

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08964

研究課題名(和文)小腸幹細胞を用いた難治性小腸疾患モデルの作成と治療法の開発

研究課題名(英文)Development and analysis of small intestinal disease model using small intestinal stem cells

研究代表者

山田 篤生(YAMADA, ATSUO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80534932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：小腸癌細胞株SIAC1細胞とマウス正常小腸細胞からオルガノイドを作成し、分化や増殖における成長因子依存性について検討した。小腸癌オルガノイドは正常小腸細胞に必須であったEGFやRspo1などの増殖因子非依存性であった。Notch阻害薬はSIAC1細胞の分化マーカーの発現を増加させたが、大腸癌治療薬であるcetuximab、bevacizumabはSIAC1オルガノイドの細胞内シグナル、増殖ともに抑制作用を示さなかった。正常小腸オルガノイドにおいてE-cadherinをノックアウトすると、増殖不能となった。これらの結果より小腸癌の治療法として、分化誘導療法と接着因子阻害療法の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To model small intestinal diseases, we used SIAC1 cells, which we have established from small intestinal adenocarcinoma, and mouse small intestine as sources of organoids. Organoids from SIAC1 cells proliferated independent of growth factors, such as EGF and Rspo1, which were indispensable for the growth and maintenance of mouse small intestinal organoids. Notch inhibitors increased differentiation marker expression in SIAC1 organoids, while cetuximab or bevacizumab, molecular targeting drugs against colorectal cancer, failed to inhibit SIAC1 xenograft growth. In mouse organoids, E-cadherin was indispensable for normal proliferation, as the conditional deletion of *cdh1* gene in organoids disrupted the crypt-like structure. These results suggest the therapeutic potential of differentiation induction or adhesion inhibition against small intestinal adenocarcinoma.

研究分野：小腸疾患

キーワード：小腸 癌 粘膜障害 薬剤 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

平均寿命の延伸による患者の高齢化と服薬の多様化、診断技術の進歩などから小腸疾患の頻度は増加傾向である。また内視鏡を使った治療手技も進歩しており、我々も早期小腸癌治療例も経験した。しかし、小腸癌は胃癌や大腸癌など他の癌腫にくらべると治療法が限られ予後も極めて不良である。また近年報告が増加している原因不明の消化管出血は、その大部分がびらんや血管異型性などの小腸病変と考えられているが、依然として診断と治療が困難であり、その発生機序については明らかになっていない。この小腸疾患の難治性には希少性に加え基礎的検討を可能とするモデルが欠如していたことも関連している。近年まで胃や大腸などのように培養可能な細胞株を用いた研究ができないために、小腸疾患の分子生物学的な解析は困難であった。我々は以前の助成事業において小腸癌の細胞株(SIAC1細胞)を世界に先駆けて樹立し、その分子異常を詳細に検討することによって小腸癌に対する新たな治療法を提案した。このように培養細胞を用いて小腸疾患の適切なモデルを作成することができれば、小腸疾患の研究は飛躍的に進歩すると考えられる。非腫瘍性小腸粘膜の培養法としては、佐藤らが報告した単離正常腺管をEGFやR-spondin1、Nogginなどの特殊な増殖因子と細胞外マトリックスに包埋して培養する三次元培養法(オルガノイド)が確立されており、腺管の分化研究に大きく貢献している。

2. 研究の目的

本研究ではマウス小腸幹細胞とヒト小腸癌細胞株を応用して癌、潰瘍などの難治性小腸疾患のモデルを作成し、疾患発生の機序を解明し、分化誘導など新規薬剤による治療効果を検討する。さらに新規治療法の臨床応用における問題点の克服のため、これら難治性小腸疾患の臨床的特徴を解明する。

3. 研究の方法

(1)小腸幹細胞オルガノイドの作成

既報で樹立した小腸癌細胞 SIAC1 細胞、および野生型マウスの小腸粘膜から EDTA によって分離した腺窩をマトリゲル内に包埋した。EGF/R-spondin1/Noggin および B27/N2 を加えた培養メディウムでこれら細胞/腺窩を培養、分化させ、オルガノイドを作成した。小腸癌由来オルガノイドと正常小腸細胞由来オルガノイドの遺伝子発現を Q-PCR で検討した。

(2)小腸オルガノイドの増殖、分化条件の検討
樹立したオルガノイドの培養メディウムから、EGF/Rspondin1 などのニッチ因子を除外して培養を行い、Q-PCR や免疫染色法によってこれらの因子が増殖、分化に与える影響を検討した。

(3)小腸癌オルガノイドの生体モデルを用いた薬物治療効果の検討

小腸癌細胞 SIAC1 細胞からオルガノイドを

作成し、ヌードマウスに移植して腫瘍を作成した。種々の抗癌剤を用いて in vitro における薬剤効果と生体における薬剤効果を検討した。

(4)小腸粘膜障害モデルの検討

小腸オルガノイドに NSAID、放射線などの刺激を加え、粘膜障害の機序を検討した。刺激後のオルガノイドより蛋白、mRNA を抽出し、検討した。またこれらの粘膜障害に關与する遺伝子を解明するためにノックアウトマウス由来のオルガノイドに同様の刺激を加え、野生型小腸オルガノイドとの違いを検討した。

(5)小腸潰瘍症の臨床的検討

原因不明消化管出血の原因となる小腸潰瘍症の成因について臨床的な検討を行った。当科および関連施設で原因不明消化管出血が疑われ、カプセル内視鏡もしくはダブルバルーン内視鏡を施行し、小腸潰瘍と診断された症例を対象として、その診断、予後に關連する因子を検討した。

4. 研究成果

(1)小腸幹細胞オルガノイドの作成

既報で樹立した小腸癌細胞株 SIAC1 細胞および野生型マウスの小腸腺窩をマトリゲルに包埋し、EGF/Rspondin1/Noggin などを含む complete メディウムで三次元培養すると、腺窩を表す明確な出芽構造を形成して増殖した。癌細胞由来の SIAC1 のみならず、野生型マウスの小腸腺窩から形成したオルガノイドも、5回以上の継代が可能であり、継代中に有意な増殖抑制や細胞形態の変化をきたさず、幹細胞性を有すると考えられた。これらのオルガノイドを抽出し、固定後にパラフィン切片を作成し、免疫染色を行った。図1に示すように小腸絨毛に存在し分泌系細胞のマーカーである UEA1 や Muc2 陽性細胞が散見され、腺窩から作成したオルガノイドに種々の細胞への分化がみられることが分かった。

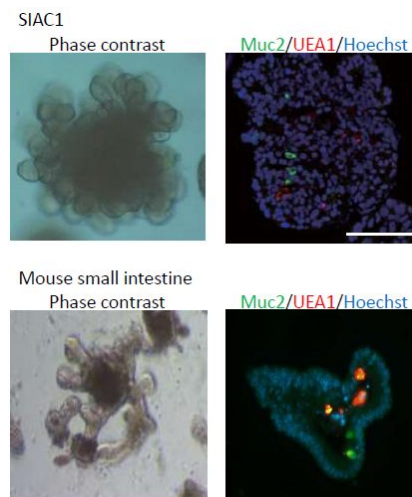


図1 小腸幹細胞オルガノイド

(2)小腸オルガノイドの増殖、分化条件の検討
 小腸癌細胞株 SIAC1 細胞をマトリゲル内に包埋し、メディウムから R-spondin1 を排除して増殖に対する影響を検討した。図 2 に示すように細胞増殖のスピードは complete メディウムでの培養とほぼ同程度であり、R-spondin1 非依存性の増殖が可能であることが分かった。

一方正常細胞由来のマウス小腸オルガノイドは R-spondin1 の排除により増殖をほとんどきたさず、さらに出芽構造がほぼ消失した球形に変形した(図 2)。すなわち、正常マウス小腸オルガノイドの分化と増殖が R-spondin1 に依存していることが明らかになった。

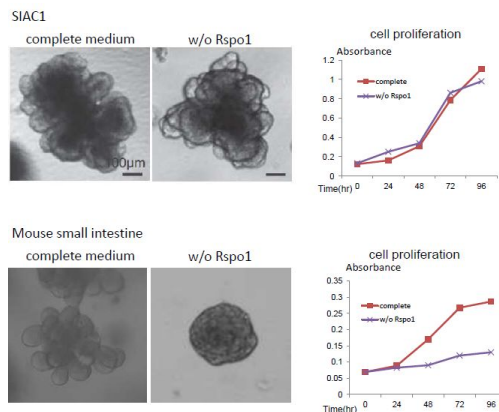


図 2 オルガノイドの形態と増殖

(3)小腸癌オルガノイドに対する薬物治療効果の検討

小腸癌に対する薬剤治療モデルの開発目的で、SIAC1 オルガノイドをヌードマウスに接種し、xenograft を作成した。接種後 2wk の時点で径 5-7mm 程度の腫瘍を形成がみられ、病理組織を検討したところ、小腸癌組織(図 3 上段)に類似した腺癌細胞であり、高倍率で観察しても腺管構造の形成が類似していた(図 3 下段)。さらに、小腸癌組織でみられた MSH6 の発現低下や β カテニンの高発現と核移行も xenograft で同様に再現されていることが分かった(図 3)。この xenograft モデルに大腸癌の治療薬として用いられている抗 EGFR 阻害剤である cetuximab、抗 VEGF 阻害薬である bevacizumab を投与し、その治療効果を検討した。図 4 に示すようにこれらの薬剤投与は xenograft の縮小をきたさないことが分かった。また in vitro でオルガノイド培養の SIAC 細胞に cetuximab および bevacizumab を添加し、細胞増殖に対する効果を検討した。図 4 上段右に示すように増殖抑制効果は見られなかった。またこれらの薬剤の細胞内シグナルに対する効果を検討した。リン酸化 ERK、c-Myc、cyclinD1 など MAPK 経路のシグナルは cetuximab と bevacizumab の投与によって減弱しておらず、xenograft モデルにおいて治療効果が見られない一因と考えられた。

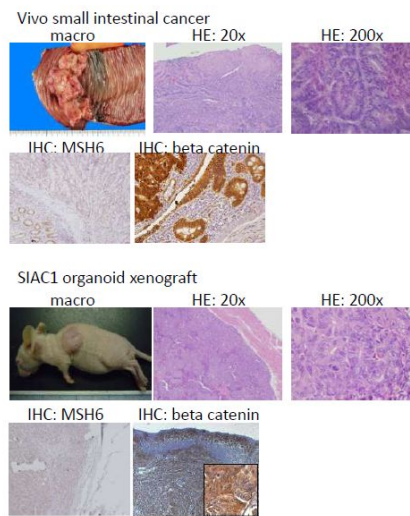


図 3 小腸癌オルガノイド xenograft

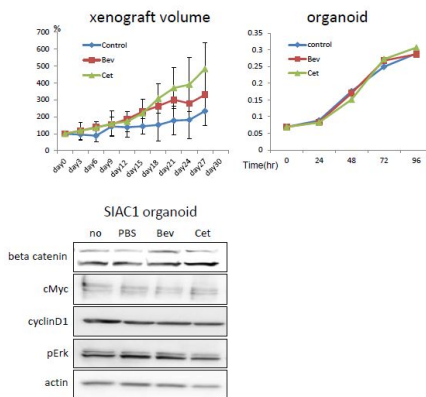


図 4 xenograft に対する薬物治療効果の検討

(4)小腸粘膜障害モデルの検討

マウスオルガノイドにインドメタシンの投与および放射線照射による障害を加え形態変化を検討した。25 μ M のインドメタシンは生体における投与と異なり、オルガノイドの形態変化をきたさず、インドメタシンの粘膜障害効果は上皮細胞以外、すなわち免疫細胞や腸内細菌を介している可能性が示唆された。一方で放射線照射によるオルガノイド障害における TNF α シグナルの影響を検討するために TNFR のノックアウトマウスから作成した小腸オルガノイドに対する放射線照射の効果を検討した。細胞死の抑制効果はみられず、放射線によるオルガノイド形態変化に対する TNF α シグナルの影響は限定的であることが示唆された。

次に小腸粘膜における E-cadherin の働きを明らかにする目的で、誘導性腸管 E-cadherin ノックアウトマウス(Lgr5-creERT;CDH11ff マウス)からオルガノイドを作成し、in vitro で 4OH-TAM を添加し、オルガノイドの E-cadherin を欠損させた。図 5 に示すようにコントロールの CDH11ff 由来のオルガノイドは 4OH-TAM を添加後も正常な出芽構造を維持していたが、E-cadherin のノックアウトオルガノイドでは、出芽部分、腺窩の細胞

が球状に変形し脱落して、オルガノイドが縮小した。細胞増殖も 4OH-TAM を添加後に停止した。

最後に薬剤による小腸粘膜の分化制御を検討するために、マウス小腸オルガノイドに secretase inhibitor の DAPT を添加した。図 5 下段に示すように DAPT によりオルガノイド内で Muc2 陽性細胞の増加と Ki67 陽性細胞の減少がみられた。これらのことから DAPT は小腸上皮の粘液分泌細胞への分化を促進すると考えられた。

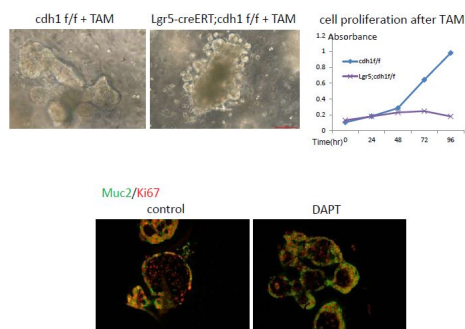


図 5 小腸粘膜障害モデルの検討

(5)小腸潰瘍症の臨床的検討

2009 年から 2017 年に当科および関連施設で原因不明消化管出血が疑われ、カプセル内視鏡もしくはダブルバルーン内視鏡で小腸潰瘍性疾患と診断された症例は 68 例であった。平均年齢は 67 歳、男性が 62%であった。69%が顕性出血を呈した。単発性の潰瘍は 26 例、多発潰瘍は 42 例であった。内服薬としては、低用量アスピリンが 13 例、NSAID が 15 例、その他の抗血小板薬は 13 例、抗凝固薬は 6 例、副腎皮質ステロイドは 5 例、プロトンポンプ阻害薬は 28 例に投与されていた。小腸潰瘍の成因としては、NSAID 潰瘍が最多で 32%、腸管術後の吻合部潰瘍が 13%、虚血性小腸炎が 10%、小腸癌が 6%、放射線性腸炎、リンパ腫、クローン病がそれぞれ 1.5%であった。これらの潰瘍性病変のうちでバルーン内視鏡がその診断に有用となる因子を解析したところ単発性の潰瘍の診断で有用であることが分かった。また再出血に関連する因子を検討したところ、低用量アスピリン服用者、および多発性潰瘍症例において有意に再出血が多いことが分かった。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Aoki T, Yamada A, Hirata Y, Suzuki H, Nakada A, Niikura R, Seto M, Okamoto M, Koike K. Etiology and Long-term Rebleeding of Endoscopic Ulcerative Lesions in the Small Bowel in Patients with Obscure Gastrointestinal Bleeding: A Multicenter Cohort Study. J

Gastroenterol Hepatol. 2017 Dec 12. doi: 10.1111/jgh.14068.

Aoki T, Yamada A, Nagata N, Niikura R, Hirata Y, Koike K. External validation of the NOBLADS score, a risk scoring system for severe acute lower gastrointestinal bleeding. PLoS One. 2018 Apr 26;13(4):e0196514. doi: 10.1371/journal.pone.0196514.

[学会発表](計 4 件)

山田篤生 新倉量太 プロトンポンプ阻害薬が小腸潰瘍性病変を増やすか? : 多施設前向き観察研究 第 10 回日本カプセル内視鏡学会学術集会 2017 年 2 月 19 日 名古屋

新倉量太 山田篤生 薬剤と小腸粘膜出血の関連 多施設前向き観察研究 第 10 回日本カプセル内視鏡学会学術集会 2017 年 2 月 19 日 名古屋

新倉量太 山田篤生 馬來 康太郎 中村正直 渡部宏嗣 藤城光弘 岡志郎 江崎幹宏 藤森俊二 中島淳 大宮直木 松本主之 田中信治 小池和彦 坂本長逸 薬剤と小腸出血の関連 JACE 多施設小腸カプセル内視鏡研究 第 55 回小腸学会学術集会 2017 年 10 月 21 日 京都

青木智則 山田篤生 小池和彦 原因不明の消化管出血で発症した小腸潰瘍症の病因検索と長期再出血 第 104 回日本消化器病学会 2018 年 4 月 20 日 東京

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山田 篤生 (YAMADA ATSUO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 80534932

(2)研究分担者

平田 喜裕 (HIRATA YOSHIHIRO)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号 : 10529192