

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08453

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いた炎症性腸疾患における疾患モデリングの確立と病態解明

研究課題名(英文) Establishment of disease models and elucidation of the pathogenesis of inflammatory bowel disease using human iPS cells

研究代表者

柿本 一城 (kakimoto, kazuki)

大阪医科薬科大学・医学部・講師

研究者番号：20589816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：誘導性多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells: iPS細胞)は、再生医療のみならず、疾患の病態解明や創薬研究の基盤技術として期待されている。本研究では、未だ根本的治療法のない炎症性腸疾患における新たな研究基盤となるべく、ヒトiPS細胞を用いて炎症性腸疾患の疾患モデルの作製を試みた。健康人由来のiPS細胞から小腸の腸管上皮細胞へ分化誘導し、in vitroにて腸管炎症モデルを作製した。また炎症性腸疾患感受性遺伝子であるATG16L1を抑制し、オートファジーが腸管炎症に関わる病態メカニズムの一部を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患の研究手法としては一般的に、マウス等による動物実験や、ヒトの腸管組織検体を用いた研究などが行われているが、動物実験では種間の差異が存在し、ヒト組織においては検体採取に限界がある。ヒトiPS細胞から腸管組織へと分化させ、炎症性腸疾患の疾患モデルとして研究に用いることが可能となれば、種間の差異や検体採取の限界といった従来の課題が解決され、今後、創薬研究や病態メカニズムの解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Induced pluripotent stem cells (iPS cells) are expected to be a fundamental technology not only for regenerative medicine but also for elucidating the pathophysiology of diseases and drug discovery research. In this study, we attempted to generate a disease model of inflammatory bowel disease using human iPS cells to provide a new research platform for inflammatory bowel disease, for which there is still no fundamental cure. We induced differentiation of intestinal epithelial cells from healthy human iPS cells into intestinal epithelial cells in the small intestine and generated an intestinal inflammatory model in vitro. We also suppressed ATG16L1, a susceptibility gene for inflammatory bowel disease, and elucidated part of the pathological mechanism by which autophagy is involved in intestinal inflammation.

研究分野：inflammatory bowel disease

キーワード：炎症性腸疾患 iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎と Crohn 病に代表される炎症性腸疾患は、消化管に慢性炎症を来たす原因不明の難病であり、本邦での患者数は増加の一途をたどっている。ステロイドや免疫抑制剤が治療の中心であるが、根本的な治療法はない。ゲノムワイド関連解析にて多数の疾患感受性遺伝子が同定されたが、さらなる病態の解明と新規治療法の開発が望まれている。

誘導性多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells: iPS 細胞)は、体を形成する全ての細胞に分化する能力と、ほぼ無限に増殖する能力を併せもつ細胞である(Cell. 131,2007)。再生医療のみならず、疾患の病態解明や創薬研究の基盤技術として期待されている。2011 年に Jason R.らが三次元培養法を用いてヒト iPS 細胞からクリプト構造を形成する腸管組織(腸管上皮幹細胞、パネット細胞、ゴブレット細胞)を作製する技術を報告したが(Nature. 470:105-9,2011)、一旦マウス体内にオルガノイドを移植する必要があった(Nat Med. 20,1310-4,2014)。その後、分化誘導の改良手法が報告され、in vitro のみでヒト iPS 細胞を用いて腸管組織を作製することができるようになってきたが、成熟した腸管組織を十分量得ることのできる確立した分化誘導法はなく、炎症性腸疾患の病態メカニズム解明や創薬研究における基盤技術として、iPS 細胞を用いた炎症性腸疾患の疾患モデリングが望まれていた。

2. 研究の目的

炎症性腸疾患の研究手法としては一般的に、マウス等による動物実験や、ヒトの腸管組織検体を用いた研究などが行われているが、動物実験では種間の差異が存在し、ヒト組織においては検体採取に限界があるといった問題がある。一方、ヒト iPS 細胞を用いて腸管組織へと分化させ、腸管炎症モデルを作製することが可能となれば、種間の差異や検体採取の限界といった課題が解決され、炎症性腸疾患における病態解明および創薬研究の研究基盤となることが期待される。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞を用いて腸管組織へと分化させた上で、炎症性腸疾患の疾患モデルを作製することを目的とした。

3. 研究の方法

(iPS 細胞の作製、iPS-IECs への分化) 健常者の血液を採取し、peripheral blood mononuclear cells (PBMC)を分離し、既報に準じて iPS 細胞を作製する。このヒト iPS 細胞からサイトカインとシグナル伝達経路阻害薬を用いて胚体内胚葉への分化を誘導し、三次元培養法にて腸管上皮細胞(human iPS derived intestinal epithelial cells: hiPS-IECs)へ分化させる。その際、胚体内胚葉へ正常に分化していることを確認するため、intestinal transcription factor である CDX2 の免疫染色を行う。また分化させた hiPS-IECs において、PCR 法にて小腸細胞マーカー(APOA4, APOC2, FGF19, GATA4)および大腸細胞マーカー(CA1, CA2, SATB2, SLC9A2)の遺伝子発現を解析する。次に、小腸の腸管上皮細胞マーカー(Villin1, MUC2, DEFA6, Lysozyme, EPCAM)の発現を PCR 法および免疫染色にて確認する。さらに hiPS-IECs における細胞接着分子(E-cadherin, -catenin, claudin-2,4)の発現を PCR 法および免疫染色にて解析する。

(hiPS-IECs における炎症応答) hiPS-IECs に発現している炎症関連のサイトカイン受容体(IL1R1, IL6R, TNFRSF1A, TNFRSF1B)および Toll-like receptor (TLR)4,5 の遺伝子発現を測定する。その上で、hiPS-IECs 三次元培養マトリゲルに IL-1, IL-6, TNF, LPS, flagellin、およびこれらの mixture を 24 時間添加して刺激し、炎症性サイトカイン、stem cell マーカー、細胞増殖マーカー、細胞分化マーカー、細胞接着分子の遺伝子発現を PCR 法にて測定する。

(炎症性腸疾患感受性遺伝子の検討) CRISPRi を用い hiPS-IECs において炎症性腸疾患感受性遺伝子であるオートファジー関連遺伝子 ATG16L1 を抑制する。この hiPS-IEC-ATG16L1KD cells に対して炎症刺激を行い、オートファジー抑制による炎症増悪のメカニズムを解析する。

4. 研究成果

まずヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞へ分化誘導し、創薬研究などに用いる十分な腸管上皮細胞(hiPS-IECs)を作製できるか検討した。健常人の血液を採取して PBMC を分離し、PBMC からヒト iPS 細胞を作製した。このヒト iPS 細胞からサイトカインとシグナル伝達経路阻害薬を用いて胚体内胚葉への分化を誘導し、三次元培養法にて hiPS-IECs へ分化させた。その際、胚体内胚葉にて intestinal transcription factor である CDX2 の免疫染色を行い、正常に分化していることを確認した。また、既報の分化誘導法におけるシグナル伝達経路阻害薬を一部改変し、分化誘導の効率化を図った。分化させた hiPS-IECs は PCR 法にて大腸細胞マーカー(CA1, CA2, SATB2, SLC9A2) 遺伝子がほとんど発現しておらず、小腸細胞マーカー(APOA4, APOC2, FGF19, GATA4) 遺伝子の発現を認めた。また PCR 法および免疫染色にて EPCAM、villin1 が発現しており、小腸の腸管上皮細胞であることが示唆された。また免疫組織染色にて hiPS-IECs の細胞表面には E-cadherin、-catenin、claudin4 といった細胞接着分子が発現し

ていた。さらに hiPS-IECs には Toll-like receptor4、5 および炎症性サイトカインレセプター遺伝子(IL1R1、IL6R、TNFRSF1A、TNFRSF1B)が発現しており、同受容体の刺激にて PCR 法で炎症性サイトカイン遺伝子発現の上昇を認めた。次にヒト iPS 細胞を用いた炎症性腸疾患の疾患モデリングとして、CRISPRi を用い hiPS-IECs にて炎症性腸疾患感受性遺伝子であるオートファジー関連遺伝子 ATG16L1 を抑制した。ATP および LPS 刺激にて IL-1、IL-8 の発現が著明に上昇しており、オートファジー抑制によるインフラマソーム経路の活性化が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kazuki Kakimoto, Yoshihiro Tatsumi, Yuka Kawasaki, Yasuyoshi Tanaka, Hideki Tawa, Ryouji Koshiba, Yutaka Naka, Yuki Hirata, Takako Miyazaki, Toshihisa Takeuchi, Shiro Nakamura, Kazuhide Higuchi
2. 発表標題 Examination of autophagy using human induced pluripotent stem cells derived epithelium-like cells
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2021 (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柿本 一城、辻本 裕之、樋口 和秀
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来の腸管上皮様細胞を用いた炎症性腸疾患関連遺伝子ATG16L1の検討
3. 学会等名 第28回日本消化器関連学会週間（第62回 日本消化器病学会大会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柿本一城、木下直彦、田中泰吉、峠英樹、小柴良司、中悠、平田有基、宮寄孝子、中村志郎、樋口和秀
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来の腸管上皮様細胞を用いた炎症性腸疾患関連遺伝子ATG16L1の検討
3. 学会等名 第17回 日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuki Kakimoto, Kiichiro Tomoda, Hiroyuki Tsujimoto, Yuki Hirata, Ken Kawakami, Toshihisa Takeuchi, Michio Asahi and Kazuhide Higuchi
2. 発表標題 Intestinal organoids derived from human induced pluripotent stem cells for modeling inflammatory bowel disease
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柿本 一城, 辻本 裕之, 樋口 和秀
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた腸管上皮細胞への分化誘導の試み
3. 学会等名 第27回日本消化器関連学会週間 統合プログラム6 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柿本一城, 友田紀一郎, 辻本裕之, 光林永子, 田中泰吉, 峠英樹, 平田有基, 川上研, 竹内利寿, 朝日通雄, 樋口和秀
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた炎症性腸疾患モデル作製の試み
3. 学会等名 第56回 日本消化器免疫学会
4. 発表年 2019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	友田 紀一郎 (kiichiro tomoda) (50362843)	大阪医科薬科大学・医学部・非常勤講師 (34401)	

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