

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07902

研究課題名(和文)炎症性腸疾患病変部に共通する特異的本態の解明

研究課題名(英文)The elucidation of common pathogenesis specialized in the lesion of IBD

研究代表者

竹中 健人 (Takenaka, Kento)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座助教

研究者番号：10783368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患(IBC)は主に潰瘍性大腸炎(UC)・クローン病(CD)に大別され、UCは直腸、CDは回腸末端とそれぞれ好発部位を認める。本研究では腸管上皮細胞の機能破綻によるバリアー能低下をきたす部位が疾患の好発部位となるのではないかと考えました。そこで、同一患者の病変部と非病変部の手術検体から上皮細胞を取り出し、オルガノイドとして培養しました。病変部と非病変部のオルガノイドの形質や遺伝子の発現を解析し、病変部の特徴を明らかとしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患(IBC)の好発部位は知られているが、なぜその部位に病変が発生するか不明である。今回の成果により、病変部特異的な機構を明らかとする事で、疾患の発症予防に寄与することが期待できます。また、病変の拡大や重症化の抑制にも有用であると考えています。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory bowel disease (IBD) is mainly classified into ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). The lesion of UC and CD is often observed in the rectum and the terminal ileum, respectively. In this study, we considered that the site where the barrier capacity is reduced due to the dysfunction of intestinal epithelial cells may be the site where the disease occurs frequently. Therefore, epithelial cells were extracted from surgical specimens of lesions and non-lesions of the same patient and cultured as organoids. Organoid traits and gene expression in lesions and non-lesions were analyzed, resulting in clarifying the characteristics of lesions.

研究分野：消化器内科学

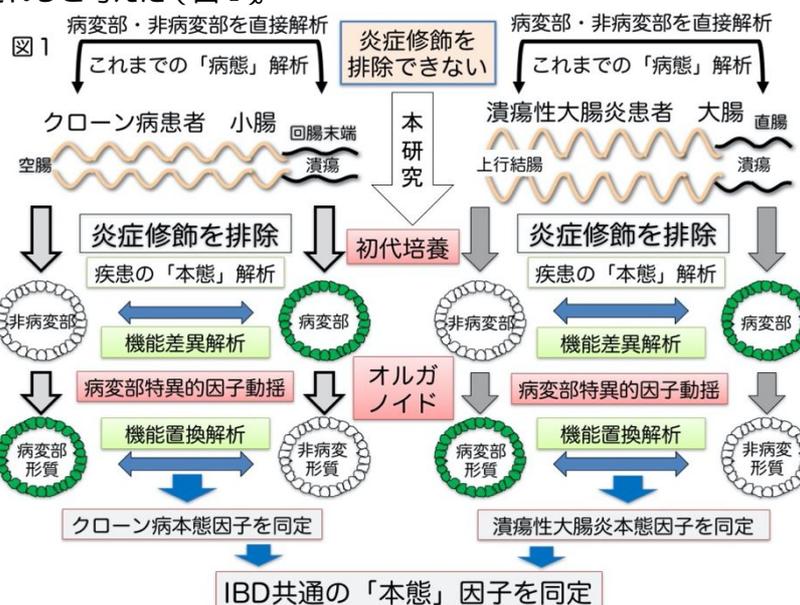
キーワード：炎症性腸疾患 病変部特異的因子

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD) は主に潰瘍性大腸炎 (UC)・クローン病 (CD) に大別され、UC は直腸、CD は回腸末端とそれぞれ好発部位を認める。消化管は全長約 10m と小腸・大腸の差異は認めるものの基本構造は同じであるが、同一腸管の中で部位限定的に発病する機構は未だ不明である。これまで IBD は炎症性の疾患であり免疫制御破綻が原因と考えられ、臨床においても免疫を抑制することを主眼として治療薬が開発されてきた。しかし、炎症抑制のみでは容易に再燃を繰り返すことが問題となり、粘膜を修復することが再燃予防・完治に重要であることが近年提唱されている。特に粘膜の腸管上皮細胞によるバリアー機能が着目されており、バリアー破綻が IBD 発症や再燃に密接に関わることが示唆されている。そこで腸管上皮細胞の機能破綻によるバリアー能低下をきたす部位が疾患の好発部位となるのではないかと考え、好発部位特異的腸管上皮細胞制御機構が IBD 疾患の「本態」に直結しないか？という学術的「問い」を設定した。これまでは「疾患の本態」ではなく「疾患の病態」解析としてヒト臨床検体を用いる場合には病変部と非病変部を採取し比較検討を行うことが通常である。炎症背景を加味した上皮細胞「病態」評価としては有用であり、臨床検体を用いて炎症環境下での IBD 上皮細胞病態を明らかとしてきた。しかし病変部では炎症細胞浸潤やサイトカイン暴露などの炎症刺激により上皮細胞は大きな修飾をうけるため、疾患発症の「本態」機構が埋伏され同定できないことが多い。本教室では世界で初めてマウス大腸上皮細胞の初代培養及びオルガノイド形態での持続継代培養に成功し、現在ではヒト臨床検体からの小腸・大腸上皮細胞のオルガノイド培養を確立させている。オルガノイドは幹細胞を含むすべての分化細胞を保持した状態であり生体内を模倣した系である。培地は無血清であることから、in vitro 環境下では組織内での炎症背景を排除した腸管上皮細胞のみの「IBD 本態評価」が可能ではないかと着想した。さらに潰瘍性大腸炎・クローン病の両疾患における病変部特異的機構を解析し、共通の因子を探索・同定することにより IBD の根幹に関わる本態解明に迫れると考えた (図 1)。

2. 研究の目的

本研究では 1) IBD 患者の病変部・非病変部の腸管上皮オルガノイドにおける機能差異、2) IBD 病変部共通の特異的遺伝子の同定、3) IBD 病変部特異的遺伝子における上皮細胞機能・疾患本態との関与解析を中心課題とし、炎症背景を除去した病変部特異的かつ疾患に共通する上皮細胞機能を抽出することにより IBD 疾患の本態を明らかとすることを目的とする。



3. 研究の方法

1) 病変部小腸・大腸オルガノイド機能解析

潰瘍性大腸炎に関しては同一人物病変部の直腸及び非病変部の上行結腸より大腸オルガノイドを樹立する。クローン病に関しては同一人物病変部の回腸末端と非病変部の空腸より小腸オルガノイドを樹立する。同一人物の病変部、非病変部由来のオルガノイドの機能解析を行う。具体的には増殖、幹細胞分画、炎症刺激応答、炎症刺激耐性を評価し、上皮細胞機能の部位別差異を解析する。評価項目としては、MTS assay による増殖能、幹細胞可視化による幹細胞分画数、炎症刺激によるサイトカイン産生、酸化ストレス度、炎症刺激によるアポトーシス、ネクロトーシス等とする。

2) 病変部特異的遺伝子の抽出

両部位オルガノイドのマイクロアレイにより発現差異を認めた遺伝子を抽出する。さらに、小腸オルガノイドにおける病変部特異的遺伝子群も抽出する。同一人物由来 3 ペアを用いた部位別オルガノイド解析により発現差異を確認する。

3) 病変部特異的遺伝子の生体での確認

バルーン内視鏡生検検体・手術検体組織を用いて、生体組織内でも病変特異的遺伝子の発現差異が維持されているかを確認する。バルーン内視鏡生検検体、手術検体は RNA later 保存・凍結切片保存済みであり、PCR、免疫染色にて発現差異を解析する。発現差異を認めた因子を候補群

として絞り込みを行う。

4) 病変部特異的遺伝子発現の動揺

病変部由来オルガノイドに Crisper/CAS9 システムを用いて、病変部特異的発現遺伝子を欠失させる。もしくは、レンチウイルスを用いて非病変部由来オルガノイドに病変部特異的発現遺伝子を発現させる。

5) 病変部特異的遺伝子動揺における細胞機能置換の確認

遺伝子動揺の後、病変部由来オルガノイドが非病変部由来オルガノイドの細胞機能に置換するか(計画 1)に準じて評価する。また逆に非病変部由来オルガノイドが病変部由来オルガノイドに置換するか評価する。特に炎症刺激耐性など IBD 病態と関与する機能の置換を確認する。機能置換が確認できた因子を候補因子として絞り込む。

6) IBD 共通の病変部特異的遺伝子解析

計画 1-5)において、小腸・大腸ともに有意な結果がえられた因子を疾患特異性本態因子として決定する。さらに小腸と大腸で同じ因子がある場合には IBD 共通本態因子として同定する。共通因子の機能解析としてマウスへの移植モデルを構築し、in vivo における機能置換作用を評価する。

7) IBD 共通の病変部特異的遺伝子を標的とした解析

計画 6)で明らかとなった因子に対する阻害作用薬を用いて上皮機能作用を確認し新規治療薬候補としての評価を計画 1)に準じて行う。阻害作用誘導としては、mi-RNA を用いるのみならず、ケミカルライブラリースクリーニングにより阻害作用を有する小化合物を抽出する。オルガノイドで効果を認めた阻害薬はマウス腸炎モデルで in vivo での効果を確認する。

4. 研究成果

1) 病変部小腸・大腸オルガノイド機能解析

潰瘍性大腸炎に関しては同一人物病変部の直腸及び非病変部の上行結腸より大腸オルガノイドを樹立した。クローン病に関しては同一人物病変部の回腸末端と非病変部の空腸より小腸オルガノイドを樹立した。同一人物の病変部、非病変部由来のオルガノイドの機能解析を施行した。具体的には増殖、幹細胞分画、炎症刺激応答、炎症刺激耐性を評価し、上皮細胞機能の部位別差異を明らかとした。

2) 病変部特異的遺伝子の抽出

両部位オルガノイドのマイクロアレイにより発現差異を認めた遺伝子を抽出した。さらに、小腸オルガノイドにおける病変部特異的遺伝子群も抽出した。同一人物由来 3 ペアを用いた部位別オルガノイド解析により発現差異を確認した。

3) 病変部特異的遺伝子の生体での確認

バルーン内視鏡生検検体・手術検体組織を用いて、生体組織内でも病変特異的遺伝子の発現差異が維持されているかを確認した。バルーン内視鏡生検検体、手術検体を PCR、免疫染色にて発現差異を解析した。発現差異を認めた因子を候補群として絞り込みを行った。

4) 病変部特異的遺伝子発現の動揺

病変部由来オルガノイドに Crisper/CAS9 システムを用いて、病変部特異的発現遺伝子を欠失させた。同時にレンチウイルスを用いて非病変部由来オルガノイドに病変部特異的発現遺伝子を発現させた。

5) 病変部特異的遺伝子動揺における細胞機能置換の確認

遺伝子動揺の後、病変部由来オルガノイドが非病変部由来オルガノイドの細胞機能に置換するか(計画 1)に準じて評価した。また逆に非病変部由来オルガノイドが病変部由来オルガノイドに置換するか評価した。

6) IBD 共通の病変部特異的遺伝子解析

計画 1-5)において、小腸・大腸ともに有意な結果がえられた因子を疾患特異性本態因子として決定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takenaka Kento, Fujii Toshimitsu, Suzuki Kohei, Shimizu Hiromichi, Motobayashi Maiko, Hibiya Shuji, Saito Eiko, Nagahori Masakazu, Watanabe Mamoru, Ohtsuka Kazuo	4. 巻 18
2. 論文標題 Small Bowel Healing Detected by Endoscopy in Patients With Crohn's Disease After Treatment With Antibodies Against Tumor Necrosis Factor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1545 ~ 1552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cgh.2019.08.024	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 Akiyama Shintaro, Matsuoka Katsuyoshi, Shimizu Mikiko, Nanki Kosaku, Mizuno Shinta, Kiyohara Hiroki, Arai Mari, Sugimoto Shinya, Iwao Yasushi, Ogata Haruhiko, Hisamatsu Tadakazu, Naganuma Makoto, Takenaka Kento, Nagahori Masakazu, Ohtsuka Kazuo, Watanabe Mamoru, Kanai Takatori	4. 巻 34
2. 論文標題 Long term effect of NUDT15 R139C on hematologic indices in inflammatory bowel disease patients treated with thiopurine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1751 ~ 1757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14693	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 Motobayashi Maiko, Matsuoka Katsuyoshi, Takenaka Kento, Fujii Toshimitsu, Nagahori Masakazu, Ohtsuka Kazuo, Iwamoto Fumihiko, Tsuchiya Kiichiro, Negi Mariko, Eishi Yoshinobu, Watanabe Mamoru	4. 巻 34
2. 論文標題 Predictors of mucosal healing during induction therapy in patients with acute moderate to severe ulcerative colitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1004 ~ 1010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14565	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 Kitazume Yoshio, Fujioka Tomoyuki, Takenaka Kento, Oyama Jun, Ohtsuka Kazuo, Fujii Toshimitsu, Tateisi Ukihide	4. 巻 212
2. 論文標題 Crohn Disease: A 5-Point MR Enterocolonography Classification Using Enteroscopic Findings	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Roentgenology	6. 最初と最後の頁 67 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2214/AJR.17.18897	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 Kawamoto Ami, Nagata Sayaka, Anzai Sho, Takahashi Junichi, Kawai Mao, Hama Minami, Nogawa Daichi, Yamamoto Kouhei, Kuno Reiko, Suzuki Kohei, Shimizu Hiromichi, Hiraguri Yui, Yui Shiro, Oshima Shigeru, Tsuchiya Kiichiro, Nakamura Tetsuya, Ohtsuka Kazuo, Kitagawa Masanobu, Okamoto Ryuichi, Watanabe Mamoru	4. 巻 13
2. 論文標題 Ubiquitin D is Upregulated by Synergy of Notch Signalling and TNF- in the Inflamed Intestinal Epithelia of IBD Patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Crohn's and Colitis	6. 最初と最後の頁 495 ~ 509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ecco-jcc/jjy180	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 Iwamoto Fumihiko, Matsuoka Katsuyoshi, Motobayashi Maiko, Takenaka Kento, Kuno Toru, Tanaka Keisuke, Tsukui Yuya, Kobayashi Shoji, Yoshida Takashi, Fujii Toshimitsu, Saito Eiko, Yamaguchi Tatsuya, Nagahori Masakazu, Sato Tadashi, Ohtsuka Kazuo, Enomoto Nobuyuki, Watanabe Mamoru	4. 巻 33
2. 論文標題 Prediction of disease activity of Crohn's disease through fecal calprotectin evaluated by balloon assisted endoscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1984 ~ 1989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14310	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 Suzuki Kohei, Murano Tatsuro, Ito Go, Nakata Toru, Fujii Satoru, Ishibashi Fumiaki, Kawamoto Ami, Anzai Sho, Kuno Reiko, Kuwabara Konomi, Takahashi Junichi, Hama Minami, Nagata Sayaka, Hiraguri Yui, Takenaka Kento, Yui Shiro, Tsuchiya Kiichiro, Nakamura Tetsuya, Ohtsuka Kazuo, Watanabe Mamoru, Okamoto Ryuichi	4. 巻 53
2. 論文標題 Single cell analysis of Crohn's disease patient-derived small intestinal organoids reveals disease activity-dependent modification of stem cell properties	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1035 ~ 1047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-018-1437-3	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 -

1. 著者名 Takenaka Kento, Ohtsuka Kazuo, Fujii Toshimitsu, Oshima Shiori, Okamoto Ryuichi, Watanabe Mamoru	4. 巻 160
2. 論文標題 Deep Neural Network Accurately Predicts Prognosis of Ulcerative Colitis Using Endoscopic Images	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 2175 ~ 2177.e3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2021.01.210	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 Takenaka Kento, Kitazume Yoshio, Fujii Toshimitsu, Tsuchiya Kiichiro, Watanabe Mamoru, Ohtsuka Kazuo	4. 巻 55
2. 論文標題 Objective evaluation for treat to target in Crohn's disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 579 ~ 587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-020-01678-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takenaka Kento, Ohtsuka Kazuo, Fujii Toshimitsu, Negi Mariko, Suzuki Kohei, Shimizu Hiromichi, Oshima Shiori, Akiyama Shintaro, Motobayashi Maiko, Nagahori Masakazu, Saito Eiko, Matsuoka Katsuyoshi, Watanabe Mamoru	4. 巻 158
2. 論文標題 Development and Validation of a Deep Neural Network for Accurate Evaluation of Endoscopic Images From Patients With Ulcerative Colitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 2150 ~ 2157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2020.02.012	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Toshimitsu Fujii, Shuji Hibiya, Chiaki Maeyashiki, Eiko Saito, Kento Takenaka, Maiko Motobayashi, Hiromichi Shimizu, Masakazu Nagahori, Kazuo Ohtsuka, Masayuki Kurosaki, Tsunehito Yauchi, Mamoru Watanabe.
2. 発表標題 Intolerance to 5-aminosalicylate is a risk of poor prognosis in Ulcerative colitis patients.
3. 学会等名 ECCO2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹中健人
2. 発表標題 実践！炎症性腸疾患・画像と病理の対比.
3. 学会等名 第19回大腸画像アカデミー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹中健人、大塚和朗、渡辺 守.
2. 発表標題 クローン病小腸病変 に対するアプローチ
3. 学会等名 JDDW2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kento Takenaka, Kazuo Ohtsuka, Toshimitsu Fujii, Kohei Suzuki, Hiromichi Shimizu, Maiko Motobayashi, Shuji Hibiya, Eiko Saito, Masakazu Nagahori, Mamoru Watanabe.
2. 発表標題 Small bowel endoscopic healing of Crohn 's disease treated with anti-TNF antibodies.
3. 学会等名 AOCC2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹中健人、大塚和朗、渡辺 守.
2. 発表標題 当院でのバルーン内視鏡によるクローン病小腸病変評価方法
3. 学会等名 日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹中健人、大塚和朗、渡辺 守
2. 発表標題 クローン病における小腸内視鏡的重症度の検討
3. 学会等名 JDDW2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ohtsuka K, Takenaka K, Suzuki K, Fujii T, Nagahori M, Matsuoka K, Saito E, Katsukura N, Fukuda M, Araki A, Watanabe M
2. 発表標題 Usefulness of single-balloon enteroscopy: from a single center 990 experiences.
3. 学会等名 DDW2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takenaka K, Ohtsuka K, Fujii T, Nagahori M, Saito E, Motobayashi M, Suzuki K, Watanabe M
2. 発表標題 Small bowel mucosal healing of Crohn's disease treated with anti-TNF antibodies.
3. 学会等名 FALK symposium (国際学会)
4. 発表年 2018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	大塚 和朗 (Ohtsuka Kazuo) (00338443)	東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授 (12602)	
研究分担者	土屋 輝一郎 (Tsuchiya Kiichiro) (40376786)	東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授 (12602)	

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