

令和元年6月7日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15930

研究課題名(和文) 腸管上皮幹細胞初代培養を用いた炎症性腸疾患における幹細胞病態解明と新規治療薬開発

研究課題名(英文) Elucidation of stem cell pathogenesis in inflammatory bowel disease using primary intestinal epithelial stem cells culture and development of new therapeutic agent

研究代表者

西村 龍 (NISHIMURA, Ryu)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60778132

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)：ヒト正常大腸オルガノイドを用いて体外炎症性疾患疑似モデルを確立した。炎症応答をマイクロアレイにて解析し、炎症関連遺伝子の上昇及び粘液関連遺伝子の低下を確認した。この疑似モデルにIBD新規治療候補薬を添加すると、炎症環境下においても炎症関連遺伝子の低下及び粘液関連遺伝子の上昇を認めた。さらに変動遺伝子を抽出することで新規治療候補薬の標的分子を同定した。この研究によりIBDモデル及び上皮機能評価系が確立され、新規治療候補薬の開発やIBDの病態解明に有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体外でのヒト大腸上皮細胞でも潰瘍性大腸炎モデルの作成に成功し、潰瘍性大腸炎における大腸上皮細胞の病態の一部が明らかになった。このモデルを用いて新規治療候補薬の効果や作用機序を明らかにすることができた。このモデルを用いて治療候補薬のスクリーニングや安全性の評価することが期待できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have established in vitro UC model using human colonic organoid. Microarray analysis showed a significant induction of inflammatory-related genes in colonic organoids whereas cell differentiation was suppressed. Treatment with the investigational drug showed reciprocal dynamics of gene expression to inflammatory stimulation. We by focused a series of genes that were upregulated in an antagonistic response to inflammation by treatment with the investigational drug, and identified the molecular target. Further maturation of this system might be more efficient to predict the effect on UC for the development of new drugs.

研究分野：消化器病態学

キーワード：幹細胞機能評価 初代培養 炎症性腸疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD) 特に潰瘍性大腸炎は本邦で患者数が増加している難治性疾患である。寛解と再燃を繰り返すことで徐々に病態が悪化してき、最終的には大腸切除に至ることがあり、炎症を抑制することで症状を改善させるだけでは不十分であった。そんな中、抗 TNF 抗体が登場し、炎症を抑えるだけでなく、炎症により損傷した粘膜が再生する粘膜治癒症例が報告されるようになった。粘膜治癒症例では手術率が有意に低下することが報告され、近年では治療目標が症状の改善から粘膜治癒へとシフトしてきており、腸管上皮細胞の再生の有無が予後を決定すると考えられてきている。

腸管上皮細胞が治療標的となってきたが、当教室ではこれまでに Wnt シグナル亢進、Notch シグナル亢進など、上皮細胞の分化制御機構の破綻が様々な腸疾患の病態と関連することを明らかとしてきた。しかしながら、幹細胞自体の制御機構破綻については未だ明らかではなく、特に炎症性腸疾患による幹細胞形質への影響については全く解析されていない。ヒト腸管上皮幹細胞の可視化は、幹細胞の経時的な変化を追尾する事が可能であり、炎症状態における幹細胞の病態を抽出することが期待できる。さらに幹細胞機能や分化運命因子を制御することで、疾患予防もしくは疾患から正常への「リセット」が可能となることが予想される。また、粘膜治癒を直接標的とした薬は現在のところ存在せず、IBD を模倣した *in Vitro* モデルがなく、上皮細胞への粘膜治癒効果を評価する方法がないために粘膜治癒を直接標的とした薬の創薬が困難であるが、体外炎症性腸疾患 (IBD) 疑似モデルを確立することにより粘膜治癒を標的とした新規治療候補薬の開発が可能となると予想される。

2. 研究の目的

本研究では、可視化した幹細胞の機能評価法と体外 IBD 疑似モデルを開発することにより、IBD 患者の幹細胞病態を明らかとすると共に、幹細胞機能を動揺させる化合物を同定し、上皮幹細胞を標的とした IBD 新規治療薬開発の基盤や上皮細胞機能評価システム、新規治療候補薬の評価系を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

当研究室では倫理委員会承認のもと、IBD 患者の小腸・大腸の生検検体から初代培養オルガノイドの樹立を定期的に行っている。またヒト腸管上皮初代培養オルガノイドにおける遺伝子導入法を確立しており、オルガノイドにおける幹細胞可視化を構築した。さらに、炎症環境モデル構築に関しては先行してマウス大腸上皮オルガノイドを用いて施行しており、1年以上にわたる炎症性サイトカイン・腸内細菌菌体成分添加により慢性腸炎モデルの構築に成功している (引用文献 1)。ヒト大腸オルガノイドにおける炎症応答関連レセプターの発現を RT-PCR で検証し、対応するリガンドに対する炎症応答を IL-8 の発現により確認した。また、マイクロアレイ及び GSEA により網羅的な上皮炎症応答反応を検証した。酸化ストレスは CellROX を用いて蛍光強度を測定し評価した。さらに、構築した体外 IBD 疑似モデルを用いて新規治療候補薬の効果を、マイクロアレイを用いて評価し、作用機序を RT-PCR や免疫染色、コロニーフォーメーションアッセイで確認した。また、体外 IBD 疑似モデルで確認した KAG の効果を DSS 腸炎マウスモデルにより再確認した。

4. 研究成果

本学倫理審査委員会承認のもと、クローン病非病変部の大腸より内視鏡生検検体からヒト大腸オルガノイドを樹立した。樹立したヒト大腸オルガノイドにおける炎症性サイトカインや Toll like receptor (TLR) の発現を RT-PCR にて同定した。オルガノイドにおいて発現を認めたレセプターに対応するリガンドを用いて 3 時間の刺激を行うと IL-8 の発現上昇を認めた。さらに、1 週間の刺激にて酸化ストレス関連遺伝子である *Duoxa2* の発現上昇を認めた。炎症応答を認めた Poly (IC)、Flagellin、IL1、TNF- α を混合して刺激を行った所、各単剤での刺激と比較して最も大きい炎症応答を認めたことから、混合刺激を炎症条件として以下の実験を行った。リガンド混合刺激を 6 週間継続して行い、オルガノイドにおける炎症応答をマイクロアレイにて解析したところ、炎症関連遺伝子の上昇及び粘液形質の減少を認めた。さらに、炎症刺激オルガノイドにおいて発現が上昇している遺伝子群は GEO で公開されている潰瘍性大腸炎患者由来の生検検体において健常者と比べて発現が上昇している遺伝子群 (GDS4365) と一致することを確認した。これは構築したモデルが IBD を模倣していることを示唆している。また酸化ストレス可視化及び定量化により炎症刺激による活性酸素 (ROS) 発生量の上昇を認めた。このようにヒト大腸上皮細胞における体外 IBD 疑似モデルを確立させるとともに、上皮細胞機能評価システムを構築した。

この体外 IBD 疑似モデルに新規治療候補薬である KAG を添加し、その効果の評価することで、IBD 新規治療薬開発の評価系の確立を行った。KAG は 4 種類存在するプロスタグランジン E2 レセプターの一つである EP4 に対する特異的アゴニストで、マウスモデルにおいて DSS 腸炎を抑制し、粘膜治癒を促進することが報告されているが (引用文献 2)、その作用機序や上皮に対する標的分子については不明である。まずは通常状態のオルガノイドに KAG を一週間投与しその効果を 3 ラインのオルガノイドで確認した。KAG 投与により幹細胞マーカー遺伝子、増殖マーカー遺伝子、分化マーカー遺伝子の発現が促進されることを確認した。このことから、KAG に

は増殖と分化を促進する効果があることが示唆された。また、そのうちの1ラインのオルガノイドにおいて、分化マーカーの一つである TFF3 のオルガノイドにおける発現を免疫染色で検証し、KAG 投与により TFF3 陽性細胞が増加することを確認した。さらに、6 週間持続して KAG を投与したところ、増殖マーカー遺伝子、分化マーカー遺伝子の発現が行進したままであることを確認した。次に、炎症刺激条件下オルガノイドに KAG を 1 週間添加し、遺伝子発現を次の 3 群で比較した。(1) 通常状態オルガノイド、(2) 炎症刺激 6 週間継続オルガノイド、(3) 炎症刺激 6 週間継続かつ新規治療候補薬 1 週間投与オルガノイド。その結果、4 4 0 7 個の遺伝子が炎症刺激により発現が 2 倍以上に上昇しており((1)と(2)の比較)、そのうち約 4 分の 3 である 3 4 9 3 個の遺伝子の発現が KAG 投与により抑制さ、これらの遺伝子のうち 1 5 4 0 個の遺伝子発現が 2 分の 1 以下に減少していた((2)と(3)の比較)。その一方で、4 5 8 7 個の遺伝子が炎症刺激により発現が 2 分の 1 以下に減少しており((1)と(2)の比較)、そのうち半数を超える 2 6 3 7 個の遺伝子の発現が KAG 投与により上昇し、これらの遺伝子のうち 3 9 9 個の遺伝子発現が 2 倍以上に上昇していた((2)と(3)の比較)。これらの結果は KAG に炎症に対して拮抗効果があり、刺激によって発現が上昇した遺伝子を抑制し、発現が抑制された遺伝子を促進する効果があることを示唆している。

さらに、KAG の作用機序及び標的分子の探索を試みた。炎症刺激により発現が上昇する遺伝子のうち、KAG によって発現が低下する遺伝子には CLDN18 や C TA などの炎症関連遺伝子が多く確認された。特に CLDN18 は潰瘍性大腸炎患者において発現が増加することが報告されている遺伝子であり、KAG の効果でその発現は半分以下にまで低下した。また、炎症オルガノイドに KAG を投与すると、ROS 発生量が低下することを認めた。さらに、炎症刺激オルガノイドに KAG を投与することで細胞増殖能が促進することを認めた。これらのことから KAG には抗炎症作用があることが示唆された。一方、炎症刺激により発現が減少する遺伝子のうち、KAG によって発現が上昇する遺伝子には粘液関連遺伝子が多く含まれ、粘膜治癒に必要とされる TFF3 や Reg4 の発現が上昇していた。分泌系への分化の促進が示唆される結果であるが、腸管上皮細胞の分化制御のキー分子である Hes1 と Atoh1 の発現に変化はなく、Atoh1 の下流に存在する SPDEF の発現が上昇していた。SPDEF は杯細胞への分化に必要であることが報告されている遺伝子であり、KAG の標的は SPDEF であることが示唆された。また、幹細胞ニッチを構成する細胞で発現することが報告されている Reg4 に注目し、オルガノイドにおける Reg4 の発現を免疫染色で確認した。Reg4 の発現は炎症刺激により低下するが、KAG 投与により回復することを認めた。さらに、シングルセルからのコロニーフォーメーションアッセイを行い、KAG 投与によりコロニー形成能が通常状態でも炎症状態でも上昇することを認めた。これは KAG には幹細胞の働きを促進する効果があることを示唆している。これらの結果は、KAG が SPDEF に作用し、幹細胞ニッチを構成する細胞からの Reg4 の発現を促進し、結果として幹細胞機能を高める効果があることを示唆している。

これらの in Vitro において確認した KAG の効果をマウスモデルにおいても検証した。DSS モデルマウスを用いて KAG の効果を確認したところ、Vitro の結果と同様に炎症により Reg 4 の発現が低下し、KAG 投与により上昇していることを認めた。

この研究により、KAG の作用機序と標的分子を明らかにすることができただけでなく、炎症刺激によって幹細胞機能が低下し、それをリカバリーする作用のある薬は上皮細胞を標的とした IBD 治療薬になり得ることが示唆された。今回の研究により構築された体外 IBD 疑似モデルが IBD 病態解明や新規治療候補薬開発に有用であることが示された。これらの結果は 2 0 1 9 年に Journal of Gastroenterology において発表されている(引用文献 3)。

また、同一患者から IBD 病変部由来オルガノイドと非病変部由来オルガノイドを樹立した。同一患者由来のこれらのオルガノイドを比較することで、遺伝的背景や環境因子などを排除することができ、IBD 病変部特異的な特徴を検索できる。非炎症環境下で 2 か月以上継代培養することで Vivo での炎症の影響を除去し、形質の違いを検証した。潰瘍性大腸炎患者の病変部由来オルガノイドは同一患者の非病変部由来オルガノイドよりも細胞増殖能が低下していること、酸化ストレスが亢進していることを認めた。マイクロアレイにて遺伝子発現の差異を網羅的に解析したところ、病変部で特異的に発現が増加している遺伝子と減少している遺伝子を見つけた。これらの遺伝子の発現パターンが潰瘍性大腸炎患者において保存されているかを確認するために同一患者における遺伝子発現を 10 症例において調べた。その結果病変部特異的な遺伝子をいくつか見つけ出した。

<引用文献>

1. Hibiya Shuji, Tsuchiya Kiichiro, Hayashi Ryohei, Fukushima Keita, Horita Nobukatsu, Watanabe Sho, Shirasaki Tomoaki, Nishimura Ryu, Kimura Natsuko, Nishimura Tatsunori, Gotoh Noriko, Oshima Shigeru, Okamoto Ryuichi, Nakamura Tetsuya, Watanabe Mamoru. Long-term Inflammation Transforms Intestinal Epithelial Cells of Colonic Organoids. Journal of Crohn's and Colitis, 11(5), 2017, 621-630, 査読有
2. Watanabe Y, Murata T, Amakawa M, et al. KAG-308, a newly-identified EP4-selective agonist shows efficacy for treating ulcerative colitis and can bring about lower risk of colorectal carcinogenesis by oral administration. Eur J Pharmacol. 754, 2015, 179-89, 査読有

3. Nishimura R, Shirasaki T, Tsuchiya K, Miyake Y, Watanabe Y, Hibiya S, Watanabe S, Nakamura T, Watanabe M. Establishment of a system to evaluate the therapeutic effect and the dynamics of an investigational drug on ulcerative colitis using human colonic organoids. Journal of Gastroenterology, Epub ahead of print, 2019.1-13, 査読有

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Nishimura R, Shirasaki T, Tsuchiya K, Miyake Y, Watanabe Y, Hibiya S, Watanabe S, Nakamura T, Watanabe M. Establishment of a system to evaluate the therapeutic effect and the dynamics of an investigational drug on ulcerative colitis using human colonic organoids. Journal of Gastroenterology. Epub ahead of print, 2019.1-13

DOI:10.1007/s00535-018-01540-y, 査読有

〔学会発表〕(計5件)

Tsuchiya K, Watanabe S, Shirasaki T, Nishimura R, Katsukura N, Hibiya S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M. TP53 mutation in human colonic organoids acquires resistance to in vitro long-term inflammation. ECCO2019, 2019

Hibiya S, Tsuchiya K, Nishimura R, Shirasaki T, Watanabe S, Katsukura N, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M. Lesion-specific gene expression in the Epithelial cells of Crohn's disease by comparing Small intestinal organoids from active and inactive Lesion in the same patient. UEG 2018, 2018

Watanabe S, Tsuchiya K, Shirasaki T, Hibiya S, Nishimura R, Katsukura N, Oshima S, Okamoto R, Tetsuya N, Watanabe M. Tp53 mutation enhances cell proliferation and stemness in human colon epithelial organoids and promotes a resistance against long-term inflammation. UEG 2018, 2018

Shirasaki T, Tsuchiya K, Nishimura R, Watanabe S, Hibiya S, Katsukura N, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M. Identification of lesion-specific epithelial function of ulcerative colitis by comparing colonic organoids from lesion and non-lesion parts of same patients. DDW2018, 2018

Hibiya S, Tsuchiya K, Watanabe S, Nishimura R, Shirasaki T, Oshima S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M. Human colonic organoid treated with inflammatory factors might mimic the pathophysiology of epithelial cells in ulcerative colitis. DDW2018, 2018

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。