研究成果報告書 科学研究費助成事業

今和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号: 14101

研究種目: 基盤研究(C)(一般)

研究期間: 2021~2023 課題番号: 21K08641

研究課題名(和文)小児IBD患者における腸管Organoid移植

研究課題名(英文)Intestinal Organoid transplantation in pediatric IBD patients

研究代表者

松下 航平(Matsushita, Kohei)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号:70750777

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):小児IBDでは、成人のIBDと比べて、その後フォローしていく経過も長期に渡るため、発症により腸での炎症 潰瘍形成 治療での一時的寛解 再燃という流れを繰り返すうちに、腸管での線維性瘢痕から狭窄症状を呈し、腸管切除等の外科手術を余儀なくされることも多い。 当研究では、小児IBD患児における内視鏡検査時の生検サンプルを用いて、同一種・同一個体からの腸管上皮細胞をシャーレ上で3次元構造を保ったまま培養するというOrganoidを樹立し、それを潰瘍形成時に内視鏡下に移植することで、炎症が鎮静化した後に線維性瘢痕や狭窄状態になってしまうのを未然に防ぐという画期的な治 療法の確立を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義これまでの研究過程から、炎症によって傷害を受けた腸管上皮細胞由来Organoidは、通常の炎症のない腸管上皮細胞由来Organoidに比べて、分化能・増殖能ともに有意に活性化していることを確認している。すなわち、傷害を受けた腸管上皮においては、傷害部位の修復を促すために,すでに分化能・増殖能ともに亢進しており、それらが有効に働く組織環境さえ整えば、自己修復能力により治癒過程が進行するはずである。小児IBD患児における潰瘍形成部近傍の組織由来のOrganoidを用いることで、すでに分化能・増殖能が亢進したOrganoidの作成がより効率的に行えるようになり、新たな再生医療の一つとなりうる。

研究成果の概要(英文): Pediatric IBD patients have a longer follow-up period than adults with IBD, and as a result, the onset of IBD often leads to inflammation in the intestine, ulcer formation, temporary remission with treatment, and relapse, which often results in stenotic symptoms from fibrotic scarring in the intestinal tract and necessitates surgical procedures such as bowel resection.

In this study, we established an organoid in which intestinal epithelial cells from the same species and individual are cultured on a petri dish while maintaining their three-dimensional structure using biopsy samples from endoscopic examinations of pediatric IBD patients, and transplanted them endoscopically at the time of ulcer formation. The aim is to establish an innovative treatment method to prevent fibrotic scarring and stenosis from occurring after inflammation has subsided.

研究分野: 小児外科

キーワード: 炎症性腸疾患 小児潰瘍性大腸炎 小児クローン病

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

現在世界中で再生医療に期待が集まっている。小児 IBD 患児においては、成人の IBD と比べても重症例が多く、最新の生物学的製剤(抗 TNF- 抗体・ 4 7 インテグリン抗体・IL-12/IL-23 抗体・Janus-activated kinase1 阻害剤などの各種新薬)によっても、十分な治療効果が得られず、最終的に手術療法に頼らざるを得ない症例が存在する。小児 IBD 患児の治療においては、小児期に腸管切除等を繰り返すことによって、将来的に予後不良な短腸症候群へと至る症例がみられるだけでなく、これら生物学的製剤には免疫抑制による肺炎など感染症に対する脆弱化や、悪性リンパ腫等の発生率を高めてしまうという副作用の側面があり、最新の医療・治療薬を用いても、患児に対して最善の治療ができているとは決して言えない現状である。

近年になり、Sato らが、シャーレ上で腸管上皮細胞の 3 次元構造をもった状態(腸管 Organoid) での培養法が発表 (Sato T et al. Nature. 2011 Jan 20:469(7330):415-8/ Nature. 2009 May 14;459(7244):262-5) され、世界中で人体の各種臓器における Organoid 研究が さかんに行われている。中でも腸管上皮の Organoid 研究が最も研究が進んでおり、現在 Commercial base で各種 Organoid 培養の試薬が利用できるようになっている。この Organoid は腸管上皮の Single cell (Lgr5 positive) からでも培養が可能と報告されている。 このような背景から、日頃小児 IBD 患児の内視鏡時に、病理学的診断目的で生検を行って いる小児 IBD 患児の検体を用いて、同様に Organoid の作成が可能なのではないか?その Organoid をシャーレ上で培養して、小児 IBD 患児における腸管上皮細胞の特殊性などを含 めた機能解析が可能になるのではないか?また同じ患児から作成された Organoid であれ ば、移植の際に障害となる免疫細胞による拒絶反応の問題が解決され、同一患者の腸管傷害 部位に散布することで、内視鏡下に容易に Organoid の移植が可能となるのではないか?と いう着想を得たのが当研究の本幹である。iPS 細胞や ES 細胞による再生医療とはまた別 のアプローチで、同一個人(同一個体)由来の組織から、腸管上皮幹細胞を刺激することで、 正常な腸管上皮をシャーレ上で増殖させた上で、傷害部位の治療を目的として同一個人(同 一個体)へ移植するという新たな再生医療の道を開くことになり、その免疫寛容の観点や同 一個人の組織を用いるという安全性の面からも、実地臨床への限りない応用が期待できる 画期的な研究となることを目標とする。

2.研究の目的

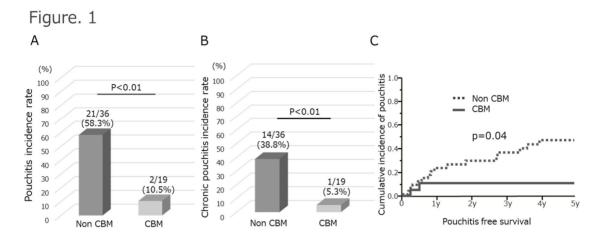
当研究では、小児 IBD 患児における内視鏡検査時の生検サンプルを用いて、同一種・同一個体からの腸管上皮細胞をシャーレ上で 3 次元構造を保ったまま培養するという Organoid (オルガノイド、通称 mini gut)を樹立し、それを潰瘍形成時に内視鏡下に移植することで、炎症が鎮静化した後に線維性瘢痕や狭窄状態になってしまうのを未然に防ぐという画期的な治療法の確立を目指すものである。小児 IBD 患者は、成人 IBD 患者よりも炎症や治療の修飾が少なく、IBD の発症初期の病態の特徴を持っていると考えられ、小児 IBD 患者で Organoid の研究・治療を目指すことは、IBD の病態解明や、将来的な QOL の向上や高額医療を抑えることが可能と考えられる。

3.研究の方法

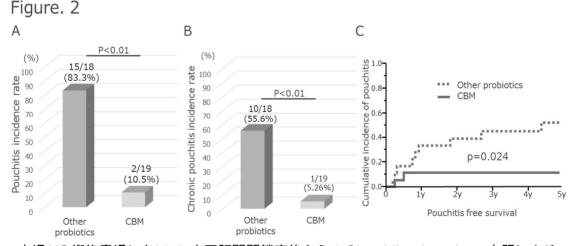
当初, IBD モデルマウスを作成した上で, その腸管上皮を用いて Organoid を作成し, そ の成長・分化レベルの解析や、機能的解析などを施行する予定であったが、IBD モデルマウ スを作成する時点で、屠殺する前に大量にマウスが死亡してしまう状態が続き、まだ十分に 研究が進んでいない。また、小児 IBD 患者での生検組織での Organoid 作成を予定してい たが,施設での倫理審査が承認されておらず、臨床検体を用いての Organoid 作成も,研究 期間内に進めることができなかった . そのため , 小児炎症性腸疾患の中で , 小児潰瘍性大腸 炎患者の術後経過の中で , 発症すると QOL 低下を来す回腸嚢炎に着目し , 同じく腸管内の 炎症であることから、そちらの病態につき、検討することとした.回腸嚢炎の発症機序に関 しては、腸内細菌と宿主側の腸管免疫が密接に影響しあっていることが最近の研究で明ら かになってきている、そこで整腸剤として投与されていた一般的に用いられる乳酸菌ベー スの整腸剤(Other probiotics)と腸管免疫や腸管バリアへの予防的・治療的効果が報告さ れてきている Clostridium butyricum の整腸剤 (CBM)における回腸嚢炎発症の予防的効 果を検討することとした.対象は,2004年1月~2023年12月までの間に当科で根治術手 術を施行した小児期発症 UC 術後の 55 例で,回腸人工肛門閉鎖術後1ヶ月以内に CBM 内 服が開始されていた群を CBM 群、CBM が内服されていなかった群を Non CBM 群,その 他の整腸剤が内服されていた群を Other probiotics 群として、後方視的に回腸嚢炎発症と慢 性回腸嚢炎発症の有無につき解析した。

4.研究成果

小児 UC 術後患児において、回腸嚢炎は 23 例、慢性回腸嚢炎は 15 例に認められた。Non CBM 群では、36 例中 21 例 (58.3%)に回腸嚢炎を発症したのに対し、CBM 群では 19 例中 2 例 (10.5%)の発症であった(p<0.01, Figure. 1A)。また慢性回腸嚢炎発症に関して、Non CBM 群では、36 例中 14 例 (38.8%)であったのに対し、CBM 群では 19 例中 1 例 (5.3%)の発症率であった(p<0.01, Figure. 1B)。 さらに kaplan-meier 法による累積回腸嚢炎発症率においても、術後 5 年以内の回腸嚢炎発症は Non CBM 群と比べ CBM 群では有意に発症が抑えられていた(p=0.04, Figure. 1C)。



次に、小児 UC 術後患児のうち、術後 1 ヶ月以内に何らかの整腸剤が投与されていたのは、全体で 37 例であった.そのうち、回腸嚢炎は 17 例、慢性回腸嚢炎は 11 例に認められた。また、術後 1 ヶ月以内に整腸剤の内服が開始されていたのは、55 例中 37 例であり、CBM 群が 19 例、Other probiotics 群が 18 例であった。Other probiotics 群では、18 例中 15 例 (83.3%)に回腸嚢炎を発症したのに対し、CBM 群では 19 例中 2 例 (10.5%)の発症であった(p<0.01、Figure. 2A)。また慢性回腸嚢炎発症に関して、Other probiotics 群では、18 例中 10 例 (55.6%)であったのに対し、CBM 群では 19 例中 1 例 (5.3%)の発症率であった(p<0.01、Figure. 2B)。さらに kaplan-meier 法による累積回腸嚢炎発症率においても、術後 5 年以内の回腸嚢炎発症は Other probiotics 群と比べ CBM 群では有意に発症が抑えられていた(p=0.024、Figure. 2C)。



小児UC術後患児において、人工肛門閉鎖直後からのClostridium butyricum内服により、回腸嚢炎発症率の軽減が期待できる可能性が示唆された。このように腸管の炎症には腸内細菌叢の影響が少なからず関係していることから,小児炎症性腸疾患患者の腸管生検サンプルから Organoid を作成し,それを内視鏡下に潰瘍病変部に移植するという再生医療を考える際には,腸内環境において腸内細菌叢の状態も同時に考える必要がある.今後の研究で小児炎症性腸疾患患者の自家 Organoid 移植を施行する段階になれば,Organoid を腸管内に散布するだけでなく,予め Clostridium butyricum 等の内服により,腸内細菌叢をDysbiosis の状態から腸内細菌叢が健康的で安定している状態である Eubiosis に整えておくことも考慮すべきであることが,この研究で示唆された.

5 . 主な発表論文等	荢
-------------	---

〔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

0_	. 丗笂組織		
	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
	小池 勇樹	三重大学・医学部附属病院・講師	
研究分担者	(Koike Yuhki)		
	(10555551)	(14101)	
	内田 恵一	三重大学・医学部附属病院・准教授	
研究分担者	(Uchida Keiichi)		
	(30293781)	(14101)	
	井上 幹大	三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト	
研究分担者	(Inoue Mikihiro)		
	(30422835)	(14101)	

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
共同研究相手国	相手力研光機則