

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06069・19K21192

研究課題名（和文）腸前駆細胞直接誘導法を利用したヒト成体型腸上皮オルガノイドの作製

研究課題名（英文）Generation of human induced intestinal stem cells using direct reprogramming

研究代表者

三浦 静 (Miura, Shizuka)

九州大学・生体防御医学研究所・特任助教

研究者番号：80822494

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円

研究成果の概要（和文）：申請者は、ヒト臍帯静脈内皮細胞にHNF4A、FOXA3、GATA6、CDX2の4つの転写因子を導入し、ヒト腸前駆細胞の誘導に成功している。マウスにおいて*in vitro*で誘導腸前駆細胞を誘導腸幹細胞へと成長させることが可能であったが、ヒト誘導腸前駆細胞はマウスと同じ条件で培養しても誘導腸幹細胞へと成長しなかった。ヒトの腸前駆細胞を採取してヒトの腸の発生過程を調べることは倫理的にも大変難しいため、ヒト誘導腸前駆細胞を腸幹細胞へと成長させる方法が確立できれば、腸の発生に関する研究にも利用可能であると考えられる。そこで、培養条件の改良や腸の発生に関連する遺伝子の追加を行い、腸幹細胞への誘導を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、培養環境下でヒトの腸前駆細胞を維持することは可能になっているが、ヒトの腸前駆細胞から腸幹細胞へと成長させたという報告はない。これが可能になれば、ヒトの腸の発生過程をより詳細に解析することが可能になり、先天性の疾患に対する研究にも貢献できると考えられる。しかしながら、ヒトの胎児の腸を採取することは倫理的にも大変難しく、研究を進めることは困難である。そのため、我々が作製したヒト誘導腸前駆細胞を用いて誘導腸幹細胞を作製できれば、発生学的にも医学的にも大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We introduced HNF4A, FOXA3, GATA6, CDX2 into HUVECs, succeeded induction of human induced fetal intestine-derived progenitor cells (iFIPC) by using direct reprogramming system. In mouse iFIPC, they can develop into intestinal stem cells (iISC). However, human iFIPC could't develop into human iISC. It is important to establish the system for generation from human iFIPC to iISC. This study will be able to contribute to the research for intestinal development and hereditary diseases.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ダイレクトリプログラミング 腸前駆細胞 腸幹細胞 オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1．研究開始当初の背景

申請者らは、ダイレクトリプログラミングという新しい方法を用いて、マウス胎仔線維芽細胞とヒト臍帯静脈内皮細胞に4つの転写因子を導入することで、直接、腸前駆細胞を作製することに成功した(以下、誘導腸前駆細胞)(Miura S. and Suzuki A., Cell Stem Cell, 2017)。マウスおよびヒト誘導腸前駆細胞は、マウスおよびヒトの胎仔腸前駆細胞と同様に球状の胎仔型オルガノイドを形成した。また、誘導腸前駆細胞は、胎仔腸前駆細胞と同様の遺伝子発現や機能を有しており、大腸炎モデルマウスに移植すると障害をうけた大腸組織を機能的に再構築することができた。さらに、マウスにおいては、マウス胎仔腸前駆細胞も申請者が作製したマウス誘導腸前駆細胞も、*in vitro* で成体マウスの腸に含まれる腸幹細胞へと成長することができた。このことから、マウス誘導腸前駆細胞は、生体の腸の代わりとして腸の発生研究に利用できることが示唆された。マウスの胎仔腸前駆細胞とは異なり、ヒトの胎児腸前駆細胞は腸幹細胞へと *in vitro* で成長させる方法が確立されていない。そのため、ヒトの誘導腸前駆細胞を誘導腸幹細胞へと成長させる方法を確立できれば、ヒトの腸幹細胞への発生過程や疾患を *in vitro* で簡便に解析できることにつながる。

2．研究の目的

これまでに、ヒトの胎児の腸を培養下で成体の腸へと成長させたという報告はなく、世界中で研究が進められている。一方、ヒトの胎児の腸を使用することは倫理的な問題があり、大変難しい。そこで本研究では、ダイレクトリプログラミングという新しい技術を利用して作製したヒト誘導腸前駆細胞を成体の腸に存在するヒト誘導腸幹細胞へと成長させることを目的とする。これが可能になれば、培養下でヒトの腸の発生過程を解析するための新たなツールになる。

3．研究の方法

ヒトの腸幹細胞はマウスの腸幹細胞と同様に突出した絨毛様構造を有する成体型オルガノイドを形成することが知られている。そこで、腸幹細胞へ成長させるために培養条件の検討を行った。その方法として、腸の発生過程に必要なシグナルや成体型の腸への分化を阻害するシグナルを阻害するためのサイトカインや低分子化合物の添加を行った。また、腸組織の形態形成には腸の間質細胞の存在が必要であることが分かっている。そこで、腸の間質細胞とヒト誘導腸前駆細胞を混合して培養し形態変化を観察した。さらにそれらをマウスの腎被膜下に移植し、生体内での成長が可能かについても解析を行った。

4．研究成果

腸の発生過程において、EGF、Notch、BMP、Wnt といった様々なシグナルが必要なことが知られている。また、絨毛構造の形成には腸の間質からのシグナルが重要であることも明らかになっている。そこで、絨毛構造の形成に必要なシグナルを誘導腸前駆細胞に与えるために、腸の発生に関与するシグナルを活性化するためのサイトカインの添加を試みた。その結果、従来の腸前駆細胞よりも腸特異的な遺伝子の発現が上昇することが明らかになった。さらに、このシグナルを阻害するサイトカイン培地中から除去したところ、腸特異的な遺伝子の発現が上昇した。このことから、このシグナルが培養下での腸の発生に重要であることが明らかになった。つづいて、そのシグナルに関わる転写因子の誘導腸前駆細胞への強制発現を試みた。まず、その転写因子を搭載したレトロウイルスベクターを作製し、誘導腸前駆細胞の誘導に用いた4つの因子とともに HUVEC に導入し、5つの遺伝子由来の誘導腸前駆細胞を作製した。4つの因子で作製した場合と5つの因子で作製した場合の遺伝子発現を qPCR 解析したところ、5つの因子で作製した場合のほうが腸特異的な遺伝子の発現が上昇した。そこで、当研究室確立している CEL-seq2 での解析を用いて、網羅的な遺伝子発現を解析した。網羅的遺伝子発現解析の結果、サイトカインを添加した場合と5因子で作製した二つの方法で作製した細胞は同様の遺伝子発現パターンを示した。一方、4因子で作製したものは多少差が見られた。しかしながら、成体の腸の細胞へと特徴は近づいているものの成体型の絨毛用構造を有するオルガノイドの作製には至らなかった。そこで、腸の間質細胞を用いることとした。マウスの腸の間質の細胞を採取し、ヒト腸前駆細胞と混合して 96well 非吸着プレートを用いて凝集塊を作製した。この凝集塊をマトリゲルに包埋し、三次元培養を行った。この際、ヒト腸前駆細胞は GFP でマークした。その結果、培養条件を変えることで凝集塊の作製は可能になったが、三次元培養を行っても絨毛の形成は見られなかった。また、マウス胎児由来の間質細胞では凝集塊が作成できたが、生体由来では凝集塊が作成できなかった。そのため、マウス胎児の間質細胞とヒト誘導腸前駆細胞の凝集塊を作製し、マウスの腎被膜下へと移植し、生体内で成体型へと成長させ、それらを再び生体内から採取して三次元培養を行い、成体型オルガノイドを作製する方法を考えた。マウス胎児の間質細胞とヒト誘導腸前駆細胞の凝集塊を免疫不全マウスの腎被膜

下へ移植し、2 か月後に解析した結果、生着の確認はできたが、単層の環状構造を形成しており、成体型への成長は確認できなかった。この原因として、ヒトの細胞とマウスの細胞を用いているという種間の差が考えられる。ヒトの間質細胞を用いることによってこの問題が解決できるかもしれない。

培養下において成体型オルガノイドへと成長させる方法は確立できていないが、発生過程を模倣したサイトカインの添加や遺伝子の強制発現を行うことによって、生体の腸とよく似た細胞へさらに近づけることができることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----