

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20949

研究課題名(和文) Mechanism of autoinflammation in chronic granulomatous disease: the molecular crosstalk between innate immune cells and gastrointestinal environments

研究課題名(英文) Mechanism of autoinflammation in chronic granulomatous disease: the molecular crosstalk between innate immune cells and gastrointestinal environments

研究代表者

頼 貞儀 (Lai, Chen-Yi)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：30739925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性肉芽腫症(CGD)は食細胞異常症であるが、自然リンパ球(ILCs)を含む腸管組織における自己炎症も有している。私たちはILCsの源である造血幹前駆細胞について比較を行い、CGDと野生型マウスとの間に差を見出さなかった。次にヒト腸管環境を模倣する目的でCGD患者由来iPS細胞を樹立、対照健康細胞とともに分化培養し、ヒト腸管オルガノイド(HIOs)を樹立した。HIOsはヒト腸管組織に類似しており、長期間維持できたことから、幹細胞が保持されていると考えた。CGD-iPS細胞からのHIOsの樹立は報告されておらず、CGD腸炎の病態解明を行うために必要な実験系を整備することができた。

研究成果の概要(英文)：Chronic granulomatous disease (CGD) is a phagocyte disorder. It is also characterized by autoinflammation in the gastrointestinal (GI) tract, where innate lymphoid cells (ILCs) reside. Here, we clarified that the hematopoietic stem and progenitor cells, the origin of ILCs, in the CGD mice are comparable to wild-type control. Induced pluripotent stem (iPS) cells were generated from CGD patients. The human intestinal organoids (HIOs) were successfully generated from iPS cells. The resulting HIOs showed structures resembled normal morphology of human intestines and could be expanded more than 4 months suggesting the maintenance of the self-renewability of intestine stem cells. This is the first successful attempt at generating intestinal tissue from CGD-iPS cells. This is of importance due to the availability of patient's samples and existing discrepancies between species. Here we established a new platform for studying human GI system in vitro and the pathophysiology of CGD colitis.

研究分野：造血幹細胞、幹細胞生物学

キーワード：慢性肉芽腫 autoinflammation intestine organoid

1. 研究開始当初の背景

慢性肉芽腫症 (CGD) は NADPH オキシダーゼ複合体の構成因子のひとつに遺伝子異常が生じて発症する免疫不全症である。NADPH オキシダーゼは食細胞における殺菌に必要な活性酸素の産生に重要であり、その欠損により患児は繰り返す感染症に苦しめられる。感染とは独立して起こす自己炎症もまたこの疾患の特徴である；腸管組織が特に標的となりやすく、その病理像はその他の炎症性腸炎に類似する (Am J Surg Pathol 37, 1365; 2013)。背景には、マクロファージや樹状細胞といった自然免疫細胞におけるケモカインの産生異常が示唆されている。一方、自然免疫細胞の中でも、最近注目されている自然リンパ球 (ILCs) については、この病態への関与はよく知られていない。ILCs は上皮細胞バリアとの関係において炎症の初期に重要な役割を演じることが知られているが、ヒトの腸管において、特に CGD 腸炎の病態においての役割は未知である。

近年の技術革新により、iPS 細胞が生み出され、患者由来 iPS 細胞の活用により、CGD の免疫異常についての病態再現が報告されている (Blood 117, 5561; 2011)。また、オルガノイド培養技術の進歩により、ヒト iPS 細胞からの腸管組織形成も可能になっている (Nature 470, 105; 2011)。ヒト腸管上皮オルガノイドは 3D 培養法により長期間維持することも可能である (Gastroenterology 141, 1762; 2011)。これらの技術を応用し、私たちは CGD における腸炎の病像について詳細な検討が可能になる、理想的な研究プラットフォームの構築を目指した。この CGD 腸炎モデルは、自然免疫細胞と腸管組織との相互作用について詳細な解析を可能にし、創薬標的の同定から、薬物介入等、治療法開発までを実現する、新たな研究ツールとなることが期待される。

2. 研究の目的

本研究においては、マウスモデルおよびヒト iPS 細胞を用いたモデルの活用により、CGD における自己炎症性腸炎のメカニズムの解明を目指す。特に以下の疑問に焦点をあてつつ研究を進める。

CGD における腸管病変の形成・進展に、自然免疫細胞、特に自然リンパ球は関与するであろうか？

CGD 腸炎を増悪、または制御するために、中心となる分子標的は何であろうか？

CGD 腸炎ならびに自己炎症性腸炎全般に、果たして患者由来 iPS 細胞を用いた研究は有用であろうか？

最終的にはインヒビター・低分子化合物等により、CGD 患者さんに治癒をもたらす分子標的療法の開発につながる成果を目指す。

3. 研究の方法

CGD マウスを用いて血液系および腸管組織

の恒常性について検討する：1) 造血細胞では ILCs を含めて、細胞表面マーカー、存在頻度、機能性について、2) 腸管組織について組織病理学的に解析を進める。

患者由来 iPS 細胞から 3D 培養によるオルガノイドを樹立する。同じく iPS 細胞から IECs を含む免疫細胞を誘導し、in vitro 炎症モデルを確立する。

イメージング技術を利用して、自然免疫細胞と腸管上皮バリアーとの相互関係を解析する。

最終的には、自己炎症の鍵を握るパスウェイを抑制する活性を各種インヒビター・低分子化合物中に求め、治療法開発につなげる。

4. 研究成果

造血系と腸管の定常状態では CGD マウスで明らかな異常を認めなかった。

ILCs の源である造血幹前駆細胞について比較を行い、CGD と野生型マウスとの間に差を見出さなかった。また、定常状態 (SPF 環境飼育) の CGD マウス腸管では健常マウスと同様、明らかな炎症所見を認めなかった。

CGD 患者由来 iPS 細胞からのヒト腸管オルガノイドの樹立

ヒト腸管環境を模倣する目的で CGD 患者由来 iPS 細胞を樹立、対照健常細胞とともに分化培養し、ヒト腸管オルガノイド (HIOs) を樹立した。HIOs はヒト腸管組織に類似しており、長期間維持できたことから、幹細胞が保持されていると考えられた。このモデルを用いることで、病態形成に重要な分子基盤を明らかにし、治療標的の抽出が可能になると思われる。さらにはクローン病等、病態に共通性を有する他の疾患の理解にも貢献することが期待できる。

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 5 件)

Iizuka-Koga M, Asashima H, Ando M, Lai CY, Mochizuki S, Nakanishi M, Nishimura T, Tsuboi H, Hirota T, Takahashi H, Matsumoto I, Otsu M, Sumida T. Functional Analysis of Dendritic Cells Generated from T-iPSCs from CD4+ T Cell Clones of Sjögren's Syndrome. Stem Cell Reports. 8, 1155-1163, 2017. 査読あり

Ieyasu A, Ishida R, Kimura T, Morita M, Wilkinson AC, Sudo K, Nishimura T, Ohehara J, Tajima Y, Lai CY, Otsu M, Nakamura Y, Ema H, Nakauchi H, Yamazaki S. An All-Recombinant Protein-Based Culture System Specifically Identifies Hematopoietic Stem Cell Maintenance

Factors. Stem Cell Reports. 8, 500-508, 2017. 査読あり

Ishida T, Suzuki S, Lai CY, Yamazaki S, Kakuta S, Iwakura Y, Nojima M, Takeuchi Y, Higashihara M, Nakauchi H, Otsu M. Pre-Transplantation Blockade of TNF- α -Mediated Oxygen Species Accumulation Protects Hematopoietic Stem Cells. Stem Cells. 35, 989-1002, 2017. 査読あり

Koso H, Tshako A, Lai CY, Baba Y, Otsu M, Ueno K, Nagasaki M, Suzuki Y, Watanabe S. Conditional rod photoreceptor ablation reveals Sall1 as a microglial marker and regulator of microglial morphology in the retina. Glia. 64, 2005-24, 2016. 査読あり

Ishida T, Takahashi S, Lai CY, Nojima M, Yamamoto R, Takeuchi E, Takeuchi Y, Higashihara M, Nakauchi H, Otsu M. Multiple allogeneic progenitors in combination function as a unit to support early transient hematopoiesis in transplantation. Journal of Experimental Medicine. 13, 1865-80, 2016. 査読あり

〔学会発表〕(計 11 件)
口頭発表

Bunki Natsumoto, Hirofumi Shoda, Huan-Ting Lin, Chen-Yi Lai, Kazuyoshi Ishigaki, Yuta Kochi, Keishi Fujio, Makoto Otsu, Kazuhiko Yamamoto Detailed characterization of immune cells differentiated from SLE patient-derived Induced Pluripotent Stem Cells 第 61 回日本リウマチ学会総会 (International Workshop Award) 2017 年 4 月 20 日~22 日 福岡、日本

浅島弘充 飯塚麻菜 安藤美樹 頼貞儀 坪井洋人 廣田智哉 高橋広行 松本功 大津真、住田孝之 シェーグレン症候群患者の CD4+T 細胞由来 iPS 細胞から誘導した樹状細胞の機能解析。第 114 回日本内科学会総会・講演会 2017 年 4 月 14 日~16 日 東京、日本

Bunki Natsumoto, Hirofumi Shoda, Huan-Ting Lin, Chen-Yi Lai, Kazuyoshi Ishigaki, Yuta Kochi, Keishi Fujio, Makoto Otsu, Kazuhiko Yamamoto Detailed characterization of immune

cells differentiated from SLE patient-derived Induced Pluripotent Stem Cells

第 45 回日本免疫学会 2016 年 12 月 5 日~7 日 沖縄、日本

Ishida T, Takahashi S, Chen-Yi Lai, Higashihara M, Nakauchi H, Otsu M. Proof of Benefit in Multiple-Cord Blood Transplantation Evidenced By Early Hematopoietic Reconstitution. 57th American Society of Hematology 2015 Annual Meeting, Dec 5-8, Orlando, FL.

ポスター発表

田丸新一、脇 裕典、頼 貞儀、奥村高志、大蔵広子、堀江由美、廣田雄輔、菊地暁子、大津 真、山内敏正、門脇孝 ミトコンドリア A3243G 変異患者の末梢血より樹立した iPS 細胞を用いた解析

第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会。 2017 年 5 月 18 日~20 日 名古屋、日本

Bunki Natsumoto, Hirofumi Shoda, Huan-Ting Lin, Chen-Yi Lai, Kazuyoshi Ishigaki, Yuta Kochi, Keishi Fujio, Makoto Otsu, Kazuhiko Yamamoto Detailed characterization of immune cells differentiated from SLE patient-derived Induced Pluripotent Stem Cells

第 45 回日本免疫学会。 2016 年 12 月 5 日~7 日 沖縄、日本

夏本 文輝、庄田 宏文、林 煥庭、頼 貞儀、石垣 和慶、高地 雄太、藤尾 圭志、大津 真、山本 一彦 全身性エリテマトーデス疾患特異的 iPS 細胞を用いた免疫細胞分化・機能解析研究

第 3 回ベーシックリサーチカンファ。 2016 年 10 月 14 日、15 日 東京、日本

長谷川 久紀、溝口 史高、頼 貞儀、大津 真、上阪 等

MyoD を導入したヒト人工多能性幹細胞の多クローン集団の樹立と筋細胞分化時のサイトカイン産生評価

第 3 回日本筋学会学術集会。 2016 年 9 月 8 日~10 日 東京、日本

Ishida T, Suzuki S, Chen-Yi Lai, Higashihara M, Nakauchi H, Otsu M. Protection of Transplanted Hematopoietic Stem Cells from Inflammatory Recipient Marrow Environment through Specific TNF-Signal Blockade. 57th American Society of Hematology 2015 Annual Meeting, Dec 5-8, Orlando, FL.

石田 隆, 鈴木 幸恵, Chen-Yi Lai, 角田 茂, 岩倉 洋一郎, 野島 正寛, 竹内 康雄, 東原 正明, 中内 啓光, 大津 真: 骨髄炎症下における造血幹細胞保護. 第 80 回日本インターフェロン・サイトカイン学会, 東京, July 17-18, 2015.

Chen-Yi Lai, Satoshi Yamazaki, Masafumi Onodera, Shigeru Kakuta, Yoichiro Iwakura, Makoto Otsu, and Hiromitsu Nakauchi. Roles for Cxcr4 signaling in murine hematopoietic stem/progenitor cells in bone marrow repopulation. 第 80 回日本インターフェロン・サイトカイン学会, 東京, July 17-18, 2015.

研究者番号:

(4)研究協力者 ()

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

頼 貞儀 (Lai, Chen-Yi)
東京大学・医科学研究所・特任助教
研究者番号: 30739925

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()