

日本医療研究開発機構 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム
(幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 上皮細胞により腸管を再デザインする研究開発
(英 語) Study of intestinal redesign by epithelial cells

研究開発実施期間: 令和 3 年 6 月 1 日～令和 6 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 杉本 真也
(英 語) Shinya Sugimoto

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 学校法人慶應義塾・慶應義塾大学医学部・助教
(英 語) Keio University・Keio University School of Medicine・Instructor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

短腸症候群や小腸機能不全に対する唯一の根本治療である小腸移植は、拒絶反応の強さゆえに他の臓器の移植件数が増加していく中で少数例の実施に留まっている（国内で通算 50 例に満たない）。仮に治療に成功しても、慢性拒絶反応や免疫抑制剤内服に伴う感染症や悪性腫瘍の発生など、生涯にわたるリスクが残ることとなる。革新的な治療開発が切望され、移植領域においては iPS 細胞を用いた再生医療やブタ臓器の異種移植で拒絶反応の低減を目指す研究などが精力的にすすめられている。しかし、ドナーが存在しても 5 年生存率が 6 割に達していない小腸移植では、仮にレシピエントの免疫抑制が前提となる小腸グラフトの創出に成功しても患者予後の改善にはつながりにくい。また、細胞からの組織再生は、仮に小動物レベルでの再生が達成されてもそれを管腔の大きなヒトの腸管に吻合し機能させるのは現実的でなかった。

これまでに研究開発代表者らは、大腸上皮を剥離し、小腸上皮へと置換することで小腸としての機能をもつ小腸化大腸を作製する手法を、小動物を用いた実験系で開発してきた。上皮細胞は、その由来臓器によって異なる固有の性質を有しており、異なった性質をもつ移植細胞が大腸に生着し、その性質を反映した組織を構築する。小腸上皮は大腸の組織に小腸特有の構造をリモデリングするポテンシャルを有することが明らかとなっている。本研究開発では、これまでに小動物において確立してきた上皮置換、すなわち腸管の「再デザイン」のコンセプトを、大動物を含む実験系へと応用するため、上皮細胞に着目したアプローチで課題

の克服を目指してきた。上皮細胞のもつ腸管のリモデリング能を活用し、移植する場となる大腸と、移植上皮細胞の双方の理解を深める本研究の推進により、現在の *in vitro* の幹細胞研究と短腸症候群を含む致死的な小腸疾患治療へのトランスレーションとの間に存在する大きなギャップを埋める革新的な治療戦略開発の足掛かりとすることを目的とした。

上皮細胞を生着させる上でボトルネックとなっていた大腸の上皮剥離について、まずは小動物での効率的な剥離を可能とする手法の検証を行った。ダメージを低減しつつ広範な剥離を達成し、その知見を大動物実験に応用した。また、大動物においても様々な上皮剥離手法、因子の効果を検証し、病理組織学的な検討を行いながら改良を重ねた。上皮細胞のモニタリングにより、問題点を把握して対策を講じることで、これまで大動物においては困難に直面していた上皮剥離を *in vivo* で達成するに至った。

小動物において、大腸上皮を剥離した際に肛門の扁平上皮と連続した部位の上皮を剥離すると隣接した扁平上皮が本来大腸上皮の存在した部位を修復し、扁平上皮が大腸側に進展してくる現象が偶発的に確認された (Sugimoto et al. *Gastroenterology* 2022)。これは、異なる種類の細胞でも上皮を剥離すれば上皮置換が起こりうるというサポートデータになるとともに、隣接する細胞についての注意を要することを示唆するものであり、大動物において、大腸剥離範囲を設定する上で重要な知見となった。ヒトの臨床においても、大腸上皮の傷害される疾患では、このような現象が起こりうるということが内視鏡学的、臨床病理学的に実臨床の所見から実証できた。また、大腸に移植する上で、ヒトの大腸上皮の組織修復における特性を知ることは極めて重要であるが、マウスにおける異種移植系を用いて、ヒトの大腸には p27 陽性の増殖の遅い休止期幹細胞が多く存在することが確認でき、上皮傷害時にはマウスとは異なる組織修復メカニズムを有することが明らかとなった (Ishikawa et al. *Gastroenterology* 2022)。また、移植されたヒト腸管上皮細胞はドライバー変異を獲得しておらず、腫瘍化していないことも確認された。このような大腸上皮傷害再生の病理学的知見も参考としながら上皮修復における検証を継続し、*in vitro*、*in vivo* (マウス、ラット、ブタ) で相互に情報をフィードバックしながら研究を推進した。

移植細胞においては、ミニブタ回腸由来の上皮細胞を移植用細胞として選定し、蛍光標識、大量培養して上皮細胞を剥離した同一個体の大腸組織への移植実験を行った。その他の移植手技についても小動物で確立してきた基盤技術の応用可否を確認し、大動物へと最適化した手法を用いて実験を遂行した。

このように多角的な検討によって理解を深めてきた大腸上皮の剥離を、大動物において実施し、上皮置換を達成すべく移植実験を実施した。結果的に、実体顕微鏡による蛍光観察や病理組織学的な評価によって、大動物の大腸において、移植した蛍光標識された小腸上皮細胞が生着していることが初めて確認できた。さらに、小腸としての形質を保持して生着していることが確認され、異なる細胞による上皮置換というコンセプトが、大動物においても実現しうるものであるということが実証された。小腸における再生医療のイノベーション創出につながる有意義な研究成果となった。

Intestinal transplantation, the only curative treatment for short bowel syndrome and intestinal failure, is limited (less than 50 cases nationwide) due to the strength of rejection, even as transplantation of other organs is on the rise. Even if treatment is successful, lifetime risks remain, including chronic rejection and the development of infections and malignancies associated with the use of immune suppressants. Innovative treatment development is urgently needed, and in

the field of transplantation, regenerative medicine using iPS cells and xenotransplantation of porcine organs to reduce rejection are being vigorously studied. However, in small bowel transplantation, where rejection is a problem even with a donor, it is unlikely that successful generation of small bowel grafts based on immunosuppression of the recipient will improve the patient's prognosis. In addition, even if tissue regeneration from cells could be achieved at the small animal level, it would be impractical to anastomose it into the large lumen of the human intestinal tract and make it function.

Previously, the Principal Investigators have developed a method to create a small intestinalized colon that functions as a small intestine by removing the colonic epithelium and replacing it with small intestinal epithelium in an experimental setting using small animals. Epithelial cells have unique properties that differ depending on their organ of origin, and transplanted cells with different properties can be engrafted into the colon and construct a tissue that reflects these properties. To apply the concept of epithelium replacement, namely "intestinal redesign", which has been established in small animals, to experimental systems including large animals, this project has tried to overcome the challenges with an approach focusing on epithelial cells. By taking advantage of the intestinal remodeling ability of epithelial cells and by promoting this research to better understand both the colon, the site of transplantation, and transplanted epithelial cells, we aim to fill the large gap that exists between current in vitro stem cell research and the translation of this research into the treatment of lethal small bowel diseases, including short bowel syndrome.

In small animals, when the colonic epithelium is removed from a continuous area with the squamous epithelium of the anus, the adjacent squamous epithelium repairs the area where the colonic epithelium was originally located, and the squamous epithelium incidentally extends toward the colon (Sugimoto et al. *Gastroenterology* 2022). This is important in setting the extent of colonic cell removal in large animals, as it provides supportive data that epithelium replacement can occur when epithelial cells of different types are removed, and also suggests that care should be taken with surrounding cells. In human clinical practice, endoscopic and clinicopathologic findings demonstrate that such a phenomenon can occur in diseases that injure the colonic epithelium. In addition, it is extremely important to know the characteristics of human colonic epithelium in tissue repair for transplantation into the colon, and it was confirmed that human colon contains a large number of p27-positive quiescent stem cells, which have a different tissue repair mechanism upon epithelial injury than in mice (Ishikawa et al. *Gastroenterology* 2022). It was also confirmed that the transplanted human intestinal epithelial cells did not acquire driver mutations and were not tumorigenic. We continued the verification in epithelium removal with reference to such pathological findings of colonic epithelial injury regeneration, and promoted the study by feeding back information to each other in vitro and in vivo (mice, rats, and pigs).

For cell transplantation, epithelial cells derived from the ileum of a miniature pig were selected as transplantation cells, and after fluorescent labeling and large-scale culture, transplantation experiments were conducted into the colon tissue of the same individual from which the epithelial cells were removed. For other transplantation techniques, we confirmed the applicability of fundamental techniques established for small animals, and conducted experiments using techniques optimized for large animals.

Having gained a better understanding of the colonic epithelium through multidimensional studies, we performed removal of the colonic epithelium in large animals and performed transplantation experiments to achieve epithelium replacement. Fluorescence microscopic observation and histopathologic evaluation confirmed for the first time that the transplanted fluorescently labeled small intestinal epithelial cells were viable in the colon of a large animal. Furthermore, it was confirmed that the epithelial cells retained the characteristics of the small intestine, demonstrating that the concept of epithelium replacement by different cells is feasible in large animals. This is a significant research result that will lead to the creation of innovations in regenerative medicine for the small intestine.