

令和 3 年 8 月 24 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15696

研究課題名(和文)免疫機能を付与した小腸オルガノイドによる次世代バイオモデル開発研究

研究課題名(英文)Development of next generation bio-model using small intestinal organoids with immune function

研究代表者

町田 正和 (Machida, Masakazu)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・(非)研究員

研究者番号：50450622

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)：培養皿内で蠕動様運動、吸収や分泌能などのヒト腸管の機能を有する立体組織(ミニ腸)の研究開発を実施してきた。本研究では、この独自性の高いミニ腸技術を応用し、ヒト腸の発生を可視化システムとして小腸幹細胞(LGR5陽性)と腸管神経叢の成熟化(PHOX2B陽性)を同時に経時的に可視化観察するバイオリソースを開発した。ミニ腸の分化誘導過程では、LGR5陽性(緑色蛍光)とPHOX2B(赤色蛍光)のダブルポジティブ動態の確認が出来た。さらに、多能性幹細胞から単球を作製しミニ腸内でマクロファージ化し組織マクロファージ機能を発揮するミニ腸の作製にも成功した。難治性腸疾患研究の進展へ貢献する成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患(inflammatory bowel diseases: IBD)の患者数は年々増え厚生労働省難治性疾患の中で患者数が最も多い。特に近年問題になっているのが、6歳未満で発症する重篤な炎症性腸疾患(VEO-IBD)である。複雑な病態を解明し、診断や新たな治療薬の開発を可能にする基礎研究の大きな進展が強く望まれている。in vitroで腸の発生が再現でき生体の小腸がもつ複雑な機能を合わせもったミニ腸モデルを開発し、発生の理解とともに行う疾患研究と、さらにVEO-IBDの診断・治療開発へと展開できる研究を今行う必要がある。本研究の成果は、成育期難治性腸疾患研究の発展に貢献する成果である。

研究成果の概要(英文)：We have developed three-dimensional tissues (mini-guts) that have peristaltic movement, absorption and secretion functions of human intestine in a petri dish. In this study, we applied this unique mini-gut technology to develop a bioresource that can simultaneously visualize and observe intestinal stem cells (LGR5) and intestinal plexus maturation (PHOX2B) over time as a system that can visualize human intestinal development. In the differentiation process of the mini guts, the double positive dynamic phase of LGR5 positive (green fluorescence) and PHOX2B (red fluorescence) was able to be confirmed. In addition, we succeeded in producing a mini-gut, in which monocytes are produced from pluripotent stem cells and macrophages are formed in the organoid to exert tissue macrophage function. The result which contributed to the progress of the intractable enterocolitis research was obtained.

研究分野：再生医学

キーワード：小腸オルガノイド バイオモデル 炎症性腸疾患 再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

現在、幹細胞による出口応用は体外での培養が主体となっている。さらには、ヒト胚性幹 (ES) 細胞や人工多能性幹 (iPS) 細胞などのヒト多能性幹細胞は、その創出から体外培養系が母体となり、産業応用でも安定的に性質を保持して維持することは基盤技術として重要である。しかし、これまでの多能性幹細胞研究から、現在標準化されている 2D 培養システムでの限界 (分化誘導法の煩雑さや分化誘導細胞の幼若性による不完全な機能獲得などの問題点) が明白になってきた。そのため細胞培養環境の領域では、次世代の医療や創薬応用を確かめ、その実用化の多様性 (対象の広がりや個々の質) を広げるために培養技術のブレークスルーは必須である。本研究課題では、新たな細胞培養空間の開発を基盤とするが、マイクロデバイス開発のような高度な先端技術からのアプローチではなく、より細胞の生命活動の観点に立ち、細胞コミュニケーションと足場の研究を展開する。このコンセプトを具現化する形で申請者らは、ヒト ES/iPS 細胞の自己組織化能と培養皿底面加工を融合することで自律的に蠕動様運動をするミニ小腸を創生することに成功した (Uchida H, et al. JCI Insight, 2017)。炎症性腸疾患 (inflammatory bowel diseases: IBD) の患者数は年々増え、厚生労働省難治性疾患の中で患者数が最も多い (クローン病と潰瘍性大腸炎)。さらに、小児期に発症するのが全体の 20-25% あり、成人の治療が小児期の IBD には効果がない場合も多く、長期的なライフスパンでの QOL も考慮すると大変大きな問題である。特に近年問題になっているのが、6 歳未満で発症する極めて重篤な炎症性腸疾患 (Very Early Onset (VEO)-IBD) である。国立成育医療研究センターでは、全国から難治性腸疾患の患児を受入れているが、特に小児期に発症する IBD 患者では、成長期発症の患者に比べて難治性の経過をとり、長期のステロイド投与や経腸栄養摂取困難などから成長障害を含む著しい QOL の低下をきたすことが少なくない。これらの多彩な病態を解明し、診断や新たな治療薬の開発を可能にする基礎研究の大きな進展が強く望まれている。超早期に発症する腸の疾患に対する研究アプローチとして、in vitro で腸の発生が再現でき生体の小腸がもつ複雑な機能を合わせもったミニ小腸モデルを開発し、発生の理解とともに行う疾患研究と、さらに VEO-IBD の診断・治療開発へと展開できる研究を今行う必要がある。

## 2. 研究の目的

申請者らは、培養ディッシュ内で蠕動様運動、吸収や分泌能などのヒト腸管の機能を有する立体組織 (ミニ小腸) の創成に世界で初めて成功した。このミニ小腸は、LGR5 陽性腸管上皮幹細胞、腸内分泌細胞、Paneth (パネート) 細胞、杯 (ゴブレット) 細胞や M 細胞など生体腸の上皮系細胞を備えるだけでなく、平滑筋細胞、カハール介在細胞や腸管神経叢も有するヒト小腸組織構成に類似した組織構造を有する。無菌環境で作製し成育・維持するものであり、腸管内微生物叢と腸管細胞群とのクロストーク解明に向けても、特定の微生物と腸管との反応性を in vitro で解明していく画期的なバイオツールになり得る。本研究では、この独自性の高いミニ小腸基盤技術を応用し、ヒト腸の発生を可視化できるシステムとして小腸幹細胞 (LGR5 陽性) と腸管神経叢の成熟化 (PHOX2B, SOX10 等陽性) を経時的に観察するバイオリソースを開発する。さらに、最大のチャレンジはこのミニ小腸に生体小腸レベルの免疫組織を含有することである。それにより、IBD モデルもより完全系となるとともに、健常状態での腸内微生物叢と腸管細胞群とのクロストーク解析を可能とする世界にも類のないヒト腸管疑似モデルとなる。

### 3 . 研究の方法

本研究では、以下のような段階的な方法で最終目標への到達を目指す。

- 1) ヒト ES または iPS 細胞による LGR5/PHOX2B ダブル可視化モデルを構築。
- 2) 免疫組織（樹状細胞/リンパ前駆細胞）をミニ小腸と融合する次世代ミニ小腸の作製。
- 3) 上記モデルを統合した疾患モデルを作製した VEO-IBD モデルとしての機能性を実証。

本研究は大きく 3 つのステージにより遂行される。

### 4 . 研究成果

培養ディッシュ内で蠕動様運動、吸収や分泌能などのヒト腸管の機能を有する立体組織（ミニ腸）の研究開発を実施してきた。本研究では、この独自性の高いミニ腸基盤技術を応用し、ヒト腸の発生を可視化できるシステムとして小腸幹細胞（LGR5 陽性）と腸管神経叢の成熟化（PHOX2B 陽性）を同時に経時的に可視化観察するバイオリソースを開発した。ミニ腸の分化誘導過程では、LGR5 陽性（緑色蛍光）と PHOX2B（赤色蛍光）のダブルポジティブ動態を確認することが出来た。さらに、多能性幹細胞から単球を作製しミニ腸内でマクロファージ化し組織マクロファージ機能を発揮するミニ腸の作製にも成功した。難治性腸疾患研究の進展へ貢献する成果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sasaki K, Inoue M, Machida M, Kawasaki T, Tsuruta S, Uchida H, Sakamoto S, Kasahara M, Umezawa A, Akutsu H.	4. 巻 3
2. 論文標題 Human Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids as a Model of Intestinal Xenobiotic Metabolism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 StemJournal	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/STJ-200001	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0件

〔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
研究協力者	阿久津 英憲  (Akutsu Hidenori)  (50347225)	国立成育医療研究センター・研究所・部長    (82612)	

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