

令和 4 年 9 月 7 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14911

研究課題名（和文）腸オルガノイド作製の基盤となるトランスクリプトーム/プロテオームの解析

研究課題名（英文）Transcriptome/proteome analyses for preparing intestinal organoids

研究代表者

曽我 慶介 (soga, keisuke)

国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・主任研究官

研究者番号：50746336

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：食品、医薬品の安全性評価でin vitro細胞評価系に利用される細胞で特に、腸細胞の誘導法について、分化条件の検討を行った。ヒト腸細胞で報告のある内胚葉分化誘導法をマウスES細胞で検証したところ、誘導群において一部の内胚葉マーカーが発現している細胞の割合が少なかった。ヒトとマウスでは種差があるため、同様の方法では誘導が難しいことが示唆された。また、M細胞を効率的に誘導する方法について、マウスオルガノイドを用いて検討したところ、RANKLに加え、TLR3刺激を行うことで、よりM細胞のマーカーが発現増加したことから、TLRがM細胞分化に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は食品等の安全性評価基盤を構築するための基礎研究であり、動物を用いない評価系として標準化を行うことを目的としている。本研究で検討を行ったが、ヒト細胞の系をマウス細胞に応用するにはさらなる検討が必要であった。また、腸細胞の中ではマイナーなため機能が未知な部分の多いM細胞は抗原取り込み等を行い腸内免疫に関与することが知られているが、今回、分化にTLR刺激が関与していることが示唆されたため、今後ウイルスなどの異物とM細胞分化に関する研究が期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated the differentiation conditions of intestinal cells, which are used for in vitro cell evaluation systems in the safety assessment of food and pharmaceutical products, in particular, the induction method of intestinal cells. The differentiation induction method using ActivinA and CHIR99021, a GSK3 inhibitor that has been reported in human intestinal cells, was tested in mouse ES cells. SOX2-expressing cells were less abundant in the induced group. This suggests that it is difficult to induce endoderm using the same method in humans and mice because of the species difference between the two species. In addition, we investigated how to efficiently induce M cells using mouse organoids and found that TLR3 stimulation, in addition to RANKL, resulted in the expression of more M cell markers.

研究分野：生化学

キーワード：腸オルガノイド ES細胞 RANKL M細胞 TLR3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、食品および医薬品の安全性評価の際に、動物実験代替法またはヒトでの評価法として、幹細胞より分化誘導した器官を用いた試験法が注目されている。しかし、異なる幹細胞株、未分化維持手法、および分化誘導法によって樹立された細胞および器官がそれぞれ同等かどうかはまだ検証の余地が大いにあり、分化誘導法の標準化には至るまでに大きな課題が残されている。

また、食品安全性を研究するにあたり重要な観点の一つに、アレルギー性が挙げられるが、食物抗原摂取からアレルギー発症までの分子メカニズムについて未知な部分が多い。

2. 研究の目的

本研究では、食品の安全性研究の観点から腸を標的とし、*in vitro* で汎用される標準的な幹細胞株とそれを用いて分化誘導する内胚葉、腸細胞そして腸オルガノイドの遺伝子発現プロファイリングを行い、その発現の変動を解析することで、実際のヒトの器官を模する技術の基礎的データを収集することを目的とする。

また、アレルギー発症メカニズムを解析する評価系を検討する。腸管パイエル板に存在する Microfold (M) 細胞は腸内の細菌や消化食物の取り込みなどを介して腸内環境を監視していると考えられるが、腸組織での細胞数が少ないことから解析が十分に進んでおらず完全な理解は得られていない。そこで、アレルギー発症に關与する可能性のある M 細胞の分化誘導条件の検討を行い、M 細胞を解析するための基礎的な研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 細胞

マウス胚性幹 (mES) 細胞株 EB5、マウス多能性幹 (miPS) 細胞株 (iPS-MEF-Ng-20D-17) 及び C57BL/6 マウス由来腸管オルガノイド (STEM CELL Technologies 社) を用いた。mES 細胞は ES 用未分化培地 (GMEM, 10%FBS, 0.1mM NEAA, 1 mM ピルビン酸 Na, 1000U/ml LIF, 0.1 mM 2-ME) を用いて 2 日に一度の培地交換で維持された。miPS 細胞はフィーダーとしてマウス線維芽細胞と共に iPS 用未分化培地 (DMEM, 15%FBS, 0.1mM NEAA, 1000U/ml LIF, 0.1mM 2-ME) を用いて 2 日に一度の培地交換で維持された。後にフィーダーフリーのために、GS2-M 培地 (Takara Bio 社) で馴化された。マウス腸管オルガノイドはマトリゲル中で三次元培養を行い、IntestiCult™ Organoid Growth Medium (Mouse) (STEM CELL Technologies 社) を用いて 2 日に一度の培地交換で維持された。

(2) 実験方法

・内胚葉分化誘導

既報^(1,2)を参考に、mES 細胞を 8 ウェルチャンバースライドにて培養し、ActivinA、GSK3β inhibitor である CHIR99021、ROCK 阻害剤 Y27632 を用いた内胚葉分化を行った。分化誘導三日目に、内胚葉マーカー SOX17 及び FOXA2、未分化マーカー OCT4 の発現を免疫染色で確認した。

・M 細胞分化誘導検討

M 細胞を誘導するために、マウス腸由来細胞をマトリゲルで三次元培養を行い、Receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) を 200 μg/ml の濃度で培地に添加し、3 日間誘導した。さらに、追加で Lipopolysaccharide (LPS) (0.1-10 μg/ml) または Poly (I:C) (0.1-10 μg/ml) を添加した際の M 細胞分化効率への影響を調べた。細胞は Gentle Cell Dissociation Reagent (STEM CELL Technologies 社) を用いてマトリゲルを溶解し、回収した。M 細胞は既報 (Cell Rep, 29, 2823-2834, 2019) を参考に Glycoprotein 2 (Gp2) (成熟 M 細胞マーカー)、SpiB (初期 M 細胞マーカー、M 細胞分化のマスター制御因子)⁽³⁾、Marcks11 (未成熟 M 細胞マーカー)、Ccl9 (未成熟 M 細胞マーカー)、Anxa5 (未成熟 M 細胞マーカー)、Tnfrsf11 (未成熟・成熟両 M 細胞に発現)、Sox8 (M 細胞分化に必須な転写因子)⁽⁴⁾、Ccl20 (RANKL 刺激で濾胞関連上皮に発現)、Tnfrsf11 (RANKL の遺伝子)、Sl100a4 (M 細胞の成熟に必須なタンパク質)⁽⁵⁾ の発現を指標にリアルタイム PCR 等で評価した。遺伝子発現量は内在性コントロールとして hypoxanthine phosphoribosyltransferase 遺伝子 (Hprt) を用いて標準化を行った。相対発現量は ΔΔCt 法で算出した。

4. 研究成果

(1) マウス細胞の内胚葉分化誘導

ヒトにおいて内胚葉分化が確認されている方法を参考に、ActivinA、GSK3β inhibitor である CHIR99021、ROCK 阻害剤 Y27632 を用いた誘導を行ったところ、内胚葉分化マーカー SOX17 は多くの細胞で発現が確認されたが、FOXA2 を発現した細胞の数は少数であった。また、分化誘導 3 日後も未分化マーカー OCT4 の発現が確認された。ヒト iPS 細胞では SOX17 および FOXA2 の両方が発現して胚胎内胚葉へ分化が進むようであるが、マウス ES 細胞では分化過程で同様なマーカー発現パターンにならないことが示唆された。mES 細胞 (ナイーブ型) は LIF

を用いて未分化を維持可能であるが、hES 細胞は一般的に発生段階の少し進んだプライム型で、厳密には未分化状態が異なる。よって、ヒトで有効であった方法のマウスへの適用は、さらに検討が必要と考えられた。

本研究では、マウス幹細胞株を用いて腸オルガノイドの基礎的データ収集を目指したが、分化条件や維持培地、細胞の種類の多様化、細胞の状態の再現性、種差の影響の大きさから、当初想定していた以上に、分化誘導法の標準化が困難であった。

(2) M 細胞誘導法の検討

M 細胞の誘導方法は RANKL で誘導する方法が知られている^(6,7)。RANKL の他に、TNF- α ^(8,9)、S100A4⁽⁵⁾、Retinoic Acid and Lymphotoxin⁽¹⁰⁾、コレラ毒素⁽¹¹⁾なども M 細胞分化を促進することが報告されている。しかし、詳細なメカニズムまでは明らかになっておらず、不明な点は多い。M 細胞は抗原取り込み関与する細胞であることから、本研究ではパターン認識受容体の一種 Toll-like receptor (TLR) に着目し、M 細胞分化の影響を調べた。

RANKL 添加では、M 細胞関連遺伝子 *Gp2*、*SpiB*、*Marcksl1*、*Tnfaip2*、*Sox8*、*Ccl9*、*Ccl20*、*Anxa5*、*S100a4* の発現増加が確認された。一方で、*Tnfsf11* の発現増加は認められなかった。RANKL に加え、TLR4 を想定した LPS 刺激を行ったところ、10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度においても RANKL のみ添加時と各遺伝子発現量は変わらなかった。一方で、RANKL に加え、TLR3 を想定した Poly (I : C) 刺激を行ったところ、最も高濃度である 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度において、各マーカーの発現の増加が認められた。RANKL のみ添加時と比較した場合、その増加率は *Gp2* : 4 倍、*SpiB* : 2 倍、*Marcksl1* : 1.5 倍、*Tnfaip2* : 4 倍、*Sox8* : 2 倍、*Ccl9* : 2 倍、*Ccl20* : 1.5 倍、*Anxa5* : 2 倍、*S100a4* : 2.5 倍であった。*Tnfsf11* の発現に変化は確認されなかった。

過去に微生物を取り込ませた場合に M 細胞誘導が促進されるという報告がある⁽¹²⁾。また、RANKL に加え TNF- α を添加した場合に、M 細胞マーカー発現量が増加したという報告がある^(8,9)。RANKL は RANK を刺激し、Noncanonical NF- κB 経路を通じて *RelB/p52*、*Sox8*、および *Gp2* の発現を誘導すると考えられている。TNF- α は Canonical な NF- κB 経路を通じて、*RelB* を活性化すると考えられている。TLR の刺激も Canonical な NF- κB 経路を通じることが知られていること、および TNF- α 同様 Poly (I : C) のみの刺激では M 細胞関連遺伝子発現増加が確認できなかったことから、今回の Poly (I : C) による刺激も TNF- α の場合と同様なメカニズムで活性化しているとも考えられる。または Poly (I : C) 刺激による腸オルガノイド内の TNF- α 産生増加が起因している可能性もある。二本鎖 RNA である Poly (I : C) で TNF- α 添加と同様な現象が確認された一方で、リポ多糖である LPS による刺激では M 細胞関連遺伝子の発現上昇が認められなかったことから、ウイルス等の外因性の核酸認識が特に腸管における M 細胞の分化に関わっている可能性が示唆された。本研究では、詳しいメカニズムまでは明らかにならなかったため、今後詳細な解析を行う予定である。また、その他のパターン認識受容体のリガンドによる刺激等での、M 細胞分化に関する検証も今後の課題である。

今回の実験系では細胞数が少なく、フローサイトメーターによる解析は十分に行えなかったが、M 細胞 (細胞表面に GP2 を発現する細胞) 割合が増加するかを明らかにするために、今後実験系を検討する必要がある。TNF- α の場合は、顕微下で細胞の割合の有意な増加は認められず、発現する M 細胞関連遺伝子の有意な増加のみが確認されている。M 細胞分化のメカニズムは近年の研究で徐々に解明されつつあるが、その M 細胞の分化割合を増やす誘導条件の探索は進んでおらず、今後の課題である。腸管における抗原取り込みから、アレルギー発症メカニズムを解析するためにはまだ多くの解決すべき課題が残されている。

< 引用文献 >

- 1) Matsuno K, Mae SI, Okada C, Nakamura M, Watanabe A, Toyoda T, Uchida E, Osafune K. Redefining definitive endoderm subtypes by robust induction of human induced pluripotent stem cells. *Differentiation*. 2016 Dec;92(5):281-290.
- 2) Workman MJ, Mahe MM, Trisno S, Poling HM, Watson CL, Sundaram N, Chang CF, Schiesser J, Aubert P, Stanley EG, Elefanty AG, Miyaoka Y, Mandegar MA, Conklin BR, Neunlist M, Brugmann SA, Helmrich MA, Wells JM. Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. *Nat Med*. 2017 Jan;23(1):49-59.
- 3) Kanaya T, Hase K, Takahashi D, Fukuda S, Hoshino K, Sasaki I, Hemmi H, Knoop KA, Kumar N, Sato M, Katsuno T, Yokosuka O, Toyooka K, Nakai K, Sakamoto A, Kitahara Y, Jinnohara T, McSorley SJ, Kaisho T, Williams IR, Ohno H. The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold cells. *Nat Immunol*. 2012 Jun 17;13(8):729-36.
- 4) Kimura S, Kobayashi N, Nakamura Y, Kanaya T, Takahashi D, Fujiki R, Mutoh M, Obata Y, Iwanaga T, Nakagawa T, Kato N, Sato S, Kaisho T, Ohno H, Hase K. Sox8 is essential for M cell maturation to accelerate IgA response at the early stage after weaning in mice. *J Exp Med*. 2019 Apr 1;216(4):831-846.
- 5) Kunimura K, Sakata D, Tun X, Uruno T, Ushijima M, Katakai T, Shiraishi A, Aihara R, Kamikaseda Y, Matsubara K, Kanegane H, Sawa S, Eberl G, Ohga S, Yoshikai Y, Fukui Y. S100A4 Protein Is

- Essential for the Development of Mature Microfold Cells in Peyer's Patches. *Cell Rep.* 2019 Nov 26;29(9):2823-2834.e7.
- 6) de Lau W, Kujala P, Schneeberger K, Middendorp S, Li VS, Barker N, Martens A, Hofhuis F, DeKoter RP, Peters PJ, Nieuwenhuis E, Clevers H. Peyer's patch M cells derived from Lgr5(+) stem cells require SpiB and are induced by RankL in cultured "miniguts". *Mol Cell Biol.* 2012 Sep;32(18):3639-47.
 - 7) Kimura S, Mutoh M, Hisamoto M, Saito H, Takahashi S, Asakura T, Ishii M, Nakamura Y, Iida J, Hase K, Iwanaga T. Airway M Cells Arise in the Lower Airway Due to RANKL Signaling and Reside in the Bronchiolar Epithelium Associated With iBALT in Murine Models of Respiratory Disease. *Front Immunol.* 2019 Jun 11; 10:1323.
 - 8) Wood MB, Rios D, Williams IR. TNF- α augments RANKL-dependent intestinal M cell differentiation in enteroid cultures. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016 Sep 1;311(3):C498-507.
 - 9) Fasciano AC, Blutt SE, Estes MK, Meccas J. Induced Differentiation of M Cell-like Cells in Human Stem Cell-derived Ileal Enteroid Monolayers. *J Vis Exp.* 2019 Jul 26;(149):10.3791/59894.
 - 10) Ding S, Song Y, Brulois KF, Pan J, Co JY, Ren L, Feng N, Yasukawa LL, Sánchez-Tacuba L, Wosen JE, Mellins ED, Monack DM, Amieva MR, Kuo CJ, Butcher EC, Greenberg HB. Retinoic Acid and Lymphotoxin Signaling Promote Differentiation of Human Intestinal M Cells. *Gastroenterology.* 2020 Jul;159(1):214-226.e1.
 - 11) Terahara K, Yoshida M, Igarashi O, Nochi T, Pontes GS, Hase K, Ohno H, Kurokawa S, Mejima M, Takayama N, Yuki Y, Lowe AW, Kiyono H. Comprehensive gene expression profiling of Peyer's patch M cells, villous M-like cells, and intestinal epithelial cells. *J Immunol.* 2008 Jun 15;180(12):7840-6.
 - 12) Ohno H, Kanaya T, Williams IR. M cell differentiation: distinct lineage or phenotypic transition? *Salmonella* provides answers. *Cell Host Microbe.* 2012 Nov 15;12(5):607-9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Cui H, Soga K, Tamehiro N, Adachi R, Hachisuka A, Hirose A, Kondo K, Nishimaki-Mogami T.	4. 巻 188
2. 論文標題 Statins repress needle-like carbon nanotube- or cholesterol crystal-stimulated IL-1 production by inhibiting the uptake of crystals by macrophages.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 biochemical pharmacology	6. 最初と最後の頁 114580
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2021.114580	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Soga K, Nakamura K, Ishigaki T, Kimata S, Ohmori K, Kishine M, Mano J, Takabatake R, Kitta K, Nagoya H, Kondo K.	4. 巻 305
2. 論文標題 Development of a novel method for specific detection of genetically modified Atlantic salmon, AquAdvantage, using real-time polymerase chain reaction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 125426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.foodchem.2019.125426	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Soga K, Nakamura K, Ishigaki T, Kimata S, Ohmori K, Kishine M, Mano J, Takabatake R, Kitta K, Nagoya H, Kondo K.	4. 巻 27
2. 論文標題 Data representing applicability of developed growth hormone 1 (GH1) gene detection method for detecting Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>) at high specificity to processed salmon commodities.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 104695
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dib.2019.104695	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 曽我慶介、成島純平、吉場聡子、柴田識人、近藤一成
2. 発表標題 全ゲノム配列を用いた遺伝子変異検出におけるツール間比較
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 曾我慶介、吉田光範、坂田こずえ、近藤一成
2. 発表標題 ナノボアシーケンス技術を用いた致死性有毒キノコAmanita virosaのゲノムアセンブリの検討
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 曾我慶介、吉田光範、吉場聡子、成島純平、柴田識人、近藤一成
2. 発表標題 ナノボアシーケンス技術を用いたスギヒラタケの全ゲノムアセンブリの検討
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 曾我慶介、中村公亮、石垣拓実、木俣真弥、大森清美、岸根雅宏、真野潤一、高畠令王奈、橘田和美、名古屋博之、近藤一成
2. 発表標題 未承認遺伝子組換えサケ検知法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------