

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム幹細胞事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 組織形成環境を制御するデザイナーニッチ細胞の開発
(英語) Development of designer niche cell that governs tissue microenvironment

研究開発実施期間：令和2年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 戸田 聡
(英語) Satoshi Toda

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 国立大学法人金沢大学・ナノ生命科学研究所・助教
(英語) Nano Life Science Institute, Kanazawa University, Assistant Professor

II 研究開発の概要

和文：

近年の幹細胞研究の発展により、生体外で臓器の一部を再現したオルガノイド培養が開発され、再生医療への応用が期待されている。実際に、炎症性疾患や変性疾患によって損傷を受けた病変組織に幹細胞やオルガノイドを移植することで組織再生を目指す移植療法が検証されている。組織形成の場であるニッチが崩壊している病変部位において組織を再生することは容易ではないが、組織再生を促進するために強力な抗炎症因子や増殖因子などを投与することは、健常組織への副作用のおそれから現実的でない。そこで本研究は、病変部位特異的にニッチを再建して組織再生を促進するため、生体内の異変を認識して局所的にニッチ因子を産生する細胞、「デザイナーニッチ細胞」を開発することを目的とする。

本研究では、一度発症すると根治が難しい難治性疾患として知られる炎症性腸疾患を標的とした。炎症性腸疾患は、昨今では抗炎症薬や抗体製剤により炎症自体をある程度抑えられるようになってきたものの、難治性の潰瘍が形成されることで上皮が再生されず、大腸全摘出以外の治療法がない患者さんも存在する。そこで、炎症を抑制する抗炎症因子や幹細胞の増殖因子を潰瘍部位特異的に安全に供給することができるデザイナーニッチ細胞を作製し、炎症性腸疾患に対する新たな細胞療法を提案することを目指した。デザイナーニッチ細胞を作製するため、最近、がんを標的とした細胞医薬開発に大きく貢献している合成生物学技術である人工受容体 synthetic Notch receptor (synNotch)を用いた。synNotch システムでは、細胞が「認識する分子」と分子認識後に「誘導する遺伝子」の両者をデザインすることが可能である。このシステムを利用することで、炎症や潰瘍などの組織環境変化を認識し、それを修復する抗炎症因子や増殖因子を産生する細胞を設計・作製することが可能になる。そこで本研究では、デザイナーニッチ細胞のコンセプトを *in vitro* および *in vivo*

両方の系で検証した。

(1) 腸オルガノイド形成を誘導するデザイナーニッチ細胞の開発

まず、*in vitro* 培養系において、組織環境を認識してニッチ因子を産生するデザイナーニッチ細胞が腸上皮組織の成長・再生を誘導できるかを検証した。ここでは、緑色蛍光分子 GFP を炎症関連因子に見立てて、炎症環境にある腸組織のモデルとして GFP を分泌する腸オルガノイドを作製した。また、*synNotch* システムを改良することで、分泌因子を認識して任意の標的遺伝子を誘導する拡散型 *synNotch* システムを開発し、細胞間で GFP の分泌と受容を介した人工的なシグナル伝達を構築する手法を樹立した (Toda et al., *Science* 370, 327-331, 2020)。このシステムを利用して、液中の GFP を認識すると腸オルガノイドの生育に必要なニッチ因子を産生するように設計したデザイナーニッチ細胞を作製した。デザイナーニッチ細胞と GFP を分泌する腸オルガノイドと共培養したところ、デザイナーニッチ細胞は腸オルガノイド由来の GFP を認識して活性化した。さらに、ニッチ因子を含まない培地において両者の共培養を行ったところ、デザイナーニッチ細胞がニッチ因子を産生することで、細胞間コミュニケーション依存的に腸オルガノイドを培養することに成功した。

(2) 腸炎モデルマウスに対するデザイナーニッチ細胞の樹立とその治療効果の検証

デザイナーニッチ細胞が *in vitro* においてオルガノイド形成を誘導できたので、次に、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) の投与により結腸に潰瘍を形成する腸炎モデルマウスを用いて、デザイナーニッチ細胞が潰瘍部位で腸上皮再生を促進することができるかを検証した。まず、潰瘍部位を認識するデザイナーニッチ細胞を作製するため、ここでは *synNotch* システムを改変して、潰瘍部位に局在する細胞を認識すると標的遺伝子を誘導する人工受容体を開発した。この人工受容体を導入した細胞株を腸炎モデルマウスの腸内に移植すると、潰瘍部位に生着し、さらに生着した細胞では人工受容体が活性化して蛍光レポーターが誘導された。よって、生体内で潰瘍部位を認識して活性化するデザイナーニッチ細胞が作製可能であることがわかった。さらに、マウス初代培養細胞を原料として作製したデザイナーニッチ細胞を用いた詳細な解析から、移植したデザイナーニッチ細胞では人工受容体が活性化し、さらに、移植後 5 日以上にわたって潰瘍部位に生着できることを見出した。以上より、生体内で炎症環境に応答してニッチ因子を誘導するデザイナーニッチ細胞の基盤技術を樹立することができた。そこで、抗炎症因子を誘導するデザイナーニッチ細胞を腸炎モデルマウスに移植し、結腸の炎症状態の改善を検討したところ、結腸における炎症性サイトカインの発現レベルが減少する傾向が見られた。しかし、腸炎により減少した体重の回復速度は、自然治癒に比べて早まる様子が見られず、抗炎症因子を産生するデザイナーニッチ細胞による治療効果は限定的であった。

(3) 今後の展望

DSS の短期投与による腸炎誘導モデルは回復期における自然治癒の速度が速く、デザイナーニッチ細胞を用いてさらに治癒を速めることは難しいと考えられた。そこで、より慢性的な腸炎が生じる条件においてデザイナーニッチ細胞の効果を検証する必要がある。また、誘導するニッチ因子は、もともと生体が持っている抗炎症因子や増殖因子に加えて、タンパク質工学により改変されたサイトカインや生物製剤等の誘導も含めて検証することで、より治療効果の高いデザイナーニッチ細胞の開発が期待される。さらに、今回開発したデザイナーニッチ細胞の強みは、「認識する分子」、「誘導する因子」とともに自由にデザインできる点にあり、炎症性腸疾患に限らず、生体内環境に異変が生じる様々な疾患・老化現象を改善する細胞医薬としての応用が期待される。

また、上記成果に加えて、研究協力者である金沢大学がん進展制御研究所の大島正伸教授との共同研究により、がん変異を導入した腸オルガノイド由来大腸がん細胞を腸炎モデルマウスの腸内に移植すると、潰瘍

部位に選択的に生着することを見出した。この手法を用いて、大腸がん細胞とデザイナー細胞の同時移植によるがん転移促進因子または抑制因子の探索や、異なる変異をもった大腸がん細胞の同時移植によるがん細胞間の競合原理の解析など、大腸がんの転移・悪性化を研究するモデルシステムとしての展開も期待される。

英文：

Recent advances in stem cell biology have enabled researchers to culture in vitro 3D tissues called organoids, which capture some of key features of organs. Organoid systems have enormous potentials in medical applications such as transplantation therapy for tissue regeneration. However, it is challenging to regenerate tissue in lesion sites where the tissue microenvironment or niche has collapsed by disease and inflammation. In addition, it is not practical to administer strong anti-inflammatory factors and growth factors to promote tissue regeneration, due to the risk of side effects on healthy tissues. Therefore, we aim to develop "designer niche cells", which can recognize diseased tissue and locally produce niche factors to reconstruct a niche specific to lesion sites.

In this study, we targeted inflammatory bowel disease, which is known as one of the intractable diseases. Although anti-inflammatory drugs and biologics have recently had some success in treating inflammation, some patients fail to regenerate epithelial tissues due to the formation of intractable ulcers. In this case, there is no treatment other than colon resection at present. Therefore, we propose a cell therapy strategy for inflammatory bowel disease by creating designer niche cells that produce therapeutic factors specifically at the ulcer site. To generate designer niche cells, we used a synthetic receptor platform called synthetic Notch receptor (synNotch), which allows us to freely design both what molecules cells recognize and what gene expression cells induce after the recognition. Using synNotch system, we have created designer niche cells that recognize the ulcer site and then produce anti-inflammatory factors and growth factors in response.

First, we tested whether epithelial tissues can be regenerated by the designer niche cells in vitro. To construct an in vitro model system, we used green fluorescent protein (GFP) as an inflammation-related factor and created GFP-secreting intestinal organoids as an inflammatory intestinal tissue. We previously developed diffusible synNotch system that can recognize secreted GFP and induce customized target genes (Toda et al., Science 370, 327-331, 2020). We engineered designer niche cells that recognize secreted GFP to produce niche factors for intestine organoids. When we co-cultured them with GFP-secreting intestinal organoids, we observed that the designer niche cells recognized GFP derived from intestine organoids and became activated to produce niche factors, resulting in the organoid growth in a culture condition without niche factors. In summary, we successfully induced the growth of intestine organoids in a cell-cell communication-dependent manner between organoids and designer niche cells.

We next tested whether designer niche cells can promote epithelial tissue regeneration at the ulcer site in vivo, using a mouse colitis model induced by dextran sulfate sodium (DSS). To generate designer niche cells that recognize the ulcer site, we first engineered an artificial receptor that recognizes cells specifically localized at the ulcer site by modifying the synNotch system. When we transplanted cell lines expressing this artificial receptor into colon lumen of colitis model mice, they were efficiently engrafted at the ulcer site and also activated to induce a fluorescent reporter, indicating that the artificial receptor also functions in vivo. We also engineered primary cells to create designer niche cells, and showed that the engrafted cells were activated at the ulcer site and survived there for more than 5 days. We then tested the transplantation of designer niche cells inducing anti-inflammatory factors to improve inflammatory environment in the colon of colitis model mice. As a result, the expression level of inflammatory cytokines at the colon tended to decrease, but the rate of weight recovery did not change by the transplantation compared to spontaneous healing, indicating that the effect of the designer niche cells was limited.

Here, we established the basic technology for designer niche cells that recognize inflammatory environment and induce niche factors in response in vivo. In the future, it will be interesting to engineer designer niche cells that can induce biologics and other artificial agents in addition to natural anti-inflammatory factors and growth factors to develop more effective designer niche cells. The strength of designer niche cells is that both "molecules to be recognized" and "genes to be induced" can be designed. The designer cells that produce therapeutic factors in response to changes in tissue environment could be applied to various difficult-to-treat diseases in addition to inflammatory bowel disease.