

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08264

研究課題名（和文）腸管オルガノイドを用いた、好酸球による炎症性腸疾患への関与機構の解明

研究課題名（英文）Unraveling the role of eosinophils in inflammatory bowel diseases using human enteroids

研究代表者

加納 原（Gen, Kano）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・特任講師

研究者番号：50725306

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の基金提供期間がコロナ禍と重なり、研究代表者が地域の新型コロナ対策の責任者となったため、研究へのエフォートを捻出できなかった。  
コロナ禍の終息後も、研究代表者の職場異動があり、研究エフォートを確保することができなかった。  
以上から、研究時間を蓄積することができず、予備実験のみで研究機関が終了してしまったため、有意な研究成果は得られていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
上記理由により、有意な成果は得られていない。

研究成果の概要（英文）：The funding period for this study coincided with the COVID-19 pandemic, and the principal investigator, who happened to be in charge of regional control of COVID-19, was unable to allocate the effort for the study.

研究分野：免疫学

キーワード：Sigle-8 好酸球 炎症性腸疾患

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

好酸球はその多くが腸管粘膜中に定住しているが、腸管感染症や炎症性腸疾患では、これまで考えられていたような炎症惹起のみならず、粘膜治癒・組織保護にも働くことが分かってきた。その詳細な機序は未解明だが、これまでの申請者らの研究結果から、好酸球がシアル酸受容体 Siglec-8 を介して粘膜障害を認識し、組織中の活性酸素濃度を適正化する作用が想定される。

炎症性腸疾患では重症度に相関して好酸球が血中・組織中に増多しており、上記の好酸球による粘膜修復が何らかの要因で正常に機能していないことが考えられるが、この点に着目した研究はこれまでほとんどなされていない。

## 2. 研究の目的

現在の炎症性腸疾患における分子標的治療は、おもに腸管粘膜で作用するリンパ球の過剰免疫を抑制することに焦点をおいている。しかし、これは腸管外での正常なリンパ球の免疫機能を抑制することにもつながり、易感染性や悪性腫瘍などの副作用にも留意する必要がある。これに対し、腸管に Dominant に存在する好酸球が炎症性腸疾患の病態形成に関与する機序を解明することができれば、その機序をコントロールすることにより、より病態特異的で患者負担の少ない治療に繋がる。

このため本研究では、腸管粘膜環境における好酸球の生理的な動態を観察するとともに、種々の活性酸素要件によるその変動を評価し、炎症性腸疾患における好酸球の関与についての Central dogma を確立することを目指した。

## 3. 研究の方法：以下はいずれも、研究計画立案時に予定していた方法である。

### 1) ヒト腸管粘膜由来の腸管オルガノイドと好酸球の共培養系を作成する

オルガノイドライブラリの樹立: 大腸内視鏡検査患者の生検サンプルを採取し、物理的細断と細胞解離試薬を用いて細胞を解離させた後、人工基底膜マトリックス上に播種し、IntestiCult™ などの市販オルガノイド専用培養液を用いて培養し、継代可能な状態とする。

Symbiosis/Dysbiosis モデルの構築: Symbiosis 菌として乳酸菌やビフィズス菌を、Dysbiosis 菌として接着性侵入性大腸菌や Clostridium difficile をオルガノイド管腔内に播種し、組織 ROS 濃度変化をルミノール試薬等にて定量する。また比色法キットなどを用いて L-乳酸を定量し解糖系の作用を評価する。それぞれの環境下において、上皮細胞の増殖による粘膜修復の状況を MUC5AC 染色などで評価する。

免疫担当細胞/好酸球との共培養系作成: 腸管内に自然リンパ球も常駐しているため、同様の環境を再現する。末梢血単核球よりセルソーターにて分離し培養した 2 型自然リンパ球 (ILC2) を、トランスウェル・プレートを用いて腸管オルガノイドと共培養を行う。このうえで、末梢血より磁気ビーズを用いて分離した好酸球を基底膜側に加え、好酸球誘導・生存に関わる IL-5、GM-CSF などの液性因子を添加し、好酸球が腸管粘膜に定住する条件を決定する。

### 2) 組織の低 ROS 化によって好酸球が誘導されるかを検証し、その機序を探索する

ROS 濃度の操作による検証: 上述の共培養系に、外因性の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> や ROS のスカベンジャーである Superoxide dismutase (SOD) を加える、NOX 阻害薬 DPI を加える、などの手法で組織 ROS 濃度を変化させ、好酸球の遊走、活性化への影響を評価する。Symbiosis 菌や Dysbiosis 菌を加える、解糖系促進剤であるクエン酸や、阻害薬である 2DG による解糖系の活性化変化、好酸球誘導への影響を観察する。

好酸球誘導因子の検索: 低 ROS によって IL-25 や Eotaxin-1 など遊走因子の上皮細胞や ILC からの分泌が亢進するのか、について定量的に評価する。

### 3) 組織 ROS に応じて好酸球が組織障害から修復へ機能転換するか検証し、その機序を探索する

粘膜修復誘導の検証: 組織 ROS 濃度および呼応する好酸球 ROS 産生の変更に際し、上皮細胞の増殖 (粘膜修復) に変化が生じるかを形態的に観察する。また、創傷治癒機構の一つである上皮間葉転移の有無について E-cadherin/FSP1 共染色などで評価する。腸管組織全体より mRNA を抽出し、トランスクリプトーム解析により粘膜修復関連因子の発現変化を測定する。若年発症 IBD と関連する NCF4 などの NOX 遺伝子異常の影響についても、CRISPR/Cas9 や RNAi を用いた誘導系により観察する。

好酸球などが放出する物質の検討: 上記変化に伴う、各種サイトカイン・ケモカインおよび S100 蛋白の分泌や、SPM 産生の変動について、LC-MS/MS などリポドミクス手法も用いて解析する。S100A8 は S-ニトロシル化により抗炎症活性に転換することが知られているため、S-ニトロシル化タンパク質検出キットによりこれを評価する。S100 による ROS スカベンジャー効果も検討する。

Siglec-8 による機能転換の検証: Siglec-8 刺激抗体や Neu5Ac の投与により、粘膜保護作用が

生じるかを観察する。また、Neu5Gc と Neu5Ac 添加でこれらの反応に変化があるかを比較する。粘膜ムチン由来の遊離シアル酸が高 ROS に伴う組織障害で実際に増多するか測定するとともに、外因性 Sialidase によるシアル酸分解や Siglec-8 阻害抗体により Siglec-8 経路をブロックすることの影響を観察する。Siglec-8 誘導性細胞死による組織中への細胞障害顆粒や DNA の放出について、他の細胞死様態である ETosis・アポトーシスと比較し評価する。

#### 4. 研究成果

以上の計画であったが、本研究の基金提供期間がコロナ禍と重なり、研究代表者が地域の新型コロナウイルス対策の責任者となったため、研究へのエフォートを捻出できなかった。コロナ禍の終息後も、研究代表者の職場異動があり、研究エフォートを確保することができなかった。

以上から、研究時間を蓄積することができず、予備実験のみで研究機関が終了してしまったため、大変遺憾ではあるが、有意な研究成果は得られていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Nothing to declare

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