

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22867

研究課題名(和文) ヒト体外腸疾患in vivoモデルを用いたIBD上皮脆弱性リセット治療の開発

研究課題名(英文) The development of the treatment for complete remission of IBD using human in vivo model

研究代表者

渡辺 翔 (Watanabe, Sho)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：00878100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患(IBD)は一旦「寛解」するも「完治」はせず、再燃するため罹病期間が長期となる難病です。寛解時でも腺管のねじれなど腸管上皮細胞は完全に正常化しておらず、脆弱性による潰瘍再発は以前より指摘されていますがその原因は不明です。本研究においてモデルを構築し、炎症モデルにおける網羅的遺伝子発現解析から特異的因子を同定しました。これらの因子を欠損させると炎症刺激下においても細胞増殖を認めるなど炎症脆弱性のリセットに成功しました。潰瘍性大腸炎患者においてもその因子の発現を確認したことから新規治療標的であることが示唆されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎の治療目標は炎症の抑制から上皮の再生を伴う粘膜治癒に移行しています。しかし、粘膜治癒を達成しても組織学的に異常を認める場合は依然、再燃する危険性があります。組織学的治癒まで達成するメカニズムや治療薬の開発は潰瘍性大腸炎の再燃を予防し、難病から脱却する完全治癒を達成することが期待できることから社会的意義の高い成果と考えています。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory bowel disease (IBD) is an intractable disease that once "in remission" is not "cured," but rather relapses, resulting in a prolonged illness period. Even in remission, the intestinal epithelial cells, such as the crypt distortion, have not completely normalized, and ulcer recurrence due to its fragility has long been reported, but its cause is unknown. In this study, we constructed a model and identified specific factors based on comprehensive gene expression analysis in an inflammatory model using human colonic organoids. We succeeded in resetting the inflammatory vulnerability, as cell proliferation was observed even under inflammatory stimuli when these factors were deficient. The expression of the factors was also confirmed in patients with ulcerative colitis, suggesting that they are novel therapeutic targets.

研究分野：消化器内科学

キーワード：炎症塑性リセット オルガノイド ヒト体外モデル 潰瘍性大腸炎

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。そのため、最近の治療ゴールは症状の改善のみならず潰瘍が治癒し粘膜で全て覆われるという「粘膜治癒」が提唱されている。しかしながら、再燃の一因として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・塑性による粘膜の脆弱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、脆弱性が維持されることが潰瘍再発による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 (Nat Med. 2012) 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 NFkB 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出来ずに脆弱性を維持したことから、長期炎症における上皮幹細胞塑性の確立に成功した (J Crohns Colitis 2017、表紙掲載)。これは世界で初めて樹立された IBD 体外再現モデルであることから、プレスリリースを本学と AMED の共同で行い、時事通信等に掲載される (時事通信 潰瘍性大腸炎のモデル、マウス細胞で再現=東京医科歯科大, H28.11.28) など大きな反響を得た。さらに、申請者はマウスの系を発展させてヒト正常大腸オルガノイドの 1 年以上にわたる炎症持続刺激に成功し、不可逆的な上皮細胞の脆弱性形質が獲得されることを確認した。しかし、長期炎症暴露による腸管上皮細胞の脆弱性獲得機構および脆弱性を解除する機構は未だ不明である。

2. 研究の目的

そこで、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、上皮細胞脆弱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ヒト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。さらに同一人物でモデルを構築し、その前後で比較を行うことから個人差を考慮せずにモデル構築のみによる差異を検出することが可能となる。

3. 研究の方法

1) ヒト IBD 擬似モデルの構築においてはヒト大腸オルガノイドに炎症刺激を 1 年以上持続的にを行い、慢性炎症モデルを構築する。経時的に解析を行い、長期炎症特異的機構を明らかとする。また、幹細胞可視化等、腸管上皮幹細胞に特化した解析系を構築する。

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においては、上記モデルから炎症刺激を除去し細胞塑性を確認する。さらに IBD 患者病変部由来のオルガノイドを樹立し、細胞塑性の共通機構を同定する。炎症塑性オルガノイドの炎症シグナル伝達系、オートファジーなどの外来抗原認識機構、細胞死機構を解析し細胞塑性形質の有無を評価すると共に、IBD における上皮幹細胞脆弱性との関連を探索する。また、炎症塑性オルガノイド特異的発現遺伝子群を抽出する。

3) 腸管上皮幹細胞炎症塑性リセット機構解析においては、炎症塑性特異的遺伝子を動揺することにより、塑性形質がリセットされるか検討する。また計画 2) により同定した塑性形質機構の阻害剤を投与し、塑性リセットを確認する。

2021 年

1) ヒト IBD *in vivo* 擬似モデルの構築においては前年度に構築した慢性炎症ヒト大腸オルガノイドを免疫不全マウスの大腸に移植を行い、マウス大腸粘膜内にヒト大腸上皮腺管を構築する。

正常大腸オルガノイドのマウス大腸への移植においては、ヒト正常腺管を構築することは確認済みである。炎症刺激オルガノイドの移植により、IBD 様の病態腺管を構築するか確認する。また、炎症刺激オルガノイドの生着率から再生能・脆弱性を評価する。

2) 腸管上皮幹細胞炎症塑性リセット機構解析においては、前年度に樹立した塑性特異的遺伝子群を発現変化させたオルガノイドをマウス大腸粘膜に移植する。生着率の向上、病的腺管の正常化を確認することで、炎症塑性・上皮脆弱化起因遺伝子として同定する。

4. 研究成果

まず、患者病態に類似させるためマウスの系を応用し、ヒト腸管上皮細胞オルガノイドを用いた IBD 体外モデルの構築を行った。炎症刺激条件を決定し、60 週の持続炎症を施行した。マウスと同様に、長期炎症刺激後に炎症刺激物質を除去しても炎症応答は完全に元に戻らないことを確認し得た。よって、同一人物由来の未刺激オルガノイドと長期炎症刺激後炎症除去した炎症塑性オルガノイドを樹立したことから、炎症塑性による差異解析は可能と考えた。特に、炎症刺激中はアポトーシスによりオルガノイドの増殖は減弱するが、長期炎症後の塑性オルガノイドにおいてもオルガノイドの増殖は減弱したままであった。脆弱性寄与遺伝子解析においては、オルガノイドへの導入効率の良い遺伝子発現技術・レンチウイルス CRISPR による高効率の発現消失技術により評価を行った。また炎症塑性形質解析として、免疫不全 (NOG) マウス腸管への移植を行い、マウス腸管にヒト大腸 GFP オルガノイドが生着することをマウス用内視鏡にて確認済みである。さらに、組織学的評価において、正常オルガノイドからヒト正常腺管が構築されるのみならず、正常オルガノイドを 1 年以上炎症刺激したオルガノイドの移植では、腺管のねじれ、杯細胞の減少など潰瘍性大腸炎と類似した腺管を作成することに成功した。炎症刺激モデルにおいて、テロメアが短縮することを発見した。テロメア短縮剤では細胞死の誘導と共に杯細胞形質の低下を認めた。逆に、テロメア伸長剤の添加により炎症刺激オルガノイドは細胞増殖を認め、杯細胞形質の発現誘導を確認した。テロメア伸長剤処理後にマウス大腸に移植すると、腺管のねじれは解消しており、杯細胞の増加を認めたことから、テロメア伸長は潰瘍性大腸炎における腸管上皮細胞の炎症塑性をリセットし、組織学的に正常化させる効果があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

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 inpress
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 Watanabe Sho, Hibiya Shuji, Katsukura Nobuhiro, Kitagawa Sayuki, Sato Ayako, Okamoto Ryuichi, Watanabe Mamoru, Tsuchiya Kiichiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Importance of Telomere Shortening in the Pathogenesis of Ulcerative Colitis: A New Treatment From the Aspect of Telomeres in Intestinal Epithelial Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Crohn's and Colitis	6. 最初と最後の頁 109 ~ 121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ecco-jcc/jjab115	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺 翔
2. 発表標題 ヒト潰瘍性大腸炎モデルを用いた粘膜治癒に対する新規治療標的の同定
3. 学会等名 JDDW 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺 翔
2. 発表標題 ヒト大腸オルガノイド体外腸炎モデルを用いた潰瘍性大腸炎の新規治療標的の同定
3. 学会等名 第12回日本炎症性腸疾患学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------