

令和 6 年 4 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07931

研究課題名（和文）クローン病由来オルガノイド単層培養による新規疾患感受性遺伝子RAP1Aの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of disease susceptibility gene RAP1A using organoid monolayer from Crohn's Disease

研究代表者

諸井 林太郎（Moroi, Rintaro）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：90803594

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）：本研究では、延べ30症例でクローン病患者由来のオルガノイドの樹立およびトランスウェルを用いた単層培養に成功した。Millicell電気抵抗値測定システムを用いて単層培養のTEERを測定したところLPS負荷とコントロールには電気抵抗値に差を認めなかった。TNF、およびインターフェロンの負荷では、抵抗値はコントロールと比較して約40%まで低下することが明らかとなった。RAP1Aリスクアレル別(AA, TA, TT)ではタイトジャンクションの抵抗値に差は認めなかった。以上より、IBD関連の炎症性サイトカインが、腸管上皮細胞の粘膜電気抵抗の低下を惹起することがあきらかとされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではクローン病患者由来の腸粘膜上皮オルガノイドの樹立、および単層培養の作成に成功し、粘膜電気抵抗値を測定を可能とするモデルを構築した。さらに、そのモデルを用いて、クローン病患者の上皮細胞は、TNFやINF刺激により粘膜電気抵抗値を低下させ、粘膜上皮の透過性を更新させることを明らかとした。RAP1A遺伝子多型による粘膜電気抵抗の変化は認めなかったが、これはオルガノイド樹立の過程で様々なストレスを除外しているためと考えられた。クローン病の原因はいまだ不明であるが、炎症性サイトカインによる粘膜電気抵抗の低下、タイトジャンクションの低下が病態の一つであることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：In this study, organoids derived from patients with Crohn's disease were successfully established and cultured as monolayers using transwells in a total of 30 cases. When TEER of monolayer culture was measured using Millicell electrical resistance measurement system, there was no difference in electrical resistance between LPS loading and control. With TNF and interferon loading, it was found that levels of resistance were reduced by about 40% compared with controls. There was no difference in tight junction resistance by RAP1A risk allele (AA, TA, TT). These results indicate that IBD-associated inflammatory cytokines induce a decrease in mucosal electrical resistance of intestinal epithelial cells.

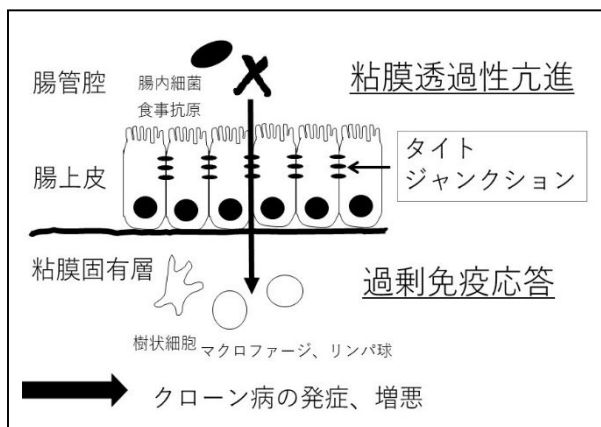
研究分野：消化器内科

キーワード：オルガノイド RAP1A

1. 研究開始当初の背景

腸管上皮透過性の異常がクローン病の発症や増悪に関連している

クローン病 (CD) は難治性炎症性腸疾患であり、外的環境要因と遺伝的要因が発症に関連する原因不明の多因子疾患である。腸管には約 100 兆個といわれる腸内細菌や様々な食事抗原が存在し、これらから生体を保護し過剰免疫応答を制御する粘膜バリア機構が存在する。腸管上皮を被覆する粘液層や腸管上皮細胞表面の糖タンパク質、細胞接着装置であるタイトジャンクションがあげられる。CD 患者ではこれらのバリア機構の破綻による過剰免疫応答が腸管内で惹起されており (図 1) 発症の原因や増悪への関連が推定されている。実際、CD の病態に関与している炎症性サイトカイン (IFN 等) は上皮間のタイトジャンクションを重度に破綻する事が報告されている (FASEB, 2005)。しかしながら、腸管上皮粘膜の透過性が CD 患者上皮内でどのような外的要因 (菌体成分や炎症性サイトカイン等) や遺伝的要因 (疾患感受性遺伝子など) により制御されているかの十分な検証は不可能であった。その理由として、これまでの粘膜透過性評価は主に大腸癌細胞株 CACO2 の単層培養を用いた検証 (in vitro) や、腸炎モデルマウスへの蛍光物質の投与 (in vivo) によるものに限定されていたことがあげられる。これまで、詳細な透過性の検証を可能とする正常腸管上皮や CD 患者由来腸管上皮の長期培養は不可能であった。

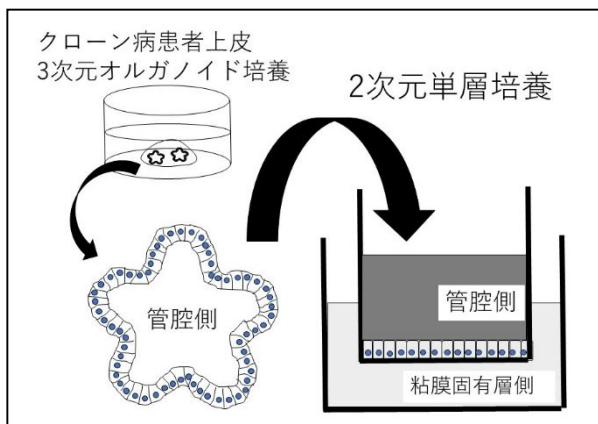


新たな日本人クローン病疾患感受性遺伝子「RAP1A」の機能とは？

申請者らは 2019 年、日本人 CD 患者の GWAS により新たな疾患感受性遺伝子 RAP1A を見出した (J Crohns Colitis, 2019)。RAP1A は Ras と類似の構造を持つ低分子量 GTP 結合蛋白質である。RAP1 のノックアウトマウスでは腸炎が確認されている事から、主に免疫担当細胞を介した CD の病態への関与を想定していた。しかし、2020 年、腎臓癌細胞を用いた研究ではあるが、RAP1 が Shank2 とともに上皮のタイトジャンクションの形成に関与していることが報告された (Cell Rep, 2020)。これらの事から「RAP1A 遺伝子多型による RAP1 の機能異常が、タイトジャンクション異常を介した粘膜透過性の亢進を惹起し、CD の病態へ関与する」という新たな仮説が提起された。

クローン病由来オルガノイド培養の確立と、新たな 2 次元単層培養による病態解明への期待

長らく腸管上皮の in vitro 長期培養は不可能であった。2011 年、腸管上皮幹細胞の維持に必要なニッチ因子 (Gastroenterology, 2011) が同定され、2016 年にはマトリゲル内 3 次元オルガノイド培養によりほぼ全ての消化管上皮の長期培養が可能となった (Cell Stem Cell, 2016)。これらの手法によりヒト由来腸管上皮の長期培養が可能となり、新たな研究ツールとして注目されている。一方で、オルガノイド培養は 3 次元構造をとり管腔側が内向きであるため、腸管上皮の極性の保持が不可能であった。極性が重要となる研究ツールとしては不向きという欠点を有する。近年、上皮細胞を 3 次元オルガノイドで培養した後、再び 2 次元・単層培養を行い、腸管上皮の特徴である頂低極性を保持した状態の培養が報告された (図 2)。これらの手技を用いることで、CD 患者由来の腸管上皮を生体内と同様な構造を保持したまま体外で培養することが可能となり、これまで不可能であった CD 患者の粘膜透過性を、in vitro で詳細に検証が可能となりうる。そこで、本研究の目的は以下の 3 点である。CD 患者由来オルガノイドの 2 次元単層培養を用いた粘膜透過性評価系を確立する。粘膜透過性・タイトジャンクションを制御する外的要因 (細菌成分やサイトカインなど) を明らかとする。新規 CD 疾患感受性遺伝子 (RAP1A) の、粘膜透過性やタイトジャンクという観点での機能解析を行い、RAP1A 遺伝子多型が CD の病態にどのように関与しているかを明らかとする。



2. 研究の目的

本研究では、新たな技術であるオルガノイド2次元単層培養法を用いた粘膜透過性の評価を行う。CDは粘膜透過性・タイトジャンクションの異常が病態に深く関連していると推定され、粘膜透過性を制御する様々な因子を同定する。当研究者らが明らかとした遺伝子多型RAP1Aがこの粘膜透過性に関与しているのであれば、遺伝子多型とCDの病態を結びつける有力な根拠がえられる。これまでに報告のない独創的な手法による病態解析である。

3. 研究の方法

研究方法

研究1 クロウン病・健常由来小腸、大腸オルガノイド培養と2次元単層培養の樹立

1-1: クロウン病・健常人小腸、大腸生検検体から3次元オルガノイドの樹立

内視鏡生検で取得した検体をEDTA溶液で上皮を短離する。ペレットをマトリゲルで包埋し、WNT/Rspondin1 conditional medium, Glutamax, B-27, IGF, FGFを混合したWENRAIF(Fujii M, Cell Stem Cell 2018)培地で培養する。

1-2: 3次元オルガノイドから2次元単層培養の樹立

1-1で作成した3次元オルガノイドの増殖が十分得られた後にTrypleLX(Thermo)を用いて単細胞化する。その後24well dishのインサート(0.4um)に単細胞化したオルガノイドを 1×10^6 個/mlに再懸濁し播種し単層培養化する。樹立した単層培養をE-cadherin、ZO-1による蛍光染色、横断面の病理組織を作成し単層上皮化を確認する。

研究2 クロウン病・健常群での粘膜透過性の評価(外的要因を中心に)

2-1: 蛍光色素、経上皮抵抗(TEER)を用いた検証

CD由来上皮(n=10)、健常人上皮(n=10)を対象とする。インサート内への播種後経時的(1,3,5,7日後)にFITC-dextran(4kd,40kd)、TEER(Millipore MillicellERS-2を用いる)測定にて粘膜透過性を評価し安定的に評価可能な条件を検証する。その後インサートにTNF、TNFSF15、IFN、IL-6等のサイトカイン、LPS、MDP等の菌体成分、酪酸、酢酸、プロピオン酸などの短鎖脂肪酸を負荷し、CD症例と健常人で粘膜透過性に影響を与える外的因子を同定する。

2-2: タイトジャンクション関連蛋白、RNAの発現変動による評価

研究2-1の条件下で、健常人CD両群においてタイトジャンクションに関連するZO-1、CLDN1、インサート内の培地とwell内(Basal側)の培地を比較することで頂低極性がこれらの発現にどのような影響を与えているかを検証する。

研究3 クロウン病疾患感受性遺伝子RAP1Aの機能解析

3-1: CD感受性遺伝子RAP1A遺伝子多型と粘膜透過性に関する検討

RAP1Aのrs488200遺伝子多型(T/T、T/A、A/A)別に、研究2で行った粘膜透過性・タイトジャンクション評価を行う(定常、サイトカイン等の負荷状態)。RAP1Aの機能解析を行う。

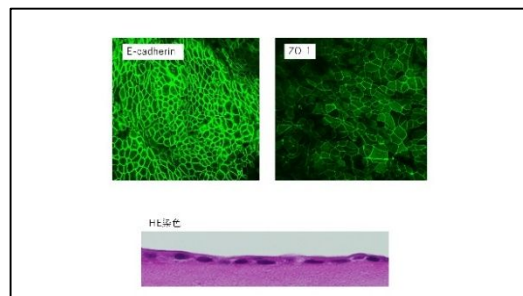
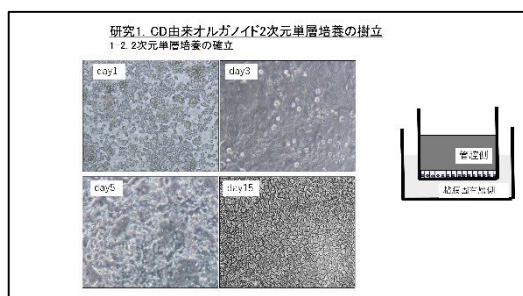
3-2: CD由来単層培養のRAP1機能による透過性変化に関する検討

RAP1及び関連するpathway上の遺伝子をsi-RNAによりノックダウンや強制発現系を樹立し研究2と同様の粘膜透過性、タイトジャンクションの評価を行う。

4. 研究成果

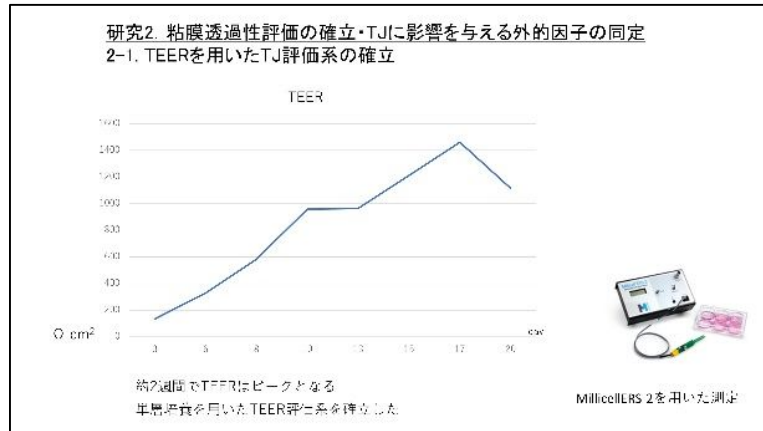
研究1. クロウン病・健常由来小腸、大腸オルガノイド培養と2次元単層培養の樹立

最終的にはのべ30症例でオルガノイドの樹立に成功した。また、研究計画通り、インサートを用いて単層培養化することも可能であった。単層培養したwellの培養膜の蛍光顕微鏡観察では、細胞骨格にそってZO-1の発現、E-cadherinの発現を確認することが可能であった。また、単層培養膜を切り出し、垂直切片で切り出しHE染色を施行したところ、膜上に核を有する上皮細胞が、均等に分布していることが確認可能であった。

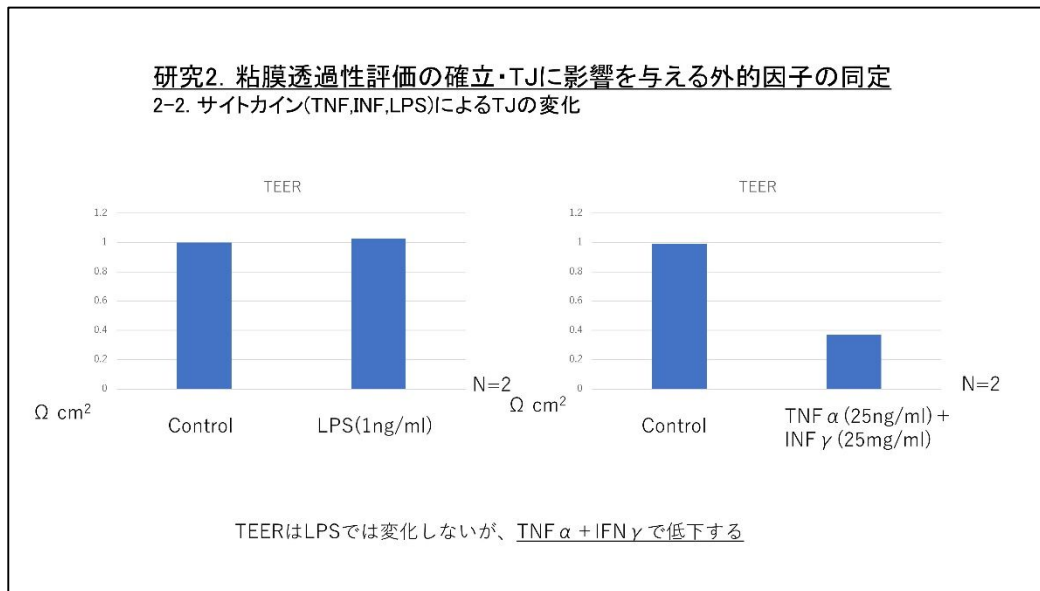


研究2 クロウン病・健常群での粘膜透過性の評価（外的要因を中心に）

本研究では、まずオルガノイド由来の単層上皮細胞の粘膜透過性の評価が Millicell 電気抵抗値測定システムで可能かどうかの検証をした。単層培養を用いた抵抗値の検証には、安定的、かつ再現性のある実験系の構築が望まれるため、まずは条件設定を行った。Millicell 電気抵抗値測定システムを用いて単層培養の TEER を測定したところ、経時的に TEER は上昇し、樹立3日後は TEER:200 $\Omega \text{ cm}^2$ 程度だったものが、5日目では 400 $\Omega \text{ cm}^2$ 、10日後は 1000 $\Omega \text{ cm}^2$ 、17日目で 1400 $\Omega \text{ cm}^2$ 程度のピークとなり、以降細胞の死滅とともに TEER の低下を確認できた。以上の事から、単層培養化してから約2週間が最も電気抵抗値が上昇することがあきらかとなり、今後この期間中に比較検証を行うこととした。

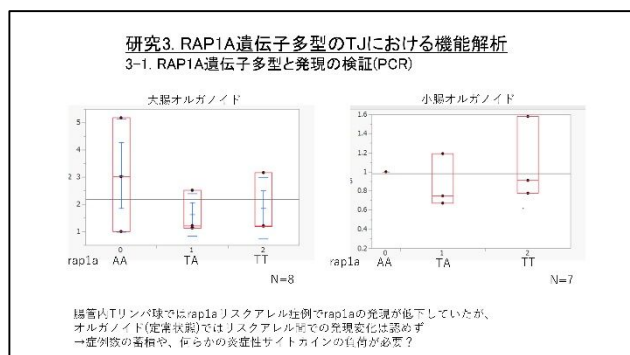


次に、上記の評価システムを用いて、クローン病の腸管炎症に関連するサイトカインを上皮細胞に付加することによる粘膜電気抵抗値の変化を明らかとした。本研究では、クローン病に関連する代表的なサイトカインである LPS と、TNF 及び INF を負荷し、検証を行った。サイトカインの濃度や負荷時間に関しては予備実験をおこない適切な条件を設定した。負荷時間は 48 h r とした。以下のスライドに示す通り、LPS の負荷による粘膜電気抵抗値の低下は認めず、TNF 、および INF 刺激による抵抗値の低下を著明にとらえることが可能であった。

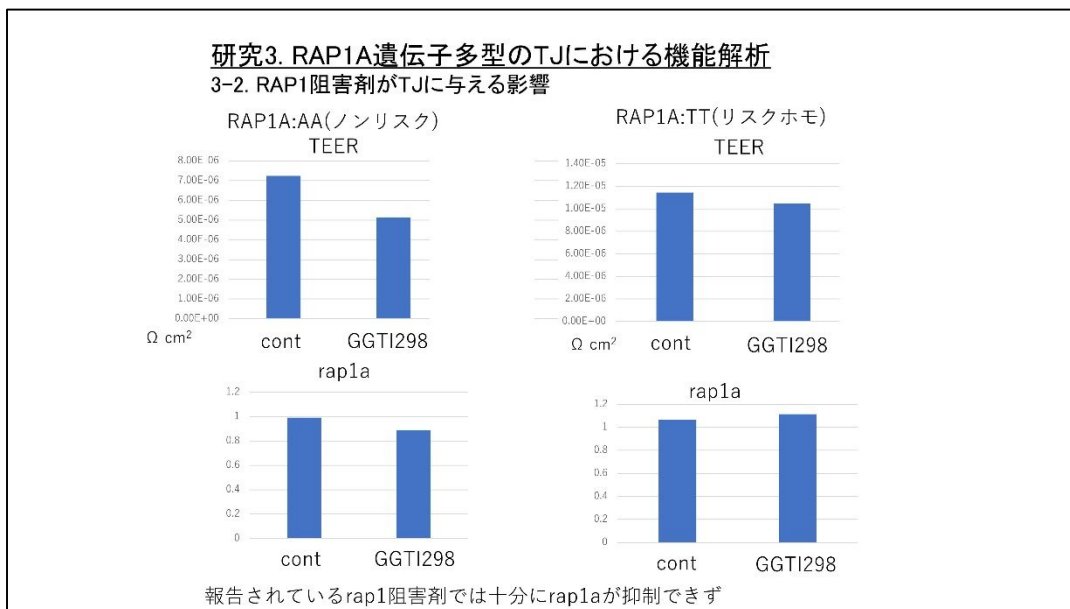


研究3 クロウン病疾患感受性遺伝子 RAP1A の機能解析

次に、クローン病患者の RAP1A 遺伝子の rs488200 遺伝子多型(T/T、T/A、A/A)別に、研究2で行った粘膜透過性・タイトジャンクション評価を行った。研究に先立ち、RAP1A 遺伝子多型による RAP1A の発現に差異が内科を PCR で定量化し評価した。その結果、遺伝子多型別に発現の変動は認めなかった。過去の研究で、リンパ球において RAP1A は遺伝子多型による発現の変動があることが報告されていたが、上皮細胞では認めないといった結



果であった。しかしながら、オルガノイド上皮細胞は、患者粘膜から単離された状態であり、すべてのニッチが補充されたニッチリッチな状態であること、様々なサイトカインストレスからフリーとなった状態であることが結果に影響していると推定された。次に RAP1A 遺伝子多型別に粘膜電気抵抗値を測定したが、両群での差は認めなかった。RAP1A 阻害剤である GGTI298 を用いて、RAP1A の発現を低下させた状態で、粘膜電気抵抗値を測定したが、ノンリスク症例、リスク症例それぞれ負荷、非負荷群間での粘膜電気抵抗値の差は認めなかった。今後は RAP1A を効率的に発現抑制させる方法の検索、および、各種サイトカイン負荷による RAP1A の遺伝子多型別の RAP1A の発現の程度などを検証し、その結果も用いて再度粘膜電気抵抗値の測定する予定である。



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〕

-

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	黒羽 正剛 (Kuroha Masatake) (70709469)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301)	
研究分担者	角田 洋一 (Kakuta Yoichi) (50509205)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	

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