

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19541

研究課題名(和文) 腸オルガノイドを用いた誘導性ホルモン分泌マウス作出と腸管不全治療

研究課題名(英文) Development of novel treatment strategy for intestinal failure based on generation and transplantation of intestinal organoids capable of GLP-2 secretion in an inducible manner

研究代表者

中村 哲也(Nakamura, Tetsuya)

順天堂大学・大学院医学研究科・特任教授

研究者番号：70265809

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)：腸オルガノイドの遺伝子改変とマウス大腸への移植実験を組合せ、大腸の一部で「限局性に」、遺伝子改変した腸上皮で「永続的」に、薬剤を経口投与すると「誘導性」に、大腸上皮からGLP-2アナログが分泌される新規マウスモデル作成を目的とした。その結果、遺伝子編集に必要なベクターを作成し、腸オルガノイドへの遺伝子導入条件を設定した。また、マウス大腸の任意の部位でキレート材であるEDTAを作用させて上皮を解離し、ここへ別に培養しておいたオルガノイド細胞を生着させる大腸上皮置換技術を再現性の高い安定した技術として確立した。本研究のさらなる進展は、新しい発想に基づく腸管不全治療技術開発につながるものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

短腸症候群は、残存腸の機能代償が不十分で腸管不全をきたす場合、患者生命の維持も脅かす事態を引き起こす。腸管上皮細胞が分泌するGLP-2は多彩な作用を示すペプチドホルモンで、そのアミノ酸置換をもつ製剤(Teduglutide)はGLP-2に比し生体内半減期が延長し、持続性に小腸粘膜増殖を惹起するため効果が期待されている。ただ経口投与が困難で、しかも頻回かつ長期にわたる注射投与が必要であるなど、新しい発想に基づく治療技術開発が望まれる。本研究は一部の大腸に、「永続的」にかつ「誘導性」にGLP-2アナログを分泌する画期的動物モデル構築を図るものであり、腸管不全治療の新技术を提示可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Combining genetic modification of intestinal organoids and the organoid transplantation technique into the mouse large intestine, we aimed to create a novel mouse model in which GLP-2 analogue, a potent humoral factor that is capable of accelerating intestinal epithelial proliferation, is locally secreted on demand from an engineered region of the large intestine generated by organoid transplantation. We have successfully created genetic materials necessary for gene editing and set up the conditions for gene transfer into intestinal organoids. We have also developed a reproducible technique for replacing the colonic epithelium with organoids by local application of the chelating agent EDTA to dissociate the epithelium and following infusion of cultured organoids to engraft. We believe that further progress in this research will pave the way to the development of novel treatment strategy applicable to patients with severe intestinal failure due to short bowel syndrome.

研究分野：消化管再生医学

キーワード：短腸症候群 腸管不全 腸オルガノイド 小腸移植 再生医療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小児に多く、広範囲小腸切除で生じる短腸症候群(SBS)は、深刻で重大な臨床的課題である。残存腸が短く、これによる機能代償が不十分で「腸管不全」をきたす場合、患児の生命維持を脅かす重大な事態を引き起こす。

腸管上皮内分泌細胞の1種であるL細胞が分泌するGLP-2は、小腸粘膜増殖、消化吸収促進など多彩な作用を示すペプチドホルモンである。GLP-2のアミノ酸置換(2番目のAla→Gly)をもつ製剤(Gly2-GLP-2; Teduglutide)は、GLP-2に比して生体内半減期が延長することが知られ、持続性に小腸粘膜増殖などを惹起するなどの作用から、腸管不全に対して承認されており、その薬剤として効果が期待されている。しかしながら、ペプチド製剤として経口投与が困難であり、しかもその効果を高めるためには頻回に、しかも長期にわたる注射投与が必要であり、新しい発想に基づく治療技術開発が望まれている。

研究代表者・中村はこれまでに、マウス大腸の任意の部位で上皮を剥離しオルガノイドで置換する技術を確立した。これを利用し、大腸上皮を小腸上皮に置換することで、短腸症候群で喪失した小腸機能を補填する技術開発を進めている。一方、近年の臨床医学においては、キメラ抗原受容体(CAR)T細胞による癌治療で例示されるように、有効性・安全性が厳密に担保されるならば、遺伝子改変細胞を体内に戻す治療も広く応用可能となってきた。本研究は、これを背景とし、代表者がもつ腸上皮置換技術をさらに一歩進め、遺伝子改変オルガノイドによる腸上皮置換を通して、新規の機能性腸上皮作出を目指すものである。

ペプチドホルモンを持続産生する改変細胞移植の研究は、インスリン産生細胞を筆頭に少なくはない。しかしながら、遺伝子改変ペプチド産生細胞を、腫瘍原性によることなく個体内で永続的に機能させた例はない。本研究は、組織幹細胞を起点とする腸上皮再生機構の特性を利用すれば、移植片内に構築される絨毛-陰窩構造では、恒久的に誘導性ペプチド産生システムを作動させるのではないかとアイデアを検証するものである。そしてその成果は、重篤な腸管不全に対する新しい治療戦略のproof-of-conceptを提示しうる点で、臨床的にもきわめて重要な意義をもつものと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、近年大きく進歩した腸上皮体外培養構造体、すなわち腸上皮オルガノイドを利用する研究を着想した。すなわち、腸上皮オルガノイドにおける遺伝子改変と、これをマウス大腸へ移植する実験の2者を組み合わせることにより、誘導薬剤を経口投与すると、腸に移植した改変オルガノイドからGLP-2アナログが分泌される新規マウスモデルを構築することを目的とした。

具体的には、1) テトラサイクリン誘導性発現(Tet-On)システムを用い、ドキシサイクリン(Dox)投与に応答しGLP-2アナログを分泌する腸上皮オルガノイドを複数種作成し、2) 作成したオルガノイドをマウス大腸の一部に移植生着させ、Dox経口投与でこの移植片からGLP-2アナログが産生されるマウスモデルを構築し、最終的には3) 各マウスでの誘導性GLP-2アナログ産生がSBSモデルマウス残存腸の代償に及ぼす影響を解析することを目的とした。

代表者がもつ腸オルガノイド培養と移植技術を組み合わせる本研究は、移植生着領域に「限局性に」、幹細胞を含み改変した腸上皮で「永続的に」、経口投与するDoxにより「誘導性」にペプチドアナログを分泌する画期的動物モデル構築を図るものであり、本研究は、腸管不全治療の新技術を提示可能な萌芽研究になるものと考えた。

### 3. 研究の方法

以下の3つのステップで研究を展開する計画とした。

(1) テトラサイクリン誘導性発現(Tet-On)システムによるGLP-2アナログ産生腸オルガノイド構築

Villin分子を発現する全タイプ腸上皮細胞からL細胞への分化では、まずisl1を発現する細胞への分化が起こり、その一部がグルカゴン(Gcg)遺伝子を発現しGLP-2を産生するL細胞となる。villin+細胞、isl1+細胞、あるいはGcg+細胞がDox投与でGLP-2アナログを産生するよう、以下の3種の遺伝子改変マウス小腸上皮オルガノイド、すなわちVillin-rtTA-EGFP; R26-Tet0- Gly2-GLP-2 オルガノイド、isl1-rtTA-EGFP; R26-Tet0- Gly2-GLP-2 オルガノイド、Gcg-rtTA-EGFP; R26-Tet0- Gly2-GLP-2 オルガノイドを作成することとした。

具体的には、villin、isl1、Gcg遺伝子座にrtTA(reverse tetracycline transactivator)とEGFPをノックインする。一方セーフハーバーとして機能するRosa26(R26)座に、Tetオペレーター(Tet0)配列とGLP-2アナログ(Gly2-GLP-2)遺伝子をノックインする。オルガノイド作成後は、Dox添加によるmRNA・タンパクレベルでのGly2-GLP-2発現、その時間変化、Dox濃度の

効果、Dox 非投与時のバックグラウンド効果などを培養実験で詳細に解析する。

#### (2) Tet-On オルガノイドによるマウス大腸上皮置換とシステム動作検証

マウス遠位大腸内腔の上皮を薬剤で解離し腸オルガノイドを移植する技術、ならびにマウスの任意の大腸部位にオルガノイドを移植する手術技術を確立した。ここでは、上皮剥離したマウス近位大腸に、先に作成した3種のオルガノイドを個別に移植生着させることを試みた。これにより、上皮置換領域のみで、経口投与する Dox 依存性に、全上皮細胞 (villin+)、多種類の内分泌細胞 (isl1+)、あるいはL細胞 (Gcg+)のみからの GLP-2 アナログ産生が誘導される。マウス作成後は、mRNA・タンパクレベルで Dox 投与時の Gly2-GLP-2 発現動態を解析する。これにより、Gly2-GLP-2 産生細胞種 (3種のオルガノイド)、DOX 投与量、移植生着面積や移植部位による GLP-2 アナログ遺伝子発現とタンパク産生を詳細に明らかにすることとした。

#### (3) 誘導性 GLP-2 アナログ産生による SBS モデルマウス残存腸の代償応答の解析

代表者は、75%遠位小腸を切除する SBS マウスモデルを確立した。2)で作出した移植マウスモデルのうち、Dox 非投与時の GLP-2 アナログ発現が低く、かつ Dox 投与時の発現が良好なものを選び、本システムの作動が SBS 残存腸の代償機構に及ぼす効果を検証する。特に、Dox の連日投与期間や量、あるいは開始のタイミングなど、ヒト SBS に対する Teduglutide の臨床試験で影響が示唆された項目について、詳細な解析を加える。

### 4. 研究成果

2年の期間を通じた研究において、CRIPR/Cas9 システムでの遺伝子編集に必要なドナーベクターをすでに作成した。また、腸オルガノイドへの遺伝子導入 (エレクトロポレーション) の詳細な条件を設定した。

オルガノイド移植を含む動物実験については、マウス大腸の近位や遠位など、任意の部位で粘膜表層を解離する技術を確立した。すなわち、大腸管腔側にキレート材である EDTA を作用させて上皮を解離し、ここへ別に培養しておいてオルガノイド細胞を生着させる大腸上皮置換技術を、再現性の高い安定した技術として確立した。具体的には、全身麻酔下にマウスを開腹し、内腔操作を可能とするチューブを大腸に挿入し、致死的とならずに上皮解離を可能にする技術を開発した。その後、別に用意した腸オルガノイドを注入し、上皮解離部に移植生着させうることでも確認できた。手術後のマウスが長期にわたり生存し、評価可能とするための条件設定もできた。かかる一連のマウス大腸上皮剥離と培養オルガノイド移植手法による大腸上皮置換技術は、申請者らグループの独自の技術であり、大腸以外の異種細胞への大腸上皮置換技術として学会報告および論文報告をおこなった。

一方、3種の遺伝子改変マウス小腸上皮オルガノイド、すなわち Villin-rtTA-EGFP; R26-Tet0- Gly2-GLP-2 オルガノイド、isl1-rtTA-EGFP; R26-Tet0- Gly2-GLP-2 オルガノイド、Gcg-rtTA-EGFP; R26-Tet0- Gly2-GLP-2 オルガノイドは、遺伝子導入された細胞の純度を高めたオルガノイド集団としての樹立には未だ至っていない。これらを早期に樹立し、上に記載した大腸への移植生着技術を利用して遺伝子改変大腸上皮を有する生動物モデルを作成することが、今後の課題である。最終的に、上記のように作出した移植マウスモデルのうち、Dox 非投与時の GLP-2 アナログ発現が低く、かつ Dox 投与時の発現が良好なものを選び、本システムの作動が SBS 残存腸の代償機構に及ぼす効果を検証する計画である。

腸オルガノイド培養と移植技術を組み合わせる本研究をさらに進めることにより、誘導性 GLP-2 アナログ産生腸オルガノイドが大腸組織で実際に作動するマウスを作成し、しかも SBS 残存腸の代償を促進できるとの成果を明示できるならば、重篤な腸管不全に対して残存腸機能の改善を図る全く新しい治療の道を開く可能性がある。実際の臨床応用を考えた場合、遺伝子改変細胞移植というハードルの高さはあるものの、移植領域内に遺伝子改変細胞を「限局」させ、しかしながらここで「永続的」に、しかも「誘導性」にペプチドアナログ量を調節して発現させうる本技術は、将来的にはたとえば GLP-1、インスリン、エリスロポイエチンなどのペプチドホルモン発現を、静脈注射や皮下注射も不要な様式で作用させうる画期的医療技術を創出する可能性がある。自身のこれまでの成果に立脚し、腸の一部を人為的ホルモン産生の「場」として利用するとのコンセプトに基づく本研究は、挑戦的研究としての高い意義をもつものと考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suda Kazuto, Matsumoto Yuka, Ochi Takanori, Koga Hiroyuki, Lane Geoffrey J., Hattori Nobutaka, Nakamura Tetsuya, Yamataka Atsuyuki	4. 巻 39
2. 論文標題 Successful engraftment of bladder organoids in de-epithelialized mouse colon	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00383-022-05294-w	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, Kobayashi Sakurako, Ogasawara Nobuhiko, Okamoto Ryuichi, Nakamura Tetsuya, Watanabe Mamoru, Jensen Kim B., Yui Shiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Transplantation of intestinal organoids into a mouse model of colitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Protocols	6. 最初と最後の頁 649 ~ 671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41596-021-00658-3	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村哲也
2. 発表標題 オルガノイド利用腸上皮置換による再生医療
3. 学会等名 第37回日本小児外科学会秋季シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須田一人、松本有加、越智崇徳、古賀寛之、中村哲也、山高篤行
2. 発表標題 「腸管利用膀胱拡大術後の癌発生予防に向けた結腸への膀胱オルガノイド移植」
3. 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木啓介、古村誠、古村浩子、藤代準、松本有加、中村哲也、中山泰秀
2. 発表標題 「小腸上皮オルガノイドによる粘膜再生に適したbiotubeの作成条件の検討」
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本有加、須田一人、山高篤行、中村哲也
2. 発表標題 「オルガノイド移植による腸管不全治療の臨床応用に向けた新規キレート剤の安全性と移植技術利用可能性の検証」
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022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	松本 有加  (Matsumoto Yuka)  (50813672)	順天堂大学・医学部・助教   (32620)	
研究分担者	須田 一人  (Suda Kaduto)  (60784725)	順天堂大学・医学部・准教授   (32620)	

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