

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07995

研究課題名(和文)オルガノイドを用いた小腸潰瘍性疾患の包括的検討

研究課題名(英文)Analysis of small intestinal ulcer disease using organoid

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：小腸潰瘍性疾患の病態解明と新規治療法の開発目的で、小腸オルガノイドを用いた検討を行った。小腸潰瘍症はオルガノイドの作成が困難であり分化障害の存在が示唆された。マウス小腸と樹状細胞の共培養系によりMuc2の発現低下を伴う小腸上皮の分化異常が誘導された。この変化はアセチルコリン受容体作動薬によって軽減され、上皮また樹状細胞のアセチルコリン受容体をノックアウトにより効果はキャンセルされた。またIL10ノックアウトマウスの腸炎マウスモデルを用いて上皮の分化障害における樹状細胞のアセチルコリン受容体の重要性が示された。これらの結果より小腸潰瘍上皮細胞の分化障害とアセチルコリン受容体の重要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小腸疾患は診断技術の発達により以前ほど希少疾患ではなくなっているものの、他部位の疾患にくらべて培養細胞モデルなどの基礎研究リソースが限られていた。オルガノイド培養技術の開発は非腫瘍性疾患や正常上皮の研究に革新的な発展をもたらしている。本研究では小腸潰瘍性疾患の上皮の分化障害と特殊性を明らかにし、マウス小腸オルガノイドを用いた治療戦略を開発することができ、今後の小腸潰瘍性疾患研究の基盤となる知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the molecular pathogenesis of small intestinal ulcers, we used organoid culture model of human and murine small intestine. Human small intestinal disease specimens obtained using double-balloon endoscopy were cultured in Matrigel with organoid culture media. In contrast to other small intestinal disease epithelium such as cancer, epithelium from small intestinal ulcers did not grow in organoid culture, suggesting the impairment of epithelial differentiation. Using mouse small intestinal organoid and dendritic cell co-culture model, we found organoid differentiation is perturbed by dendritic cells, and acetylcholine analogue sufficiently ameliorated this phenotype. Knockout mouse of $\alpha 7nAChR$ showed the critical role of acetylcholine in the control of intestinal epithelial differentiation in murine colitis model.

研究分野：消化器病

キーワード：小腸 潰瘍 上皮細胞 分化障害

1. 研究開始当初の背景

小腸は十二指腸、空腸、回腸の三部位から構成され全消化管の約75%の長さと同90%の粘膜表面積を占めているが、内視鏡の到達が不可能であったため病気の診断が困難であった。近年小腸へのアプローチが可能になってきたことから、新たな疾患概念の提唱やその原因の同定まで報告されている。

小腸潰瘍性疾患は、自己免疫、NSAIDなどの薬剤によるもの、CMVウイルス、EBウイルスなどの感染に伴うもの、悪性リンパ腫などの腫瘍によるもの、上記のCEASなど原因が多岐にわたる。小腸癌、悪性リンパ腫には手術および化学療法が、自己免疫性疾患にはステロイドや免疫抑制薬が、CMV感染症には抗ウイルス薬が用いられるが、特異的な治療法がない疾患も多く大部分が難治である。しかもこれらの疾患においても時には診断が困難、また合併する症例も少なからずみられ、治療法の選択に難渋する場合もある。現在までの小腸潰瘍症の原因や分類は、感染、薬剤など外的要因、もしくは、免疫異常などに基づくものが大部分である。現在までに小腸上皮細胞における機能的、特徴的な異常は明らかになっていない。またその正常分化を阻害する機序も十分に解明されていない。

2. 研究の目的

現在までの分類にとらわれず、包括的に小腸潰瘍症の分子・機能異常の同定、原因検索、再分類を試み、分子異常や機能障害を標的とした上皮細胞自体の機能回復をめざした治療法を開発する。とくに分化上皮培養モデルであるオルガノイドを用いて腸管の炎症や潰瘍の原因、細胞間相互反応、上皮分化異常の機序について検討し、新規治療法を開発する。

3. 研究の方法

1. ヒト小腸疾患オルガノイドの樹立

小腸内視鏡検査において発見される潰瘍性疾患の小腸粘膜を採取し、佐藤らの方法を応用したオルガノイド培養法によって培養した(Sato T Nature 2009)。オルガノイドの培養条件は、各種増殖因子を除去することで検討した。また細胞増殖はcell counting kitを用いた培養上清の比色法にて検討した。

2. マウス小腸オルガノイドの解析

野生型マウス小腸よりオルガノイドを作成した。骨髓細胞からGM-CSFによる刺激で樹状細胞を分化誘導し、オルガノイドと共培養を行った。オルガノイドの変形を鏡検で確認し、RNAを抽出、Q-PCRを行った。アセチルコリン受容体刺激の効果はnicotineを培養上清に加えて検討した。アセチルコリン受容体の役割を解明するために $\alpha 7nACh$ 受容体のノックアウトマウス($\alpha 7nACh f/f$)を用い、CD11c-creマウスと交配したマウスより $\alpha 7nACh$ 受容体ノックアウト樹状細胞、villin-creマウスと交配したマウスより $\alpha 7nACh$ 受容体ノックアウトオルガノイドを作成し、nicotine刺激の効果を検討した。

3. 腸炎モデルの解析

CD11c-cre; $\alpha 7nACh f/f$ マウス、およびvillin-cre; $\alpha 7nACh f/f$ マウスをIL10^{-/-}マウスと交配して、病理像、大腸組織のmRNA発現、免疫染色による炎症細胞浸潤などを検討した。

4. 研究成果

1. ヒト小腸オルガノイドの樹立と解析

バルーン内視鏡で診断した小腸潰瘍性疾患からのオルガノイドの作成を行った。ダブルバルーン内視鏡を施行した小腸潰瘍性疾患症例は12例(クローン病6例、薬剤性小腸潰瘍疑い3例、小腸癌1例、原因不明小腸潰瘍性疾患2例)であった。潰瘍発生メカニズムの検討のためにクローン病2例、薬剤性小腸潰瘍1例、小腸癌1例よりオルガノイドを作成した。原因不明小腸潰瘍性疾患の2例は、マトリゲル内での培養が困難であり、オルガノイド培養に成功しなかった。これらのオルガノイドの増殖能についてWnt, R-spondin, EGFを含む培養条件においてマトリゲル内でのオルガノイドのサイズとCell counting kitによる呈色反応によって細胞増殖能を検討した。小腸癌由来のオルガノイドは他疾患のオルガノイドより有意に細胞増殖能の亢進が見られた。また小腸癌由来のオルガノイドのみEGF非依存性の培養が可能でありEGF-Kras-MAPKシグナルの活性化が示唆された(図1)。また小腸潰瘍性疾患では幹細胞からの分化機序に異常がある可能性が示唆された。またこれらの症例のデータを用いて、出血、再出血のリスクの判定法について他施設での検討を行い、有用な初期治療法を探索した(業績1, 2)。とくに小腸潰瘍性疾患では6割以上で多発例であり、アスピリン服用者と多発例で再出血が多いことが明らかになった。一方単発例の場合は原因がダブルバルーン内視鏡で明らかになることが多いことも明らかになった。

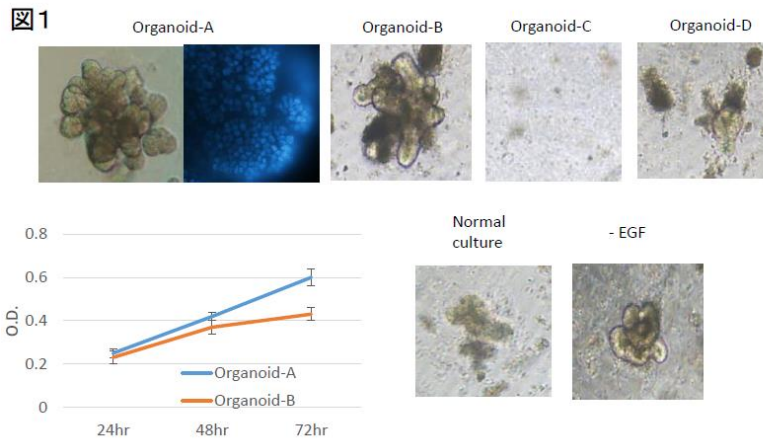


図1：小腸疾患オルガノイドの作成と解析
 上段：培養オルガノイド形態(20x) A 小腸癌、B クローン病、C 小腸潰瘍、D 小腸潰瘍
 下段：オルガノイドの増殖速度 右 Organoid-A の培養条件検討

2. 小腸オルガノイド分化障害メカニズムの解析

小腸潰瘍性疾患の発生メカニズムの解析目的で、マウス正常小腸細胞からオルガノイドを作成し、骨髄細胞から分化培養した樹状細胞と共培養を行った。共培養によってオルガノイドの陰窩様の構造の形成が障害され、嚢胞状に変化する形態異常が誘導された。また免疫染色を行い共培養オルガノイドにおいて UEA1 染色反応の低下、また Q-PCR で Muc2 遺伝子の発現低下が見られ杯細胞が減少すること、すなわち正常分化の障害が示唆された (図2 上段)。

次にこの小腸オルガノイド分化障害モデルを用いて、潰瘍性大腸炎への治療効果が報告されているアセチルコリン受容体作動薬 nicotine の効果を検討した。樹状細胞と小腸オルガノイドの共培養上清に nicotine を添加すると嚢胞状変化が減少し、また Muc2 遺伝子発現も増加した。すなわち上皮の分化障害が抑制される可能性が示唆された (図2 中段)。

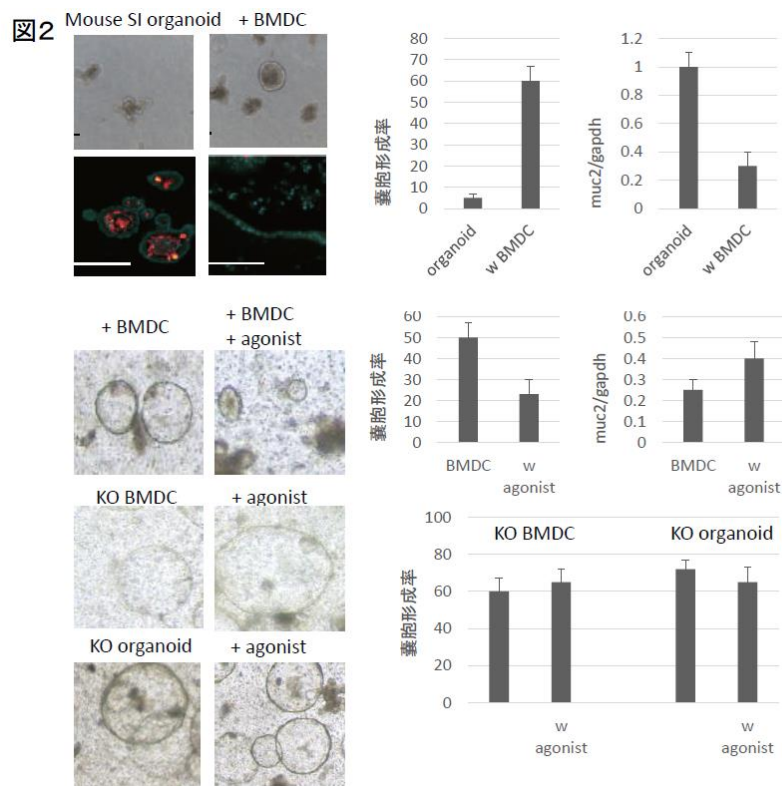


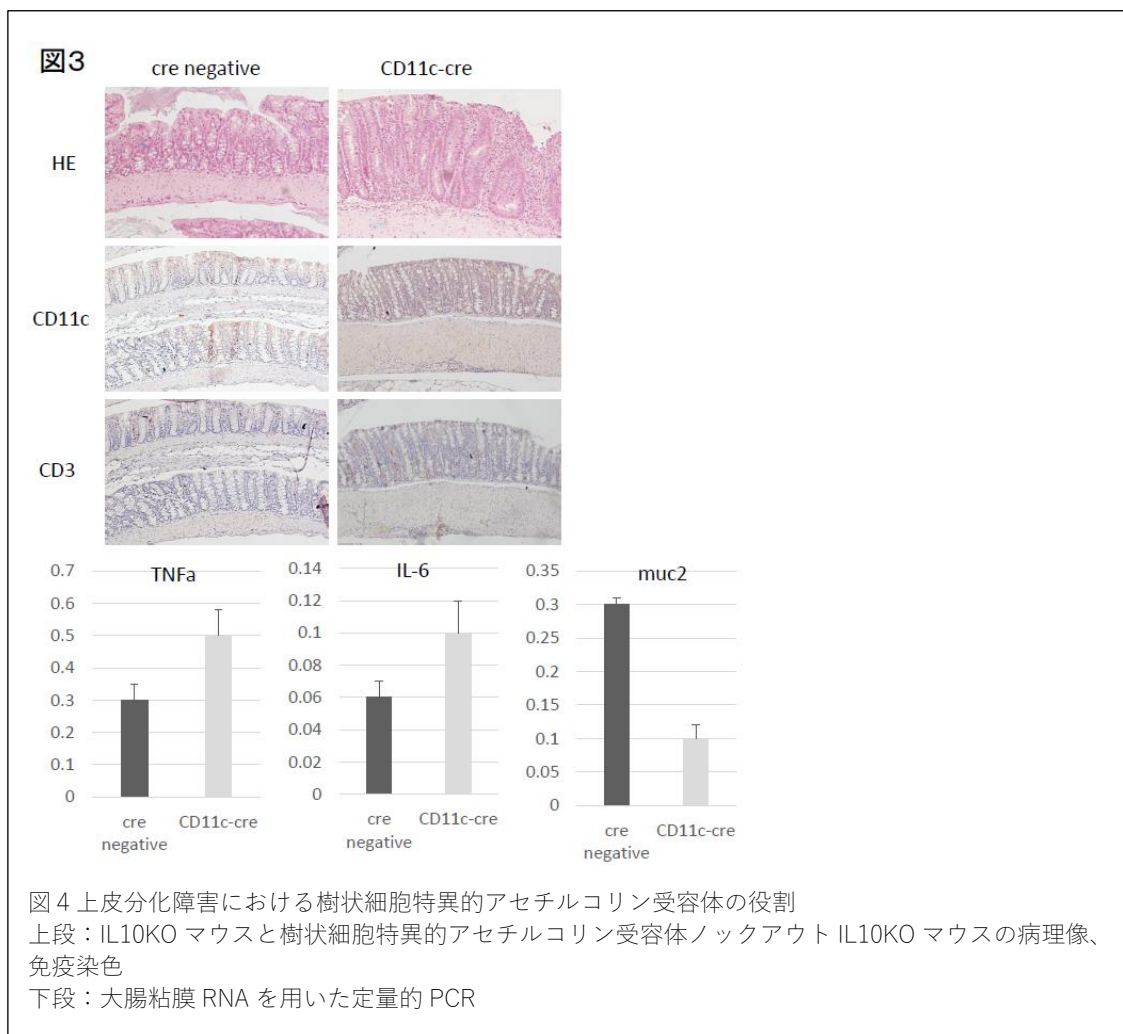
図2 マウス小腸オルガノイド分化障害モデルの解析
 上段：樹状細胞共培養の影響、UEA1 染色、嚢胞形成率、muc2mRNA 発現
 中段：樹状細胞共培養モデルに対するアセチルコリン受容体刺激薬の効果
 下段：オルガノイド、樹状細胞のアセチルコリン受容体の役割

この小腸分化におけるアセチルコリン受容体の役割を解明するために $\alpha 7$ nACh 受容体のノックアウトマウス ($\alpha 7$ nACh f/f) を用いた。まず、腸上皮特異的に $\alpha 7$ nACh 受容体をノックアウトす

るために villin-cre マウスと $\alpha 7nACh$ f/f の交配したオルガノイドを作成したが、とくに分化への異常はみられなかった。次に野生型マウスの樹状細胞と共培養したところ野生型小腸オルガノイド同様に嚢胞状変形を認めた。しかし nicotine 添加による嚢胞状変化の抑制はほぼみられなかった。次に樹状細胞の $\alpha 7nACh$ 受容体のノックアウト (CD11c-cre; $\alpha 7nACh$ f/f) と野生型のオルガノイドの共培養を行った。野生型の樹状細胞との共培養と同様に嚢胞状変形がみられ、nicotine 添加による抑制は見られなかった (図 2 下段)。また Muc2 遺伝子発現は nicotine 添加によって回復傾向がみられた。これらの結果より樹状細胞による小腸オルガノイドの分化障害は、上皮および樹状細胞のアセチルコリン受容体の活性化によって軽減できることが明らかになった。

3. 生体における上皮分化障害とアセチルコリン受容体の働きの解析

オルガノイド共培養モデルにおけるアセチルコリン受容体刺激の効果を生体で確認するため、IL10 ノックアウトマウスと $\alpha 7nAChR$ f/f を用いた。樹状細胞特異的 $\alpha 7nAChR$ f/f; IL10 ノックアウト (CD11c-cre; $\alpha 7nACh$ f/f; IL10^{-/-}) は CD11c-cre negative のコントロールと比べて優位に腸管の炎症が悪化していた。免疫染色でも CD11c 陽性樹状細胞、CD3 陽性リンパ球などの増加がみられた。また Muc2 遺伝子の発現低下、TNF, IL-6 などの炎症性サイトカインの発現増加もみられた。すなわち生体においても樹状細胞のアセチルコリン刺激が上皮の分化を促進する可能性が示唆された (図 3)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Aoki T, Hirata Y, Yamada A, Koike K.	4. 巻 25
2. 論文標題 Initial management for acute lower gastrointestinal bleeding.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 69
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3748/wjg.v25.i1.69.	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 青木 智則, 山田 篤生, 小池 和彦	4. 巻 36
2. 論文標題 貧血の日常診療に必要な具体的知識とその活用 小腸出血性疾患	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Practice	6. 最初と最後の頁 1223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 山田 篤生	4. 巻 89
2. 論文標題 カプセル内視鏡読影におけるAIの開発と有用性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医療機器学	6. 最初と最後の頁 538
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Aoki T, Hirata Y, Yamada A, Koike K.	4. 巻 25
2. 論文標題 Initial management for acute lower gastrointestinal bleeding.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 69-84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3748/wjg.v25.i1.69.	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 Aoki T, Yamada A, Hirata Y, Suzuki H, Nakada A, Niikura R, Seto M, Okamoto M, Koike K.	4. 巻 33
2. 論文標題 Etiology and Long-term Rebleeding of Endoscopic Ulcerative Lesions in the Small Bowel in Patients with Obscure Gastrointestinal Bleeding: A Multicenter Cohort Study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 1327-1334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14068.	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5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 壺井 章克, 岡 志郎, 田中 信治, 齋藤 宏章, 松田 知己, 青木 智則, 山田 篤生, 多田 智裕
2. 発表標題 小腸angioectasiaの取扱い 当科の治療成績から
3. 学会等名 日本小腸学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高峰 航, 澤辺 一生, 新倉 量太, 山田 篤生, 小池 和彦
2. 発表標題 カプセル内視鏡診断補助システムの開発
3. 学会等名 日本小腸学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 篤生
2. 発表標題 小腸カプセル内視鏡読影におけるAI活用
3. 学会等名 日本小腸学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木智則、山田篤生、小池和彦
2. 発表標題 原因不明消化管出血の治療戦略と予後
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青木智則、山田篤生 小池和彦
2. 発表標題 原因不明の消化管出血で発症した小腸潰瘍症に対するバルーン内視鏡による病院検索の意義
3. 学会等名 第106回日本消化器内視鏡学会関東支部例会
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	平田 喜裕 (Hirata Yoshihiro) (10529192)	東京大学・医科学研究所・准教授 (12601)	培養細胞の解析
研究分担者	新倉 量太 (Niikura Ryota) (90625609)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	臨床検体の採取

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