

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K05928
研究課題名(和文) ヒト臓器モデルを用いた分子細胞生物学的手法による機能性食品成分の探索と機能解明

研究課題名(英文) Establishment of novel research platform for food and nutrition science using physiologically-relevant human intestinal organoids

研究代表者
高橋 裕 (Takahashi, Yu)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：30835377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生理機能が高いとされるヒト小腸オルガノイドを用いた解析を行った。サイトカインを恒常的に発現するL細胞の培養上清を使用し、オルガノイド培養のコストの大幅な削減、および高効率な遺伝子導入に成功した。薬物代謝酵素の誘導、糖取り込み、カイロミクロン分泌といったヒト小腸で重要な生理機能は、従来の株化細胞であるCaco-2細胞では低い、オルガノイドより作製した単層の腸管上皮細胞では高いことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小腸オルガノイドの利用には、手間に加え膨大なコストを要する。本研究では、培養コストを従来よりも1/100に低減させ、さらに実験者誤差が生じにくい操作方法の確立に成功した。また、小腸オルガノイドでは様々な代謝機能が従来の細胞に比べて高いことを具体的に示した。以上の結果は、特に基礎研究におけるオルガノイドの活用を促進し、これまでに見出せていないヒトパイオロジーの解明に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Organoids are self-organizing cell clumps composed of tissue-specific stem cells and their differentiated cells in three-dimensional cultures. They are recognized as physiologically relevant in vitro models that recapitulate in vivo functions and structures of specific organs, and we worked on the development of methods to use them. We established mouse L cells stably expressing the cytokines Wnt3a, R-spondin1, Noggin, and HGF by lentiviral infection. Using conditioned medium from the cells as culture medium, we were able to continuously culture human intestinal organoids at a lower cost than using commercially available recombinant proteins. Furthermore, we found that CYP3A4 induction, SGLT1-mediated glucose transport, and MTP-dependent chylomicron secretion occurred in organoid-derived monolayer intestinal epithelial cells, but not in Caco-2 cells. Taken together, we established a platform to routinely use human intestinal organoids with highly physiological functions.

研究分野：食品科学

キーワード：iPS細胞 小腸オルガノイド Caco-2細胞 レンチウイルス CYP誘導 スクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国を始めとする先進国では深刻な高齢化が進んでおり、食による疾病の予防は、国民の健康寿命を延伸しつつ医療費を削減する上で非常に重要な意味を持つ。特に機能性食品は、ヒトにおいて作用が見出されるという科学的な論拠が必要不可欠であり、実験動物よりもヒトでの生理的機能を正確に予測できる評価系が切望されている。

オルガノイドは臓器特異的幹細胞およびその分化細胞から成る三次元構造体であり、従来の株化細胞よりも高度に生理的なモデルとして現在、注目を集めている。ヒトオルガノイドは脳から大腸に至るまで様々な種類が報告されており、組織・臓器由来だけでなく、iPS細胞などの多能性幹細胞から分化誘導可能であることも知られている。オルガノイドは実験動物に移植すると機能を有した臓器を形成することから、細胞というよりも *in vitro* で培養可能な臓器と見なされており、「organ buds」や「mini-organ」とも呼ばれている。オルガノイドは再生医療や発生学分野で盛んに研究が行われているが、分子生物学的手法を組み合わせた特定の遺伝子機能や細胞内シグナル伝達について解析するといった、基礎研究の観点からのアプローチは少ないのが現状である。この原因として、オルガノイドの培養には非常に高価なサイトカインや細胞外マトリクス等の試薬が必要であること、オルガノイドは三次元の細胞塊であるため、従来の細胞株よりも煩雑な操作が必要であるという点が挙げられる。また、*in vitro* で培養されたオルガノイドが従来の細胞株に比べて実際にどのように高い生理機能を有するのかという具体的な証拠は少ない。

2. 研究の目的

代表者はこれまでにヒト小腸オルガノイドの培養技術 (Takahashi, *et al.*, *Stem Cell Reports*, 2018) および小腸オルガノイドからの単層上皮細胞の作製 (Takahashi, *et al.*, *EBioMedicine*, 2017) に成功してきた。本研究では、ヒト小腸オルガノイドの培養コストの更なる削減および培養技術のブラッシュアップを目指した。さらに、従来のヒト小腸上皮モデルである Caco-2 細胞ではヒト小腸上皮細胞の生理機能を十分に反映しない現象に着目し、オルガノイドもしくはオルガノイド由来単層上皮細胞においてその機能解析を行うことで、ヒト小腸オルガノイドの生理的妥当性についての評価を目指した。

3. 研究の方法

(1) ヒト小腸オルガノイド

ヒト小腸オルガノイドはヒト胎児皮膚由来の iPS 細胞株である TkDN4-M を分化させることで樹立した。

(2) ヒトオルガノイド培養用培地の調製

レンチウイルスを用いて Wnt3a, R-spondin1, Noggin を安定的に発現させた L 細胞をコンフルエントの状態です 3 日間培養した上清 (L-WRN conditioned medium) を回収した。この培養上清を Advanced DMEM で 4 倍希釈し、さらに 50 ng/mL Epidermal growth factor, 50 ng/mL HGF (Hepatocyte growth factor), 10 μ M Y27632, 10 μ M SB202190, 0.5 μ M A83-01, 1% BSA となるように添加した各試薬を含む培地をオルガノイド培養用培地として用いた。

(3) ヒト小腸オルガノイドの継代

Multidish 4 Well 上で培養したオルガノイドを PBS (Phosphate-buffered saline) (-) で洗浄後、TrypLE Express を 1 well あたり 0.5 mL 加え、15 mL チューブに回収した。37 °C の温浴で 5 分間インキュベートし、ピペティングにより細胞塊をばらばらにした後、3 倍量の培地を加えて遠心した。上清を除去し培地を加えて懸濁し、マトリゲルに包埋後、Multidish 4 Well に 40 μ L ずつ播種した。37 °C、5% CO₂ インキュベーター内で 15 分間インキュベートすることでマトリゲルを固化させ、ヒトオルガノイド培養用培地を 1 well あたり 500 μ L 加え、37 °C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。3 日毎に培地交換を行い、6 日毎に継代操作を繰り返した。

(4) ヒト小腸オルガノイドの単層化

Multidish 4 Well 上で培養したオルガノイドを PBS (-) で洗浄後、TrypLE Express を 1 well あたり 0.5 mL 加え、15 mL チューブに回収した。37 °C の温浴で 5 分間インキュベートし、ピペティングにより細胞塊をばらばらにした後、3 倍量の培地を加えて遠心した。1 well あたり 400 μ L のヒトオルガノイド培養用培地を加え、ピペティングにより十分に懸濁した。コラーゲンゲル培養キットを用いて調製したコラーゲン溶液をトランスウェルにコートし、1 well あたり 400 μ L の細胞懸濁液を加えた。底面のプレートには 1 well あたり 1.2 mL のヒトオルガノイド培養用培地を加え、37 °C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。3 日毎に培地交換を行い、6 日毎に継代操作を繰り返した。

4. 研究成果

(1) ヒト小腸オルガノイドに要する培養コストの削減

代表者はこれまでに、マウス L 細胞に各種サイトカイン (Wnt3a, R-spondin1, Noggin) を強制発現した安定発現株 (L-WRN 細胞) を樹立し、その培養上清を用いて小腸オルガノイドの培養が可能であることを示した (Takahashi, *et al.*, *Stem Cell Reports*, 2018)。これにより、市販の組換えタンパク質を用いる場合の約 1/20 のコストでオルガノイド培養が可能となった。これまでは L-WRN 細胞の培養上清に市販の HGF (Hepatocyte growth factor) 組換えタンパク質を添加してオルガノイド培養用培地として使用していたが、代表者は、本細胞にさらに HGF を安定的に強制発現した L-WRNH 細胞を樹立し、その培養上清を培地として用いた。L-WRN 細胞培養上清に市販の精製 HGF を加えた場合と L-WRNH 細胞培養上清を用いた場合においてヒト小腸オルガノイドの増殖速度を比較したところ、有意な差は見られないことが判明した。なお、HGF を添加しない場合 (L-WRN 培養上清のみを用いた場合) においては、オルガノイドの増殖は低下した。そのため、L-WRNH 細胞培養上清を用いることで、市販の HGF に要する培養コストを低減できることが示された。

さらに、これまでオルガノイドは Matrigel に包埋した状態で三次元培養を行ってきたが、Matrigel はマウス肉腫由来であるため粘性等のロット間差が大きく、未知因子が含まれ、価格が高いといった欠点が存在する。そのため、代表者は Matrigel の代替となる細胞外基質を探索し、コラーゲンゲルを見出した。コラーゲンゲルは Matrigel に比べて価格が 1/10 程度であり、ロット間差が小さいという特徴がある。Matrigel とコラーゲンゲルをそれぞれ用いてヒト小腸オルガノイドを培養したところ、増殖速度や各種マーカー遺伝子の発現量に大きな差は見られなかった。また、コラーゲンゲルを用いて培養したオルガノイドからも Matrigel を用いた場合と同様に単層上皮細胞の樹立が可能であった。

上記二つの方法を組み合わせることで、ヒト小腸オルガノイドの培養コストをこれまでの 1/20 から 1/100 程度まで下げることに成功した。

(2) ヒト小腸オルガノイドに関する培養技術の改善

オルガノイドを培養すると、細胞塊の状態が大きくなるため、数を増やすためには継代時に破碎する必要がある。これまで、オルガノイドの破碎には注射針を用いた物理的破碎を行ってきたが、実験者間の差異が大きく、安定しないという欠点があった。そこで破碎方法を物理的破碎から酵素処理に変更するための検討を行った。使用する酵素はトリプシンが一般的であるが、実験間および実験者間の差異を低減するため、細胞毒性を生じにくいとされるトリプシン代替品である TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) を用いた。様々な検討の結果、37 °C のインキュベーション後、TrypLE Express を含む溶液の中で 30~40 回ほどピペッティングすることでシングルセルレベルでの破碎が可能であり、さらにセルストレイナーを通して破碎が十分でない細胞塊を除くことで、実験間、実験者間で差異の少ない条件を見出すことに成功した。さらに、このように細胞をばらばらにした条件で単層培養を行うことで、単層が均一となり、実験間誤差が低下した。また、オルガノイドへの遺伝子導入を行う際、細胞塊の状態では著しく効率が低いため、一過的に二次元培養した状態で導入後、再度三次元培養によりオルガノイドを形成させるという方法が効果的である。従来の物理的破碎により調製した方法と今回変更した酵素処理により調製した方法でそれぞれ蛍光遺伝子を発現するレンチウイルスの感染を行ったところ、酵素処理により調製した細胞のほうが感染効率 (蛍光遺伝子の発現量) は大きく増大した。これは、物理的破碎法では未破碎のオルガノイドが多く含まれることに起因すると考えられた。以上より、オルガノイドの継代および遺伝子導入に関して、従来法よりも良い条件を見出すことに成功した。

(3) ヒト小腸オルガノイドとオルガノイド由来単層上皮細胞の性質の比較

これまで代表者はヒト小腸オルガノイドから単層の腸管上皮細胞の樹立を行ってきたが (Takahashi, *et al.*, *EBioMedicine*, 2017)、オルガノイドは三次元培養であるのに対し、単層上皮細胞は二次元培養と、培養環境には差異がある。培養環境の差は遺伝子発現レベルで細胞の性質に影響を与える可能性が推定されたため、両者の遺伝子発現を網羅的に比較した。その結果、腸上皮マーカーである *VIL1*, *CDX2*, 幹細胞マーカーである *LGR5*, 小腸機能を司る *HNF4A*, 脂肪酸取り込みを行う *CD36*, トリアシルグリセロール合成の律速酵素である *DGAT1*, カイロミクロン合成に重要な役割を果たす *MTTP*, 糖輸送に必要な *SLC5A1*, ペプチド輸送を司る *SLC15A1*, 薬剤排出を制御する *ABCB1*, 胆汁酸輸送に関与する *ABCC3* といった各種マーカー遺伝子や小腸上皮細胞の機能に重要な遺伝子発現量は、オルガノイドと単層上皮細胞の間で有意な差は見られなかった。

さらに小腸において重要な役割を果たすとされる核内受容体 LXR (Liver x receptor), FXR (Farnesoid x receptor) および AhR (Aryl hydrocarbon receptor) についてそれぞれのリガンド応答性を調べたところ、オルガノイドと単層上皮細胞で大きな差は見られなかった。したがって、培養環境の違いは、小腸上皮細胞の性質に大きな影響を与えないものと考えられた (論文 1)。

(4) ヒト小腸オルガノイド由来単層上皮細胞と Caco-2 細胞の違い

ヒト上皮モデルとして、Caco-2 細胞が古くから使用されてきたが、本細胞は結腸がん由来サンプルであり、本来増殖しないはずの上皮細胞が増殖するという非生理的な状態である。また、Caco-2 細胞は吸収上皮様の単一種の細胞からのみ構成されており、オルガノイドとは異なり、パネート細胞や杯細胞など他の種類の上皮細胞は含まれない。さらに、代謝機能についても、Caco-2 細胞はヒトの小腸上皮を模倣しないいくつかの性質が報告されている。例えば、薬物代謝酵素である CYP3A4(Cytochrome P450 3A4)の誘導、SGLT1(Sodium/glucose cotransporter)を介した糖取り込み、脂肪酸負荷による細胞外への脂質輸送能は、Caco-2 細胞ではほとんど見られないことが指摘されている。

代表者は、これらの小腸機能について、オルガノイド由来単層上皮細胞を用いた検討を行った（二次元培養が可能な単層状態のほうが Caco-2 細胞との比較対照として適切であると判断した）。CYP3A4 は核内受容体 PXR (Pregnane X receptor) の標的遺伝子であるため、PXR リガンドを処理したところ、Caco-2 細胞では CYP3A4 の発現は誘導されないが、オルガノイド由来単層上皮細胞では数十倍誘導された。また、SGLT の基質である AMG (methyl- α -D-glucopyranoside) の取り込み量を評価したところ、オルガノイド由来単層上皮細胞では放射線同位体標識された AMG は効率的に細胞内に取り込まれ、SGLT 阻害剤によりその量が大きく減少した一方、Caco-2 細胞では取り込み量は少なく、さらに SGLT 阻害剤による変化は見られなかった。さらに、オルガノイド由来単層上皮細胞に脂肪酸の一種であるオレイン酸を負荷すると、カイロミクロンに 1 分子含まれる Apo (Apolipoprotein) B-48 の分泌が増え、さらに MTP (Microsomal triglyceride transfer protein) 阻害剤を処理するとその量が大きく減少した。しかし、Caco-2 細胞ではオレイン酸負荷による ApoB-48 の分泌亢進が見られないだけでなく、MTP 阻害剤による減少がほとんど見られなかった。Caco-2 細胞においては、オルガノイド由来単層上皮に比べて PXR、SGLT1、MTP の発現量が非常に低く、遺伝子発現量の違いが機能の違いを反映していると推察された。

以上の結果より、ヒト小腸オルガノイド由来単層上皮細胞は、Caco-2 細胞よりも生理的に妥当なモデルとして有用であると考えられた（論文 2）。

<参考文献>

- (1) [Takahashi, Y.](#), Inoue, Y., Kuze, K., Sato, S., Shimizu, M., Kiyono, H., Yamauchi, Y., Sato, R. Comparison of gene expression and activation of transcription factors in organoid-derived monolayer intestinal epithelial cells and organoids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **85**: 2137-2144. (2021)
- (2) [Takahashi, Y.](#), Noguchi, M., Inoue, Y., Sato, S., Shimizu, M., Kojima, H., Okabe, T., Kiyono, H., Yamauchi, Y., Sato, R. Organoid-derived intestinal epithelial cells are a suitable model for preclinical toxicology and ADME studies. *iScience* in press.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takahashi Yu, Inoue Yu, Kuze Keitaro, Sato Shintaro, Shimizu Makoto, Kiyono Hiroshi, Yamauchi Yoshio, Sato Ryuichiro	4. 巻 85
2. 論文標題 Comparison of gene expression and activation of transcription factors in organoid-derived monolayer intestinal epithelial cells and organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2137 ~ 2144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab136	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 該当する

1. 著者名 Yu Takahashi, Makoto Noguchi, Yu Inoue, Shimizu, Hirotsu Kojima, Takayoshi Okabe, Hiroshi Kiyono, Yoshio Yamauchi, Ryuichiro Satohintaro Sato, Makoto Sh	4. 巻 -
2. 論文標題 Organoid-derived intestinal epithelial cells are a suitable model for preclinical toxicology and ADME studies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋裕, 山内祥生, 佐藤隆一郎
2. 発表標題 ヒトiPS細胞からの小腸オルガノイドおよび単層上皮細胞の樹立
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久世圭太郎, 高橋裕, 山内祥生, 佐藤隆一郎
2. 発表標題 安価で安定的なヒト小腸オルガノイド培養技術の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋裕, 佐藤隆一郎
2. 発表標題 ヒト臓器オルガノイドを活用した次世代食品科学研究
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野口惇, 清水誠, 高橋裕, 岸野重信, 小川 順, 山内祥生, 佐藤隆一郎
2. 発表標題 腸内細菌が産生する脂肪酸代謝産物のヒトiPS 小腸モデルを用いた生理機能解明
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋裕
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来小腸オルガノイドを活用した新たな食品・栄養科学研究
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 米田陸人, 桑田啓子, 柴田貴広, 佐々木崇, 高橋裕, 山内祥生, 佐藤隆一郎
2. 発表標題 E3 ユビキチンリガーゼRNF122 の骨格筋における発現制御機構及び機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋裕, 山内祥生, 佐藤隆一郎
2. 発表標題 小腸オルガノイド由来単層上皮細胞の生理学的特性評価
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久保山文音, 高橋裕, 山内祥生, 佐藤隆一郎
2. 発表標題 肝機能の生理学的解明を目指したヒト肝臓オルガノイド培養技術の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 高橋裕, 佐藤慎太郎, 佐藤隆一郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 7
3. 書名 iPS細胞を活用した生理機能の高いヒトモデルの構築とその応用	

1. 著者名 佐藤慎太郎, 高橋裕	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 11
3. 書名 単層化を介した腸管上皮オルガノイドへの遺伝子導入	

1. 著者名 亀井 康富	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 236
3. 書名 栄養・代謝物シグナルと食品機能	

〔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
---------	---------