

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19519

研究課題名（和文）パーソナル化機能性蛋白産生オルガノイドの腸上皮移植による単回完結型補充療法の開発

研究課題名（英文）Development of a single-session replacement therapy by the transplantation of personalized functional protein-producing intestinal organoids

研究代表者

岡本 隆一（Okamoto, Ryuichi）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50451935

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：機能性神経内分泌腫瘍由来オルガノイドについて、定法により複数の異なる症例より樹立可能であることを確認した。また樹立後の培養経過や増殖効率については個別の症例により異なるパターンを呈し、由来組織における遺伝子発現パターン等を反映している可能性が示された。また、機能性神経内分泌腫瘍由来オルガノイドを用いた解析より得られた遺伝子発現パターンを元に、特定の機能性分泌蛋白の発現を制御する候補因子群を同定した。これらオルガノイドを移植する際の適切なモデルについても比較検証を行い、一定の効率で生着が得られる条件等が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特定の分泌蛋白について恒常的な発現制御機能を欠くとした機能性神経内分泌腫瘍について、同腫瘍由来のオルガノイドを樹立・解析するための手法を確立した。また複数症例の機能性神経内分泌腫瘍由来オルガノイドを比較検討することにより、機能性分泌蛋白に関する異なる制御機構を反映した遺伝子発現パターンに関する網羅的データの取得に成功し、これに基づき発現制御因子群を抽出する基盤を確立した。

研究成果の概要（英文）：Through our series of study, it was confirmed that organoids derived from functional neuroendocrine tumors can be established from multiple different cases using established methods. Additionally, the cultivation progress and proliferation efficiency after establishment showed varying patterns depending on individual cases, suggesting a reflection of the gene expression patterns in the original tissues. Moreover, based on the gene expression patterns obtained from analyses using organoids derived from functional neuroendocrine tumors, candidate factors that regulate the expression of specific secreted proteins were identified. Comparative verification was also conducted regarding the appropriate models for transplanting these organoids, and conditions under which engraftment can be achieved with a certain efficiency were confirmed.

研究分野：消化器内科

キーワード：機能性神経内分泌腫瘍 オルガノイド 機能性分泌蛋白

1. 研究開始当初の背景

膵・消化管等に内在する「神経内分泌細胞」は多彩なホルモン等の機能性蛋白を産生・分泌することにより、全身機能の調節・制御と恒常性維持に極めて重要な役割を果たしている。これらホルモン・機能性蛋白は、その役割を果たすためには適切な量・タイミングで継続的に供給されることが極めて重要であるが、多様な先天的・後天的要因でその供給機能が破綻・欠損することにより、代謝障害・成長障害・糖尿病・血友病等の全身機能の障害につながる。このような病態に対し、組み換え型蛋白等を補充する治療が実施されているが、1) 持続・反復投与を長期に渡り継続する必要があること、2) 病態の変化に応じた供給量の調整が必要であること、3) 極めて高額な「組み換え型蛋白」の継続使用が必要となる場合があることなどの課題を有しており、これらを具体的に解決するための手段は示されていない。

一方、研究代表者らは多彩な疾患に由来する患者由来の腸・膵オルガノイドを樹立し解析する中で、生体内で機能的蛋白を自律的・継続的に供給可能な機能性神経内分泌腫瘍(NET)が有する特殊な機能に着目し、これを単に病態解析に用いるだけでなく、幅広い疾患の治療に応用可能ではないかと考え本研究を着想した。この際の課題として1) 機能性 NET の腫瘍性と蛋白分泌機能を切り分けて利用すること、2) 多くの機能性 NET 症例からオルガノイドを樹立し多彩な分泌パターンの制御を可能とすること、3) 直腸等の移植処置が容易な部位を狙い、機能を発揮し得る腸上皮としてオルガノイド移植を実施すること、4) 適切で効率的なゲノム編集技術を有していること、5) 患者への臨床応用に際し必要な技術的基盤や基本的なノウハウが既に整っていること、が課題として挙げられた。これらに対し、1) 研究代表者らの施設は年間 80~100 例程度の腸・膵 NET 症例を受け入れており国内随一のハイボリュームセンターであること、2) 機能性 NET オルガノイドの樹立方法は確立済みであり実際にガストリノーマ・インスリノーマ由来オルガノイドを樹立済みであること、3) ヒト腸上皮由来オルガノイドを含む独自のオルガノイド同所移植技術を確立済みであること(Nat Med, 2012; Gen Dev, 2014)、4) ヒト腸上皮オルガノイドを用いたゲノム編集技術も確立済みであること、5) 自家腸上皮オルガノイド移植の実用化経験を有し、これを用いた FIH 試験が実施段階にあること等、主要な技術的課題を解決するための基盤を既に有していた。従って本計画は十分に遂行可能と考えられ実施を計画した。

2. 研究の目的

本研究の遂行に先立ち、研究代表者らは体外の「ミニ臓器」とされるオルガノイドを患者由来組織より樹立し(Nat Med, 2012; J Crohns Colitis, 2019)、ゲノム編集等の技術を用いながら消化管疾患の病態解明や新規治療法を開発してきた(J Crohns Colitis, 2021)。従来、これら手法は腸上皮オルガノイドを用いていたことから炎症性腸疾患等の消化管疾患を主な病態解明の対象としてきたが、研究代表者らによる研究・開発の進展により、膵組織等を用いた際も安定して患者由来オルガノイドが樹立可能であることが示されている。また、研究代表者らは「オルガノイド医療」の実用化にも積極的に取り組み、「自家腸上皮オルガノイドの移植」を用いた炎症性腸疾患に対する再生医療の First-in-human 試験 (FIH 試験)の実施が目前の状況にあった(jRCT 登録: jRCTb032190207)。そこで本研究では、腸・膵オルガノイドの培養技術、遺伝子改変技術ならびに「オルガノイド医療」実用化の実績を統合し、「パーソナル化・機能性蛋白産生オルガノイド」の作成・開発と技術的フィージビリティの検証・疾患モデルにおける Proof-of-concept (POC)の取得を目的とする。具体的には 1) 機能性神経内分泌腫瘍(f-NET)由来オルガノイドをモデルとした機能性蛋白産生オルガノイド(Pro-f-オルガノイド)・プロトタイプ的设计・デザイン、2) f-NET/Pro-f-オルガノイドの移植による疾患表現型調節に関するフィージビリティの検証、3) Pro-f-オルガノイドのパーソナル化技術の開発、4) Pro-f-オルガノイドの移植による疾患治療における前臨床 POC の取得、を実施する。これら研究計画を遂行することにより、ホルモン等を代表とする「全身を循環する機能性蛋白」を介した全身恒常性維持システムにおける欠損・破綻に起因する諸疾患に対し、直腸局所への単回の細胞移植を介して生涯に渡り適切な制御・治療を実現する、全く新しい単回完結型補充療法を開発・実現するため画期的な技術基盤の確立が期待できる。

3. 研究の方法

本研究では以下の4つの課題を計画期間2年で遂行する計画とした。1) 機能性神経内分泌腫瘍(f-NET)由来オルガノイドをモデルとした機能性蛋白産生オルガノイド(Pro-f-オルガノイド)・プロトタイプ的设计・デザイン: 樹立済みの患者由来 f-NET ライブラリを基に「非腫瘍化」と「恒常的なホルモン産生能」を特定のゲノム領域で分離し得るか検証を行う。このため複数の f-NET 細胞系譜について WGS・RNA-seq 解析等を実施し、腫瘍性増殖と自律的・恒常的なホルモン産生を担う最小のゲノム領域を同定する。これにより腫瘍性を排除し、特定の機能性蛋白を産生・分泌する腸上皮オルガノイドを誘導可能な複数パターンの「発現制

御ユニット」及び「発現蛋白ユニット」の候補ゲノム領域を同定した上で、CRISPR/CAS9 法により既存の腸上皮オルガノイド内に導入し、機能的評価を行う。2) f-NET/Pro-f-オルガノイドの移植による疾患表現型調節に関するフィージビリティの検証：既存の f-NET 細胞系譜および前記 1)により樹立した複数の Pro-f-オルガノイド系譜を用い、これを直腸内の一定の領域に移植・生着させることにより、機能性蛋白産生腸上皮が存在することで惹起し得る全身表現型についてモデルマウスを用いて検証する。3) Pro-f-オルガノイドのパーソナル化技術の開発：1)による解析結果を参照し、複数の恒常性分泌パターンを制御し得る「発現制御ユニット」と複数の機能性蛋白産生をコードする「発現蛋白ユニット」をゲノム・カセットとして調製し、これを CRISPR/CAS9 法及び Piggybac 法によりゲノム上の特定部位を狙い自在に入れ替えを可能とすることで、個別の病態に応じた Pro-f-オルガノイドの可変性向上(パーソナル化)を図る。4) Pro-f-オルガノイドの移植による疾患治療における前臨床 POC の取得：特定の機能性蛋白の欠乏等に起因する疾患モデルマウス(T1DM, 血友病 A など)を用い、パーソナル化 Pro-f-オルガノイドの単回移植が如何なる疾患表現系の改変・改善を誘導し得るか検証を加える。この際、生着エリアのサイズ・部位や生着後組織の長期維持と疾患表現系との関連についても検討を行う。

4. 研究成果

1) 機能性神経内分泌腫瘍(f-NET)由来オルガノイドをモデルとした機能性蛋白産生オルガノイド(Pro-f-オルガノイド)・プロトタイプ的设计・デザイン

機能性神経内分泌腫瘍(f-NET)由来オルガノイドについて、あらかじめ設定した手法により複数の異なる症例より樹立可能であることを確認した。樹立後の培養経過や増殖効率については個別の症例により異なるパターンを示し、由来組織における遺伝子発現パターン等との比較検討により増殖性・腫瘍性を規定する内的因子について知見が得られる可能性が考えられた。また機能性神経内分泌腫瘍が有する機能性蛋白分泌能についても、樹立した機能性神経内分泌腫瘍(f-NET)由来オルガノイドにおいて、一定の条件下で由来腫瘍の特性を反映した機能を保持し得ることが確認された。

2) f-NET/Pro-f-オルガノイドの移植による疾患表現型調節に関するフィージビリティの検証

樹立したオルガノイドを直腸・遠位大腸に移植する際の前処置として DSS 腸炎モデル・薬剤を用いた粘膜剥離モデル等について、生着効率等の観点から見た有用性・安定性について検討を行い、各々一定の効率で生着が得られるものの、前処置に要する期間や生着面積の制御・予測等について、未だ課題を有することが確認された。

3) Pro-f-オルガノイドのパーソナル化技術の開発

機能性神経内分泌腫瘍(f-NET)由来オルガノイドを用いた解析より得られた遺伝子発現パターンを元に、特定の分泌蛋白の発現を制御する候補因子群(発現制御ユニット)を同定した。同知見を基に異なる分泌蛋白産生パターンを備えたオルガノイドの作成手法の開発を行い、一定の進展が得られた。

4) Pro-f-オルガノイドの移植による疾患治療における前臨床 POC の取得

前年度における検討や「Pro-f-オルガノイドのパーソナル化技術の開発」における検討にて樹立したオルガノイド等を直腸・遠位大腸に移植する際の手技や前処置についての検討により、薬剤を用いた粘膜剥離モデル及び DSS(デキストラン硫酸)誘発性腸炎等について、一定の効率で生着が得られる条件等が確認された。また細径内視鏡を用いて生体マウス腸管内を経時的に観察し、生着面の局在・面積等を評価する系についても確立し、検証を終了した。

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 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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 2023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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 4件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Ryuichi Okamoto
2. 発表標題 Clinical Application of Patient-derived Organoids
3. 学会等名 World Bio Innovation Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryuichi Okamoto
2. 発表標題 Bench-to-bedside research: Patient-derived organoid transplantation for treatment of intractable ulcerative colitis
3. 学会等名 SIBDS 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡本 隆一
2. 発表標題 炎症性腸疾患と再生医療
3. 学会等名 第23回 日本再生医療学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 岡本 隆一
2. 発表標題 炎症性腸疾患と腸粘膜再生
3. 学会等名 第22回日本抗加齢医学会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryuichi Okamoto
2. 発表標題 Recent progress in the treatment of inflammatory bowel disease
3. 学会等名 第2回国際臨床免疫シンポジウム (招待講演) (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
--	---------------------------	-----------------------	----

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