

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
分担研究報告書

タイトル 免疫難病に対する先駆的治療薬開発 生物製剤を中心とした早期臨床試験拠点の医・薬集学的整備によるFIMの実施とPOCの確立

研究分担者 金井 隆典 慶應義塾大学医学部消化器内科 教授
研究分担者 佐藤 俊朗 慶應義塾大学医学部消化器内科 特任准教授

研究要旨：消化器免疫難病である潰瘍性大腸炎は、近年の免疫統御療法の進歩により患者のQOLは向上しているが、重症潰瘍性大腸炎患者は大腸全摘術が余儀なくされている。本研究において、我々は腸管粘膜のバリアー機能の回復を目指した粘膜再生治療の開発を目指している。粘膜再生治療 First In Human 試験の実現のため、平成 25 年度は内視鏡的な粘膜移植技術の改善のため、大動物を用いた移植方法、線維芽細胞との共培養による移植細胞の安定性改善と低コスト化、培養細胞の GMP 化に取り組んだ。今後、安定した腸管上皮幹細胞の内視鏡的移植技術の確立と GMP 準拠プロトコールによる腸管上皮幹細胞培養技術を推進する。

A．研究目的

炎症性腸疾患の患者数は日本国内で 10 万人以上であり、その大部分を占める潰瘍性大腸炎は若年者を中心に近年増加傾向にある。最近の免疫統御療法の発展により、従来の治療に抵抗性の潰瘍性大腸炎に対しても、タクロリムスや抗 TNF α 抗体などの投与により病勢をコントロールすることが可能となった。しかしながら、これらの免疫統御療法にも抵抗性を示し、大腸全摘術を施行せざるを得ない難治例の数は減っておらず、難治症例に対する治療方法が課題となっている。我々は、こうした難治例では粘膜再生障害が遷延していることを見出し、腸管上皮バリアーの破綻が腸内抗原や細菌の粘膜内への侵入と炎症の難治化を引き起こしていると考えた。引き起こされた炎症はさらに腸管上皮細胞の増殖抑制による粘膜再生障害につながり、悪循環となっている。

このような悪循環を断ち切るために、今回我々は腸管上皮幹細胞治療による粘膜再生治療を考案した。実際に、近年の潰瘍性大腸炎の長期寛解導入は粘膜治癒と相関することが明らかになった。培養した皮膚上皮や角膜上皮が既に上皮の移植治療として成功している。しかし、培養方法などの技術的な問題点のため、腸管上皮に関しては未だ臨床応用されていない。

B．研究方法

我々は腸管上皮幹細胞培養技術を開発し (Sato T et al. Nature 2009)、ヒト細胞への応用にも成功した (Sato T et al. Gastroenterology 2011)。本技術はマウス腸炎モデルに対する培養細胞移植技術

の確立と治療効果から、粘膜再生治療の実現が期待された (Shiro Y et al. Nature Medicine 2012, Sato T et al. Science 2013)。我々は、本技術の臨床応用を視野に入れ、大動物 (ブタ) を用いた内視鏡的な培養腸管上皮細胞の移植技術の開発を推進している。

ブタから内視鏡的に腸管上皮粘膜を採取し、培養、レンチウィルスを用いた GFP 可視化を行う。さらに、線維芽細胞の培養法を確立し、共に内視鏡的に投与する。腸管上皮細胞の臨床グレードでの培養法確立のため、動物由来成分を含むマトリジェルの代替物のスクリーニング、また、Wnt 蛋白の安定化には血清が必要であり、化合物による Wnt 活性化を試みる。(倫理面への配慮)

前臨床試験であるが、動物実験に関する倫理に関しては慶應義塾大学医学部において動物実験計画が承認されている。

C．研究結果

ブタより内視鏡的に腸管上皮を採取し、ヒト腸管上皮幹細胞培養に準じた培養法により安定した培養に成功した。さらに、ヒト腸管粘膜線維芽細胞の安定長期培養を確立した。線維芽細胞と上皮幹細胞の共培養により、増殖因子の低減を図ることが可能となった。

レンチウィルスにより EGFP 標識した上皮細胞を用い、ブタ腸管粘膜への内視鏡的移植を行った。Autofluorescence Imaging を装備した内視鏡観察により、投与後の GFP 発現上皮細胞の患部への付着が確認できた。しかしながら、潰瘍形成後の炎症反応

が強く、培養細胞が生着・生存できることは確認できていない。潰瘍性大腸炎を擬似化したブタ腸管粘膜の腸炎モデルならびに、内視鏡的培養細胞の投与方法をさらに検討していきたい。

培養方法の臨床グレード化を目指し、マトリジェルの代替細胞外基質としてコラーゲン type1 に変更し、安定した培養に成功した。さらなる培養効率改善のために、ラミニンフラグメント添加による細胞外基質の安定化を検討している。また、Wnt - 3 の新しい技術で精製した Wnt タンパクを用い、腸管上皮幹細胞の維持が可能であることがわかった。

D . 考察

本研究は、臨床応用を視野に入れた粘膜再生療法の開発であり、内視鏡の施行が可能なブタを用い、非臨床試験を推進している。内視鏡を用いた腸管粘膜再生治療は前例がなく、容易ではないが、本施設は腸管上皮培養技術、大動物内視鏡設備、内視鏡治療における基礎開発技術の全てを有しており、十分な期待ができる。

E . 結論

日本発の難治性炎症性腸疾患に対する FIH 試験を計画し、大動物を用いた非臨床試験を推進している。培養技術の改善と大動物を用いた内視鏡粘膜再生治療モデルの開発に成功した。今後、FIH 試験の実現に向けてさらに研究を推進していく。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Nakaya T, Ogawa S, Manabe I, Tanaka M, Sanada M, Sato T, Taketo MM, Nakao K, Clevers H, Fukayama M, Kuroda M, Nagai R. KLF5 regulates the integrity and oncogenicity of intestinal stem cells. *Cancer Res*. 2014 (in press) PMID: 24626089
- 2) Mikami Y, Mizuno S, Nakamoto N, Hayashi A, Sujino T, Sato T, Kamada N, Matsuoka K, Hisamatsu T, Ebinuma H, Hibi T, Yoshimura A, Kanai T. Macrophages and Dendritic Cells Emerge in the Liver during Intestinal Inflammation and Predispose the Liver to Inflammation. *PLoS One*. 2014 2;9:e84619.
- 3) Mahe MM, Aihara E, Sato T, Shroyer NF.

Establishment of gastro-intestinal epithelia-organoids. *Current Protocols in Molecular Biology* (in press)

- 4) Sato T, Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science*. 2013;340:1190-4.
- 5) Sato T, Clevers H. Primary culture for small intestinal stem cells. *Methods in Molecular Biology*. 2013;945:319-28.
- 6) *Huch M[#], Bonfanti P[#], Boj SF[#], Sato T[#], Loomans CJ, van de Wetering M, Sojoodi M, Li VS, Schuijers J, Gracanin A, Ringnalda F, Begthel H, Hamer K, Mulder J, van Es JH, de Koning E, Vries RG, Heimberg H, Clevers H. Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. *EMBO J*. 2013 Oct 16;32(20):2708-21. [#]Equal authorship
- 7) Takabayashi K, Kashiwagi K, Kawata T, Sato T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Takaishi H, Hibi T, Ogata H, Yahagi N, Kitagawa Y, Shigematsu N, Kanai T. Continuous low-dose irradiation by I-125 seeds induces apoptosis of gastric cancer cells regardless of histological origin. *Cancer Biol Ther*. 2013;15.
- 8) *Hayashi A, Sato T, Kamada N, Mikami Y, Matsuoka K, Hisamatsu T, Hibi T, Roers A, Yagita H, Ohteki T, Yoshimura A, Kanai T. A single strain of *Clostridium butyricum* induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute experimental colitis in mice. *Cell Host Microbe*. 2013 12;13:711-22.
- 9) Miyoshi J, Matsuoka K, Inoue N, Hisamatsu T, Ichikawa R, Yajima T, Okamoto S, Naganuma M, Sato T, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Hibi T. Mucosal healing with oral tacrolimus is associated with favorable medium- and long-term prognosis in steroid-refractory/dependent ulcerative colitis patients. *J Crohns Colitis*. 2013. 15;7:e609-14.
- 10) Miyake M, Toguchi H, Nishibayashi T, Higaki K, Sugita A, Koganei K, Kamada N, Kitazume MT, Hisamatsu T, Sato T, Okamoto S, Kanai T, Hibi T. Establishment of novel prediction system of intestinal absorption in humans using

human intestinal tissues. J Pharm Sci. 2013;102:2564-71.

- 11) Yoneno K, Hisamatsu T, Shimamura K, Kamada N, Ichikawa R, Kitazume MT, Mori M, Uo M, Namikawa Y, Matsuoka K, Sato T, Koganei K, Sugita A, Kanai T, Hibi T. TGR5 signalling inhibits the production of pro-inflammatory cytokines by in vitro differentiated inflammatory and intestinal macrophages in Crohn's disease. Immunology. 2013;139:19-29.
- 12) Matsumoto A, Kanai T, Mikami Y, Chu PS, Nakamoto N, Ebinuma H, Saito H, Sato T, Yagita H, Hibi T. IL-22-producing ROR γ t-dependent innate lymphoid cells play a novel protective role in murine acute hepatitis. PLoS One. 2013;8:e62853.
- 13) Handa T, Kanai T, Sato T, Mikami Y, Sujino T, Hayashi A, Mizuno S, Matsumoto A, Hisamatsu T, Hibi T. Dendritic cells administered intrarectally penetrate the intestinal barrier to break intestinal tolerance via Th2-mediated colitis in mice. Immunol Lett. 2013;150:123-9.
- 1) 佐藤俊朗. Wnt シグナルによる消化器上皮幹細胞制御. Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌. 2014:152-155
- 2) 南木康作, 藤井正幸, 佐藤俊朗. 腸の再生機構. 幹細胞研究と再生医療. 中内啓光編. 南江堂 2013 年 p61-68
- 3) 股野麻未, 佐藤俊朗. 大腸がん幹細胞の機能解析法. がん基盤生物学-革新的シーズ育成に向けて- 清木元治 編 南江堂 2013 年 p42-45
- 4) 半田単己, 佐藤俊朗. 腸管上皮幹細胞の加齢・老化とそれに伴う関連疾患. 内分泌・糖尿病・代謝内科 2013;37:198-202
- 5) 佐藤俊朗. Wnt シグナルを利用した消化器組織再生技術“オルガノイド培養”の開発. 細胞工学 2013;32:421-424
- 6) 佐藤俊朗. 腸管上皮幹細胞の老化. Anti-Aging Medicine. 2013;9:47-52
- 7) 佐藤俊朗. 腸管上皮幹細胞ニッチによる幹細胞制御機構. 分子消化器病 2013;10:17-21

2. 学会発表

- 1) 佐藤俊朗. ミニ組織技術を用いた大腸がん幹細胞制御機構の解明. がん研究分野の特性等を

踏まえた支援活動 公開シンポジウム 一橋講堂, 竹橋 2014 年 1 月 30 日.

- 2) 佐藤俊朗. 幹細胞ニッチシグナルによる腸管上皮幹細胞制御機構. 大阪大学蛋白質研究所セミナー. 細胞が集団になって初めて発現する機能. 大阪大学蛋白質研究所 2013 年 11 月 28 日
- 3) Toshiro Sato. Molecular mechanism of intestinal stem cell self-renewal: Stem cells and their niche signals. The graduate course in Molecular and Developmental Biology. (Prof. Noah Shroyer & Prof. James Wells) Cincinnati Children's. USA. 2013.11.13
- 4) Toshiro Sato. Molecular mechanism of intestinal stem cell self-renewal: Stem cells and their niche signals. University of Michigan Center for Organogenesis Seminar. (Prof. Linda Samuelson & Prof. Jason Spence) University of Michigan Center, USA. 2013.11.12
- 5) Toshiro Sato, Ai Takano, Shoichi Date, Mami, Matano, Mariko Shimokawa, Takanori Kanai. Molecular mechanism of intestinal carcinogenesis; Stem cells and their niche signals. Symposia 12, Aberrant signal transduction and therapeutic strategy for molecular target. 第 72 回 日本癌学会学術総会 横浜 2013 年 10 月 3 日
- 6) 佐藤俊朗 腸管上皮幹細胞培養技術の確立～幹細胞ニッチと自己複製機構の解明～. 第 6 回 Symphony 飯田橋 2013 年 9 月 22 日
- 7) Toshiro Sato, Mami Matano, Shoichi Date, Ai Takano, Mariko Shimokawa. Molecular mechanism of intestinal stem cell self-renewal: Stem cells and their niche signals. International Symposium 3. Molecular mechanisms for the growth and differentiation of tissue-specific stem cells in mammals. 第 86 回日本生化学会大会 横浜 2013 年 9 月 11 日
- 8) Toshiro Sato. Establishment of intestinal stem cell culture: basic and application. European Cancer Stem Cells Research meeting. Cardiff Univ. UK. Invited Speaker 2013.7.25
- 9) Toshiro Sato. Establishment of patient-derived colorectal cancer/adenoma organoid culture system: an application to tubulology. 1st International Meeting for

Epithelial Tubulology (Sapporo) 2013.6.22

- 10) **佐藤俊朗** 腸管上皮幹細胞の自己複製機構：幹細胞ニッチと発がん 第13回GIリサーチフォーラム 東北大学 2013年6月19日
- 11) **佐藤俊朗** 消化器幹細胞培養による組織再生技術 基礎から応用 徳島大学疾患酵素学研究所 セミナー 徳島大学2013年5月23日
- 12) **Toshiro Sato**. Long-term culture system for human intestinal stem cells and cancer. Methods Workshop: Stem Cells, Enteroids and Organoids: A New Era for In Vitro Models of the Intestine. American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2013. Invited Speaker. Washington DC, USA. 2013.4.6

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

名称: Culture medium for epithelial stem cells and organoids comprising the stem cells

発明者: Toshiro Sato, Johannes Carolus Clevers

権利者: Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen

種類: 特許

番号: US 864229 B2

取得年月日: 2014年2月4日

国内外の別: 海外

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし