

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02895

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞由来複合型自己組織化腸管組織を用いた難治性腸炎モデルの確立

研究課題名（英文）Establishment of refractory inflammatory bowel disease model using human iPS cell-derived self-organizing complex intestinal tissue

研究代表者

水谷 知裕（Mizutani, Tomohiro）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：80632588

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：炎症性腸疾患は未だ原因不明の難治性疾患であり、その複合的な病態を再現する実験モデルが存在しないことが問題である。本研究では、iPS細胞から誘導する自己組織化腸管スフェロイドを基盤とし、浮遊状態で多様な細胞集団を共在させることでより複雑で生理的な「複合型腸管組織」を作出することを目的とした。iPS細胞から誘導し作出された複合多層型腸管組織は、免疫不全マウスへの移植を通じて、より成熟した腸組織を構築することが明らかとなった。本研究で得られた成果を基に難治性腸炎in vitro/in vivo実験系を構築することで、その病態解明や今後の治療応用につながることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって見いだされた、iPS細胞由来自己組織化複合型腸管スフェロイドは、内胚葉由来の腸上皮細胞と中胚葉由来の間質細胞を有する複合型の腸管組織を作り出した。これは、今までのiPS細胞由来腸オルガノイドが球状構造であったのに対して、腸組織の生理的構造の最大の特徴である管腔構造を再現し得た点において、体外において腸組織が有する複合的な生命現象を解明する実験系としての可能性が強調される。将来的には、全ての細胞種を実装した完全なる腸組織を作出することで、様々な生理および疾患病理を再現しうる体外実験モデルの可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：Inflammatory bowel disease is a refractory disease condition with an unknown etiology, and the absence of an ideal experimental model that fully replicates its complex pathology poses a significant challenge so far. This study aimed to create a more physiologically relevant complex intestinal tissue from iPS cell-derived self-organizing intestinal spheroids by co-culturing a diverse other cell populations in a suspension state. The complex multilayered intestinal tissue, derived from iPS cells, demonstrated the ability to form more mature intestinal structure upon xenotransplantation into immunodeficient mice. Based on the findings from this study, the establishment of an in vitro and in vivo experimental system for refractory inflammatory bowel disease could provide deeper insights into the disease's pathology and pave the way for future therapeutic applications.

研究分野：消化管再生医療

キーワード：腸管スフェロイド iPS細胞 腸管グラフト 自己組織化

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎、クローン病など炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease: IBD)は、腸管に慢性持続性の炎症・潰瘍を生じる「難病」であり、その患者数は増加の一途を辿る。腸管に慢性炎症、潰瘍を来す疾患としては狭義の IBD 以外にも、腸管ペーチェット病や非特異性多発性小腸潰瘍症が挙げられる。近年の基礎研究の発展に伴い、慢性腸炎疾患において様々な病態メカニズムの解明が進歩している。しかしその一方で、IBD を正確に再現するマウスモデルはなく、基礎研究データは実際の疾患多様性を反映できないという問題があった。また、オルガノイドのように患者由来の腸上皮細胞を体外で培養する技術は確立されたものの、in vivo において腸管上皮細胞、免疫細胞、間質細胞、血管内皮、神経細胞といった多様な細胞集団が複合的に関与する慢性腸炎疾患の病態において、複合的な腸管組織を模倣し得る培養システムは達成されていない。in vitro における全層性腸管の作出は、腸上皮細胞のみならず間葉系細胞などを有するヒト iPS 細胞由来腸オルガノイド(HIO; Human intestinal organoids)の分化誘導法が注目される。しかしながら、球状スフェロイド構造は成熟しても保持され、単一管腔組織という腸組織の最大の特徴を模倣できない、という短所を持っていた。

近年、HIO 誘導法を発展応用し、特殊な低接着性ガラスプレート上で浮遊培養を行うことで、高効率に腸スフェロイドを均一かつ大量に調製する技術を確立した。本研究では、このスフェロイドから管腔構造を有する「自己組織化腸管スフェロイド」を作出すること、さらに「自己組織化腸管スフェロイド」を基盤として、多様な細胞集団を共在させることで、より複雑かつ生理的な「複合型腸管組織」を in vitro で作出することが期待できると考えた。

2. 研究の目的

近年、ヒト iPS 細胞から腸上皮スフェロイドを誘導する試みは多くなされている。しかしながら、実際の腸管組織最大の特徴であり、腸炎の「場」である管腔を有する腸管スフェロイドの誘導、構築を可能とした報告はない。加えて、この腸管組織の生理的形態を再現することができない短所から、消化管疾患の病態再現を達成した研究はなく、多能性幹細胞からヒト腸管組織を作出するという再生医療における細胞源を主眼とした研究に留まる。そこで本研究は、iPS 細胞由来の臨床応用可能な機能性腸管グラフトを作出するという新規再生医療を進める中で見出した、「iPS 細胞由来の全層性機能性腸管スフェロイド」に、多様な細胞集団を共在させた「複合型腸管組織」で難治性腸炎疾患の病態をより正確に再現する実験モデルを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 「自己組織化腸管スフェロイド」を用いた複合型腸管組織の誘導条件の検討

ヒト iPS 細胞から誘導した自己組織化腸管スフェロイドを基に、複合型腸管組織の作出を試みる。既報の応用により、神経堤細胞との共培養による腸管神経系を発生させる条件、血管内皮細胞の誘導による血管組織の構築条件を検討する。既に確立した腸スフェロイドの浮遊培養条件においても、血管内皮細胞誘導のシグナル活性が得られることは確認できており、本検討では管腔を有する腸管スフェロイドに対して、誘導された血管や神経系が適合し、生理的な組織構築をなすことができるかを追求する。各条件におけるスフェロイドはシングルセル遺伝子発現解析・組織学的評価・消化吸収/排泄機能試験・神経伝達試験によって評価を行い、腸管組織特異的機能の安定獲得が可能な誘導条件を決定する。

2) 免疫不全マウスに対する複合型腸管組織移植の確立

確立された複合型腸管スフェロイドを用いて、超免疫不全マウスに対する皮下/腸間膜移植実験を行う。既に検討された移植技術を利用し、組織化した腸管スフェロイドを移植することで、ホストの血管や神経系と融合して成熟・機能化し得るかを検討する。遺伝子発現解析・組織学的評価を行う。

3) 難治性腸炎疾患モデルの作出および解析

理化学研究所バイオリソースセンター疾患特異的 iPS 細胞バンクが有する難治性腸炎の患者から樹立された疾患特異的 iPS 細胞を用いて、疾患特異的表現型を有する疾患モデル腸管スフェロイドを作出する。IBD、非特異性多発性小腸潰瘍症、ヒルシュスプルング病、ペーチェット病患者から樹立された疾患特異的 iPS 細胞を入手し、分化誘導を試みる。誘導が可能であれば、in vitro における疾患表現型の確認や遺伝子発現解析、薬剤応答性を通じた疾患特異的反応を確認する。

4. 研究成果

1) 「自己組織化腸管スフェロイド」を用いた複合型腸管組織の誘導条件の検討

ヒト iPS 細胞から誘導した自己組織化腸管スフェロイドを基に作出した内胚葉由来上皮組織および中胚葉由来間質細胞からなる複合型腸管スフェロイドを構築した。引き続き、血管内皮細胞および外胚葉由来の腸神経細胞の融合を検討した。培養条件の検討により中胚葉由来の血管内皮細胞分画を出現させる条件を見出した。また、迷走神経堤細胞由来の腸管神経細胞の誘導条件を検討した。

2) 免疫不全マウスに対する複合型腸管組織移植の確立

上述の複合型腸管スフェロイドを用いて、超免疫不全マウスに対する腸間膜移植実験を行なった。

3) 難治性腸炎疾患モデルの作出および解析

疾患特異的 iPS 細胞を入手し、上述の複合型腸管スフェロイドが作成できるかを検証した。複数の iPS 細胞ラインにおいて同様の分化誘導、スフェロイド構築を確認できた。

今後、本研究成果を基盤として、体外で作出することができた腸組織を模倣した複合型腸管スフェロイドを用いることで、疾患特異的 iPS 細胞由来の疾患腸組織を構築する技術の開発を続ける。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10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 Yonemoto Yuki, Nemoto Yasuhiro, Morikawa Ryo, Shibayama Nana, Oshima Shigeru, Nagaishi Takashi, Mizutani Tomohiro, Ito Go, Fujii Satoru, Okamoto Ryuichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Single cell analysis revealed that two distinct, unique CD4+ T cell subsets were increased in the small intestinal intraepithelial lymphocytes of aged mice	5. 発行年 2024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.2024.1340048	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 Takahashi Junichi, Sugihara Hady Yuki, Kato Shu, Nagata Sayaka, Okamoto Ryuichi, Mizutani Tomohiro	4. 巻 4
2. 論文標題 Protocol to generate large human intestinal organoids using a rotating bioreactor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 102374 ~ 102374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2023.102374	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 Satoshi, Ogasawara Nobuhiko, Kobayashi Sakurako, Kirino Sakura, Inoue Masami, Hiraguri Yui, Nagata Sayaka, Shimizu Hiromichi, Ito Go, Mizutani Tomohiro, Nemoto Yasuhiro, Tsuchiya Kiichiro, Okamoto Ryuichi, Watanabe Mamoru, Yui Shiro	4. 巻 58
2. 論文標題 Organoids transplantation as a new modality to design epithelial signature to create a membrane-protective sulfomucin-enriched segment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 379 ~ 393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-023-01959-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 Okamoto Ryuichi, Mizutani Tomohiro, Shimizu Hiromichi	4. 巻 104
2. 論文標題 Development and Application of Regenerative Medicine in Inflammatory Bowel Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 24 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000527423	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 Takahashi Junichi, Mizutani Tomohiro, Sugihara Hady Yuki, Nagata Sayaka, Kato Shu, Hiraguri Yui, Takeoka Sayaka, Tsuchiya Mao, Kuno Reiko, Kakinuma Sei, Watanabe Mamoru, Okamoto Ryuichi	4. 巻 2
2. 論文標題 Suspension culture in a rotating bioreactor for efficient generation of human intestinal organoids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100337 ~ 100337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2022.100337	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 Kobayashi Sakurako, Ogasawara Nobuhiko, Watanabe Satoshi, Yoneyama Yosuke, Kirino, Nagata Sayaka, Okamoto-Uchida Yoshimi, Kofuji Satoshi, Shimizu Hiromichi, Ito Go, Mizutani Tomohiro, Yamauchi Shinichi, Kinugasa Yusuke, Kano Yoshihito, Nemoto Yasuhiro, Watanabe Mamoru, Tsuchiya Kiichiro, Nishina Hiroshi, Okamoto Ryuichi, Yui Shiro	4. 巻 42
2. 論文標題 Collagen type I-mediated mechanotransduction controls epithelial cell fate conversion during intestinal inflammation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-022-00237-3	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 Okamoto Ryuichi, Mizutani Tomohiro, Shimizu Hiromichi	4. 巻 104
2. 論文標題 Development and Application of Regenerative Medicine in Inflammatory Bowel Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 24 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000527423	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 Kuno Reiko, Ito Go, Kawamoto Ami, Hiraguri Yui, Sugihara Hady Yuki, Takeoka Sayaka, Nagata Sayaka, Takahashi Junichi, Tsuchiya Mao, Anzai Sho, Mizutani Tomohiro, Shimizu Hiromichi, Yui Shiro, Oshima Shigeru, Tsuchiya Kiichiro, Watanabe Mamoru, Okamoto Ryuichi	4. 巻 25
2. 論文標題 Notch and TNF- signaling promote cytoplasmic accumulation of OLFM4 in intestinal epithelium cells and exhibit a cell protective role in the inflamed mucosa of IBD patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100906 ~ 100906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100906	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 Tsuchiya Mao, Ito Go, Hama Minami, Nagata Sayaka, Kawamoto Ami, Suzuki Kohei, Shimizu Hiromichi, Anzai Sho, Takahashi Junichi, Kuno Reiko, Takeoka Sayaka, Hiraguri Yui, Sugihara Hady Yuki, Mizutani Tomohiro, Yui Shiro, Oshima Shigeru, Tsuchiya Kiichiro, Watanabe Mamoru, Okamoto Ryuichi	4. 巻 542
2. 論文標題 Functional analysis of isoflavones using patient-derived human colonic organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 40 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.01.021	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 Morikawa Ryo, Nemoto Yasuhiro, Yonemoto Yuki, Tanaka Shohei, Takei Yuria, Oshima Shigeru, Nagaishi Takashi, Tsuchiya Kiichiro, Nozaki Kengo, Mizutani Tomohiro, Nakamura Tetsuya, Watanabe Mamoru, Okamoto Ryuichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Intraepithelial Lymphocytes Suppress Intestinal Tumor Growth by Cell-to-Cell Contact via CD103/E-Cadherin Signal	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1483 ~ 1503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2021.01.014	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 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 水谷知裕, 高橋純一, 杉原ハヂィ優樹, 加藤周, 永田紗矢香, 渡辺守, 岡本隆一
2. 発表標題 オルガノイドによる腸組織再生医療のアプローチ
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡本隆一, 水谷知裕, 清水寛路, 永田紗矢香, 平栗優衣, 杉原ハヂィ優樹, 加藤周, 高橋純一, 福田将義, 大塚和明
2. 発表標題 炎症性腸疾患に対する再生医療
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Junichi Takahashi, Tomohiro Mizutani, Ryuichi Okamoto
2. 発表標題 A suspension method for efficient induction and maturation of human intestinal organoids using a rotational bioreactor.
3. 学会等名 2023 RIKEN BDR-CuSTOM Joint Organoid Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023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	岡本 隆一 (Okamoto Ryuichi) (50451935)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	

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