

令和元年5月31日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15968

研究課題名(和文)腸内細菌-腸管上皮-免疫応答の一連反応観察のための新規オルガノイド培養法の確立

研究課題名(英文)A novel culture system of intestinal epithelium for study the interaction among microbiome-host epithelium-immune cells

研究代表者

佐々木 伸雄 (Sasaki, Nobuo)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：30777769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまで報告されているオルガノイドは3次元構造体を形成する。そのため、腸内細菌と上皮細胞の相互作用を研究するためには、細菌をオルガノイドの内側に注入する必要があり、高度な技術が要求される。そこで本研究は、既報の3次元オルガノイド培養法に改良を加えることで、腸管上皮を2次元の状態に培養する方法を確立した。また、既報のヒト腸管オルガノイド培養条件に修正を加えることで、ヒト腸管単層培養法で培養された腸管上皮は、幹細胞だけでなく、全ての分化細胞が存在している状態で長期間培養することが可能となった。以上のことより、腸内細菌との相互作用観察に適した新規2次元腸管上皮培養法を確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌は、我々の健康と深い関係があることが明らかにされてきている。しかし、これまでの腸内細菌研究は、腸内細菌と病気との相関性を示すものが主であり、これらの具体的な因果関係を示す研究は未だに少ない状況であった。本研究成果は、腸内細菌による健康維持や疾患発症メカニズムの理解を助ける新規の細胞培養法であり、今後は科学的根拠に基づいた安全性高いプロバイオティクスの開発などに利用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：As organoids cultured in the original method represent 3D structures, the gut microbiome is needed to transplant inside of organoid by microinjection to study the mechanism of their interaction. However, this microinjection on organoid is intrusive and required for high skill. Here, we developed a novel monolayer culture of the intestinal epithelium by some modification of an original recipe. Using this culture condition, the human normal intestinal epithelial cells were cultured containing not only stem cell, but also every functional differentiated cell such as enterocyte, goblet cell, and enteroendocrine cell. Therefore, this culture method of the monolayered human gut epithelium represented the almost same physiological condition of the gut in our body in the dish, and we strongly emphasized it is a very easy system to study the interaction mechanism between host cells and bacteria.

研究分野：組織幹細胞

キーワード：組織幹細胞 オルガノイド 腸内細菌

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの腸内細菌に関する研究により、腸内微生物は宿主と複雑な相互作用の上で共生関係にあり、宿主と一生共存して全身の恒常性維持に重要な役割をはたすことが明らかにされてきた。しかし微生物と宿主細胞の相関性を示す報告は数多くあるものの、因果関係を説明する分子機構に関しては未だ不明な点が多い。その1つの大きな理由として、これまで正常な腸管上皮細胞が長期間培養することができなかったため、詳細な分子生物学的研究を行うための *in vitro* 実験系がなかったことが考えられる。しかし、最近では成体腸管上皮組織幹細胞培養法（オルガノイド培養法）が確立されたことより、マウスやヒトにおいても正常な腸管上皮細胞を培養することが可能になった。この培養法の特徴は、幹細胞の自己複製能力を保持しているため長期間安定的に継代培養できるだけではなく、腸管上皮を構成する全ての機能性分化細胞を産出できる多分化能もコントロールできるため、生体腸管の生理機能をシャーレ上で再現することができる。そのためオルガノイドは、腸内細菌から宿主細胞への影響、さらにその反対に宿主上皮細胞が腸内細菌へ供与する効果を検証するのに有効な培養系になることが期待されている。そこで本課題研究は、既報のオルガノイド培養法をさらに発展させることで、腸内細菌と宿主の共生関係を理解するための研究基盤となる新規腸管上皮培養法の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

これまでに報告されているオルガノイド培養法は、生体内の腸管にみられる絨毛-陰窩構造を擬似化した単層上皮細胞による3次元構造体を形成する。したがって、この培養法で作製されるオルガノイドは濾胞構造をとり、体内の腸内細菌が存在するのはこのオルガノイドの内腔側となる。そのため、実際にオルガノイドを用いて腸内細菌-上皮細胞の相互作用を検証するためには、マイクロインジェクション法などで微生物をオルガノイドに直接注入する必要があり、高度な技術が要求されるなど汎用性が低い問題がある。また、現行のヒト腸管上皮オルガノイド培養法は、幹細胞を永続的に培養するための増殖培地と、多分化能を誘導するための分化培地の2種類を使い分ける必要がある。増殖培地条件下では、幹細胞を安定的に培養することができるが、この培地で培養されているオルガノイドには機能性分化細胞が存在しない。対照的に、分化培地で培養したオルガノイドでは、粘液産出細胞である杯細胞や水分や栄養吸収に重要な吸収上皮細胞が存在するが、継代培養することができない。そのためヒト正常上皮細胞に関しては、安定的に長期間培養しながら、上皮細胞の生理機能を調べることは不可能であるという問題がある。さらに、従来のオルガノイド培養法は上皮細胞のみの培養法であるため、腸内細菌と密接な関係にある粘膜免疫細胞の異常に起因する炎症性腸疾患などの病態を再現することが困難である。そこでこれらの問題を解決するために、本研究では既存のオルガノイド培養技術を発展させ、腸内細菌研究に有益な新規のオルガノイド培養法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 腸内細菌と宿主上皮細胞の相互作用を簡便に観察するための腸管上皮の2次元単層培養法の検討

従来のオルガノイド培養法で培養されたヒトの正常腸管は3次元構造をとり、腸管内腔側が内側を向いていることが、腸内細菌との相互作用を検証する上で律速となっている。そこでこの腸管上皮細胞の3次元培養法を2次元の状態で単層培養化することで、簡便に腸内細菌と相互作用を検証できる培養系を開発することにする。実際には、トランズウェルを用いて単層培養に適した細胞外基質の選定や既報のオルガノイド培地に修正を加えることで、ヒト正常腸管（小腸・大腸）上皮を長期間安定的に単層状態で培養できる条件を検討した。また、幹細胞、吸収上皮細胞、杯細胞、神経内分泌細胞、パネート細胞（小腸のみ）、deep crypt secretory 細胞（大腸のみ）がすべて含んだ状態での2次元培養法を確立するために、様々な培地条件を検討する。1週間以上にわたり腸管上皮細胞が培養された培養条件で構成される細胞の種類を調べるために、各細胞におけるマーカー遺伝子の発現パターンについて、定量的RT-PCR法によって検証した。

(2) ヒト腸管上皮の生理条件を再現できる長期間2次元オルガノイド培養法の確立

腸管上皮細胞は、頂端部-基底部極性（頂底極性）、細胞間密接結合、物質透過性を制御する、という特徴を持つ。そこで本課題研究で作製した単層培養法で培養される腸管上皮細胞が、生体内の生理機能を反映するのかについて、上記の三点について検討する。に関しては、上皮細胞の頂端部に特異的に局在するマーカータンパク質（頂端部 F-actin、基底部 integrin-6 (ITGA6)）の発現を免疫細胞化学染色法によって、に関しては、タイトジャンクションを構成するZO-1分子、アドヘレンスジャンクションを構成するCDH1分子の発現を免疫細胞化学染色法によって、に関しては、経上皮電気抵抗の測定や蛍光標識をしたデキストランを用いた取り込み実験を実施することで腸管上皮細胞の性質を検討した。

(3) 確立した新規培養法を用いた宿主と腸内細菌の相互作用検証実験

本課題研究で開発した単層培養ヒト腸管上皮細胞が腸内細菌との相互作用を簡便に観察できる *in vitro* 培養系であることを証明するために、腸管上皮細胞と直接的に接着をすることが知られている病原性大腸菌 0-157:H7 株を用いて共培養実験を試みる。前培養した大腸菌を 2 次元培養しているトランズウェルの上層に加えるだけで、腸管上皮と直接接触することを調べるために、電子顕微鏡を用いて詳細に観察した。さらに腸内細菌研究への応用実用化に向けて、実際に腸内細菌叢の乱れ(dysbiosis)に起因する疾患の患者から入手したヒト糞便から同定された細菌の機能解析を実施した。

#### 4. 研究成果

(1) まず初めに、トランズウェルを用いて腸管上皮を 2 次元化した単層状態で培養するために必要な細胞外基質の選定を行った。ゼラチンやコラーゲンなどを用いて単層培養を試みたが、希釈したマトリジェルを用いてトランズウェルをコートする方法が、ヒトの腸管上皮を効率よく 2 次元で培養できることが明らかとなった。さらに研究代表者は、生体内の生理機能を再現できるようなヒト腸管上皮単層培養に適する培地の選択を行った。3 次元ヒト腸管オルガノイド培養法のプロトコルを参考にし、単層培養を作製する際には増殖培地を用いて、腸管上皮細胞がトランズウェルを完全に覆ったことを確認してから、分化培地に変更することで杯細胞や吸収上皮細胞などの機能性細胞を誘導する方法を手検討した。この方法では、きちんと腸管上皮細胞が単層状態でコンフルエントになるまで増殖し、また分化培地に変更することで機能性分化細胞が誘導できることが分かった。しかしこの培養法は、一旦分化培地に変更すると、腸管上皮細胞を長期間維持することができなかつたり、出現する機能性分化細胞の数(割合)がばらついたりするといった問題がみられた。そこでこれらの問題を解決するために、研究代表者は従来のヒト腸管オルガノイド培地に適切な成長因子を加えることで、幹細胞と機能性分化細胞が共存する状態で、長期間安定的にヒトの腸管上皮細胞を単層状態で培養することに成功した。実際に、新規培養液を用いたヒト大腸上皮 2 次元培養法で 1 週間培養した腸管上皮から RNA を回収し、定量的 RT-PCR 法を用いて幹細胞(*LGR5*, *PTK7*)、杯細胞(*MUC2*)、神経内分泌細胞(*CHGA*)、大腸上皮細胞(*AQP8*, *CAR1*)それぞれのマーカー遺伝子の発現を調べたところ、幹細胞だけではなく、すべての分化細胞のマーカー遺伝子の発現が観察された。以上の結果より、新規オルガノイド培養液で培養した 2 次元腸管上皮細胞は、長期間安定的に培養できるようになっただけでなく、機能性分化細胞が幹細胞自立的に産出されることが明らかとなった。

(2) (1) で最適化された培養条件で培養された単層のヒト腸管上皮細胞の生理機能を調べることにした。頂底極性が正常に形成されているかを検証するために、Phalloidin を用いて腸管上皮細胞の F-actin を染色し、共焦点顕微鏡を用いて X-Z 軸観察した。その結果、F-actin が上皮細胞の上部(頂端側)で集積することが分かった。次に、基底部に局在することが知られている ITGA6 の細胞内局在についても同様に、抗 ITGA6 抗体を用いた免疫化学染色法と共焦点顕微鏡を用いた観察により、この培養条件で培養されたヒト腸管上皮細胞において ITGA6 が基底部に局在することが明らかとなった。これら結果は、トランズウェル上で培養されている 2 次元上皮細胞は、頂端側が培養液中(上側)に露呈する形で存在し、さらに頂端極性を維持しながら培養されていることを示唆するものであった。

また、1 週間培養したヒト腸管単層上皮細胞を抗 ZO-1 抗体、抗 CDH1 抗体を用いて免疫化学染色し、共焦点顕微鏡観察による細胞間密接結合の確認を行った。その結果、この培養条件で培養されているヒト腸管上皮細胞におけるタイトジャンクションやアドヘレンスジャンクションが正常に形成されていることが明らかとなった。さらにこの培養条件で培養されている 2 次元腸管上皮細胞における物質透過性を調べるために、経上皮電気抵抗性を測定した。培養開始直後における経上皮電気抵抗は  $100(\cdot \text{cm}^2)$  程度であったが、腸管上皮細胞がトランズウェルを完全に覆うことが確認される培養開始 2~3 日後における経上皮電気抵抗は、生体内の大腸上皮とほぼ同等である  $400-800(\cdot \text{cm}^2)$  まで上昇することが明らかとなった。さらに、蛍光(FITC)標識されたデキストランを用いた経時的な腸管透過性評価も同時に実施したところ、経上皮電気抵抗値の上昇がみられる培養開始 3 日後において、トランズウェルの下層で検出できる FITC-デキストラン量が最小になることが明らかとなった。以上の結果は、本課題で作製した新規プロトコルを用いて培養したヒト 2 次元腸管上皮細胞は、生体内の腸管上皮同様に粘膜バリアとして機能することが示唆された。

(3) 本課題研究の成果である新規 2 次元ヒト腸管上皮細胞培養系が、腸内細菌と宿主間に存在する相互作用の検証する実験に適するかを検討するために、腸管上皮細胞に直接接着することが知られている病原性大腸菌(0-157)との共培養を行った。初めにトランズウェルを用いて、正常ヒト大腸上皮細胞の単層培養を行い、腸管上皮細胞が単層状態でコンフルエントになったのを確認した後、液体 LB 培地で前培養した 1,000 cells の 0-157 をトランズウェルの上層側の培地に添加することで、腸管上皮と 0-157 の共培養を開始した。培養開始 6, 12, 24 時間後においてサンプルを回収し、0-157 と共培養した腸管上皮細胞を走査性や透過性電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、培養開始 6 時間後から腸管上皮の頂端側に接着する 0-157 が観察されはじめ、12 時間後では場所によっては 0-157 がコロニーを形成しているのが観察された。共

培養開始 24 時間後の腸管上皮では、0-157 がコロニーを形成している部分において、腸管上皮細胞による粘膜バリアーが崩壊している様子が観察された。さらにヒト正常小腸上皮細胞や大腸がん患者由来上皮細胞の単層培養にも成功したので、同様に 0-157 との共培養を行ったところ、ヒト正常大腸上皮細胞と同様に 0-157 と接着する上皮細胞が観察された。

さらに開発した 2 次元ヒト腸管上皮培養法が腸内細菌研究へ応用できるかを検討するために、ヒト患者の糞便中に含まれる機能性細菌を同定することを試みた。難治性希少疾患である原発性硬化性胆管炎(PSC)患者の多くは大腸炎を併発することが知られている。そこで我々のグループは、PSC が腸内細菌依存的な疾患であるという仮説を立てて研究を行った。はじめに PSC 患者の糞便を無菌マウスに投与し、対照群として健康人、炎症性腸疾患患者の糞便を無菌マウスに投与したヒト糞便化マウスを樹立した。これらのマウスにおいて、PSC 患者糞便を投与したマウスでのみ、炎症性サイトカイン IL-17 を産出する T<sub>H</sub>17 細胞が肝臓で異常に増加することが確認された。この結果は、PSC が腸内細菌依存的な疾患であることを強く示唆するものであった。そこで次に我々は、この PSC 患者の糞便中に含まれる病原性細菌の同定を試みた。腸内細菌 16SrDNA メタゲノム比較解析などにより絞り込まれた候補細菌について、2 次元培養したヒト腸管上皮細胞と共培養することで、これらの細菌が上皮組織に対する影響を検証した。これらの研究は現在進行中ではあるが、既に宿主上皮細胞へ影響を与える候補細菌の同定に成功しており、今後これらの細菌の分子機能を明らかにし、PSC 発症のメカニズムを理解していく。以上の結果から、本課題研究で開発したヒト腸管上皮 2 次元培養法は、生体内の腸管上皮と同様の生理状態をシャーレ上で再現しており、実際に腸内細菌の機能解析を行う *in vitro* 培養系として有効であることが分かった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Roerink SF\*, **Sasaki N\***, Lee-Six H, Young M, Alexandrov LB, Behjati S, Mitchell TJ, Lightfoot H, Egan DA, Pronk A, Smakman N, van Gorp J, Anderson E, Gamble S, Alder C, van de Wetering M, Campbell PJ, Stratton MR, Clevers H (\*equal contribution as first author). Intra-tumour diversification in colorectal cancer at the single-cell level. *Nature* (2018) 556(7702):457-462. doi: 10.1038/s41586-018-0024-3 (査読あり)
2. Borten M\*, Bajikar S\*, **Sasaki N**, Clevers H, Janes K. (\*equal contribution as first author) Automated brightfield morphometry of 3D organoid populations by OrganoSeg. *Sci Rep* (2018) 28:8(1):5319. doi: 10.1038/s41598-017-18815-8. (査読あり)
3. Mito A, Nakano Y, Saitoh T, Gouraud SSS, Yamaguchi Y, Sato T, **Sasaki N**, Kojima-Aikawa K. Lectin ZG16p inhibits proliferation of human colorectal cancer cells via its carbohydrate-binding sites. *Glycobiology* (2018) 28(1):21-31. doi:10.1093/glycob/cwx088 (査読あり)
4. Drost J, van Boxtel R, Blokzijl F, Mizutani T, **Sasaki N**, Sasselli V, de Ligt J, Behjati S, Grolleman JE, van Wezel T, Nik-Zainal S, Kuiper RP, Cuppen E, Clevers H. Use of CRISPR-modified human stem cell organoids to study the origin of mutational signatures in cancer. *Science* (2017) 358(6360): 234-238 doi: 10.1126/science.aao3130. (査読あり)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. **佐々木 伸雄**, 佐藤 俊朗. オルガノイド研究の礎～応用～未来, 日本農芸化学会 シンポジウム, 2018 年
2. **佐々木 伸雄**. 大腸がんにおいて 1 細胞レベルで明らかにされた単一腫瘍内における不均一性の網羅的解析. 第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年
3. **Nobuo Sasaki**, Hans Clevers. Comparing clonal evolution at single cell level between normal crypt and colon cancer. KSBMB International Conference2017, 2017 年
4. **佐々木 伸雄**, 吉田 康祐, 佐藤 俊朗. Understanding the function of niche for colorectal stem cells during recovery step from inflammation, COCKPI-T 研究発表シンポジウム, 2017 年
5. **佐々木 伸雄**, Clevers Hans. A high-resolution molecular history of intra-cancer diversification. 生命科学系学会合同年次大会, 2017 年

〔図書〕(計 1 件)

1. **Sasaki N**, Sato T, Clevers H. Intestinal Epithelial Lgr5+ Stem Cell Niche and Orgnaoids. ELSEVIER, BIOLOGY OF STEM CELL NICHES AND MOLECULAR MECHANISMS, 2017年, 111-125.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：佐藤 俊朗

ローマ字氏名：SATO, Toshiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。