

令和 5 年 6 月 9 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：21K15992

研究課題名（和文）潰瘍性大腸炎におけるIL-12/23サイトカイン・ネットワークの解明

研究課題名（英文）Investigation of IL-12/23 pathway in ulcerative colitis

研究代表者

清水 寛路（Shimizu, Hiromichi）

東京医科歯科大学・統合研究機構・助教

研究者番号：00733875

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）：IL-12/23は炎症を引き起こす複雑なサイトカイン・ネットワークの構成分子であり、潰瘍性大腸炎治療における一つの重要な治療ターゲットである。抗IL12/23抗体製剤は、IL-12/23を特異的に阻害することで治療効果を発揮する。本研究はIL-12/23阻害が効果を発揮する仕組み、すなわち腸管粘膜のどの構成細胞を標的とするのか、如何なる分子機序を介して効果を発揮するのかを解析し、その治療効果が決定される条件を、臨床情報と患者由来の組織検体を用いたシングルセル解析を行なって解明を試みた。分子メカニズムの解明にはさらなる解析が必要であったが、臨床情報から治療効果予測に有用な因子が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎の治療における分子標的薬は、腸管で炎症を引き起こす複雑なサイトカイン・ネットワークの、特異的な経路を阻害して効果を発揮する。しかし、抗IL-12/23抗体製剤が、どの種類の細胞を標的とし、どのように障害された腸粘膜を治癒するのか、そのメカニズムはよくわかっていない。本研究は、患者の臨床情報と患者由来の組織検体の解析を通じて、分子標的薬のひとつ抗IL-12/23抗体製剤の作用メカニズムの解明と、治療予測因子の同定を試みることで、抗IL-12/23抗体製剤の治療効果予測の解明を目標とした研究である。

研究成果の概要（英文）：Ulcerative colitis is an idiopathic disease which causes chronic inflammation in colon. For the treatment of ulcerative colitis, anti-inflammatory agents are used such as corticosteroid, immune-modulator and biologic agents. Anti-IL-12/23 anti-body is one of biologic agent blocking specific pro-inflammatory IL-12/23 pathway in colonic tissue. IL-12/23 pathway is a proinflammatory cytokine in ulcerative colitis, interacting numerous other pathways to exacerbates colitis. This study, analyzing patient derived colonic tissue, was aiming to find out in which cells IL-12/23 has any effects, how anti-IL-12/23 antibody reduces and blocks proinflammatory response in colonic tissue, and what is the key biomarkers and/or conditions that determine its treatment efficacy. We underwent single-cell RNA analysis on organoids generated from colonic tissue derived from the patients with ulcerative colitis.

研究分野：再生医療研究

キーワード：潰瘍性大腸炎 IL-12/23 大腸オルガノイド

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患のひとつ、潰瘍性大腸炎は大腸に原因不明の炎症と潰瘍を起こす慢性疾患である。治療には炎症制御を主な効果とする副腎皮質ステロイド、免疫調節薬や抗 TNF 抗体等の生物学的製剤が用いられる。しかしながらこれら治療薬のいずれに対しても抵抗性あるいは無効な「難治性潰瘍」が残存する例が存在することから、なお炎症の制御と「潰瘍の治癒」が両立可能な新治療の開発が望まれている。抗 IL-12/23 抗体製剤は 2020 年 3 月より本邦で潰瘍性大腸炎の治療に臨床導入され、直接的あるいは間接的に多彩な粘膜構成細胞を標的候補とする新規生物学的製剤である。本研究では抗 IL-12/23 抗体製剤の大腸における効果を、研究代表者らが既に確立しているオルガノイド共培養システムやシングルセル遺伝子解析システムを用いて、粘膜を構成する細胞種横断的に、すなわち免疫担当細胞・間葉系細胞・腸上皮細胞にそれぞれについて分子生化学的・機能的解析を行って、同薬剤が各細胞に対してどのように効果を発揮し、同時に治療効果の有無が決定されるのか、その全体像を描出することを目指す。本研究の遂行により、複数のサイトカインシグナルが収束かつ開始される「IL-12/23 サイトカインネットワーク」が、如何にして免疫担当細胞-腸上皮細胞-間葉系細胞・連関の中で難治性潰瘍性大腸炎の病態を制御しているのかという問い、つまり疾患特異的な「IL-12/23 サイトカインネットワーク・プロファイル」を解明し、「炎症の制御」と「上皮再生」が達成可能な「治療最適化」の基盤構築が期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究は難治性潰瘍性大腸炎に対する抗 IL-12/23 抗体製剤の効果を、患者由来組織検体を用いた解析を実施することにより、細胞・分子レベルで網羅的に描出・解明することを目的としている。さらに同解析結果から抗 IL-12/23 抗体製剤治療の効果を規定する要件を見出し、「炎症の制御」と「潰瘍の治癒(上皮の再生)」の両者に対する治療効果予測指標・適切な効果判定指標を設定できる基盤を構築することで、難治性潰瘍性大腸炎に対する最適化した新たな治療体系の構築を目標とする。

### 3. 研究の方法

1) 大腸粘膜構成細胞群におけるシングルセル遺伝子解析系の構築 (令和 3 年度): 健常者及び活動期・寛解期の潰瘍性大腸炎患者より得られた内視鏡生検組織を用い、免疫担当細胞・腸上皮細胞・間葉系細胞各々の細胞群について、単一細胞レベルの遺伝子発現情報を広汎に解析可能な系の構築と検証を実施する。この為、既に腸上皮細胞において構築済みのシングルセル解析系 (*J Gastroenterol*, 2018) を新たに免疫担当細胞・間葉系細胞に対し最適化する。必要に応じ各細胞の短期培養を行うほか、既に構築済みの MultiplexPCR 法による最大 96 遺伝子の同時解析系から、RNA-seq による網羅性の高い解析へ拡張する。

2) 抗 IL-12/23 抗体製剤投与による「IL-12/23 サイトカインネットワーク・プロファイル」を解析 (令和 3 年度): 同一症例の抗 IL-12/23 抗体製剤導入前、導入後 8 週における大腸内視鏡検査を行い、大腸組織の生検検体を採取する。疾患活動性に関する臨床的評価(臨床スコア・内視鏡スコア)に紐づけて同組織の病理学的評価を行い、併せて免疫担当細胞・腸上皮細胞・間葉系細胞における「IL-12/23 サイトカインネットワーク・プロファイル」について免疫組織学的に解析を加える。これにより、同薬剤の主たる標的細胞・標的分子の絞り込み・同定を試みる。

3) 抗 IL-12/23 抗体製剤投与による粘膜構成細胞群応答・細胞間連関の解析 (令和 3~4 年度): 1) が完了次第、抗 IL-12/23 抗体製剤導入前及び導入後 8 週における大腸内視鏡検査により得られた生検組織を用い、免疫担当細胞・腸上皮細胞・間葉系細胞について、各々単一細胞レベルの広汎遺伝子発現情報を取得する。これら情報を臨床的な有効例・無効例に分け健常者と比較し有効例・無効例において各細胞群内で特異的に変動する遺伝子・シグナル経路、有効例において同一細胞群間で共通した変動を示す遺伝子・シグナル経路、有効例において異なる細胞群間に共通して変動を示す遺伝子・シグナル経路の抽出・解析を実施する。これら情報に基づき、3 種の異なる細胞群で構成される疾患特異的な「IL-12/23 サイトカインネットワーク・プロファイル」の描出と、潰瘍性大腸炎における抗 IL-12/23 抗体製剤の中核となる標的細胞・分子について仮説モデルを構築する。

4) 抗 IL-12/23 抗体製剤投与による「IL-12/23 サイトカインネットワーク」に対する効果の

**【1 研究目的、研究方法など(つづき)】**

in vitro モデルにおける検証 (令和 4 年度) : 3)にて得られた仮説モデルを in vitro 培養系において再現し、検証を行う。確立済みのオルガノイド共培養系を用い、炎症性サイトカイン・抗 IL-12/23 抗体製剤等を添加する事により、炎症環境下と抗 IL-12/23 抗体製剤投与下における各細胞群の応答、並びに免疫担当細胞-腸上皮オルガノイド間や間葉系細胞-腸上皮オルガノイド間の細胞間連関(細胞間相互作用)について解析を行う。

5) 「IL-12/23 サイトカインネットワーク・プロファイル」に基づく治療効果予測因子・効果判定因子の探索(令和 4 年度) : 3)にて得られた応答情報と導入 8 週目以降の臨床情報(粘膜治癒の有無・寛解維持期間・再燃様式・手術の有無等)を統合的に解析する事により、抗 IL-12/23 抗体製剤投与時における治療効果予測因子及び想起の効果判定を行う際に適切な因子の同定が可能かどうか探索する。

**4 . 研究成果**

1. シングルセル遺伝子解析系を大腸粘膜構成細胞群において可能とするため、まず潰瘍性大腸炎(UC)患者由来の大腸オルガノイド、およびクローン病(CD)患者由来の大腸オルガノイドの初代培養を樹立した。この培養腸管上皮細胞を用いて、マイクロ流路系と MultiplexPCR 法によるシングルセル解析の条件検討を行った。この結果、当研究室で確立した手法、つまり小腸オルガノイドを用いた既報(J Gastroenterol)とほぼ同じ条件にてシングルセルレベルの細胞分離、RNA の抽出及び逆転写反応が実施できた。

2. 次に、このシングルセル遺伝子発現データについて主成分解析を行ったところ、大腸オルガノイドの UC と CD の間には明らかな差異は認めなかった。同一患者由来の小腸オルガノイド(n=6)と大腸オルガノイド(n=5)の間には異なる分布を認め、上皮細胞の採取部位による差異を検出することが確認された。

3. IL-12/23 抗体製剤投与を行なった対象患者 44 症例について、治療開始前の患者背景の抽出と、内視鏡的疾患活動性評価、生検を実施し病理学的評価を行なった。これら因子と、治療開始後の治療効果の関連性について解析を行い、過去の生物学的製剤使用歴が負の治療効果予測因子として抽出された。また、治療後 8 週時点での寛解症例はその後 56 週まで有意に治療継続が可能であった。対象患者のうち 13 症例は入院を要する重症例であったが、これらのうち治療開始後 3 日で臨床的活動度の改善が見られる症例は、有意に寛解を得ることができ、予測因子になり得ると考えられた。以上より、大腸粘膜構成細胞群におけるシングルセル遺伝子解析系の構築に成功した。IL-12/23 抗体製剤を投与した対象患者背景と内視鏡検査、病理学的評価から治療効果予測因子を見出した。治療開始後の経過も長期的な治療効果予測に有用である可能性が示唆された。

## 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 4件）

1. 著者名 Tsuchiya M, Ito G, Hama M, Nagata S, Kawamoto A, Suzuki K, Shimizu H, Anzai S, Takahashi J, Kuno R, Takeoka S, Hiraguri Y, Sugihara HY, Mizutani T, Yui S, Oshima S, Tsuchiya K, Watanabe M, Okamoto R.	4. 巻 Jan 20
2. 論文標題 Functional analysis of isoflavones using patient-derived human colonic organoids.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 542, 547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.01.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kuno R, Ito G, Kawamoto A, Hiraguri Y, Sugihara HY, Takeoka S, Nagata S, Takahashi J, Tsuchiya M, Anzai S, Mizutani T, Shimizu H, Yui S, Oshima S, Tsuchiya K, Watanabe M, Okamoto R.	4. 巻 Jan 11
2. 論文標題 Notch and TNF-alpha signaling promote cytoplasmic accumulation of OLFM4 in intestinal epithelium cells and exhibit a cell protective role in inflamed mucosa of IBD patients.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep	6. 最初と最後の頁 100906, 100906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100906	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu H, Fujii T, Hibiya S, Motobayashi M, Suzuki K, Takenaka K, Saito E, Nagahori M, Ohtsuka K, Watanabe M.	4. 巻 19
2. 論文標題 Rapid prediction of 1-year efficacy of tofacitinib for treating refractory ulcerative colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Intestinal Research	6. 最初と最後の頁 115, 118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5217/ir.2020.00030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiromichi Shimizu, Toshimitsu Fujii, Kenji Kinoshita, Ami Kawamoto, Shuji Hibiya, Kento Takenaka, Eiko Saito, Masakazu Nagahori, Kazuo Ohtsuka, Mamoru Watanabe and Ryuichi Okamoto	4. 巻 21
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 Gastroenterology	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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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