

201442060A

厚生労働科学研究委託費

(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)))

独自の体外病態モデルによる難治性炎症性腸疾患の  
革新的治療薬開発に関する研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 渡 辺 守

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究費委託事業による委託業務として、業務主任者 渡辺 守が実施した平成26年度「独自の体外病態モデルによる難治性炎症性腸疾患の革新的治療薬開発に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

## 序

潰瘍性大腸炎（UC）およびクローン病（CD）に代表される炎症性腸疾患（IBD）は、現在我が国においても患者数が17万人を超える原因不明の難治性疾患である。いまだ根本的な治療法が無く、若年発症患者が多いため日常生活の制限、学業・就労に大きな制限が生じ、QOLが大きく損なわれている患者も少なくない。その発症には環境因子による複雑な病態の関与が示唆されており、それぞれの病態に対し治療を行うため、多剤併用もしくは頻回の治療薬変更を余儀なくされることから、難病としての位置づけは未だ不変である。この現状を打破するために臨床研究者と基礎研究者の合体による革新的治療技術の開発は喫緊の課題である。

「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班は過去36年にわたり、炎症性腸疾患の現状・実態を調査し、発症病因や増悪因子を明らかにするとともに、本疾患群に対する厚生労働事業の主要な役割を担ってきたが、本年度からその一部を難治性疾患等実用化研究事業として、革新的医薬品開発をゴールとする基礎研究に特化した研究班として新しくスタートすることとなった。そこで、これまで「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究班」等の厚生労働省難治疾患克服事業において先進的な役割を果たしてきた現・前班長経験者を軸として、基礎のトップ研究者を加えた分野随一の体制を整え、革新的な医薬品開発を具体的な目標に掲げた病態解明を目的として本研究班を組織することができた。これまで継続して実りある研究成果を挙げていただいた諸先生のご賛同により、日本一のチームを構成できたことに深謝致したい。

本年度は10年計画という大きなプロジェクトの1年目ではあるが、分担研究者・協力研究者の諸先生のご協力により、班会議の使命である質の高い基礎研究で大きな成果を得ることができた。来年度以降、この研究班を更に発展させ、日本の総力をあげて取り組むことで、革新的医薬品の開発から炎症性腸疾患の自然史を変え、医療経済的・社会経済的問題解決に繋がる貢献が可能であると信じている。今後とも諸先生方のご協力を賜れば幸いである。

平成27年3月

業務主任者 渡辺 守

# 目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	1
独自の体外病態モデルによる難治性炎症性腸疾患の革新的治療薬開発に関する研究 渡辺 守（東京医科歯科大学大学院消化器病態学）	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
腸管上皮幹細胞制御探索プロジェクト	
疑似腸管モデルの構築に関わる技術開発	
腸管上皮初代培養細胞を用いた体外病態モデルの構築	5
渡辺 守（東京医科歯科大学大学院消化器病態学）	
腸管上皮幹細胞運命決定制御機構の解明	
腸管上皮幹細胞運命決定制御機構の解明	12
千葉 勉（京都大学大学院医学研究科消化器内科学）	
特殊な腸管上皮M細胞分化の分子メカニズム	16
大野 博司（理化学研究所統合生命医科学研究センター）	
潰瘍性大腸炎における胃型粘液形質発現	19
味岡 洋一（新潟大学大学院医歯学総合研究科）	
免疫制御探索プロジェクト	
IBD 患者病勢特異的マーカーの探索	
IBD 患者病勢特異的マーカー探索プロジェクト	21
日比 紀文（北里大学北里研究所病院炎症性腸疾患先進治療センター）	
クローン病患者における酸化ストレスに対する抗 TNF $\alpha$ 抗体の効果	23
松本 主之（岩手医科大学消化器内科消化管分野）	
IBD の新規バイオマーカーLRG の実用化に向けた免疫学的解析	25
飯島 英樹（大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学）	
炎症性腸疾患における LR11 の検討	28
鈴木 康夫（東邦大学佐倉病院医療センター佐倉病院内科）	

<b>IBD モデルマウスにおける免疫病態解析</b>	
炎症性腸疾患モデルを用いた免疫制御技術の開発	30
竹田 潔 (大阪大学大学院医学系研究科免疫制御学)	
DSS 腸炎に対する尿酸の抗炎症効果の検討	34
三浦総一郎 (防衛医科大学校)	
GMA モデルを用いた抗炎症効果の基礎的解析	37
石原 俊治 (島根大学医学部内科学講座第二)	
炎症性腸疾患モデルマウスにおける mTOR の役割	40
渡邊 聡明 (東京大学腫瘍外科)	
<b>病態特異的腸内細菌探索プロジェクト</b>	
<b>疾患特異的腸内細菌の探索</b>	
病態特異的腸内細菌探索プロジェクト	41
金井 隆典 (慶應義塾大学医学部内科学)	
<b>病態特異的腸内細菌探索プロジェクト：疾患特異的腸内細菌の探索</b>	
クローン病の病態形成に関与するクロストリジウム属細菌叢の検討	44
安藤 朗 (滋賀医科大学内科学講座消化器内科)	
<b>病勢相関性腸内細菌の探索</b>	
病勢相関性腸内細菌の探索	47
本田 賢也 (独立行政法人理化学研究所 統合生命科学研究センター)	
腸内細菌由来物質による IBD の病勢制御に関する研究	49
高後 裕 (旭川医科大学 消化器血液腫瘍制御内科学)	
<b>III. 学会等発表実績</b>	55
<b>IV. 研究成果の刊行物・別刷</b>	75
<b>V. 研究成果の刊行に関する一覧</b>	139
<b>VI. 知的財産権・社会活動報告</b>	141
<b>VII. 研究事業報告</b>	143
<b>VIII. 研究班構成</b>	151

# I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費

(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業)))

独自の体外病態モデルによる難治性炎症性腸疾患の革新的治療薬開発に関する研究

委託業務成果報告 (総括・業務項目)

独自の体外病態モデルによる難治性炎症性腸疾患の革新的治療薬開発に関する研究

業務主任者 渡辺 守 東京医科歯科大学消化器病態学 教授

研究要旨

炎症性腸疾患 (IBD) ではその発症に環境因子が大きな影響を与えることから複雑な病態の関与が示唆されており、それぞれの病態に対し治療を行うため多剤併用もしくは頻回の治療薬変更を余儀なくされる場面に直面し患者のQOLを低下させていることから、臨床研究者と基礎研究者の合体による革新的治療技術の開発は緊急の課題である。そのため本研究班は、これまで「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究班」等の厚生労働省難治疾患克服事業において先進的な役割を果たしてきた班長経験者を軸として、基礎のトップ研究者を加えた分野随一の体制を整え、革新的な医薬品開発を具体的な目標に掲げた病態解明を目的とする。各班員は粘膜免疫機構、ヒト・細菌相互作用、炎症による発癌機構、腸管再生機構の分野でそれぞれ質の高い研究を展開してきた。本研究班ではIBD病態と直結する「免疫制御」「腸内細菌」「腸管上皮幹細胞」を柱とした各個研究を集結し、独自に開発したヒト体外腸内環境モデルをさらに発展させ、複雑な各病態を体外モデル内に集約することで疾患を疑似化するという世界初の多病的病態モデルを確立させる。最終的にはこの病態モデルを用いて多数の作動点を有する革新的な医薬品の開発を行いIBD治療の簡略化を目指すものであり、本研究班のみで遂行可能な世界的評価に耐え得る独創的な研究である。初年度は各担当研究者が患者臨床検体を有効活用し、免疫制御、腸内細菌、腸管上皮幹細胞の病態の相互作用を抽出すると共に、体外での腸内環境モデル構築を完成させる。期待される成果としては、若年者の罹患が増加している本邦において、治療の簡略化、QOL向上による患者の社会活動向上は医療経済・社会経済ともに大きく貢献することが期待できる。さらにヒト細胞を用いた体外疾患モデルの構築は、医薬品開発における安全性試験を動物モデルからヒト環境に近い状況で行うことでより精度の高い評価を可能とし、新規医薬品実用化への時短化にも貢献できる。倫理面においてはプライバシーの保護を厳密に行い、各審査等で適切な審査・承認を受けて研究を遂行する。

A. 研究目的

炎症性腸疾患 (IBD) は未だ原因不明の難治性疾患であり、特に重症例は難病としての社会的立場づけからも病態究明と新規治療法開発が急務である。さらに若年者の罹患数が増加している現況では患者のQOL向上は医療経済・社会経済への貢献の点でも極めて重要である。また、これまでの研究から免疫抑制薬、プロバイオティクス等の医薬品が開発されたが、薬品の作動点は1つであることから不十分な作用を補完するため多剤の治療薬を併用する 경우가多く、治療の簡略化も必要である。炎症性腸疾患 (IBD) に関する革新的な医薬品の開発を行い、患者QOL向上と医療経済への貢献を通じた社会貢献を目指す。「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究班」との連携により臨床試料を最大限に活用し、新規治療法開発に直

結する「粘膜免疫-腸内細菌-腸管上皮幹細胞」相互作用機構を明らかとする。そこで本研究では病態と直結する「粘膜免疫」「腸内細菌」「消化管再生」研究を先進的に遂行してきた研究者を集結し、「ヒト腸内環境」を独自に構築した腸内環境モデルを用いて総合的に解析・評価を行う。三分野の相互関係を明らかとすることで多作動点を有し三分野を包含する革新的な治療薬を開発するという世界的にも独創的な研究を展開することを目的とする。

具体的なプロジェクト (p) 体系は以下の通りである。

【p-A プロジェクトの総合推進】

【p-B 上皮幹細胞制御探索プロジェクト】

- B-(1) 疑似腸管モデルの構築に関わる技術開発
- B-(2) 腸管上皮幹細胞運命決定制御機構の解明

### 【p-C 免疫制御探索プロジェクト】

- C-(1) IBD 患者病勢特異的マーカーの探索
- C-(2) IBD モデルマウスにおける免疫病態解析

### 【p-D 病態特異的腸内細菌探索プロジェクト】

- D-(1) 疾患特異的腸内細菌の探索
- D-(2) 病勢相関性腸内細菌の探索

p-A) プロジェクトの総合推進では、各プロジェクトとの連携及び炎症性腸疾患臨床研究班である厚生労働科学研究 難治性疾患克服研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班との連携・情報交換を通して、総合推進を図ることを目的とする。また実用化のために必要な研究課題を抽出し、適宜研究分担者・研究協力者を追加することで研究班の組織改変を図る。

p-B) 上皮幹細胞制御探索プロジェクトでは、腸管上皮細胞の特性・および疾患病態を明らかとするとともに、体外での病態疑似モデル構築を目指すものである。

p-C) 免疫制御探索プロジェクトでは、免疫担当細胞（リンパ球・抗原提示細胞など）の腸管環境恒常性維持に関わる機構および IBD 特異的病態を明らかとすることを計画した。

p-D) 病態特異的腸内細菌探索プロジェクトでは、腸内細菌叢の網羅的探索及び IBD 特異的腸内細菌を同定しその腸内環境に影響を及ぼす機能明らかとすることを目的とした。

(倫理面への配慮)

プロジェクトの遂行に当たっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」などに準じて、1) 倫理審査委員会で研究の適否などを議論・審査し承認を得る。2) 意義と必要性を説明しその自由意志に基づき同意を得られた場合にのみ検体提供を受ける。検体提供の有無により、治療など不利益を被ることはない。3) 個人のプライバシーの保護を厳密に行う。4) 希望に応じ検体提供者やその保護者への研究結果の説明を行う。5) 研究目的でのみ検体を使用し、その他の目的では使用しない等、人権及び利益の確保を行うよう配慮する。マウスの実験に関しても国際社会がヒトの健康のためとはいえども、実験および飼育管理の過程において動物に対して不

要な苦痛を与えないように努めるという人道的な配慮を求めていることを十分認識し、各大学の動物実験ガイドラインに沿って実施する。また臨床治験においては1) 倫理委員会及び医薬品等臨床研究審査委員会で審査し承認を得る。2) 被験者の自由意志に基づいて同意を得られた場合にのみ治験参加とする等の十分な配慮をおこなった。

### B. 研究成果

#### 平成 26 年度成果の総括

当初目的に掲げた研究計画を十分遂行することができた。初年度であったが複数のプロジェクトが着実に進行し、多くの論文発表を行い、当該領域の一流誌に多くの研究成果が掲載された。

以下に各々のプロジェクト研究の成果を記す。

#### 【p-A プロジェクトの総合推進】

本研究会発足の直後に班会議を企画し、難治性疾患克服研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班と合同で班会議を開催した。治療抵抗性や疾患分類などの協議から難治性の根幹に関わる病態の描出を合同会議にて共有することができた。また各プロジェクトにおける進捗状況を把握し、最終的な疑似モデル構築に必要なステップの確認、新規治療薬の標的となる候補の選定を行うなどプロジェクトの推進事項を確認した。さらに各プロジェクトの補完を目的として研究協力者を追加し班構成をより強固なものにしたことから、総合推進の目的は達成されている。

#### 【p-B 上皮幹細胞制御探索プロジェクト】

##### B-(1) 疑似腸管モデルの構築に関わる技術開発

独自に構築した初代培養の技術を用いて疑似モデルの構築を開始した。まずは初代培養細胞が体内と同様に腸内細菌、サイトカイン応答を作動するかを解析し、初代培養においても各種レセプターが発現し、サイトカイン、腸内細菌構造物の添加にて自然免疫応答が惹起されることを確認した。さらに長期炎症状態を再現するため、サイトカインを持続添加することにより長期炎症状態による腸管上皮細胞の形質転換を発見した。ヒトにおける初代培養系の構築も行い、クローン病患者の小腸内視鏡施行時に小腸生検検体から初代培養の構築、潰瘍性大腸炎患者の大腸内視鏡施行時に生検検体から初代培養の構築にそれぞれ成功している。また



横浜市立市民病院の IBD 手術検体からも東京までの輸送にもかかわらず初代培養が構築できることを確認しており、幅広い体制から患者検体の収集を行える基盤を構築した。

#### B-(2) 腸管上皮幹細胞運命決定制御機構の解明

遺伝子改変マウスを用いた細胞系譜解析に加え、ヒト臨床検体を用いた体外モデルによって、腸管上皮幹細胞の動態解明を試みている。腸管上皮幹細胞からの細胞系譜解析が可能な複合変異マウスを作製し、正常腸管オルガノイドを作成した。さらに、腸管粘膜保護作用を持つことが知られるプロスタグランジンE2を培地に添加することにより、オルガノイドは経時的に増大を確認しえた。また、腸炎および腸管繊維化を抑制する新規因子の候補因子として HSP47、および EPRAP を同定し、ヒト臨床検体とマウスモデルを用いて確認した。

#### 【p-C 免疫制御探索プロジェクト】

##### C-(1) IBD 患者病勢特異的マーカーの探索

IBD 患者から末梢血単核細胞 (PBMC) もしくは粘膜固有層単核細胞 (LPMC) を分離する技術を応用して、①IBD 患者 LPMC のエピゲノム解析を行ったところ、健常人 LPMC 中の CD33+マクロファージ、CD3+T 細胞、上皮細胞は異なるエピゲノム制御状態にあることが明らかになった。また、②IBD 患者 PBMC 並びに LPMC 内のチオリン代謝産物をマススペクトロメトリーで解析し、従来の赤血球中代謝産物を測定する方法では不可能であった、ターゲット細胞 (PBMC) 中のチオプリン代謝産物の測定が可能になった。さらに有用な便中バイオマーカーの探索も開始し、便中 S100A12 が潰瘍性大腸炎の粘膜治癒の予測に有用であることが示された。

##### C-(2) IBD モデルマウスにおける免疫病態解析

虫垂には、複数のリンパ球集簇 (虫垂リンパ組織、Cecal patch) が存在しており、虫垂切除群では、その後の潰瘍性大腸炎の発症数に変化をもたらすことが報告されている。そこで、Cecal patch の機能を解析したところ、Cecal patch は、典型的な腸管関連リンパ組織であるパイエル板と同様の領域が存在し、免疫学的組織、発達過程がパイエル板と類似していることを明らかとした。さらに、Cecal patch の IgA 陽性細胞は大腸および小腸に動員されること、一方パイエル板の IgA

陽性細胞は主に小腸に動員されることが示唆された。最終的に、Cecal patch の IgA 陽性細胞が大腸および小腸に動員される分子機構を明らかとしている。

#### 【p-D 病態特異的腸内細菌探索プロジェクト】

##### D-(1) 疾患特異的腸内細菌の探索

*Clostridium* 属細菌の腸管免疫に対する抑制的な作用を検討するため、プロバイオティクスである *Clostridium butyricum* に着目した。*Clostridium butyricum* の DSS 誘因大腸炎モデルマウスに対する炎症抑制効果は無菌マウスあるいは様々な遺伝子組み換えマウスを用いて検討したところ、*Clostridium butyricum* は TLR2/MyD88 経路を介して強力に IL-10 産生 CD11b 陽性マクロファージを誘導し腸炎抑制効果を示した。

##### D-(2) 病勢相関性腸内細菌の探索

潰瘍性大腸炎・クローン病患者に由来する便・唾液サンプルを無菌マウスに投与し、宿主免疫系に影響を与える細菌種の単離を試みている。潰瘍性大腸炎患者に由来する便を無菌マウスに投与したところ、消化管 Th17 細胞が増加した。このマウスから Th17 細胞を誘導する細菌 20 菌株を単離した。一方、クローン病患者に由来する唾液サンプルを無菌マウスに投与したところ、大腸 Th1 細胞の誘導が観察された。投与したマウスから Th1 細胞に影響を与える 1 菌株を単離培養した。

#### C. 評価

##### 1) 達成度について

複数のプロジェクトを設定しスタートした本研究班では、当初の目標どおりの成果を達成できたと考える。マウスにおける疑似モデルの構築、疾患特異的病態の描出など大きな成果を得ている。さらにヒトでの初代培養を開始する、ヒト患者特異的腸内細菌の同定などヒトでの解析に関しても成果を得ることができた。これらを融合させたモデル構築に対する準備が整ったことから当初の目的を果たすことができた。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

学術的には、腸管上皮幹細胞の動態、新規免疫制御機構の解明、疾患特異的腸内細菌の同定及び機能解析といずれのプロジェクトも学術的に高い意義を持ち、国際的にも評価されるものと考えられる。これらの病態解

明から革新的医薬品を開発するという社会的意義に合致した成果と考える。

### 3) 今後の展望について

本研究班の成果を基礎として、今後も個々において質の高い複数のプロジェクトを、多角的に、研究者の有機的連携をもってすすめることにより、我が国における炎症性腸疾患の病態解明及び革新的医薬品の開発を行う。各プロジェクトの知見を集約し、体外モデルを構築することで腸内環境を総合的に評価できることが期待できる。医薬品の開発だけでなく、現在進行中の治験薬の安全性・有効性確認にも大きな役割を果たせる。

### 4) 研究内容の効率性について

目標を着実に遂行できた部分が多く、期待された効率で成果があげられた。分担研究者・研究協力者班員の密接な連携が今後のさらなる効率的研究の進展を促進するものと考えている。

## D. 結論

研究代表者、分担研究者および研究協力者の協調的研究体制により、難治性炎症性腸疾患に対する実用化のためのプロジェクトを遂行した。初年度であったが、当初目指した成果が確実にあげられた。日常生活における QOL の著しい低下を余儀なくされる炎症性腸疾患患者に対し、基礎研究で得られた知見に基づく新しい治療法開発とその臨床応用、およびこれに基づく正しい情報の普及が可能になるものと期待される。

難治性炎症性腸疾患（難性炎症性腸疾患）の病態解明は、腸内環境と免疫系の相互作用を明らかにし、腸内細菌叢の多様性と炎症反応の関連性を解明することによって、革新的な治療法を開発することが期待される。

本研究は、炎症性腸疾患の病態解明と革新的医薬品の開発を目的として、多角的なアプローチで進められた。各プロジェクトの知見を集約し、体外モデルを構築することで腸内環境を総合的に評価できることが期待される。

本研究は、炎症性腸疾患の病態解明と革新的医薬品の開発を目的として、多角的なアプローチで進められた。各プロジェクトの知見を集約し、体外モデルを構築することで腸内環境を総合的に評価できることが期待される。

本研究は、炎症性腸疾患の病態解明と革新的医薬品の開発を目的として、多角的なアプローチで進められた。各プロジェクトの知見を集約し、体外モデルを構築することで腸内環境を総合的に評価できることが期待される。

本研究は、炎症性腸疾患の病態解明と革新的医薬品の開発を目的として、多角的なアプローチで進められた。各プロジェクトの知見を集約し、体外モデルを構築することで腸内環境を総合的に評価できることが期待される。

本研究は、炎症性腸疾患の病態解明と革新的医薬品の開発を目的として、多角的なアプローチで進められた。各プロジェクトの知見を集約し、体外モデルを構築することで腸内環境を総合的に評価できることが期待される。

本研究は、炎症性腸疾患の病態解明と革新的医薬品の開発を目的として、多角的なアプローチで進められた。各プロジェクトの知見を集約し、体外モデルを構築することで腸内環境を総合的に評価できることが期待される。

本研究は、炎症性腸疾患の病態解明と革新的医薬品の開発を目的として、多角的なアプローチで進められた。各プロジェクトの知見を集約し、体外モデルを構築することで腸内環境を総合的に評価できることが期待される。

本研究は、炎症性腸疾患の病態解明と革新的医薬品の開発を目的として、多角的なアプローチで進められた。各プロジェクトの知見を集約し、体外モデルを構築することで腸内環境を総合的に評価できることが期待される。

本研究は、炎症性腸疾患の病態解明と革新的医薬品の開発を目的として、多角的なアプローチで進められた。各プロジェクトの知見を集約し、体外モデルを構築することで腸内環境を総合的に評価できることが期待される。

## II. 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託費  
(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業)))  
独自の体外病態モデルによる難治性炎症性腸疾患の革新的治療薬開発に関する研究  
委託業務成果報告 (業務項目)

腸管上皮初代培養細胞を用いた体外病態モデルの構築

業務主任者 渡辺 守 東京医科歯科大学大学院消化器病態学 教授

研究要旨：炎症性腸疾患は慢性持続性炎症を伴う炎症性の疾患であるが、同時に潰瘍、出血、狭窄など患者の症状と直結する障害は粘膜、腸管上皮細胞の障害が主な原因となっている。以前より我々は上皮細胞の病態に着目し、分化制御機構の破綻が病態と密接な関連があることを報告してきた。そこで独自に構築した大腸上皮細胞の初代培養系をさらに発展させ、体外で病態モデルを擬似化させることで、腸内環境の相互作用を明らかにするとともに、多作動点を有する革新的医薬品を開発することにより腸内環境全体をリセットし、炎症性腸疾患の完全寛解を目指すものである。

共同研究者

土屋輝一郎<sup>1</sup>、堀田伸勝<sup>2</sup>、福島啓太<sup>3</sup>、林 亮平<sup>3</sup>、  
日比谷秀爾<sup>3</sup>、水谷知裕<sup>3</sup>、大島 茂<sup>3</sup>、永石宇司<sup>4</sup>、  
岡本隆一<sup>5</sup>、中村哲也<sup>1</sup>、大塚和朗<sup>6</sup>  
東京医科歯科大学消化管先端治療学<sup>1</sup>、腫瘍センター<sup>2</sup>、  
東京医科歯科大学消化器病態学<sup>3</sup>、東京医科歯科大学  
消化器内科<sup>4</sup>、東京医科歯科大学再生医療研究センター<sup>5</sup>、  
東京医科歯科大学光学医療診療部<sup>6</sup>

A. 研究目的

本研究は研究班のプロジェクトの内、B-(1) 疑似腸管モデルの構築に関わる技術開発を行う。

独自に構築した腸管上皮細胞の初代培養系をさらに発展させ、免疫担当細胞、腸内細菌との共培養系を構築することにより、腸内環境の体外疑似モデルを構築することを目的とする。さらに各プロジェクトで明らかとなる上皮細胞、免疫担当細胞、腸内細菌の各病態を体外モデル系に反映させることにより、病態モデルを構築する。この病態モデルを用いて、腸内環境全体に影響を与える病態を解明すると共に、それを標的とした新規医薬品の開発を行い、炎症性腸疾患に対する革新的医薬品を実用化することを最終目標とする。

本年度は腸管上皮細胞初代培養の体外における細胞機能を確認し、腸内での細胞機能を維持しているかを確認するとともに、長期炎症状態における上皮細胞機能形質異常を明らかとすることを目的とする。

さらにヒト検体を用いた初代培養の系を用いて患者

検体の収集を幅広く行えるよう環境整備を行う。

B. 研究方法

1) マウス初代培養上皮細胞の自然免疫応答解析

マウス小腸、大腸初代培養細胞のサイトカイン、Toll like Receptor (TLR) の発現、局在を免疫染色及び PCR 法にて行う。

各レセプターのリガンドを培地に添加し上皮細胞の免疫応答を IL-8 遺伝子発現、NF- $\kappa$ B シグナル等で評価する。上皮の免疫応答が確認できた場合、サイトカイン等を培地に長期間添加し、持続炎症モデルの構築を行い、上皮細胞の形質転換の有無を解析する。

2) 初代培養細胞遺伝子導入技術の構築

初代培養細胞に mCherry 蛍光遺伝子をレンチウイルスにて導入し、感染効率、蛍光発現解析により高効率遺伝子導入条件を検討する。

3) ヒト初代培養における環境整備

倫理審査により、ヒト培養解析が可能となるよう整備を行う。またヒト細胞での効率のよい培養条件を検討する。

(倫理面への配慮)

以上の研究の施行に当たっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」などに準じて、1) 倫理審査委員会で研究の適否などを議論・審査し承認を得る。2) 意義と必要性を説明しその自由意志に基づき同意を得られた場合にのみ検体提供を受ける。検体提供の有無により、治療など

不利益を被ることはない。3) 個人のプライバシーの保護を厳密に行う。4) 希望に応じ検体提供者やその保護者への研究結果の説明を行う。5) 研究目的でのみ検体を使用し、その他の目的では使用しない等、人権及び利益の確保を行うよう配慮した。動物実験に関しては、当施設の動物実験ガイドラインに準拠して、動物実験委員会の承認を受けて実施した。

#### C. D. 研究結果及び考察

##### 1) マウス初代培養上皮細胞の自然免疫応答解析

マウス初代培養にて各レセプターの遺伝子発現を解析したところ、体内での腸管と同等に各レセプターが発現していることを確認した。また免疫染色にて局在解析を行い、特にTLR5は小腸オルガノイドの基底側に限局して発現しており、対照的にTLR4は管腔側に限局して発現していた。一方大腸オルガノイドでは限局せず管腔側、基底側の両側に発現を認めた。

そこで、各種サイトカイン、腸内細菌成分であるLPS、Flagellinを培地に添加したところ、IL-8の産生を伴う上皮細胞の自然免疫応答を確認した。興味深いことに全てを同時に添加した条件では一番IL-8の発現誘導が多く認められた。また、NF- $\kappa$ B p65の免疫染色により、一部の上皮細胞にp65の核内移行を認めたことから自然免疫応答が腸内と同様に制御されていることが明らかとなった。

さらに、サイトカイン、LPS、Flageinの全てを培地に添加した状態で、初代培養の継代を行い、最長60週間培養した。培養後の上皮細胞を単離し、マイクロアレイにて網羅的遺伝子発現解析を施行したところ、有意に発現差を認める遺伝子群を同定した。

また培地からサイトカイン等を除去したにもかかわらず、IL-8発現が残存しており、自然免疫応答が消失しないという形質転換を確認した。上皮細胞の免疫応答が持続することから慢性炎症の一因になることが示唆された。

##### 2) 初代培養細胞遺伝子導入技術の構築

マウス小腸初代培養オルガノイドに遺伝子導入し幹細胞動態、遺伝子機能解析を行うことを目的としている。小腸オルガノイドにレンチウイルス感染させることに成功し、mCherry陽性細胞を確認した。さらに1年以上にわたり、陽性細胞が持続して確認できたことから、上皮幹細胞にmCherryが遺伝子導入されたことが示唆され、幹細胞からの分化細胞系譜の観察も可能な状況

となっている。

##### 3) ヒト初代培養における環境整備

すでに倫理審査により、ヒト初代培養の解析は承認されている。大腸内視鏡による大腸生検検体からの大腸上皮細胞初代培養、バルーン内視鏡(小腸内視鏡)による小腸生検検体からの小腸上皮細胞初代培養はすでに確立している。さらに横浜市立市民病院との連携により、IBD患者の手術検体から小腸・大腸細胞の初代培養を行うことを可能としており、幅広く患者由来の細胞解析、及び保存を行っている。

#### 評価

##### 1) 達成度について

本研究の目的に沿って研究計画をほぼ遂行することができた。腸管上皮細胞初代培養が体内での機能と同等の性能を保持することが確認できたのみならず、長期炎症状態を体外で擬似化することで、上皮細胞の形質転換を発見した。今後体外モデルで具現化した病態を詳細に解析することで鍵分子を同定することが期待できる。さらにヒト検体の解析も拡充できる環境を整備したことから本年度は期待通りの成果であると考え

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

長期炎症状態における上皮細胞形質転換減少など学術的にも大きな成果が得られた。さらに小腸上皮細胞を大腸に移植する系も構築し、体外モデルの病態を最終的にin vivoに還元するためのツールが完成した。これらは一流誌の学術雑誌に掲載されるなど国際的にも大きな評価を得ている。この体外モデル構築から病態疑似モデルにより難病であるIBDの病態の鍵分子を明らかとするとともにそれを標的とした革新的医薬品を開発することは大きな社会的意義につながることを期待できる。

##### 3) 今後の展望について

上皮細胞の初代培養の疾患における病態を解析するとともに免疫担当細胞との共培養系の構築及び腸内細菌との共培養系を構築し、腸内環境すべてを体外で擬似化するモデルの構築を目指す。

またヒト検体においては、患者由来初代培養のバンク化を目指す。

##### 4) 研究内容の効率性について

当初たてた目標を着実に遂行できており一定の効率性は挙げられた。

## E. 結論

腸管上皮細胞の初代培養は体内での上皮応答が体外で経時的・可視的に解析できることを確認し、体外疑似モデルとして適していることを明らかとした。今後共培養系を確立し、腸内環境疑似モデル、病態疑似モデルを構築し、腸内環境全体を動揺させる鍵分子の同定を行う予定である。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Oryoji D, Hisamatsu T, Tsuchiya K, Umeno J, Ueda S, Yamamoto K, Matsumoto T, Watanabe M, Hibi T, Sasazuki T: Associations of HLA class I alleles in Japanese patients with Crohn's disease. *Genes Immun.* 16(1): 54-56, 2015.
- 2) Matsuzawa Y, Oshima S, Nibe Y, Kobayashi M, Maeyashiki C, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: RIPK3 regulates p62-LC3 complex formation via the caspase-8-dependent cleavage of p62. *Biochem Biophys Res Commun.* 456(1): 298-304, 2015.
- 3) Yoshida M, Kinoshita Y, Watanabe M, Sugano K: JSGE Clinical Practice Guidelines 2014: standards, methods, and process of developing the guidelines. *J Gastroenterol.* (Epub ahead of print), 2014.
- 4) Kawa S, Okazaki K, Notohara K, Watanabe M, Shimosegawa T; Study Group for Pancreatitis Complicated with Inflammatory Bowel Disease organized by The Research Committee for Intractable Pancreatic Disease (Chairman: Tooru Shimosegawa) and The Research Committee for Intractable Inflammatory Bowel Disease (Chairman: Mamoru Watanabe), both of which are supported by the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan. : Autoimmune pancreatitis complicated with inflammatory bowel disease and comparative study of type 1 and type 2 autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol.* (Epub ahead of print), 2014.
- 5) Kobayashi K, Hirai F, Naganuma M, Watanabe K, Ando T, Nakase H, Matsuoka K, Watanabe M: A randomized clinical trial of mesalazine suppository: The usefulness and problems of central review of evaluations of colonic mucosal findings. *J Crohns Colitis* 8(11): 1444-1453, 2014.
- 6) Watanabe M, Hibi T, Mostafa NM, Chao J, Arora V, Camez A, Petersson J, Thakkar R. : Long-term safety and efficacy of adalimumab in Japanese patients with moderate to severe Crohn's disease. *J Crohns Colitis:* S1873-9946(14)00157-3, 2014.
- 7) Horita N, Tsuchiya K, Hayashi R, Fukushima K, Hibiya S, Fukuda M, Kano Y, Mizutani T, Nemoto Y, Yui S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Fluorescent labelling of intestinal epithelial cells reveals independent long-lived intestinal stem cells in a crypt. *Biochem Biophys Res Commun.* 454: 493-499, 2014.
- 8) Ohfuji S, Fukushima W, Watanabe K, Sasaki S, Yamagami H, Nagahori M, Watanabe M, Hirota Y, for the Japanese Case-Control Study Group for Ulcerative Colitis: Pre-illness isoflavone consumption and disease risk of ulcerative colitis: a multicenter case-control study in Japan. *PLoS One.* 9: 110270, 2014.
- 9) Fukata N, Okazaki K, Omiya M, Matsushita M, Watanabe M: Hematologic malignancies in the Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J of Gastroenterology.* 49(9): 24-30, 2014.
- 10) Fukuda M, Mizutani T, Mochizuki W, Matsumoto T, Nozaki K, Sakamaki Y, Ichinose S, Okada Y, Tanaka T, Watanabe M, Nakamura T: Small intestinal stem cell identity is maintained with functional paneth cells in heterotopically grafted epithelium onto colon. *AGenes Dev.* 28: 1752-1757, 2014.
- 11) Takenaka K, Ohtsuka K, Kitazume Y, Nagahori M, Fujii T, Saito E, Naganuma M, Araki A, Watanabe M: Comparison of magnetic resonance and balloon enteroscopic examination of the small

intestine in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 147(2): 334-342, 2014.

12) Shimizu H, Okamoto R, Ito G, Fujii S, Nakata T, Suzuki K, Murano T, Mizutani T, Tsuchiya K, Nakamura T, Hozumi K, Watanabe M: Distinct expression patterns of Notch ligands, Dll1 and Dll4, in normal and inflamed mice intestine. *PeerJ*. 2:e370; DOI 10.7717/peerj.370., 2014.

## 2. 学会発表

1) Tsuchiya K, Fukushima K, Watanabe M: The acquisition of cancer stemness by Atoh1 in colitis associated cancer. ECCO2015, Barcelona, 2015年2月20日.

2) Hibiya S, Tsuchiya K, Fukushima K, Hayashi R, Horita N, Oshima S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Long-term stimulation with cytokines acquires irreversible accumulation of NF- $\kappa$ B signaling in colonic epithelial cells. ECCO2015, Barcelona, 2015年2月20日.

3) Watabe T, Nagaishi T, Suzuki M, Yamazaki M, Onizawa M, Jose N, Tokai A, Hosoya A, Totsuka M, Yagita H, Watanabe M: TNFR2 signaling in the epithelia may be involved in the development of colitis-associated tumor. The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Kyoto, 2014年12月12日.

4) Watanabe M: Colorectal Neoplasm. Molecular mechanism of inflammation-associated colorectal cancer. APDW2014, Bali, 2014年11月24日.

5) Watanabe M: IBD: The New Emerging Diseases in Asia-Pacific. Challenges of IBD in Asia - from diagnosis to management. APDW2014, Bali, 2014年11月23日.

6) Watanabe M: Role of Cyclosporin/Tacrolimus : Tacrolimus and infliximab in patients with refractory ulcerative colitis. TSIBD2014, Taipei, 2014年11月9日.

7) Watanabe M: Stem cell transplantation in IBD, are we there yet?. New Advance in Cancer and Stem Cell, Kaohsiung, 2014年11月8日.

8) Watanabe M: Novel Therapies for Inflammatory Bowel Disease Stemcelltherapy: what, when, and how? SIDDS2014, Seoul, 2014年10月27日.

9) Takenaka K, Otsuka K, Watanabe M: Enteroscopic and MR findings of small intestine in Crohn's disease. JDDW 2014, Kobe, 2014年10月26日.

10) Hayashi R, Tsuchiya K, Hibiya S, Fukushima K, Horita N, Okada E, Araki A, Ohtsuka K, Watanabe M: Human alpha-defensin 6 regulated by both atoh1 and beta-catenin might be the pathogeneses of crohn's disease. UEGW2014, Vienna, 2014年10月22日.

11) Nisha Jose, Nagaishi T, Watabe T, Tokai A, Suzuki M, Yamazaki M, Watanabe M: The expression of myosin light chain kinase induced by NK- $\kappa$ B activation is involved in the development of colitis-associated cancer. UEGW2014, Vienna, 2014年10月22日.

12) Ito G, Okamoto R, Shimizu H, Fujii S, Nakata T, Suzuki K, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Notch Signaling and TNF-alpha synergistically promotes intracellular protein accumulation of olfm4 in the inflamed mucosa of ulcerative colitis. UEGW2014, Vienna, 2014年10月21日.

13) Matsuzawa Y, Oshima S, Takahara M, Nozaki K, Kobayashi M, Nibe Y, Maeyashiki C, Nemoto Y, Ma A, Watanabe M: A ubiquitin-modifying enzyme A20 controls the dynamics of autophagy. UEGW2014, Vienna, 2014年10月21日.

14) Fujii T, Naganum M, Kitazume Y, Takenaka K, Saito E, Nagahori M, Otsuka K, Watanabe M: MR enterocolonography can identify patients who need additional treatment by predicting recurrence, hospitalization and surgery of Crohn's disease patients in remission. UEGW2014, Vienna, 2014年10月20日.

15) Takenaka K, Ohtsuka K, Kitadume Y, Fujii T, Saito E, Nagahori M, Watanabe M: Magnetic resonance enterocolonography can detect small intestinal active lesions in crohn's disease;comparison with balloon enteroscopy. UEGW2014, Vienna, 2014年10月20日.

- 16) Watanabe M: Gut as a second brain to regulate human whole body? Cluster Lectures, Hamburg, 2014年10月14日.
- 17) Hibiya S, Tsuchiya K, Watanabe M: Long-term stimulation with cytokines leads to irreversible NF- $\kappa$ B signaling activation in colonic epithelial cells. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, 2014年9月25日.
- 18) Tsuchiya K, Hibiya S, Watanabe M: Innate immune spiral of intestinal epithelial cells by the longterm inflammation. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, 2014年9月25日.
- 19) Saito E, Nagahori M, Takenaka K, Fujii T, Otsuka K, Watanabe M: Outcom of induction and maintenance therapy for refractory ulcerative colitis. The 2nd Annual Meeting of AOCC, Seoul, 2014年6月21日.
- 20) Takenaka K, Otsuka K, Nagahori M, Fujii T, Saito E, Watanabe M: Comparison of Magnetic Resonance and Balloon Enteroscopic Examination of Deep Small Intestine in Patients with Crohn's Disease. AOCC2014, Seoul, 2014年6月20日.
- 21) Watanabe M: Stem cell as a promising target for IBD: From the bench to the bedside. AOCC2014, Seoul, 2014年6月20日.
- 22) Fukuda M, Mizutani T, Mochiduki W, Taichi M, Nozaki K, Ichinose S, Watanabe M, Nakamura T: Successful Engraftment of Cultured Small Intestinal Epithelial Stem Cells onto Damaged Colonic Mucosa by Heterotopic Transplantation. I2th Interational society for stem cell research, Vancouver, 2014年6月19日.
- 23) Mizutani T, Fukuda M, Watanabe M, Nakamura T: Successful Engraftment of Cultured Small Intestinal Epithelial Stem Cells onto Damaged Colonic Mucosa by Heterotopic Transplantation. GI Research Academy 2014, Tokyo, 2014年6月6日.
- 24) Horita N, Tsuchiya K, Hayashi R, Fukushima K, Hibiya S, Fukuda M, Kano Y, Mizutani T, Nemoto Y, Yui S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Establishment of the gene transduction into the primary intestinal organoid identified the subpopulation of the stem cells in a crypt. 12th Stem Cell Research Symposium, Fukuoka, 2014年5月31日.
- 25) Watanabe M, Yoshimura N, Motoya S, Tominaga K, Iwakiri R, Watanabe K, Hibi T: AJM300, an oral  $\alpha$ 4 integrin antagonist, for active ulcerative colitis: a multicenter, randomized, doubleblind, placebo-controlled phase 2a study. DDW2014. Chicago, 2014年5月4日.
- 26) Mizutani T, Fukuda M, Mochizuki W, Matsumoto T, Nozaki K, Ichinose S, Watanabe M, Nakamura T: Successful Engraftment of Cultured Small Intestinal Epithelial Stem Cells onto Damaged Colonic Mucosa by Heterotopic Transplantation. DDW2014. Chicago, 2014年5月3日.
- 27) 齊藤詠子、長堀正和、竹中健人、藤井俊光、大塚和朗、渡辺 守: 潰瘍性大腸炎におけるインフリキシマブ (IFX) 濃度と短期の治療効果に関する検討. 第11回日本消化管学会総会学術集会, 東京, 2015年2月13日.
- 28) 渡辺 守: 難病克服に向けた新しい消化管再生医療. 第11回日本消化管学会総会学術集会教育講演. 東京, 2015年2月13日.
- 29) 渡辺 守: 日本における炎症性腸疾患治療薬に対する臨床試験の問題点を繙く. 第2回 PMDA 炎症性腸症候群 (IBD) ワークショップ. 東京, 2015年2月4日.
- 30) 渡辺 守: 培養腸上皮幹細胞を用いた難治性炎症性腸疾患治療法の開発. 平成26年度厚生科研(難治性疾患等実用化研究) 推進事業「研究成果発表会」. 東京, 2015年1月25日.
- 31) 土屋輝一郎、堀田伸勝、福島啓太、林 亮平、日比谷秀爾、水谷知裕、大島 茂、永石宇司、岡本隆一、中村哲也、大塚和朗、渡辺 守: 腸管上皮初代培養細胞を用いた体外病態モデルの構築. 厚生労働科学研究費委託費難治性疾患等実用化研究事業「独自の体外病態モデルによる難治性炎症性腸疾患の革新的治療薬開発に関する研究」. 東京, 2015年1月23日.



- 32) 渡辺 守: 腸からヒト全身を繚く新しい時代の到来 “Gut regulates the entire human body?”. 第417回国際治療談話会例会, 東京, 2015年1月15日.
- 33) 齊藤詠子、長堀正和、竹中健人、藤井俊光、松岡克善、大塚和朗、渡辺 守: 潰瘍性大腸炎におけるインフリキシマブ (IFX) 濃度と短期の治療効果に関する検討. 第11回日本消化管学会総会学術集会, 東京, 2015年2月13日.
- 34) 藤井俊光、北詰良雄、齋藤詠子、竹中健人、松岡克善、長堀正和、大塚和朗、渡辺 守: クロウン病における MRenterocolonography (MREC) での疾患活動性評価と予後予測. 第6回日本炎症性腸疾患研究会学術集会, 東京, 2014年12月14日.
- 35) 齊藤詠子、大塚和朗、竹中健人、藤井俊光、永石宇司、長堀正和、渡辺 守: タクロリムスを使用した難治性潰瘍性大腸炎の内視鏡的検討. 第99回日本消化器内視鏡学会関東地方会, 東京, 2014年12月7日.
- 36) 竹中健人、大塚和朗、渡辺 守: クロウン病における小腸病変の評価におけるシングルバルーン内視鏡の有効性. 小腸研究会, 東京, 2014年11月15日.
- 37) 竹中健人、大塚和朗、渡辺 守: クロウン病小腸病変のMRIスコアと内視鏡スコアの比較. 小腸研究会, 東京, 2014年11月15日.
- 38) 藤井俊光、北詰良雄、齊藤詠子、長堀正和、大塚和朗、渡辺 守: クロウン病における MRenterocolonography (MREC) での病態評価と長期予後の関連. 小腸研究会, 東京, 2014年11月15日.
- 39) 福田将義、水谷知裕、望月和歌菜、松本太一、野崎健吾、酒巻友里子、市野瀬志津子、岡田随象、田中敏博、渡辺 守、中村哲也: 大腸への異所移植における培養小腸上皮幹細胞の固有性とパネート細胞機能の維持. 小腸研究会, 東京, 2014年11月15日.
- 40) 林 亮平、土屋輝一郎、渡辺 守: クロウン病病態解明を主眼とした $\alpha$ -defensin発現制御機構解析. 小腸研究会, 東京, 2014年11月15日.
- 41) 渡辺 守: 生物学的製剤全盛の今こそ見直す IBD治療とは? - Beyond Biologics -. JDDW2014. 神戸, 2014年10月25日.
- 42) 齊藤詠子、長堀正和、渡辺 守: 難治性潰瘍性大腸炎 (UC) における内科治療と手術例での予後の検討. JDDW2014. 神戸, 2014年10月25日.
- 43) 藤井俊光、長堀正和、渡辺 守: クロウン病における MRenterocolonography (MREC) での病態評価と入院・手術予測. JDDW2014. 神戸, 2014年10月23日.
- 44) 渡辺 守: 潰瘍性大腸炎の大腸内視鏡 index を検証し、粘膜治療の定義を明確にする - 国内外エキスパートの徹底討論を中心に -. JDDW2014. 神戸, 2014年10月23日.
- 45) 福島啓太、土屋輝一郎、渡辺 守: 炎症性発癌大腸癌における Atoh1 蛋白発現と癌幹細胞形質獲得機構. JDDW2014. 神戸, 2014年10月23日.
- 46) 渡辺 守: IBD と腸管免疫. 第41回日本小児栄養消化器肝臓学会特別講演, 東京, 2014年10月11日.
- 47) 渡辺 守: 消化器疾患に対する生物学的製剤. 第42回日本臨床免疫学会総会, 東京, 2014年9月27日.
- 48) 渡辺 守: 新しい時代の潰瘍性大腸炎治療. 第331回日本消化器病学会関東支部例会, 東京, 2014年9月20日.
- 49) 竹中健人、和田祥城、福田将義、松沢 優、荒木昭博、大塚和朗、渡辺 守: 径 12mm 0-IIc 型早期癌の1例. 24th Annual Meeting on Depressed Colorectal Cancer, 大阪, 2014年9月14日.
- 50) 松沢 優、竹中 健人、福田 将義、和田 祥城、岡田 英里子、土屋 輝一郎、荒木 昭博、大塚和朗、渡辺 守: 出血傾向のある放射線性腸炎に対するアルゴンプラズマ凝固法の検討. 第32回日本大腸検査学会総会, 東京, 2014年9月6日.
- 51) 渡辺 守: 消化管からヒト全身を繚く新しい時代の到来. 第32回日本大腸検査学会総会ランチョンセミナー, 東京, 2014年9月6日.
- 52) 渡辺 守: 炎症性腸疾患に対する腸管粘膜再生治療法の開発. 学術セミナー「臓器再生を目指した再生医療開発の最前線」～早期実用化に向けた Strategy～. 東京, 2014年8月8日.
- 53) 土屋輝一郎、堀田伸勝、福島啓太、林 亮平、日比谷秀爾、水谷知裕、大島 茂、永石宇司、岡本隆一、中村哲也、大塚和朗、渡辺 守: 腸管上皮初代培養細胞を用いた体外病態モデルの構築.

厚生労働科学研究費委託費難治性疾患等実用化研究事業「独自の体外病態モデルによる難治性炎症性腸疾患の革新的治療薬開発に関する研究」. 東京, 2014年7月25日.

- 54) 渡辺 守: 炎症性腸疾患の治療 up date. 日本内科学会関東支部主催第 50 回生涯教育講演会. 東京, 2014年7月13日.
- 55) 渡辺 守: 大腸上皮幹細胞を用いた消化管難病に対する再生医療. 沖縄, 2014年7月3日.
- 56) 齊藤詠子、大塚和朗、竹中健人、藤井俊光、長堀正和、渡辺 守: 難治性潰瘍性大腸炎 (UC) におけるタクロリムス (Tac) 及びインフリキシマブ (IFX) 使用例の内視鏡的検討. 第 98 回日本消化器内視鏡学会関東地方会, 東京, 2014年6月14日.
- 57) 竹中健人、大塚和朗、藤井俊光、長堀正和、齊藤詠子、荒木昭博、渡辺 守: クロウン病の小腸病変に対するバルーン内視鏡所見と予後の検討. 第 98 回日本消化器内視鏡学会関東地方会. 東京, 2014年6月14日.
- 58) 和田祥城、大塚和朗、竹中健人、福田将義、松沢優、新田沙由梨、鈴木雅博、渡辺 守、中村大樹、三澤将史、工藤進英: 「動画で見る消化管拡大内視鏡診断」Narrow Band Imaging (NBI) 拡大観察を用いた大腸病変の診断. 第 98 回日本消化器内視鏡学会関東地方会シンポジウム 1. 東京, 2014年6月14日.
- 59) 渡辺 守: 大腸上皮幹細胞培養系の確立と移植-腸管免疫への応用-. 第 18 回腸内細菌学会特別講演. 東京, 2014年6月11日.
- 60) 渡辺 守: 炎症性腸疾患の治療 up to date. 第 50 回日本内科学会中国支部主催生涯教育講演会. 山口, 2014年6月1日.
- 61) 荒木昭博、新田沙由梨、渡辺 守、藤井俊光、大塚和朗、宍戸華子、岡田英里子、鈴木康平、竹中健人、長堀正和、和田祥城、加納嘉人、齊藤詠子: カプセル内視鏡の画像保存. 第 87 回日本消化器内視鏡学会総会. 2014年5月15日.
- 62) 林 亮平、土屋輝一郎、渡辺 守: 小腸生検検体を用いたクロウン病病態解析. 第 100 回日本消化器病学会総会. 東京, 2014年4月26日.
- 63) 永石宇司、鈴木雅弘、鬼澤道夫、山崎元美、渡辺 守: IBD 合併大腸癌モデルの発生過程における上

皮細胞特異的 MNF シグナルの解析. 第 100 回日本消化器病学会総会. 東京, 2014年4月25日.

- 64) 齊藤詠子、長堀正和、渡辺 守: IBD の治療 ; Real practice における選択とその根拠. 第 100 回日本消化器病学会総会. 東京, 2014年4月25日.
- 65) 渡辺 守: 炎症性腸疾患の治療を考え直す! 第 100 回日本消化器病学会総会ランチョンセミナー. 東京, 2014年4月24日.
- 66) 竹中健人、大塚和朗、渡辺 守: クロウン病小腸病変の評価における シングルバルーン内視鏡の有効性. 第 100 回日本消化器病学会総会. 東京, 2014年4月23日.
- 67) 岡田英里子、土屋輝一郎、渡辺 守: NSAIDs・抗血小板薬による小腸粘膜障害の病理学的検討. 第 100 回日本消化器病学会総会. 東京, 2014年4月23日.
- 68) 渡辺 守: 炎症性腸疾患の病態と治療の最前線. 第 111 回日本内科学会講演会 シンポジウム. 2014年4月11日.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

渡辺 守、中村哲也: 「大腸上皮幹細胞の単離・培養技術と、これを用いた大腸上皮移植技術」特願 2011-236469

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生労働科学研究委託費

(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業)))

独自の体外病態モデルによる難治性炎症性腸疾患の革新的治療薬開発に関する研究

委託業務成果報告 (業務項目)

腸管上皮幹細胞運命決定制御機構の解明

研究分担者 千葉 勉 京都大学大学院医学研究科消化器内科学 教授

研究要旨：炎症性腸疾患の新規治療法開発を目指して、体外腸内環境モデルをはじめとする解析系により、腸管上皮幹細胞の運命決定因子の検証を試みた。まずヒト腸内環境を再現する体外モデル構築のため、活性化 WNT を用いたオルガノイド培養系を検討した。つぎに様々な腸管上皮幹細胞レポーターマウスから正常腸管オルガノイドを作成し、炎症性サイトカインやプロスタグランジン添加による幹細胞への影響を解析した。さらに新規治療標的因子として、HSP47、EPRAP の腸管の炎症および繊維化における意義を、ヒト臨床検体とマウスモデルを用いて示した。

A. 研究目的

本研究では、炎症性腸疾患の新規治療法開発を目指し、「粘膜免疫-腸内細菌-腸管上皮幹細胞」相互作用機構を明らかにするという研究班全体のテーマに沿って、腸管上皮幹細胞の運命決定機構を炎症性腸疾患病態モデルにより解析し、新規治療法開発へ向けた知見を獲得する。

B. 研究方法

炎症性腸疾患の病態モデルとして、体外腸内環境モデル、および様々な遺伝子改変マウスを用い、腸管粘膜傷害時および回復過程の腸管上皮幹細胞の動態を検討する。その際、腸管上皮幹細胞に与える間質細胞からの影響も複合的に観察する。そのために、まずヒトとマウス双方に適用できる体外腸内環境モデルとして、活性化 WNT を用いたオルガノイド培養系を準備する。さらに様々な腸管上皮幹細胞レポーターマウスからもオルガノイドを作成し、細胞系譜解析を行う。また、炎症性腸疾患における腸管上皮幹細胞と間質細胞の相互作用の重要性に鑑み、炎症性腸疾患の新規治療標的として HSP47 発現の意義を、ヒト臨床検体で検討する。また

同様に EPRAP の遺伝子改変マウスに対し腸炎を生じさせ、腸管粘膜上皮および幹細胞の変化を、上皮間質相互作用の観点から検討する。

(倫理面への配慮)

本研究で行う組換え DNA 実験ならびに遺伝子改変マウス実験に関しては、京都大学組換え DNA 実験安全委員会および動物実験委員会の承認をすでに得ている。また、ヒト臨床検体を用いて新規抗炎症、抗繊維化因子の発現や局在を検討する実験計画についても、京都大学医の倫理委員会などから必要な承認をすでに得ている。臨床検体の採取に関しては、患者に対して研究の趣旨を十分に説明するなど、インフォームドコンセントに十分留意し、文書による患者の同意を得て行う。また研究に際して得られる情報が提供者のものと同定できないように、すべての検体について匿名化をおこなう。本研究が大幅な進捗を示し、ヒトにおいてゲノム、エピゲノム解析を広範に展開する必要が生じた際は、「臨床研究に関する倫理指針」(平成 20 年厚生労働省告示第 415 号)に則り研究計画書を作成し、京都大学医の倫理委員会の承認を得た上で研究を遂行する。遺伝子解析については

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成16年文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第一号、(平成25年全部改正))に準じて行う。

### C. 研究結果

平成26年度には、以下の研究を行った。

- (1) 本研究では、遺伝子改変マウスを用いた細胞系譜解析に加え、ヒト臨床検体を用いた体外モデルによって、腸管上皮幹細胞の動態解明を試みる。そのため、従来のマウス・ヒトからのオルガノイド培養系に加え、活性化 WNT を用いた新しい培養液でオルガノイド・スフェロイド培養系を樹立する準備を進めた。
- (2) Lgr5、Bmi1、Dclk1 など代表的な幹細胞マーカー遺伝子の下流に cre コンストラクトを挿入した遺伝子改変マウスと Rosa26-LacZ または YFP マウスとを交配し、腸管上皮幹細胞からの細胞系譜解析が可能な複合変異マウスを作製した。これらのマウスから幹細胞を含む正常腸管上皮を採取し、正常腸管オルガノイドを作成した。オルガノイド培養系において腸管の炎症状態を模倣するために、代表的な炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や LPS を培地に投与し、オルガノイド系内の幹細胞因子の変動を定量的 PCR 法で検討した。さらに、腸管粘膜保護作用を持つことが知られるプロスタグランジン E2 を培地に添加した。その結果、プロスタグランジン E2 の添加によって、オルガノイドは経時的に増大したが、幹細胞因子には大きな変動を認めなかった。
- (3) 本研究では、腸炎および腸管繊維化を抑制する新規因子の同定も目的としている。そこで平成26年度には、それらの候補因子として HSP47、および EPRAP の意義をヒト臨床検体とマウスモデルを用いて確認

した。

まず HSP47 については、これまでにコラーゲン生成に特異的な機能を持つ分子シャペロンであることが示されていたが、炎症性腸疾患、とくに繊維化が大きな合併症となるクローン病における意義については十分に明らかにされていなかった。本研究では、炎症性腸疾患患者の腸管組織で IL17A と HSP47 がともに上昇していることに着目した。HSP47 は、クローン病患者の腸管組織において免疫染色上  $\alpha$ -SMA 陽性の活性化繊維芽細胞に高発現し、クローン病の病勢が強いほど HSP47 陽性の細胞数は多かった。IL17A は炎症性腸疾患患者から単離した繊維芽細胞、および培養繊維芽細胞株からの HSP47 および I 型コラーゲンの産生を増加させた。I 型コラーゲンの産生は HSP47 のノックダウンにより抑制された。また IL17A 刺激は、JNK を介して HSP47 の発現を誘導することが示された。

つぎに EPRAP については、マクロファージにおいてプロスタグランジン EP4 受容体の下流シグナルを調節する因子として同定されたが、炎症性腸疾患や腸管上皮細胞においてどのような役割を果たすかは十分に明らかでなかった。そこで EPRAP のノックアウトマウスを作製し、DSS を投与し腸炎を起こして野生型マウスと比較した。その結果、野生型マウスの間質には EPRAP を発現するマクロファージが誘導されていた。EPRAP ノックアウトマウスでは、野生型よりも重篤な腸炎が生じ、EPRAP ノックアウトマウス由来の骨髄を移植した野生型マウスでも同様に重篤な腸炎を生じた。また腸炎の晩期合併症としての腸管繊維化も EPRAP ノックアウトマウスでより高度であった。そのため、EPRAP は炎症性腸組織に誘導される