bowel inflammation in Crohn's disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Radiology	6. 最初と最後の頁 109362 ~ 109362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejrad.2020.109362	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 Takenaka Kento, Kitazume Yoshio, Fujii Toshimitsu, Tsuchiya Kiichiro, Watanabe Mamoru, Ohtsuka Kazuo	4. 巻 55
2. 論文標題 Objective evaluation for treat to target in Crohn's disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 579 ~ 587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-020-01678-8	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 Takenaka Kento, Kimura Maiko, Ohtsuka Kazuo	4. 巻 70
2. 論文標題 Colonic strictures mimicking Crohn's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 233-387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2019-320172	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
研究分担者	土屋 輝一郎 (Tsuchiya Kiichiro) (40376786)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	

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
---------	---------