

厚生労働科学研究費補助金
医療技術実用化総合研究事業（早期探索的・国際水準臨床研究事業）
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—
—潰瘍性大腸炎に対する粘膜再生治療法のFirst in Man試験—

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26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培養技術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、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、PiggyBacベクターを用いたGFP可視化を行う。内視鏡的な粘膜傷害モデルを作製し、GFP標識オルガノイドの内視鏡的移植投与を行う。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、GMP準拠グレードのWnt活性化方法を考案する。

（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

当該研究期間では、体重20kg程度で1年間以上飼育できるマイクロミニブタを導入し、内視鏡的腸管上皮オルガノイド移植実験の効率化を図った。EDTAによる上皮剥離モデル、生検鉗子による粘膜損傷モデルを作製し、マトリジェルおよびフィブリンなどを生体糊を用いて、培養オルガノイドの生着に成功した。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生着が1週間程度確認できた。

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 typeI 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行ったが、代替には成功できていない。新しい技術で精製した Wnt タンパクとその安定化方法により、無血清で腸管上皮幹細胞の維持することに成功した。本技術により、より安全性の高い培養技術を確立できると考えられる。

D. 考察

本研究は、免疫統御療法不応性の重症潰瘍性大腸炎患者の新規粘膜再生療法の開発・応用を目指し、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。培養上皮細胞を用いた腸管粘膜再生治療は未だ達成されていない技術であるが、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。ブタへの内視鏡粘膜移植により、1週間程度の生着が確認でき、今後、さらなる生着期間の延長と粘膜再生の治療効果の検討を行う。

E. 結論

日本発の難治性炎症性腸疾患に対する FIIH 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、FIIH 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) Combination Therapy with Infliximab and Thiopurine Compared to Infliximab Monotherapy in Maintaining Remission of Postoperative Crohn's Disease. Sakuraba A, Okamoto S, Matsuoka K, Sato T, Naganuma M, Hisamatsu T, Iwao Y, Ogata H, Kanai T, Hibi T. *Digestion*. 2015;91:233-238.
- 2) Ink4a/Arf-dependent Loss of Parietal Cells Induced by Oxidative Stress Promotes CD44-dependent Gastric Tumorigenesis. Seishima R, Wada T, Tsuchihashi K, Okazaki S, Yoshikawa M, Oshima H, Oshima M, Sato T, Hasegawa H, Kitagawa Y, Goldenring JR, Saya H, Nagano O. *Cancer Prev Res*. 2015 Mar 26. pii: canprevres.0025.2015. [Epub ahead of print]
- 3) Modeling colorectal cancer using

CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, Sato T. *Nat Med*. 2015 Mar;21(3):256-62. doi: 10.1038/nm.3802. Epub 2015 Feb 23.

- 4) Suppressing TGF β signaling in regenerating epithelia in an inflammatory microenvironment is sufficient to cause invasive intestinal cancer. Oshima H, Nakayama M, Han TS, Naoi K, Ju X, Maeda Y, Robine S, Tsuchiya K, Sato T, Sato H, Taketo MM, Oshima M. *Cancer Res*. 2015 Feb 15;75(4):766-76. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2036.
- 5) An individual based computational model of intestinal crypt fission and its application to predicting unrestrictive growth of the intestinal epithelium. Pin C, Parker A, Gunning AP, Ohta Y, Johnson IT, Carding SR, Sato T. *Integr Biol (Camb)*. 2015 Feb;7(2):213-28. doi: 10.1039/c4ib00236a.
- 6) Transformation of intestinal stem cells into gastric stem cells on loss of transcription factor Cdx2. Simmini S, Bialecka M, Huch M, Kester L, van de Wetering M, Sato T, Beck F, van Oudenaarden A, Clevers H, Deschamps J. *Nat Commun*. 2014 Dec 11;5:5728. doi: 10.1038/ncomms6728.
- 7) Classical Th1 cells obtain colitogenicity by co-existence of ROR γ t-expressing T cells in experimental colitis. Saigusa K, Hisamatsu T, Handa T, Sujino T, Mikami Y, Hayashi A, Mizuno S, Takeshita K, Sato T, Matsuoka K, Kanai T. *Inflamm Bowel Dis*. 2014 Oct;20(10):1820-7. doi: 10.1097/MIB.0000000000000149.
- 8) Cross-talk between ROR γ t+ innate lymphoid cells and intestinal macrophages induces mucosal IL-22 production in Crohn's disease. Mizuno S, Mikami Y, Kamada N, Handa T, Hayashi A, Sato T, Matsuoka K, Matano M, Ohta Y, Sugita A, Koganei K, Sahara R, Takazoe M, Hisamatsu T, Kanai T. *Inflamm Bowel Dis*. 2014 Aug;20(8):1426-34. doi: 10.1097/MIB.0000000000000105.
- 9) Macrophages and dendritic cells emerge in the liver during intestinal inflammation and predispose the liver to inflammation. 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. *PLoS One*. 2014 Jan 2;9(1):e84619. doi: 10.1371/journal.pone.0084619.

eCollection 2014.

- 10) Continuous low-dose irradiation by I-125 seeds induces apoptosis of gastric cancer cells regardless of histological origin. 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. Cancer Biol Ther. 2014 Jan;15(1):81-8. doi: 10.4161/cbt.26610. Epub 2013 Oct 22.
- 11) Intestinal tumor in a dish. Ohta Y, Sato T. Front Med (Lausanne). 2014 May 30;1:14. doi: 10.3389/fmed.2014.00014. eCollection 2014.
- 12) Culturing intestinal stem cells: applications for colorectal cancer research. Fujii M, Sato T. Front Genet. 2014 Jun 5;5:169. doi: 10.3389/fgene.2014.00169. eCollection 2014. Review.

2 学会発表

- 1) Toshiro Sato. American Association of Cancer Research (AACR) annual meeting 2015. Modelling of colorectal cancer using CRISPR/Cas9 mediated engineering of human intestinal organoids. Pennsylvania Convention Center
- 2) 佐藤俊朗・第29回日本医学会総会 2015 関西. 消化器幹細胞の培養技術確立と再生医療への応用. 京都国際会議場. 2015年4月12日
- 3) 佐藤俊朗. 第14回日本再生医療学会総会. 腸管上皮幹細胞のニッチ制御機構. パシフィコ横浜. 2015年3月19日
- 4) 佐藤俊朗. 愛媛大学 大学院医学研究科セミナー ミニ組織培養技術の大腸がん研究への応用. 愛媛大学. 2015年2月17日
- 5) 佐藤俊朗. 中外製薬株式会社 御殿場研究所セミナー. ミニ組織化技術の大腸がん研究への応用. 中外製薬 御殿場研究所. 2015年1月30日
- 6) 佐藤俊朗. Recent Advance in Tumor Angiogenesis 2015. 大腸オルガノイド培養系の大腸がん研究へのインパクト. グランドホテル浜松. 2015年1月24日
- 7) 佐藤俊朗. 第8回 In vivo 実験医学シンポジウム. ヒト大腸がんミニ組織技術による新しい生体内がん再構築モデルの確立. 学士会館. 2014年11月13日
- 8) 佐藤俊朗. ヒト腸管上皮細胞培養の応用: ニッチシグナルと大腸がん. セッションII. 第一回六

甲医学研究会. 六甲山ホテル. 2014年11月7日

- 9) Toshiro Sato. The impact of intestinal Organoid culture system on colorectal cancer research. Paradigm shift in colorectal cancer research. 第73回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2014年9月26日
- 10) Toshiro Sato. Establishment and Applications of Intestinal Stem Cell Culture system; Stem Cell Niche and Cancer. The 33rd Sapporo International Cancer Symposium. Royton Spposo, Sapporo, 2014. 6.27.
- 11) 佐藤俊朗, 太田悠木 細胞外環境による腸管上皮幹細胞制御とがん化機構. Basic Science 4. 第14回日本抗加齢医学会総会. 大阪国際会議場. 2014年6月8日.
- 12) Toshiro Sato. Establishment and Applications of Intestinal Stem Cell Culture system; Stem Cell Niche and Cancer. GI Research Academy. Royal Park Hotel. Tokyo. 2014.6.6
- 13) Toshiro Sato, Yuki Ohta, Ai Takano, Shoichi Date, Mamiko Matano, Mariko Shimokawa. The Self-renewing Mechanism of Intestinal Stem Cell: Niche and Cancer, Symposium 2. 47th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists and Asia Pacific Developmental Biology Network, WINK AICHI, Nagoya, 2014. 5.28.
- 14) Toshiro Sato. Establishment and Applications of Intestinal Stem Cell Culture System. Invited Lecture. Annual International Workshop on Mucosal Immunology and Vaccine for Young Investigators. Organized by The Institute of Medical Science, The University of Tokyo. 2014. 5.23.
- 15) 佐藤俊朗. 腸管幹細胞とそのニッチ. 特別講演. 京都大学再生医科学研究所公開シンポジウム. 京都. 2014年5月13日.
- 16) 佐藤俊朗, Hans Clevers, 金井隆典. 消化管上皮幹細胞培養の基盤と応用. シンポジウム1, 消化管幹細胞研究の新たな展開. 第100回日本消化器病学会総会. 東京国際フォーラム, 東京. 2014年4月25日
- 17) 佐藤俊朗. 消化器ミニ組織培養の開発とその再生医療応用. ランチョンセミナー1. 第51回日本臨床分子医学会学術集会. 東京国際フォーラム. 2014年4月11日.
- 18) 佐藤俊朗. 腸管上皮幹細胞制御機構の解明: ニッチとがん. Meet The Expert. 熊本大学 臨床医学教育センター. 2014年3月6日.
- 19) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし