

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08003

研究課題名(和文)炎症性腸疾患における小腸難治化機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms for the refractoriness of small intestinal lesions in inflammatory bowel diseases

研究代表者

竹中 健人 (Takenaka, Kento)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座講師

研究者番号：10783368

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)：申請者はこれまでに初めて炎症性腸疾患における小腸病変の難治性と小腸上皮細胞の炎症に対する脆弱性を発見した。本研究ではヒト小腸・大腸炎症モデル及び小腸病変残存クローン病症例臨床検体を活用し、小腸炎症脆弱性を制御する鍵分子の同定を目指した。ヒト小腸オルガノイドにおいて条件検討を行い、長期培養を試みたが、30週以上の培養維持は不可能であった。このことから小腸上皮細胞は大腸上皮細胞に比して炎症反応に対する耐性が低い可能性が示唆される。マイクロアレイによる網羅的な解析ではいくつか候補となる因子を同定しており、今後さらに解析を進めて腸病変脆弱性を規定する候補因子の絞り込みを行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臓器特異的な炎症脆弱機構の発見は独創的であり、申請者らにのみ遂行可能な研究と考える。また小腸特異的な炎症脆弱機構の発見は、クローン病以外の他の小腸炎症性難病にも応用されることが期待でき、新規治療薬の開発など発展性・創造性に富む研究である。

研究成果の概要(英文)：The applicant first discovered the refractoriness of small intestinal lesions in inflammatory bowel diseases. In this study, we used in vitro models of inflammation and clinical samples from Crohn's disease patients to identify key molecules that regulate the refractoriness of small intestinal lesions in inflammatory bowel diseases. Long-term cultures in human small intestinal organoids were attempted, but it was not possible to maintain the cultures for more than 30 weeks. This suggests that small intestinal epithelial cells may be less resistant to inflammatory responses than colonic epithelial cells. On the other hand, the quantification of inflammatory cytokines, oxidative stress factors and telomere length showed no significant differences compared to colonic epithelial cells. On the other hand, a comprehensive microarray analysis identified several candidate factors, and further analysis is planned to narrow down the candidate factors that define intestinal lesion susceptibility.

研究分野：消化器内科学

キーワード：クローン病 オルガノイド 小腸病変

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease; IBD)は難治性の慢性の腸疾患であり、主に潰瘍性大腸炎(UC)とクローン病(CD)に大別される。クローン病は小腸・大腸に難治性の潰瘍病変を有し、出血・狭窄・瘻孔などが生じるため QOL が著しく低下する。クローン病治療の問題点として、一旦寛解しても再燃を来し狭窄・瘻孔を生じること、病変部位を切除しても残存小腸から再燃すること、小腸は大腸と異なり全摘出ができないため手術を繰り返した結果、短腸症候群を引き起こすことが挙げられる。そのため、いかに再燃を減少させ健康な小腸を維持できるかがクローン病の予後・QOL の向上に重要なポイントとなる。近年、IBD の再燃を予測する因子として粘膜治癒が着目され、臨床症状や炎症状態だけでなく消化管内に潰瘍を認めないことを治療のゴールとして設定されるようになった。潰瘍性大腸炎においては罹患範囲が大腸のみであることから、通常の大腸内視鏡にて粘膜評価は比較的容易に可能である。しかし、クローン病は小腸・大腸全域に罹患範囲が広がるため、消化管全体の粘膜評価は未だに難しい現状である。そこで申請者の教室では小腸病変の評価法を向上させるため MRI の小腸画像診断を試み、MR entero-colonography(MREC)にてクローン病小腸病変の描出に成功し、内視鏡所見と同様に臨床的に寛解状態の患者における深部小腸病変の描出を可能とした(Inflamm Bowel Dis. 2013)。さらに申請者の竹中は小腸病変評価法を発展させ、Single Balloon Enteroscopy(SBE)と MREC の所見を比較検討することによりクローン病深部小腸の病変評価法を確立した(Gastroenterol. 2014, Inflamm Bowel Dis. 2015)。その結果、クローン病では生物製剤で治療しても大腸は粘膜治癒するものの小腸には以前潰瘍が残存し粘膜治癒していない症例が多いことを報告した(Clin Gastroenterol Hepatol. 2019)(図 1)。つまり、小腸上皮細胞は大腸上皮と比較して治療効果に乏しく、小腸を主眼とした粘膜治癒機構の解明が必要であることが示唆された。さらに、分担者の土屋・岡本は小腸内視鏡検体及び患者由来オルガノイドが深部小腸のクローン病の病態描出に有用であることも示しており(図 2)、ヒト検体解析を発展させることが臨床問題解決に直結すると考えた。また、マウス大腸上皮オルガノイドを樹立し(Nat Med. 2012)、炎症刺激を長期間行うことにより IBD 大腸病変モデルを構築した(J Crohns Colitis 2017、表紙掲載)。ヒト大腸細胞による IBD モデルにより薬剤の粘膜治癒効果及び作用機序の解明に有用であることを報告し(J Gastroenterol. 2019)、大腸粘膜治癒機構を明らかとしている。しかしながら、ヒト小腸オルガノイドを用いた炎症刺激では長期的な培養が維持できないことが判明し、小腸上皮細胞の慢性炎症脆弱性が示唆された(図 3)。臨床情報による小腸潰瘍の残存と基礎的検討による小腸上皮の慢性炎症脆弱性を総合的に解釈した結果、クローン病においては小腸上皮特異的に粘膜再生を阻害する機構が存在するのではないか?という学術的な「問い」を設定した。

2. 研究の目的

そこで、本研究では本教室で独自に構築してきた小腸病変評価システムとヒトオルガノイド評価システムを融合・発展させることによる小腸粘膜難治化機構の解明を目的とする。具体的には、1)ヒト小腸オルガノイド慢性炎症脆弱度評価、2)慢性炎症脆弱性とクローン病病態との関連解析、3)小腸特異的慢性炎症脆弱性鍵分子の同定を目的とする。

3. 研究の方法

本研究においては、独自に構築した大腸上皮持続炎症刺激モデルを基軸として、小腸上皮慢性炎症脆弱性を分子生物学的に評価することにより小腸特異的炎症脆弱機構を明らかにする。具体的な研究方法を下記する。

1) ヒト小腸オルガノイド慢性炎症脆弱度評価・ヒト小腸オルガノイド炎症刺激生存評価

ヒト大腸オルガノイドでは約 100 週間の持続炎症刺激において培養維持が可能であった。ヒト小腸オルガノイドでも長期培養可能か検討する。また炎症刺激においては、大腸では TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、Flagellin、LPS、Poly IC を混合して刺激しており、小腸でも同様の刺激を試みる。

・炎症応答度評価

炎症応答遺伝子として、IL-8 などの炎症性サイトカイン産生、Duoxa2 などの酸化ストレス関連因子の発現を生存期間中の時系列を解析し、大腸での発現と比較する。

・炎症脆弱度評価

大腸では持続炎症刺激により、アポトーシスが持続的に亢進する。炎症刺激を除去してもアポトーシスは減弱せずに恒常化を認めるため、小腸においても同様の現象を確認する。また、annexin V 蛍光によるアポトーシス可視化や caspase 関連因子のウエスタンブロットによる定量化を行い、大腸との脆弱度評価を行う。

・大腸炎症脆弱因子評価

ヒト大腸持続炎症刺激により、脆弱性関連因子を同定している。申請者らはヒト特異的に発現するアポトーシスシグナルの上流因子を発見した。また持続炎症中にテロメア短縮も認めており、これらの因子が大腸炎症脆弱性の原因であることを証明した。小腸オルガノイドにおけるこれら因子の影響を大腸と比較する。

以上により、ヒト小腸オルガノイドの慢性炎症脆弱度を評価し、その経路についても大腸との相違を明らかとする。

2) 慢性炎症脆弱性とクローン病病態との関連解析

確立したヒト小腸オルガノイドにおける慢性炎症脆弱度について、病態との関連を明らかにする。

・クローン病小腸病変部、非病変部オルガノイド解析

同一人物患者由来の病変部と非病変部からオルガノイドを樹立している。これらのオルガノイドに炎症刺激を行い、慢性炎症脆弱度を評価する。

・小腸病変残存クローン病患者由来オルガノイド解析

クローン病治療にて大腸は治癒したが小腸のみ病変が残存している患者から小腸・大腸オルガノイドを樹立する。それぞれ持続炎症刺激を行い、慢性炎症脆弱度を評価する。

・小腸病変部特異的因子と炎症脆弱度の関連解析

上記オルガノイドを未刺激の状態にてマイクロアレイ解析を行い、小腸病変特異的発現遺伝子を同定する。

3) 小腸特異的慢性炎症脆弱性鍵分子の同定

生存期間を含めた慢性炎症脆弱度が最も強い小腸オルガノイドを選定し、炎症刺激状態でのマイクロアレイ解析を行い、脆弱性特異的遺伝子を抽出する。さらに内視鏡生検

検体にて、小腸のみ病変が残存している症例にも脆弱性特異的遺伝子が発現していることを確認する。また慢性炎症脆弱性特異的遺伝子の発現を動揺させ、炎症脆弱度の変化を確認する。以上により、大腸ではなく小腸特異的に発現し、クローン病病態や炎症脆弱性に影響する因子を同定する。小腸脆弱性特異的因子の機能を解析することにより、小腸特異的な難治機構を理解する。

4. 研究の結果

1) ヒト小腸オルガノイド慢性炎症脆弱度評価・ヒト小腸オルガノイド炎症刺激生存評価

・炎症応答度評価

ヒト小腸オルガノイドにおいてさまざまな条件検討を行い、長期培養を試みたが、30週以上の培養維持は不可能であった。このことから小腸上皮細胞は大腸上皮細胞に比して炎症反応に対する耐性が低い可能性が示唆される。

一方で、30週時点でのIL-8などの炎症性サイトカイン産生、Duoxa2などの酸化ストレス関連因子の発現解析では、大腸との大きな差は見られなかった。

・炎症脆弱度評価

小腸においても大腸と同様に刺激時および刺激除去後にもアポトーシスの亢進が確認された。

・大腸炎症脆弱因子評価

ヒト小腸オルガノイドにおいても、慢性刺激によって大腸オルガノイドと同様に、アポトーシスシグナルの上流因子の発現と、テロメア短縮を認めた。一方で小腸オルガノイドと大腸オルガノイドとの比較においては大きな差は見られなかった。

2) 慢性炎症脆弱性とクローン病病態との関連解析

・クローン病小腸病変部、非病変部オルガノイド解析

同一人物患者由来の病変部と非病変部のオルガノイドにおける慢性刺激を行なったが、30週の時点では刺激に対する炎症性サイトカイン、酸化ストレス因子、アポトーシス、テロメア長などにおいて有意な差を認めなかった。

・小腸病変残存クローン病患者由来オルガノイド解析

クローン病治療にて大腸は治癒したが小腸のみ病変が残存している患者から小腸・大腸オルガノイドを樹立する。それぞれ持続炎症刺激を行ったが、30週の時点では刺激に対する炎症性サイトカイン、酸化ストレス因子、アポトーシス、テロメア長などにおいて有意な差を認めなかった。

・小腸病変部特異的因子と炎症脆弱度の関連解析

上記オルガノイドのマイクロアレイによる遺伝子発現解析では、いくつか発現に差がみられた。今後さらに詳細な解析を行い、小腸病変脆弱性を規定する候補因子の絞り込みを行う予定である。

3) 小腸特異的慢性炎症脆弱性鍵分子の同定

マイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果、慢性炎症刺激後のオルガノイド、小腸のみ病変が残存している症例オルガノイドに共通して上昇する遺伝子をいくつかピックアップすることができた。今後さらに詳細な解析を行い、小腸病変脆弱性を規定する候

補因子の絞り込みを行う予定である。

5. 考察

ヒト小腸オルガノイドは慢性刺激によって、ヒト大腸オルガノイドに比して明らかに短い期間しか培養ができなかった。このことは小腸上皮細胞が大腸上皮細胞に比して、慢性炎症によって誘導されるアポトーシスへの耐性が低いことが示唆される。一方で炎症性サイトカインや酸化ストレス因子、テロメア長などの定量では大腸上皮細胞と有意な差を認めなかった。このことは培養期間が短いことによって、これらの因子が上昇する前に急速に細胞死が誘導されてしまったことが考えられる。

他方、マイクロアレイによる網羅的な解析ではいくつか候補となる因子を同定しており、今後さらに解析を進めて腸病変脆弱性を規定する候補因子の絞り込みを行う予定である。

本報告書においては研究成果を論文としてまとめている途中であるため具体的な数値や個別の因子に関しては新規性を確保するために伏せさせていただいた。

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	土屋 輝一郎 (Tsuchiya Kiichiro) (40376786)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
研究分担者	岡本 隆一 (Okamoto Ryuichi) (50451935)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	

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