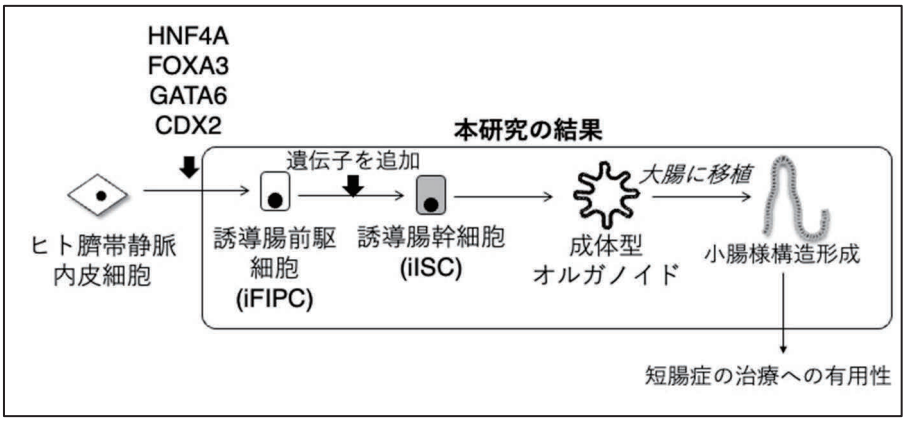
148　直接誘導法による移植応用可能な誘導腸幹細胞の作製	三浦　静

【目的】2017 年に筆者らは、細胞を未分化な状態を経ずに目的の細胞へと分化転換させるダイレクトリプログラミング法を利用して、マウス胎仔由来線維芽細胞に 4 つの転写因子（*Hnf4α*、*Foxa3*、*Gata6*、*Cdx2* ）を組み合わせて導入することで胎仔腸由来の腸前駆細胞（FIPC）と同様の性質を持つ誘導腸前駆細胞（iFIPC）の作製に成功した（Miura and Suzuki., *Cell Stem Cell.*, 2017）。iFIPC は FIPC と同様に球状の胎仔型オルガノイドを形成して腸幹細胞（ISC）の性質をもつ誘導腸幹細胞（iISC）へと成長し、陰窩－絨毛構造を有する成体型オルガノイドを形成した。また、iISC は、生体内と同様に 4 種類の腸上皮細胞に分化することが可能であり、自己複製能も有していた。さらに、これらのオルガノイドを大腸炎モデルマウスに移植すると、胎仔型オルガノイドは大腸上皮組織を再構築し、成体型オルガノイドは小腸上皮組織を再構築することができた。ヒトの細胞においてもヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）に 4 つの転写因子を導入することで、ヒト iFIPC へとリプログラミングし、ヒト胎児型オルガノイドが形成された。ヒト胎児型オルガノイドは、大腸炎モデルマウスの大腸中でヒト大腸組織を再構築できた。このことから、ヒト iFIPC は、医療応用への利用が期待される細胞である。しかし、実際に医療応用可能な細胞であるかは未だ明らかになっていないという点や、ヒト iFIPC への誘導は可能となったが、マウス iFIPC とは異なり、iISC へと成長させる方法が確立されていないという問題が残されている。そこで本研究では、短腸症への移植に有用な細胞を作製すべく、ヒト iFIPC を iISC へと成長させ、大腸中でヒト小腸組織を構築させることを目的とする。生体由来の細胞を用いる場合、患者の小腸から採取する必要があるため、侵襲性の問題や患者の体への負担が考えられるが、ヒト iISC を患者由来の細胞から作製できるようになれば、低侵襲な方法で大量に細胞の作製が可能であり、細胞移植の新たなソースとして移植医療に貢献できる。

【方法】1. ヒト iFIPC を iISC へと成長させる方法の探索：まず、腸の分化に重要な転写因子に関する情報を収集し、それらをヒト iFIPC に強制発現した。その後、ヒト iFIPC を長期間培養し、形態や遺伝子発現が成体型オルガノイドと類似しているかを解析した。2. ヒト iISC 由来成体型オルガノイドの大腸移植：上記実験で成体型オルガノイドを作製できたため、免疫不全大腸炎モデルマウスの大腸への移植を行い、小腸組織を構築するかを解析した。生着の有無については、ヒトの細胞特異的に反応する CK8/18 抗体を用いた。また、小腸様構造形成の有無については、小腸のマーカーである Sucrase-isomaltase や Lysozyme の免疫染色、HE 染色による組織学的解析を行った。

【結果】腸の分化に重要な転写因子をヒト iFIPC に強制発現すると、陰窩-絨毛様構造を有するオルガノイドが形成された。この成体型オルガノイドは腸幹細胞や分化した細胞を含んでおり、長期間培養することができた。また、このオルガノイドを大腸炎モデルマウスに移植すると、小腸組織を構築できることが明らかになった。

本研究の概要



148. 直接誘導法による移植応用可能な誘導腸幹細胞の作製

三浦　静

九州大学 生体防御医学研究所 器官発生再生学分野

Key words：ダイレクトリプログラミング，腸幹細胞，オルガノイド

緒　言

1. 腸の疾患とオルガノイド研究

小腸は栄養素などの外部からの物質を取り込む機能を有している。そのため、何らかの理由で小腸の大量切除をおこなった場合、短腸症と呼ばれる腸管機能不全の疾患が引き起こされることがある。短腸症の治療法としては、経静脈栄養が必須であり、患者の QOL の向上のためにも細胞移植など新たな治療法の開発が望まれる。そうした中、2009 年には、マウスの小腸幹細胞（ISC）を培養下で増殖維持させる方法が確立され、腸の疾患研究に広く使用されている［1]。ISC は三次元培養することによって生体内と同様に陰窩-絨毛構造を有する組織構造体（オルガノイド）を形成する。ヒトの ISC もマウスと同様のオルガノイドを形成することが可能であり、最近、ヒト ISC 由来オルガノイド（以下、成体型オルガノイド）を短腸症の治療へと利用するための研究が報告された［2]。マウスの成体型オルガノイドを大腸に移植すると小腸の組織構造を構築することから、このマウスでの研究を基盤として、ヒトの成体型オルガノイドをラットの大腸に移植して小腸組織を構築させたのち、小腸構造を有する大腸を切りとって短腸症モデルラットの小腸に移植するという方法が確立された。

2. ダイレクトリプログラミングを用いた腸上皮オルガノイド研究

2017 年に筆者らは、細胞を未分化な状態を経ずに目的の細胞へと分化転換させるダイレクトリプログラミング法を利用して、マウス胎仔由来線維芽細胞に 4 つの転写因子（*Hnf4α*、*Foxa3*、*Gata6*、*Cdx2* ）を組み合わせて導入することで胎仔腸由来の腸前駆細胞（FIPC）と同様の性質を持つ誘導腸前駆細胞（iFIPC）の作製に成功した[3]。iFIPC は FIPC と同様に球状の胎仔型オルガノイドを形成して ISC の性質をもつ誘導腸幹細胞（iISC）へと成長し、陰窩ー絨毛構造を有する成体型オルガノイドを形成した。また、iISC は、生体内と同様に 4 種類の腸上皮細胞に分化することが可能であり、自己複製能も有していた。さらに、これらのオルガノイドを大腸炎モデルマウスに移植すると、胎仔型オルガノイドは大腸上皮組織を再構築し、成体型オルガノイドは小腸上皮組織を再構築することができた。ヒトの細胞においてもヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）に 4 つの転写因子を導入することで、ヒト iFIPC へとリプログラミングし、ヒト胎児型オルガノイドが形成された。ヒト胎児型オルガノイドは、大腸炎モデルマウスの大腸中でヒト大腸組織を再構築できた。このことから、ヒト iFIPC は、医療応用への利用が期待される細胞である。しかし、実際に医療応用可能な細胞であるかは未だ明らかになっていないという点や、ヒト iFIPC への誘導は可能となったが、マウス iFIPC とは異なり、iISC へと成長させる方法が確立されていないという問題が残されている。そこで本研究では、短腸症への移植に有用な細胞を作製すべく、ヒト iFIPC を iISC へと成長させ、大腸中でヒト小腸組織を構築させることを目的として研究を行った。生体由来の細胞を用いる場合、患者の小腸から採取する必要があるため、侵襲性の問題や患者の体への負担が考えられるが、ヒト iISC を患者由来の細胞から作製できるようになれば、低侵襲な方法で大量に細胞の作製が可能であり、細胞移植の新たなソースとして移植医療に貢献できる。また、本研究は、患者の QOL を高める上でも非常に重要な研究であると考えられる。

方　法

1. ヒト iFIPC を iISC へと成長させる方法の探索

まず、腸の分化に重要な転写因子に関する情報を収集し、それらの遺伝子を搭載したレトロウイルスベクターを作製した。その後、レトロウイルスを用いてヒト iFIPC にそれらの遺伝子を強制発現した。遺伝子を強制発現したヒト iFIPC を長期間培養し、形態が成体型オルガノイドと類似しているかを調べた。その後、腸幹細胞で発現している LGR5 の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションで解析し、分化細胞マーカーの発現は免疫染色によって解析した。また、定量的遺伝子発現解析によって腸幹細胞マーカーおよび腸の分化細胞マーカーの発現を調べた。

2. ヒト iISC 由来成体型オルガノイドの大腸移植

免疫不全大腸炎モデルマウスの大腸への移植を行い、ヒト小腸組織を構築の有無について調べた。免疫不全大腸炎モデルマウスは、NSG マウスにデキストラン硫酸ナトリウムを投与することで作製した。移植後 1 ヶ月で解析を行い、生着の有無を確認した。生着の有無については、ヒトの細胞特異的に反応する CK8/18 抗体を用いた。その後、小腸上皮細胞のマーカーである Sucrase-isomaltase や小腸の陰窩に存在するパネート細胞マーカーの Lysozyme の免疫染色、その他分化マーカーの免疫染色と HE 染色による組織学的解析を行った。

結　果

1. ヒト iFIPC を iISC へと成長させる方法の探索

腸の分化に重要な転写因子に関する情報を収集し、いくつかの遺伝子をヒト iFIPC に強制発現した。遺伝子を強制発現したヒト iFIPC を腸幹細胞用の培地で培養すると、陰窩-絨毛様構造を有する成体型のオルガノイドへと成長した（図 1）。*In situ* ハイブリダイゼーションの結果より、このオルガノイドは LGR5 を発現している腸幹細胞を含んでいることが明らかになった。また、腸の分化細胞であるパネート細胞や杯細胞、吸収上皮細胞、内分泌細胞もオルガノイド中に含まれていることが免疫染色によって示された。さらに、遺伝子発現解析の結果から、新たに作製したオルガノイドは、これまでのオルガノイドよりも腸幹細胞マーカーや分化細胞マーカーの発現が高いことが明らかになった。これらの結果から、作製した細胞は多分化能を有していることが明らかになった。また、このオルガノイドは長期間培養が可能であり、腸幹細胞としての性質を維持し続けることができた。このことから、新たな方法で作製した iFIPC は、誘導腸幹細胞（induced intestinal stem cell：iISC）へと成長できることが明らかになった。

2. ヒト iISC 由来成体型オルガノイドの大腸移植

大腸炎免疫不全マウスの大腸にヒト iISC 由来のオルガノイドを移植した。まず、生着の有無を調べるためにヒト CK8/18 抗体で免疫染色を行った。その結果、マウスの大腸中でヒト CK8/18 を発現するヒト iISC 由来のオルガノイドの生着が確認された。つづいて、HE 染色を用いた組織学的解析を行った結果、移植した細胞は大腸中でヒト小腸様構造を形成していることが示された。そこで、iISC 由来のオルガノイドが生着した部分の免疫染色を行ったところ、小腸上皮細胞マーカーである Sucrase-Isomaltase の発現が確認された。さらに、生着した組織の陰窩では Lysozyme 陽性の細胞も観察され、小腸に存在するパネート細胞にも分化していることがわかった。その他の腸幹細胞マーカーや分化細胞マーカーについても発現が観察され、生体内でも多分化能を維持していることが明らかになった。このことから、iISC 由来のオルガノイドは、ヒトの小腸組織として生着し、分化可能であることが示された。

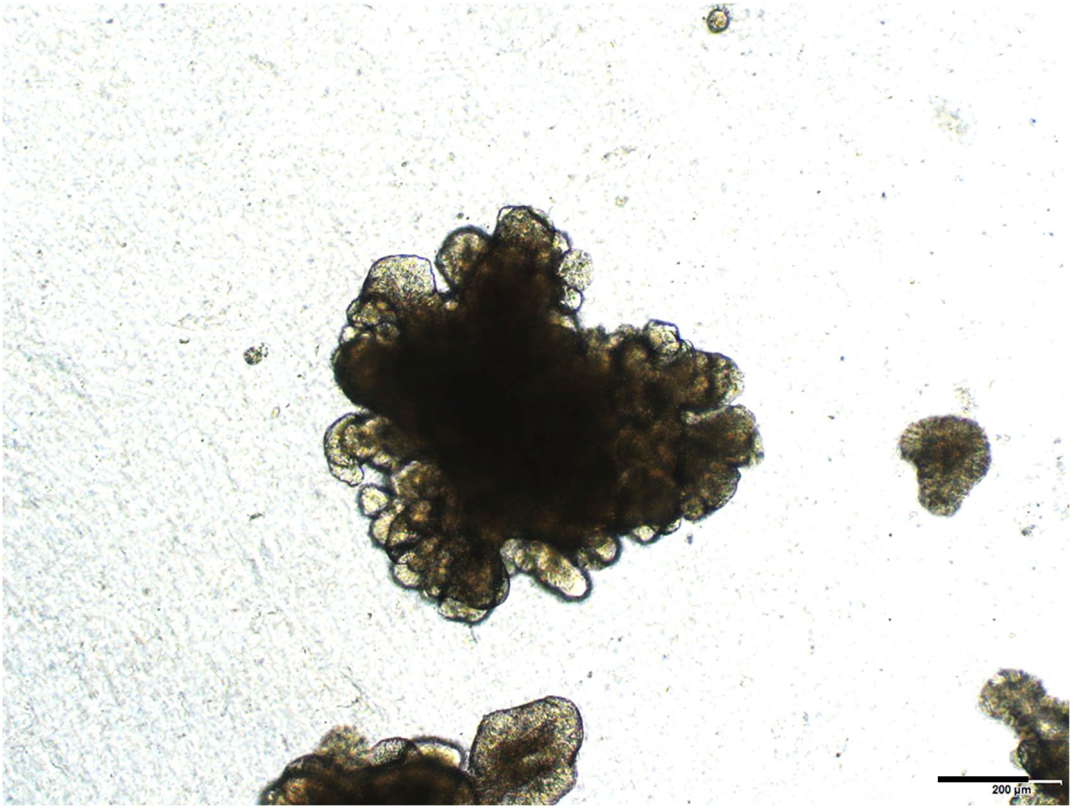


図 1. iISC 由来のオルガノイド

新たな方法で作製した iISC 由来のオルガノイドは、陰窩-絨毛様構造を有する成体型オルガノイドを形成した（スケールバー：200 μm）。

考　察

本研究によって、iFIPC を iISC へと成長させる新たな方法を確立できた。これまでの方法では陰窩-絨毛様構造を有するオルガノイドは作製できなかったことから、本研究結果は大変画期的な成果である。胎児の生体から採取した FIPC においても培養下で ISC へと成長させる方法は確立されておらず、その方法の確立が望まれていた。よって、本研究の方法は *in vitro* で腸の発生研究を行うための新しい方法となりうるかもしれない。このように、本研究は腸の研究の発展にも貢献できる可能性がある。また、*in vitro* だけではなく生体内でも小腸の細胞として生着できることが明らかになり、移植への利用も期待できる。今後は、この方法を利用して自己の細胞からヒト iISC を作製することによって、生体由来の細胞の代わりとして短腸症などの小腸の疾患に対する治療にも貢献したい。そのために、本研究での結果をもとに、ヒトの血液由来の細胞から iISC の作製を試みたい。血液由来の iISC は、免疫拒絶の問題を解決できるとともに、患者一人一人の遺伝的背景を含めた細胞を作製できるため、移植や創薬研究に利用できる。また、ゲノムへの遺伝子の挿入がない方法（プラスミドやセンダイウイルス、アデノウイルスなど）を利用して血液由来 iISC を作製できれば、実際に臨床応用可能な新たな細胞として、様々な腸の疾患への利用も期待できる。

謝　辞

本研究は九州大学生体防御医学研究所器官発生再生学分野の鈴木淳史教授にご助言をいただき遂行することができた。

文　献

1) Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. Nature. 2009 May 14;459(7244):262-5. doi: 10.1038/nature07935. Epub 2009 Mar 29.PMID: 19329995

2) Sugimoto S, Kobayashi E, Fujii M, Ohta Y, Arai K, Matano M, Ishikawa K, Miyamoto K, Toshimitsu K, Takahashi S, Nanki K, Hakamata Y, Kanai T, Sato T. An organoid-based organ-repurposing approach to treat short bowel syndrome. Nature. 2021 Apr;592(7852):99-104. doi: 10.1038/s41586-021-03247-2. Epub 2021 Feb 24.PMID: 33627870

3) Miura S, Suzuki A. Generation of Mouse and Human Organoid-Forming Intestinal Progenitor Cells by Direct Lineage Reprogramming. Cell Stem Cell. 2017 Oct 5;21(4):456-471.e5. doi: 10.1016/j.stem.2017.08.020. Epub 2017 Sep 21.PMID: 28943029