

審査の結果の要旨

氏名 田中 恵理

本研究は、腸管上皮の極性を利用しやすいヒト腸管上皮 *in vitro* モデルの作成を目的とし、大腸幹細胞およびヒト多能性幹細胞より気相液相界面培養法を用いたヒト腸管上皮 *in vitro* モデルの構築について検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. 大腸幹細胞をもちいて気相液相界面(Air-liquid interface: ALI)培養法による分化誘導を行い、組織を評価したところ、丈の高い単層円柱上皮が見られ、免疫蛍光染色にて腸管上皮のマーカーである CDH17 および杯細胞のマーカーである MUC2 の発現を認めた。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。
2. 続いて、汎用性の高い iPS 細胞からも同様のモデルの作成を試みることにした。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ーである 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、腸管上皮のマーカーである CDX2 の発現を確認した。
3. ALI 培養を行い day55 の時点で組織を評価すると、腸管上皮と間質を併せ持った組織構築が見られた。小腸のマーカーである CPS1 陽性、大腸のマーカーである SATB2 陰性となり、主に小腸へ分化していると考えられた。
4. 間質の部分の細胞はすべて Vimentin 陽性であり主に線維芽細胞で構成され、一部には Vimentin および  $\alpha$ -SMA が陽性となる筋線維芽細胞が腸管上皮細胞を裏打ちするように存在していた。
5. 本モデルの腸管上皮を構成する細胞を免疫染色で評価したところ、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、小腸の多様性に富んだ腸管上皮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ーである 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 は中後腸以降に発現が上昇した。腸管幹細胞マーカーである 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ーである 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 で発現が高値となった。

6. 本モデルの腸管上皮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。
7. 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。

以上、本論文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。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。