

## 論文の内容の要旨

論文題目 気相液相界面培養法を用いたヒト腸管上皮 *in vitro* モデルの確立

氏名 田中 恵理

医学研究において、複雑な構造や機能を有した生体の環境により近い実験モデルの開発は重要である。近年、2次元培養と比較してより生理活性の高い3次元培養モデルであるオルガノイドの樹立が盛んになっているが、腸管のような管腔を持つ、極性が明確な臓器の場合、オルガノイドの内腔を管腔側として組織が構築されるため、実験モデルとして管腔側へのアプローチが困難であるという弱点がある。この技術的な難しさや内腔にアプローチする際の細胞障害性を克服する方法として、底面がフィルター状のトランズウェルと呼ばれる容器を用いて、単層の腸管上皮を形成する方法が用いられるようになり、さらに腸管幹細胞を気相液相界面(*air-liquid interface* : ALI)培養と呼ばれる方法で培養することで、効率的に腸管上皮幹細胞から腸管上皮細胞に分化することが報告されている。

これまで ALI 培養を用いたモデルでは、ヒト胎児の腸管上皮やヒト成人の腸管上皮の内視鏡生検試料より単離された腸管上皮幹細胞を培養することで組織構築を行っているが、このような組織幹細胞の場合、生体から細胞を得る必要があるため継続的に十分な量の実験試料を得ることが難しく、また倫理的な問題もあるためハードルが高いというデメリットがある。これに比べ、多能性幹細胞は半永久的に分裂、増殖が可能で、すべての細胞に分化できる多能性を持ち、腸管への分化のプロセスを追う研究が可能になるほか、疾患特異的 iPS 細胞を用いた疾患モデル研究やゲノム編集技術を利用した研究への応用もしやすく、汎用性が高いというメリットがある。腸管上皮の多様な細胞を有した、生体環境により近い腸管上皮 *in vitro* モデルを構築することは、生理学的機能や病態の解明に非常に重要であると考えられることから、本研究では腸管上皮幹細胞およびヒト人工多能性幹細胞(iPS 細胞)から ALI 培養法を用いて、極性が明確で細胞の多様性に富む、汎用性の高い腸管上皮モデルを構築できるか検討を行った。

まず、大腸幹細胞をもちいて ALI 培養による腸管上皮の分化誘導を行い、組織を評価したところ、免疫蛍光染色にて腸管上皮のマーカーである CDH17 の発現が確認でき、また杯細胞のマーカーである MUC2 が散在して発現していた。この結果より、既報と同様に ALI 培養法により大腸幹細胞の分化が誘導されることが確認できた。

続いて、iPS 細胞から腸管上皮への分化誘導を行った。腸管上皮への分化の過程で、多能性幹細胞はまず内胚葉へと分化し、続いて中後腸に分化した後、腸管上皮へと成長する。iPS 細胞から腸管上皮への分化誘導は、この過程を適切に誘導することが重要であり、各段階での分化マーカーを評価しつつ培養を行った。

まず、iPS 細胞から内胚葉へと分化を誘導する際、既報によって方法に違いが見られたが、3日間 Activin A を添加するだけではなく、day1 に CHIR99021(GSK-3 $\beta$  阻害薬)

を添加することによって、より内胚葉のマーカである CXCR4、SOX17、FOXA2 の発現が上昇し、効率的に内胚葉へ誘導できることを確認した。内胚葉から中後腸への分化は CHIR99021 と FGF4 により誘導し、腸管上皮のマーカである CDX2 の発現を確認できた。この後も 2 次元培養を継続して、EGF、CHIR99021、LDN193819 を用いて腸管上皮幹細胞へ分化させた。day25 前後まで培養したところで細胞を単離し、トランズウェルに播種した。7~10 日程度トランズウェルの上下に培養液を入れた状態で培養を継続し、細胞の増殖、接着を待ったのち、トランズウェルの上側の培養液を除去して ALI 培養を行った。およそ、day55 前後まで培養を続け組織を固定し評価を行った。

その結果、ヘマトキシリンエオジン染色を行うと気相側に単層円柱上皮が並び、液相側に間質様の構造を持つ組織が形成されていた。iPS 細胞から内胚葉へと分化させる際に、一部は中胚葉へと分化し、多能性幹細胞から分化誘導した腸管上皮オルガノイドには間葉系細胞が含まれることが報告されている。興味深いことに、本研究においては、トランズウェルに上皮細胞と間葉系細胞が混在した状態で播種しているにもかかわらず、自律的に腸管様の組織構築が認められた。続いて、免疫蛍光染色にて CDX2 の発現を確認すると、単層円柱上皮細胞の核が染色され、腸管上皮細胞に矛盾しないことを確認した。さらに間質の部分の細胞はすべて Vimentin 陽性であり、一部には Vimentin および  $\alpha$ -SMA が陽性となる細胞が腸管上皮細胞を裏打ちするように存在し、線維芽細胞と一部の筋線維芽細胞で構成されていることが分かった。

続いて、本モデルの腸管上皮が小腸もしくは大腸のどちらの特徴をもつのか、小腸のマーカである CPS1 および大腸のマーカである SATB2 を用いて免疫蛍光染色を行ったところ、CPS1 陽性、SATB2 陰性となり、主に小腸へ分化していると考えられた。

小腸の腸管上皮細胞は、腸管上皮幹細胞から分化した吸収上皮細胞、杯細胞、パネート細胞、腸管内分泌細胞で主に構成されている。これらの細胞の発現を免疫染色で確認したところ、吸収上皮に発現する Villin、杯細胞に発現する MUC2、パネート細胞に発現する Lysozyme、腸管内分泌細胞に発現する Chromogranin A が陽性となり、本モデルにおいても小腸の多様性に富んだ分化細胞へと分化していることが確認できた。また、iPS 細胞からこれらの腸管上皮細胞に至るまでの各分化段階における遺伝子発現の変化を定量 PCR で評価したところ、多能性幹細胞および前腸のマーカである SOX2 は中後腸へ分化して以降、iPS 細胞と比較し有意に発現が低下し、CDX2 は中後腸の時点から発現が上昇して、トランズウェル播種前の day25 で最も発現が上昇していた。Day55 では発現がやや低下していたが、これはトランズウェルに播種した組織において腸管上皮は管腔側の一層のみのため、間葉系細胞が相対的に増えるためだと考えられる。これを支持する結果として、Vimentin は day55 で最も発現が上昇していた。腸管幹細胞マーカである LGR5、BMII は中後腸の時点で最も発現が高値となった。そのほか各分化細胞のマーカである Villin、MUC2、CHGA、LYZ は、day25 での発現は少ないが、ALI 培養にて分化誘導した後の day55 で有意に上昇していた。

本研究の目標の一つとして、腸管上皮の極性の利用を容易にするモデルを構築することがあげられるが、この極性を評価する目的として一般的なエクソソームの表面マーカーである CD63 および CD9 で免疫組織化学染色を行った。その結果、CD63 は主に管腔側、CD9 は基底膜側で染色がみられ、発現分布より本モデルの腸管上皮には明確な極性があることが確認できた。これはヒトの生体組織における発現についての既報と同様の結果であった。

さらに、今回おもに使用したヒト正常 iPS 細胞株以外の細胞株でも同様に腸管上皮モデルが作成できるか、その他のヒト正常 iPS 細胞株を用いて細胞分化、ALI 培養を行ったところ、同様に腸管上皮組織を作成することができた。さらに、クローン病小腸大腸型および小腸型患者由来の疾患特異的 iPS 細胞株を用いて同様の培養法を行ったところ、こちらも腸管上皮組織の構築がみられ、その他の iPS 細胞株にも汎用できる培養法であることが確認できた。

本研究の腸管上皮モデルの特徴として、腸管上皮細胞と間質細胞が自律的に組織化した、より生体に近い腸管組織モデルであることが挙げられる。間質は単なる腸管上皮細胞の足場や支持組織ではなく、上皮と間質の相互作用が腸管の発達や上皮の増殖において重要な役割を果たしているとされており、また、上皮間葉相互作用が炎症時における粘膜の修復、再生や悪性腫瘍の発生に関わっている可能性が報告されるなど、疾患研究において上皮と間葉の関わりを評価することは重要な観点と考えられる。本研究のモデルは自律的に組織化された腸管上皮および間葉組織をあわせ持つ腸管組織であり、この点からも研究応用が期待できると考える。

上述のように、本研究では、気相液相界面培養法を用いて極性が明確な腸管上皮の *in vitro* モデルを構築し、さらに汎用性の高いヒト iPS 細胞から分化誘導を行うことで新規のモデルを作成することに成功した。さらに、生体に近い多様な腸管上皮細胞と間質細胞により構成されていることが示された。このモデルは既存の腸管上皮オルガノイドで弱点となっている管腔側へのアプローチを容易にし、iPS 細胞の特性を生かした幅広い研究への応用を可能にする有用なツールとなりうると考える。