

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 4 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15292

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた慢性偽性腸閉塞症の疾患モデルの作成と創薬研究

研究課題名(英文) Development of experimental model of Chronic Intestinal Pseudo-obstruction (CIPO) using iPS and drug discovery research

研究代表者

辻井 正彦 (Tsuji, Masahiko)

大阪大学・医学系研究科・招へい教授

研究者番号：40303937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：1) CIPO診療実態調査 自主臨床研究「慢性偽性腸閉塞症の予後を規定する因子を解析する前向き後向き多施設共同観察研究」としてOGF関連施設で臨床研究倫理審査の承認を得た(大阪大学承認番号13124)。現在までに14症例が登録され、女性10症例、男性4症例、臓器障害は大腸が最も多く13症例、治療法は在宅中心静脈栄養4症例、手術6症例、ストマ造設2症例、内視鏡減圧5症例であった。

2) 血清APOB48蛋白発現解析 臨床研究倫理審査の承認を得た(大阪大学承認番号15432)。CIPO4症例、便秘症3症例、健常人3症例の血清を採取、ウエスタンブロットによりAPOB48蛋白発現解析を行った。

研究成果の概要(英文)：1) Clinical research of CIPO (Chronic Intestinal Pseudo-obstruction) : An independent study of prospective multi center study analyzing prognostic factors of CIPO was accepted in 20 institutions (Osaka Gut Forum) led by Osaka University (endorsement number 13124). Fourteen cases have been enrolled to date: 10 females, 4 males. The large intestine was compromised in 13 cases. Four cases were treated with IVH, 6 were with surgery, and 5 were with decompression by endoscopy.

2) Analysis of concentration of serum protein APOB48: Concentration of serum protein APOB48 has been measured by immunoblotting analysis in 4 cases of CIPO, 3 cases of chronic constipation, and 3 healthy control.

研究分野：消化器内科学

キーワード：慢性偽性腸閉塞 便秘 過敏性腸症候群

1. 研究開始当初の背景

慢性偽性腸閉塞症 (Chronic Intestinal Pseudo-Obstruction: 以下 CIPO) は腸閉塞の症状を慢性的に呈する難治性疾患で、消化管に閉塞起点を認めない原因不明の疾患である。わが国における患者数は二千人程度と推定される希少疾患で、疾患の原因を追究する基礎的研究は全く行われておらず、疾患の進行を阻止することは出来ない。消化管の機能が廃絶すれば高位小腸に人工肛門を造設して中心静脈栄養に依存し、最終的には小腸移植が必要となる。

我々の教室では KIT 変異マウスの解析から消化管のカハール介在細胞 (ICC) が消化管運動のペースメーカー細胞であることを示した。そして、ICC が変性した CIPO の 2 症例を報告した。CIPO の病態の一部に ICC が関与するはずだが、多施設から神経異常の報告もあり網羅的な解析が必要である。CIPO は希少疾患であることから多施設との共同研究が必要であるが、大阪大学は関連病院と連携した研究組織である Osaka Gut Forum (以下 OGF) を立ち上げているため臨床研究を開始するための基盤は整備されている。

最近、患者由来の iPS 細胞が病態の解明や治療法の開発に使われるようになった。2014 年大阪大学はそれを支援するための最先端医療イノベーションセンターを設置した。たとえば、神経や筋細胞など興奮性細胞を分化誘導してその機能特性評価を行ない創薬に応用するプロジェクトが始動している。iPS 細胞を ICC に直接分化誘導する技術は確立されていないが、ICC や神経細胞を含む腸管様臓器への分化は報告されており、患者の病態を再現する系として期待される。

このような背景から、希少疾患である CIPO 患者由来の iPS 細胞を用いた病態解明および創薬スクリーニングのための基盤が大阪大学において確立された。

2. 研究の目的

本研究では、CIPO 患者から作成した iPS 細胞を用いて CIPO の疾患モデルを作成し、創薬研究を展開することを目的とする。

3. 研究の方法

1) CIPO 患者を抽出するため、OGF 参加施設における CIPO 診療実態調査を行った。なお、CIPO は希少疾患であるため、診療実態調査自身も意義深い。

2) CIPO 診療実態調査で CIPO と診断された症例の一部について、血中 APOB48 発現レベルを測定した。なお、APOB48 は最近 CIPO の血清マーカーとして期待される血中蛋白である。

4. 研究成果

1) CIPO 診療実態調査  
自主臨床研究「慢性偽性腸閉塞症の予後を規

定する因子を解析する前向き後向き多施設共同観察研究」として大阪大学をはじめとした OGF 関連施設で臨床研究倫理審査の承認を得た (大阪大学承認番号 13124)。

大阪大学から 4 症例、その他の施設から 10 症例が登録された。年齢は 10 歳台 1 症例、30 歳台 2 症例、40 歳台 2 症例、50 歳台 2 症例、60 歳台 1 症例、70 歳台 5 症例、90 歳台 1 症例の結果であり、年齢分布に偏りは認めなかった。性別は女性 10 症例、男性 4 症例と女性の人数が多い結果であり、性ホルモンが発症増悪に関与する可能性が示唆された。病因は特異性が最も多く 11 症例であった。臓器障害は大腸が最も多く 13 症例、小腸 3 症例、胃 2 症例、食道 1 症例であった。治療法は在宅中心静脈栄養 4 症例、手術歴 6 症例、ストマ造設 2 症例、内視鏡減圧 5 症例であった。

症例	年齢	性別	病因	障害臓器			在宅中心静脈栄養	手術歴	ストーマ	内視鏡減圧
				食道	胃	小腸				
1	51	女	特異性	○	○	○	週1回	軸捻転解除		
2	32	女	特異性		○	○		胃壁固定		有効
3	38	女	特異性			○	毎日			
4	52	女	特異性			○		結腸切除		
5	48	女	強皮症		○	○	毎日			
6	43	男	二分瘻柱			○		回盲部切除		
7	78	女	特異性			○		離脱		有効
8	74	男	S状結腸切除			○			横行結腸	
9	77	男	特異性			○				
10	78	男	特異性			○		S状結腸切除		
11	66	女	特異性			○			回腸	
12	19	女	特異性			○				有効
13	94	女	特異性			○		腸閉塞2回		有効
14	70	女	特異性		○	○				有効

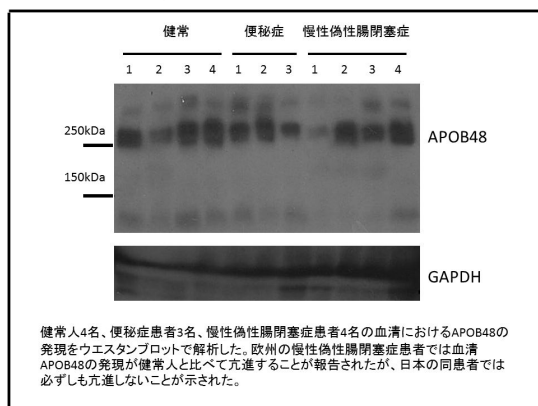
治療内容と障害臓器の関連性を上図に示した。在宅中心静脈栄養を継続する必要のある 3 症例は全て小腸が障害されていた。腸管切除、ストマ造設、内視鏡減圧を選択された症例は全て障害臓器が大腸に限局されていた。厚労省班会議の実態調査によれば、大腸のみの障害であれば腸管切除は有効かもしれないとされている。我々の結果はこの報告を支持するものであり、その他の選択肢としてストマ造設、内視鏡減圧も有用である可能性を示唆している。

2) 血清 APOB48 蛋白発現解析

自主臨床研究「慢性偽性腸閉塞症における血清 APOB48 蛋白発現解析」として大阪大学をはじめとした OGF 関連施設で臨床研究倫理審査の承認を得た (大阪大学承認番号 15432)。

健康人 4 人、便秘症患者 3 人、CIPO 患者 4 人の血清を採取、ウエスタンブロットにより APOB48 蛋白発現解析を行った。なお、抗体は既報 (Gastroenterology 2015; 148: 771-782)と同じものを購入しようとしたが、抗体業者の都合により購入出来なくなっており、既報の論文責任者に問い合わせた代わりとなる抗体として ABCAM 社 Anti-Apolipoprotein B 抗体 (ab20737) Product code ab20737) を勧められ、同抗体を用いて

ウエスタンブロットを行った。その結果、確かに APOB48 と思われるバンドがサイズ 250kDa の近傍で確認されたが、発現量は健康人、便秘症患者、CIPO 患者において特に違いは見られなかった。我々が解析した CIPO 患者は 4 名と少数であり結果の解釈は限定的であるが、APOB48 は日本人の CIPO 患者を見分ける血清マーカーとしては役立ちそうにない。



CIPO 患者由来の iPS 細胞を用いた病態解明および創薬スクリーニングが本研究の目的であったが、患者を抽出する段階で今回の研究は終了となった。

今回、CIPO 患者由来の iPS 細胞を作成し、さらに ICC や神経細胞を含む腸管様臓器への分化を誘導して、in vitro で CIPO の実験モデルを作成し、薬剤の効果判定に用いる研究を立ち上げた。

本検討では in vitro の organ culture レベルで薬剤の効果判定するもので、遺伝子レベル、もしくは分子生物学的に異常が明らかな患者が、少なくとも生理学的、もしくは生化学的な検査により確定診断された患者から細胞を調整する方が、効率良く検討を進めることができると考えた。しかし、現在、CIPO に特異的な検査はなく、また CIPO の原因、病態生理について、分子生物学な遺伝子レベルでは詳細には明らかにされていないため、診断マーカーも同定されていない。CIPO の家系解析から明らかになった遺伝子変異についてはいくつか報告があるが、頻度は稀で CIPO の大半は散発性であるため、既報の遺伝子変異からの絞り込みは困難である。唯一散発性 CIPO 患者を用いた検討で、遺伝子レベルでの特異的な異常として、CIPO 患者で APOB48 が高発現していること、その原因として RAD21 遺伝子に遺伝子変異があることが報告されている (Gastroenterology 148:771-782,2015)。そこで、今回、まず、iPS 細胞を調整する患者を絞り込む目的で、血清 APOB48 量を既報に従いウエスタンブロットで検討した。結果に示すように CIPO 患者の中に APOB48 発現の多いものもあつたが、正常者でも APOB48 量が多いものもあり、今回の検討方法では APOB48 を用いて CIPO 患者を絞り込むことは困難であることが判明した。

今後は、他の CIPO 患者でも同様の検討を行う、APOB48 検出方法を改良すること、新たな CIPO のマーカーを用いて患者の絞り込みを行う、臨床的に確定診断される CIPO 患者から iPS 細胞を調整し、検討を進める、ことを続けていく予定である。

## 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 15 件)

Evaluation of endoscopic entire 3D image acquisition of the digestive tract using a stereo endoscope

Kayo Yoshimoto, Kenji Watabe, Tetsuji Fujinaga, Hideki Iijima, Masahiko Tsujii, Hideya Takahashi, Tetsuo Takehara, Kenji Yamada

Proc. SPIE 10054, Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic and Surgical Guidance Systems XV (14 February 2017); doi: 10.1117/12.2250774

臨床現場における睡眠時呼吸障害のスクリーニングのための非接触手法の検討

Yutaka Matsuura, Hieyong Jeong, Kenji Yamada, Kenji Watabe and Yuko Ohno  
Journal of Robotics and Mechatronics, in press

A novel pathogenesis of inflammatory bowel disease from the perspective of glyco-immunology. Shinzaki S, Iijima H, Fujii H, Kamada Y, Naka T, Takehara T, Miyoshi E. BMC Cancer. in press

Age at onset is associated with the seasonal pattern of onset and exacerbation in inflammatory bowel disease. Araki M, Shinzaki S, Yamada T, Arimitsu S, Komori M, Shibukawa N, Mukai A, Nakajima S, Kinoshita K, Kitamura S, Murayama Y, Ogawa H, Yasunaga Y, Oshita M, Fukui H, Masuda E, Tsujii M, Hiyama S, Inoue T, Iijima H, Takehara T. J Gastroenterol. in press

Indigo Naturalis ameliorates murine dextran sodium sulfate-induced colitis via aryl hydrocarbon receptor activation. Kawai S, Iijima H, Shinzaki S, Hiyama S, Yamaguchi T, Araki M, Iwatani S, Shiraishi E, Mukai A, Inoue T, Hayashi Y, Tsujii M, Motooka D, Nakamura S, Iida T, Takehara T. J Gastroenterol. in press

Clinical problems with antithrombotic therapy for endoscopic submucosal dissection for gastric neoplasms. Yoshio T,

Nishida T, Hayashi Y, Iijima H, Tsujii M, Fujisaki J, Takehara T. World J Gastrointest Endosc. 16:756-762, 2017

Leucine-rich Alpha-2 Glycoprotein is a Serum Biomarker of Mucosal Healing in Ulcerative Colitis. Shinzaki S, Matsuoka K, Iijima H, Mizuno S, Serada S, Fujimoto M, Arai N, Koyama N, Morii E, Watanabe M, Hibi T, Kanai T, Takehara T, Naka T. J Crohns Colitis. 11:84-91, 2017

Narrow-band imaging with magnifying endoscopy for Peyer's patches is useful in predicting the recurrence of remissive patients with ulcerative colitis. Hiyama S, Iijima H, Kawai S, Mukai A, Shiraishi E, Iwatani S, Yamaguchi T, Araki M, Hayashi Y, Shinzaki S, Mizushima T, Tsujii M, Takehara T. Intest Res. 14:314-321, 2016

p53 functional deficiency in human colon cancer cells promotes fibroblast-mediated angiogenesis and tumor growth. Hayashi Y, Tsujii M, Kodama T, Akasaka T, Kondo J, Hikita H, Inoue T, Tsujii Y, Maekawa A, Yoshii S, Shinzaki S, Watabe K, Tomita Y, Inoue M, Tatsumi T, Iijima H, Takehara T. Carcinogenesis. 37:972-984, 2016

Core Fucosylation on T Cells, Required for Activation of T-Cell Receptor Signaling and Induction of Colitis in Mice, Is Increased in Patients With Inflammatory Bowel Disease. Fujii H, Shinzaki S, Iijima H, Wakamatsu K, Iwamoto C, Sobajima T, Kuwahara R, Hiyama S, Hayashi Y, Takamatsu S, Uozumi N, Kamada Y, Tsujii M, Taniguchi N, Takehara T, Miyoshi E. Gastroenterology 150:1620-1632,2016

"Underwater" endoscopic submucosal dissection: a novel technique for complete resection of a rectal neuroendocrine tumor. Yoshii S, Hayashi Y, Matsui T, Aoi K, Tsujii Y, Iijima H, Takehara T. Endoscopy. 48:E67-68, 2016

Miyoshi E, Shinzaki S, Fujii H, Iijima H, Kamada Y, Takehara T. Role of aberrant IgG glycosylation in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Proteomics Clin Appl. 10: 384-90, 2016

N-Acetylglucosaminyltransferase V exacerbates murine colitis with macrophage dysfunction and enhances colitic tumorigenesis. Shinzaki S, Ishii M, Fujii H, Iijima H, Wakamatsu K, Kawai S, Shiraishi E, Hiyama S, Inoue T, Hayashi Y,

Kuwahara R, Takamatsu S, Kamada Y, Morii E, Tsujii M, Takehara T, Miyoshi E. J Gastroenterol. 51:357-369

Vitamin K deficiency leads to exacerbation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis. Shiraishi E, Iijima H, Shinzaki S, Nakajima S, Inoue T, Hiyama S, Kawai S, Araki M, Yamaguchi T, Hayashi Y, Fujii H, Nishida T, Tsujii M, Takehara T. J Gastroenterol. 51:346-356, 2016

Esophagogastric junctional adenocarcinoma originating from endoscopically unrecognizable Barrett's epithelium. Nagai K, Tsujii Y, Matsui T, Yoshii S, Fujinaga T, Maekawa A, Inoue T, Hayashi Y, Shinzaki S, Iijima H, Tsujii M, Morii E, Takehara T. Dis Esophagus. 4:1164-1166, 2016

〔学会発表〕(計 3 件)  
大腸カプセル内視鏡の病変検出率と大腸内視鏡検査法における位置づけの検討. 前阪和城,小森 真人,辻井 正彦. 第 91 回日本消化器内視鏡学会総会 2016 年 5 月 12-14 日

内視鏡検査におけるプロポフォルによる静脈麻酔の有用性. 福岡 誠,小森 真人,奥山 直木,工藤 慎之輔,前阪 和城,白井 久美子,木村 晋也,大西 幸作,楠本 侑宏,末吉 由佳,松本 健吾,平尾 元宏,法水 淳,辻井 正彦. 第 91 回日本消化器内視鏡学会総会 2016 年 5 月 12-14 日

中下部悪性胆道狭窄に対する SEMS(EGIS Biliary Stent, Double Bare type および Double Covered type)の使用経験. 福岡 誠,小森 真人,奥山 直木,工藤 慎之輔,前阪 和城,白井 久美子,木村 晋也,大西 幸作,楠本 侑宏,末吉 由佳,松本 健吾,平尾 元宏,法水 淳,辻井 正彦. 第 91 回日本消化器内視鏡学会総会 2016 年 5 月 12-14 日

〔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  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

辻井正彦 (TSUJII MASAHIKO)

大阪大学・医学系研究科・招へい教授

研究者番号: 40303937

(2)研究分担者

渡部健二 (KENJI WATABE )  
大阪大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：50379244

竹原 徹郎 (TAKEHARA TETSUO)  
大阪大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：70335355

林 義人 (HAYASHI YOSHITO)  
大阪大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：80647123

飯島 英樹 (IIJIMA HIDEKI)  
大阪大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：90444520

(3)連携研究者

なし