

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18106

研究課題名(和文)炎症性腸疾患の新たなin vitro病態モデルの確立

研究課題名(英文)Development of a novel pathological model of inflammatory bowel disease in a dish

研究代表者

鶴田 覚(Tsuruta, Satoru)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・再生医療センター・リサーチアソシエイト

研究者番号：50814365

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)：ミニ腸の機能性獲得に関する成果で、組織マクロファージを内在化したミニ腸作製に成功した。ミニ腸に正着した組織マクロファージは、CD14(-)、IBA1(+)、CX3CR1(+)の生体小腸組織マクロファージと同様の特性を有していた。大腸菌パーティクルの貪食能試験では、病原体の貪食能を有することも確認できた。炎症性の各種サイトカイン、ケモカインを分泌することからも自然免疫応答を有する腸管オルガノイドの開発に世界で初めて成功した。本成果は、米国消化器病学会の学会誌へ受理された。試験管内で腸管の免疫応答を評価出来る画期的なバイオモデルであり、炎症性腸疾患の研究や創薬の発展に大きく貢献し得る成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管発生・維持・成長の過程での腸管上皮系または間葉系の細胞と腸管免疫組織との機能的連携を再現し、腸管炎症における細胞内シグナルやサイトカインシグナルを評価できるこれまでにない極めてイノベティブな難治性腸疾患研究のバイオモデルを構築することができた。世界初の免疫組織を有する高機能腸管オルガノイドでIBDにおける腸管炎症を再現するモデルを作り出し、未だ明らかになっていない疾患原因の究明とその新たな治療開発へ展開していく。また、これが実現すればIBDのみならず腸内細菌、腸管感染症や様々な難治性腸疾患の研究へも大きく貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：We finally succeeded in creating a mini-gut with internalized tissue macrophages. Tissue macrophages positively attached to the mini-gut had the same characteristics as CD14(-), IBA1(+), and CX3CR1(+) biological small intestinal tissue macrophages. Phagocytosis test of E. coli particles also confirmed that they have the ability to phagocytose pathogens. We succeeded in developing intestinal organoids with innate immune response also from the secretion of various inflammatory cytokines and chemokines. These results were accepted for publication in the Journal of the American Gastroenterological Association. This is an epoch-making bio-model that enables in vitro evaluation of the intestinal immune response, and is an achievement that will greatly contribute to the development of research on inflammatory bowel disease and drug discovery.

研究分野：消化器

キーワード：マクロファージ 自然免疫 オルガノイド ミニ腸 iPS細胞 小腸

1. 研究開始当初の背景

クローン病と潰瘍性大腸炎からなる炎症性腸疾患 (inflammatory bowel diseases: IBD) の患者数は近年急激に増加しており、潰瘍性大腸炎にいたっては患者数が 16 万人を越え指定難病の中でも患者数が最も多い。さらに、小児期に発症する IBD は全体の 20-25% であるとされ、罹患部位が広範で重症化しやすく、成人の治療が奏効しない場合も多く、病勢やステロイド使用に伴う成長障害も留意され、身体・精神的な未熟性からもトータルケアが必要となり大きな問題となる。特に近年、6 歳未満に発症する極めて重篤な小児期早期発症炎症性腸疾患 (Very early onset (VEO) -IBD) が注目されている。国立成育研究医療センターにおいては、全国から難治性腸疾患の患児を受け入れているが、小児期に発症する IBD 患者では成長期発症の患者に比べて難治性の経過をとり、経腸栄養摂取が困難であり成長障害を含めた著しい生活の質 (QOL) の低下をきたすことが少なくない。IBD の病因として遺伝的要因や環境因子、免疫学的要因が挙げられ、更に炎症細胞や炎症性サイトカインなどの制御因子、上皮バリア機構の破綻などの関与も言われている。これらの多彩な病態を解明し、診断や新たな治療薬の開発を可能にする基礎研究の大きな進展が望まれている。腸炎の実験モデルとして古くから Dextran Sulfate Sodium (DSS) を経口投与したマウスなどが用いられてきたが、動物種の違いのみならずその発生機序の再現性に限界がある。

2. 研究の目的

所属する研究室では、ヒト iPS/ES 細胞から試験管内で蠕動運動、吸収や分泌能などのヒト腸管機能を有する腸管疑似臓器 (オルガノイド) “ミニ腸” の創出に世界で初めて成功した (Uchida H, et al. JCI Insight, 2017)。このミニ腸は、Lgr5 陽性腸管上皮幹細胞、吸収上皮細胞、ゴブレット細胞、Paneth 細胞、腸管内分泌細胞、M 細胞などのなどの生体腸管の粘膜上皮系細胞を備えるだけでなく、粘膜下領域にカハール介在細胞や腸管神経叢、平滑筋細胞の存在も確認され、ヒト腸管組織構造に類似した組織構造を示す極めてハイスペックな *in vitro* 腸管モデルである。この独創的なミニ腸作製技術を基盤とし、大きなチャレンジとして免疫系機能を統合した *in vitro* 腸管モデルを構築する。さらに IBD 疾患 iPS 細胞の樹立・応用を併用することで、腸管発生・維持・成長の過程での腸管上皮系または間葉系の細胞と腸管免疫組織との機能的連携を再現し、腸管炎症における細胞内シグナルやサイトカインシグナルを評価できるこれまでにない極めてイノベティブな難治性腸疾患研究のバイオモデルを構築することができる。これまで報告される腸管固有の機能性を有さない腸管オルガノイドとは異なり、ミニ腸から構築する世界初の免疫組織を有する高機能腸管オルガノイドで IBD における腸管炎症を再現するモデルを作り出し、未だ明らかになっていない疾患原因の究明とその新たな治療開発へ展開していく。また、これが実現すれば IBD のみならず腸内細菌、腸管感染症や様々な難治性腸疾患の研究へも大きく貢献するものである。

3. 研究の方法

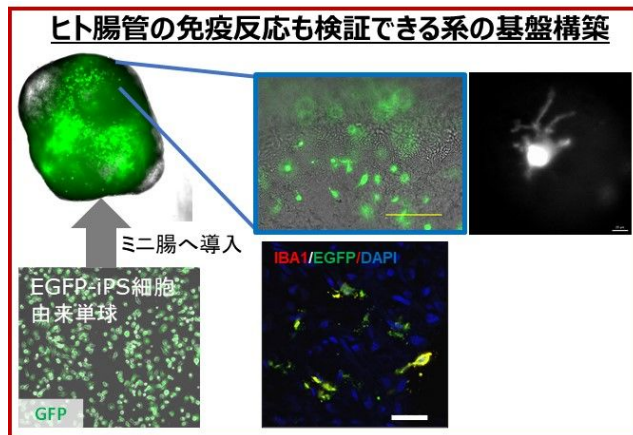
ミニ腸が GP2 陽性の M 細胞を有することを確認している。しかし、これまで腸管オルガノイドに免疫系細胞を導入した報告は一例もない。そのため、抗原認識の司令塔としての役割を担う免疫組織 (マクロファージ、樹状細胞) をミニ腸に誘導するために、生体の発生 (ヒト腸管粘膜固有層におけるマクロファージと樹状細胞は、組織内へ遊走してきた単球から分化する) を模倣するコンセプトに基づいて、おなじヒト細胞から単球系前駆細胞を誘導しミニ腸に融合していく。まず同じゲノム背景を持つ (アイソジェニック) 多能性幹細胞からミニ腸と単球をそれぞれ作製する。単球細胞系には可視化マーカーを導入し、ミニ腸作製過程 (つまり腸管の発生過程) の導入時期を検証しつつミニ腸間質内で単球が腸管マクロファージ/樹状細胞へと成熟化する過程を解析する。

免疫-ミニ腸の細胞間シグナル検出系の確立: 腸内細菌や食餌抗原に恒常的に曝露されている消化管において、抗原提示細胞は外来抗原に対して速やかに免疫反応を誘導するだけでなく、過剰な免疫反応を制御する炎症制御性の性質を有し、抗原提示細胞から産生されるサイトカインが細胞間のシグナルとして重要な役割を占めている。さらに近年の研究で抗原提示細胞が腸管上皮の増殖・維持や透過性もしくは腸管間質の平滑筋による蠕動運動に関与するという腸管上皮・間質細胞と免疫系細胞の相互関係が徐々に明らかになってきている。まず網羅的に免疫・炎症サイトカインの発現解析をマルチプレックスアッセイ法 (ミリポア) により行う。ミニ腸の特性上、特にユニークなのは、すでにミニ腸粘膜上皮細胞の代謝物が培地上清とミニ腸内腔へ分泌されることを確認している。免疫・炎症サイトカイン関連バイオマーカーを一気に数百サンプル培地上清とミニ腸内腔液で解析していく。さらに、炎症性刺激として細菌のリポ多糖 (LPS) を添加しバイオマーカーの反応性を解析していく。次年度にかけて行い、細胞間シグナルと

なる液性因子や上皮透過性や蠕動運動の変化を試験管内での免疫-ミニ腸から検出し、分子レベルでの解析を行う系を確立する。

4. 研究成果

ミニ腸の機能性獲得に関する成果で、組織マクロファージを内在化したミニ腸作製に成功した(図:マクロファージ内在化ミニ腸)。ミニ腸に正着した組織マクロファージは、CD14およびCD11c(-)、IBA1(+)、CX3CR1(+)の生体小腸組織マクロファージと同様の特性を有していた。さらに、大腸菌パーティクルの貪食能試験では、病原体の貪食能を有することも確認できた。炎症性の各種サイトカイン、ケモカインを分泌することからも自然免疫応答を有する腸管オルガノイドの開発に世界で初めて成功した。本成果は、米国消化器病学会の学会誌(Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology:CMGH)へ受理された。試験管内で腸管の免疫応答を評価出来る画期的なバイオモデルであり、炎症性腸疾患の研究や創薬の発展に大きく貢献し得る成果である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Sasaki Kengo, Inoue Makoto, Machida Masakazu, Kawasaki Tomoyuki, Tsuruta Satoru, Uchida Hajime, Sakamoto Seisuke, Kasahara Mureo, Umezawa Akihiro, Akutsu Hidenori	4. 巻 3
2. 論文標題 Human Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids as a Model of Intestinal Xenobiotic Metabolism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 StemJournal	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/STJ-200001	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 Tsuruta S, Uchida H, Akutsu H	4. 巻 3
2. 論文標題 Intestinal Organoids Generated from Human Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JMA Journal	6. 最初と最後の頁 9-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.31662/jmaj.2019-0027	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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