

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15991

研究課題名（和文）食餌由来因子ゲニステインの腸上皮機能調節作用の解析

研究課題名（英文）Analysis of the role of the dietary-derived factor genistein on intestinal epithelium

研究代表者

河本 亜美（Kawamoto, Ami）

東京医科歯科大学・医学部附属病院光学診療部・助教

研究者番号：70849124

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では患者由来のヒト腸上皮オルガノイドを用いてイソフラボン類であるゲニステインの腸上皮における機能解析を行なったところ、ゲニステインはEGF受容体とHGF受容体の両方を選択的に阻害することにより大腸上皮幹・前駆細胞の増殖機能に対し抑制的な作用を有することを示した。さらに患者由来大腸上皮オルガノイドを用いた2次元単層上皮形成による創傷治癒モデルの解析で、ゲニステインは創傷治癒反応を有意に遅延させた。これらよりゲニステインは、幹・前駆細胞機能の抑制により、腸管粘膜に負の影響を及ぼし、持続的な粘膜損傷や潰瘍性大腸炎の発症につながる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦においてクローン病に対し脂質制限や栄養療法が行われているがその詳細なメカニズムは明らかでない。食餌由来因子と炎症性腸疾患の発症・進展等について特定の食餌因子が腸上皮に対する直接作用を通じて疾患発症に関与し得る機序を示した報告はない。イソフラボン類は本邦で摂取量が多い食餌因子群であり、健康維持に正の効果をもつ作用が広く認知されているが、本研究により同因子群のうち、ゲニステインは腸上皮を介した生体に対する負的作用を有し得る当方独自の知見を得た。従って本研究はイソフラボン類の新たな作用機序を明らかとし、今後新たな予防・治療法等への展開に寄与し得るものと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, functional analysis of the isoflavone genistein in the intestinal epithelium using patient-derived human intestinal epithelial organoids showed that genistein has inhibitory effects on the proliferative function of colonic epithelial stem/progenitor cells by selectively inhibiting both EGF and HGF receptors. Furthermore, genistein significantly delayed the wound healing response in a two-dimensional monolayer epithelial wound healing model using patient-derived colonic epithelial organoids. These results indicate that genistein may negatively affect the intestinal mucosa by suppressing stem/progenitor cell function, leading to persistent mucosal damage and possibly lead to the development of ulcerative colitis.

研究分野：消化器病態学

キーワード：ゲニステイン イソフラボン 潰瘍性大腸炎 ヒト大腸上皮オルガノイド チロシンキナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

申請者グループは炎症性腸疾患を対象とする診療・臨床・基礎研究を行い、炎症性腸疾患患者の内視鏡生検組織及び同患者由来の腸上皮オルガノイドを用いた炎症性腸疾患の病態解明に向けた、腸上皮の役割について継続的に研究を行ってきた(Stem Cell Reports,2018; J Gastroenterol, 2018; J Crohn's Colitis 2019; BBRC 2020)。炎症性腸疾患は難治性の潰瘍を腸管に形成し、下痢や血便を主症状とする原因不明の難治性疾患である。炎症性腸疾患は遺伝的素因・免疫調節機構の破綻・腸内細菌叢の異常、環境因子が複合的に合わさった多因子疾患と考えられているが、発症の正確なメカニズムは未だ明らかでない。炎症性腸疾患の発症・成立過程における環境因子、特に食餌由来因子の重要性は以前より提唱されており、さまざまな国・地域に於いて食習慣と疾患発症の相関を明らかにするための調査研究が報告されてきたが、特に腸上皮との直接的な相互作用を通じて疾患発症に至る機能的意義を明確に示された食餌因子は未だ明らかとなっていない。研究代表者らのグループも本邦における大規模調査に参加し、イソフラボン類が本邦における潰瘍性大腸炎の発症リスク因子として同定されることに貢献している(Plos One, 2014)。イソフラボン類は本邦で特に摂取量が多い食餌因子群であり、健康維持に正の効果をもつ作用が広く認知されている。一方、研究代表者らは同因子群のうち、ゲニステインは腸上皮を介した生体に対する負的作用を有し得る複数の知見を得ている。従って本研究の遂行によりイソフラボン類の新たな作用機序が明らかとなれば、今後新たな予防・治療法等への展開に寄与し得るものと考えている。

## 2. 研究の目的

本邦においてクローン病に対する治療として脂質制限や栄養療法が行われ、一定の成果が示されてきた一方、その詳細なメカニズムは明らかでない。また潰瘍性大腸炎における栄養療法は確立されていない。食餌由来因子と炎症性腸疾患の発症・進展等について患者を対象とした様々な臨床研究が存在するが、特定の食餌因子が腸上皮に対する直接作用を通じて疾患発症に関与し得る機序が明らかにされたというほとんどない。

申請者の研究室では腸上皮オルガノイド技術を用いた解析には豊富な経験を有しているが、本研究は同技術を新たに「イソフラボン類を起点とした腸上皮機能制御機構」の解析に応用・展開することにより、新たな疾患発症機構の解明を試みようとするものである。

## 3. 研究の方法

診断・治療目的で大腸内視鏡を実施した患者の大腸生検組織よりヒト腸上皮オルガノイドを樹立し、イソフラボン類などの添加による増殖能評価は3D スキャナーを用いてオルガノイド再構成試験により評価した。またゲニステインを添加したオルガノイドを用いて RTK-array assay、ウエスタンブロット、qPCR を行い、ゲニステイン下流の経路について評価を行なった上、EGFR、HGFR の発現を IBD 患者の手術検体を用いて免疫染色法にて同定した。2 チャンバー培養インサートを、オルガノイドを用いた 2 次元単層腸上皮上に配置することにより作成される創傷治癒モデルにより、蛍光顕微鏡又は共焦点顕微鏡を用いて創傷治癒への影響を検討した。

## 4. 研究成果

(1)イソフラボン類のうちゲニステインは腸上皮に作用し幹・前駆細胞の増殖能を抑制する

イソフラボン類の腸上皮への影響を患者由来大腸上皮オルガノイドを用いて検討したところ、ゲニステインを添加により腸管管腔測へ水の分泌・排出が促進され、内腔の急速な拡大・膨張が

誘導された。しかし同イソフラボン類であるダイゼインの添加では同様の応答は観察されなかった (図 1)。患者由来大腸上皮オルガノイドを用いてシングルセルからのオルガノイド再構成試験を行ったところ、ゲニステインの添加により、再構成したオルガノイドの個数や総断面積等の著しい低下を認めた。一方でゲニステインはエストロゲン類似作用を有することが知られているが、代表的なエストロゲンである  $17\beta$ -estradiol の添加でも増殖抑制効果は認められず、ゲニステイン同様に CFTR に作用しオルガノイドの膨化を誘導する PGE2 においても同様に増殖抑制効果は認められず、イソフラボン類のうちゲニステインが同作用を有することを明らかとした。(図 1)

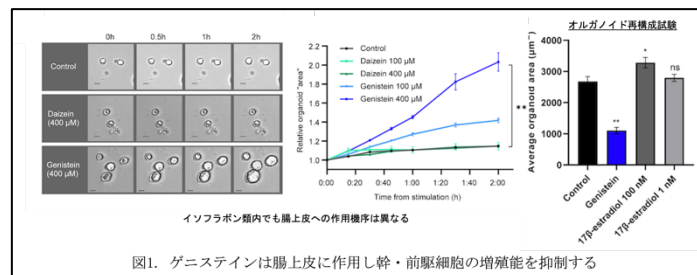


図1. ゲニステインは腸上皮に作用し幹・前駆細胞の増殖能を抑制する

(2)ゲニステインは EGFR、HGFR を阻害することにより大腸上皮幹・前駆細胞の増殖能を抑制する

既報によりゲニステインはヒトレセプターチロシンキナーゼ (RTK) のリン酸化抑制作用を持つと報告されているためヒト大腸上皮オルガノイドを用いて 49 種類の RTK に対する抗体をスポットしたアレイを用いてスクリーニングを行ったところゲニステインの添加により HGF および EGFR のリン酸化抑制を認め、ウェスタンブロットにより HGFR 阻害剤 SGX-523、PHA-665752 および EGFR 阻害剤 Erlotinib と同様にゲニステインが HGFR ないし EGFR のリン酸化を抑制することを確認している(図 2)。

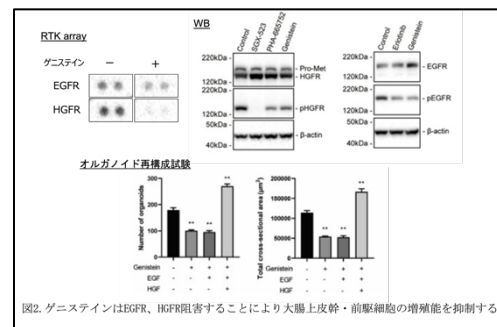


図2. ゲニステインはEGFR、HGFR阻害することにより大腸上皮幹・前駆細胞の増殖能を抑制する

HGF、EGFR の生体内での分布をヒト大腸手術検体やヒト腸上皮オルガノイドを用いて蛍光免疫染色法による解析したところ、腸上皮全体に EGFR/HGF 受容体が発現していることを明らかとした。HGF あるいは EGF の添加がゲニステインの腸上皮への効果に対して与える影響をヒト大腸上皮オルガノイドを用いて検討したところ EGF 添加のみではゲニステインによる抑制的な効果は改善を認めなかったが、HGF 単独あるいは HGF、EGF の同時添加によってゲニステイン添加による増殖能抑制の著大な改善を認めた。以上よりゲニステインは大腸上皮において EGFR、HGFR を抑制することにより大腸上皮幹・前駆細胞の増殖能を抑制することを明らかとした (図 2)。

(3)ゲニステインは大腸上皮において創傷治癒を遅延するゲニステインの腸上皮での役割を検討するため患者由来組織から樹立し大腸上皮オルガノイドを用い、2次元単層上皮(モノレイヤー)をトランスウェル上に形成させ、創傷治癒モデルとして評価・解析を行なった。確立済みの経時的画像解析法(MVP 法を用いた細胞動態の定量解析)により間隙閉鎖率と創傷治癒速度( $\mu \text{ m}^2/\text{h}$ )を計測したところ、

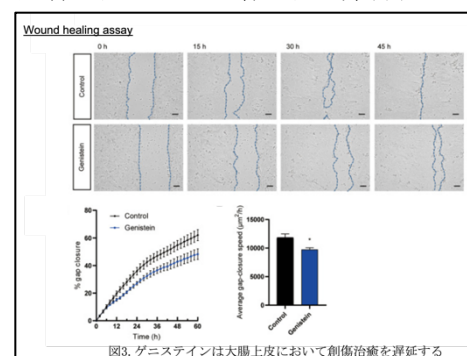


図3. ゲニステインは大腸上皮において創傷治癒を遅延する

ゲニステイン投与群で有意な低下を認め、ゲニステイン投与により創傷治癒が遅延することを明らかとした (図 3)。

以上より、ゲニステインが EGFR や HGFR 経路を含む分子経路を介して幹/前駆細胞機能および創傷治癒能力を調節する作用を有することを明らかとした。ヒト大腸上皮の創傷治癒反応に関するゲニステインの新たな機能的側面を明らかとした本研究は、イソフラボン類の一つであ

る食餌因子ゲニステインが潰瘍性大腸炎の発症や増悪へ関与していることを示唆するものである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kaneshiro M, Takenaka K, Suzuki K, Fujii T, Hibiya S, Kawamoto A, Motobayashi M, Shimizu H, Nagahori M, Saito E, Okamoto R, Ohtsuka K, Watanabe M.	4. 巻 53(8)
2. 論文標題 Pancolonic endoscopic and histologic evaluation for relapse prediction in patients with ulcerative colitis in clinical remission	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aliment Pharmacol Ther.	6. 最初と最後の頁 900-907
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/apt.16310.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takenaka K, Kawamoto A, Hibiya S, Suzuki K, Fujii T, Motobayashi M, Shimizu H, Nagahori M, Saito E, Okamoto R, Watanabe M, Ohtsuka K.	4. 巻 754(8)
2. 論文標題 Higher concentrations of cytokine blockers are needed to obtain small bowel mucosal healing during maintenance therapy in Crohn's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aliment Pharmacol Ther.	6. 最初と最後の頁 1052-1060
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/apt.16551.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takenaka K, Fujii T, Kawamoto A, Suzuki K, Shimizu H, Maeyashiki C, Yamaji O, Motobayashi M, Igarashi A, Hanazawa R, Hibiya S, Nagahori M, Saito E, Okamoto R, Ohtsuka K, Watanabe M.	4. 巻 7(3)
2. 論文標題 Deep neural network for video colonoscopy of ulcerative colitis: a cross-sectional study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Lancet Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 230-237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/S2468-1253(21)00372-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu H, Fujii T, Kinoshita K, Kawamoto A, Hibiya S, Takenaka K, Saito E, Nagahori M, Ohtsuka K, Watanabe M, Okamoto R.	4. 巻 21(1)
2. 論文標題 Intravenous tacrolimus is a superior induction therapy for acute severe ulcerative colitis compared to oral tacrolimus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 494
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12876-021-02043-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河本亜美、竹中健人、岡本隆一
2. 発表標題 クローン病における小腸潰瘍に対するLRGの有効性
3. 学会等名 JDDW 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河本亜美、竹中健人、日比谷秀爾、藤井俊光、齊藤詠子、清水寛路、本林麻衣子、長堀正和、大塚和朗、渡辺守、岡本隆一
2. 発表標題 クローン病の活動性小腸病変に対するLRGの有効性
3. 学会等名 GI Week 2022
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------