

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 5 月 2 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18039

研究課題名（和文）ダイレクトリプログラミングによる血液由来腸前駆細胞の作製

研究課題名（英文）Conversion of T cells to intestinal progenitor 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・助教

研究者番号：80822494

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では血液由来の細胞からの誘導腸前駆細胞（iFIPCs）の作製を目的とした。この研究を始めるにあたり、これまでの方法で作製したiFIPCsは培養下で腸幹細胞（ISCs）へと成長することができないという問題が残されていた。血液由来の細胞を作製するためにはまずこの問題の解決が必要である。そこで、新たな方法を確立した。その結果、作製したiFIPCsは培養下で陰窩 絨毛様構造を有するオルガノイドを形成できた。このオルガノイドはLGR5陽性の腸幹細胞や腸の分化細胞も含んでおり、長期間維持できることが明らかになった。このことから、誘導腸前駆細胞は培養下で誘導腸幹細胞へと成長できることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立した新たな誘導方法は、血液由来の細胞を実際に医療で利用するための基盤技術となり、大変重要である。これまでの方法でiFIPCを作製した場合、生体由来の細胞と非常によく似た細胞の作製は不可能であったかもしれない。しかし、今回開発した方法を用いることで血液からの誘導をスムーズに行うことができる。自分自身の血液の細胞からiFIPCsを作製できれば、自身の遺伝的背景を有し、かつ、免疫拒絶反応のない腸前駆細胞を作製することが可能になり、創薬研究や移植に大きく貢献できる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to generate induced intestinal progenitor cells (iFIPCs) from blood-derived cells. In starting this study, we were left with the problem that iFIPCs generated by previous methods were unable to grow into intestinal stem cells (ISCs) in culture. In order to produce blood-derived cells, this problem must first be solved. Therefore, we established a new method. As a result, the iFIPCs produced were able to form organoids with a crypto-villus-like structure in culture. The organoids also contained LGR5-positive intestinal stem cells and intestinal differentiated cells, which could be maintained for a long time. This indicates that induced intestinal progenitor cells can grow into induced intestinal stem cells in culture.

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

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

腸は、外部から物質を取り込む機能を持った臓器であり、その内腔は常に感染源にさらされている。感染源からの感染を防ぐバリア機能の役目も持つ腸上皮細胞は、そのバリア機能が崩壊すると炎症性腸疾患のような重篤な疾患が引き起こされる。しかしながら、炎症性腸疾患の発症機序には未だ不明な点が多い。そのため、発症メカニズムの解明や治療法の開発が急務であり、腸上皮細胞の性質をもった細胞を用いて *in vitro* における網羅的解析法の確立が切望されていた。2009 年に佐藤らは、小腸の幹細胞をマトリゲルに包埋し三次元培養することで腸幹細胞を大量に長期間維持できる、小腸上皮の組織構造体（オルガノイド）培養系を確立した（Sato et al., *Nature*, 2009）。また、2012 年には小腸と同様に大腸幹細胞を長期間維持する方法も確立された（Yui et al., *Nat Med*, 2012）。小腸および大腸上皮オルガノイドは、生体内と同様の組織構造や機能を有しており、現在、医療応用に向けた研究が進められている。また、成体由来だけではなく胎仔の腸に含まれる腸前駆細胞の培養系も確立された。腸前駆細胞は、培養下で成体の腸に含まれる腸幹細胞へと成長し、腸前駆細胞由来のオルガノイドを大腸炎モデルマウスに移植すると、障害を受けた大腸組織を機能的に再構築する。さらに最近では、胚性幹細胞（ES 細胞）や人工多能性幹細胞（iPS 細胞）のような生体以外の細胞からも腸上皮オルガノイドを作製できるようになっている（Spence et al., *Nature*, 2011）。このように、様々な細胞を起点として腸上皮オルガノイドの作製が行われているが、生体由来の細胞を用いた場合の問題点としては侵襲性の問題が挙げられ、ES 細胞や iPS 細胞を用いた場合においては、倫理的問題や未分化な細胞が混入していた場合の腫瘍形成のリスクがある。これらを解決する手法として、ダイレクトリプログラミングという方法がある。ダイレクトリプログラミングとは、体細胞に組織特異的な転写因子を導入することで目的の細胞へと分化転換させる手法のことである。この方法を用いて、申請者らは、マウス胎仔由来線維芽細胞及びヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）に 4 つの転写因子（HNF4A、FOXA3、GATA6、CDX2）を導入し、腸前駆細胞を誘導することに成功した（以下、誘導腸前駆細胞）。誘導腸前駆細胞は、生体の胎児由来の腸前駆細胞と同様の性質を有し、培養下で腸幹細胞へと成長した。また、腸前駆細胞を大腸炎モデルマウスに移植すると、障害を受けた大腸組織を機能的に再構築できた。このように、誘導腸前駆細胞は医療応用への新たなツールとしての利用が期待できる。しかしながら、実際に医療応用を考えた際に、元の細胞に臍帯静脈内皮細胞を用いていることから、免疫拒絶の問題があることや、薬剤試験への利用においても個人の遺伝的背景に合わせた治療法の開発が難しいことが大きな問題であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、血液由来の細胞を用いて誘導腸前駆細胞を作製することを目的とした。ダイレクトリプログラミングの研究では、元の細胞に線維芽細胞を用いることが多く、成体の末梢血由来の細胞を用いている例はほとんどない。どのような細胞を元細胞として用いるかによって転換効率は大きく異なるため、これまでに申請者らが報告した方法と同じ転写因子や同じ培養方法で誘導可能かは明らかになっていない。一方、本研究で末梢血から腸前駆細胞を誘導できれば、生体由来の細胞を用いる際の問題であった、侵襲性の問題を解決することができる。また、患者自身の血液から誘導腸前駆細胞を作製できれば、免疫拒絶のない細胞の作製が可能になるとともに、遺伝的背景を含めた細胞を作製することができる。さらに、ダイレクトリプログラミングを用いると、ES 細胞や iPS 細胞から目的の細胞を分化誘導する場合と異なり、未分化な状態を経ずに目的の細胞へと直接運命転換するので、未分化な状態の細胞が残ったまま解析に利用するというリスクがない。ES 細胞や iPS 細胞から腸の細胞を作製するためには複雑な工程を経なければならないが、ダイレクトリプログラミングの場合は簡単な方法で作製ができるため、本研究で血液由来の細胞からの直接運命転換が可能になれば、臨床応用可能な細胞を簡単に作製するための基盤技術の創出につながる。

## 3. 研究の方法

本研究では血液由来の細胞からの誘導腸前駆細胞の作製を目的とした。この研究を始めるにあたり、これまでの方法で作製した誘導腸前駆細胞は培養下で腸幹細胞へと成長することができないという問題が残されていた。マウス誘導腸前駆細胞は、生体由来の腸前駆細胞と同様に培養下で陰窩-絨毛様構造を有する腸幹細胞へと成長できるが、ヒトにおいては、ヒトの生体由来の腸前駆細胞も腸幹細胞へと成長させる方法が確立されておらず、新たな培養系の確立が求められている。そのため、本研究で実際に医療応用できる細胞を作製するためには、血液由来の細胞の作製へ取り掛かる前にこの問題の解決が最優先事項であると考えた。そこで、新たな誘導超前駆細胞作製方法の確立を行なった。具体的には、下記方法で実験を行なった。

## 1. ヒト誘導腸前駆細胞を腸幹細胞へと成長させる方法の探索

まず、腸の分化に重要な転写因子に関する情報を収集し、それらの遺伝子を搭載したレトロウイルスベクターを作製した。その後、レトロウイルスを用いてヒト誘導腸前駆細胞にそれらの遺伝子を強制発現した。また、培地条件についても、腸の発生過程や成熟に必要なサイトカインを添加した。その後、遺伝子を強制発現したヒト誘導腸前駆細胞を長期間培養し、形態が腸幹細胞由来の陰窩-絨毛様構造を有するオルガノイド（成体型オルガノイド）と類似しているかを調べた。成体型オルガノイドを作製できたのちは、腸幹細胞で発現している LGR5 の *in situ* ハイブリダイゼーションや分化細胞マーカーの免疫染色を行ってその局在を明らかにした。また、定量的遺伝子発現解析によって腸幹細胞マーカーおよび腸の分化細胞マーカーの発現を調べた。

## 2. ヒト誘導腸幹細胞由来成体型オルガノイドの大腸移植

免疫不全大腸炎モデルマウスの大腸への移植を行い、ヒト小腸組織の構築の有無について調べた。免疫不全大腸炎モデルマウスは、NSG マウスにデキストラン硫酸ナトリウムを投与することで作製した。移植後 1 ヶ月で解析を行い、生着の有無を確認した。生着の有無については、ヒトの細胞特異的に反応する CK8/18 抗体を用いた。その後、小腸上皮細胞のマーカーである Sucrase-isomaltase や小腸の陰窩に存在するパネート細胞マーカーの Lysozyme の免疫染色、その他分化マーカーの免疫染色と HE 染色による組織学的解析を行った。

## 4. 研究成果

### 1. ヒト誘導腸前駆細胞を誘導腸幹細胞へと成長させる方法の探索

腸の分化に重要な転写因子に関する情報を収集し、いくつかの遺伝子をヒト誘導腸前駆細胞に強制発現した。遺伝子を強制発現したヒト誘導腸前駆細胞を新規の培地で培養すると、陰窩-絨毛様構造を有する成体型オルガノイドへと成長した。*In situ* ハイブリダイゼーションの結果より、このオルガノイドは LGR5 を発現している腸幹細胞を含んでいることが明らかになった。また、腸の分化細胞であるパネート細胞や杯細胞、吸収上皮細胞、内分泌細胞もオルガノイド中に含まれていることが免疫染色によって示された。さらに、遺伝子発現解析の結果から、新たに作製したオルガノイドは、これまでのオルガノイドよりも腸幹細胞マーカーや分化細胞マーカーの発現が高いことが明らかになった。これらの結果から、作製した細胞は多分化能を有していることが明らかになった。また、このオルガノイドは長期間培養が可能であり、腸幹細胞としての性質を維持し続けることができた。このことから、新たな方法で作製した誘導腸前駆細胞は、誘導腸幹細胞へと成長できることが明らかになった。

### 2. ヒト誘導腸幹細胞由来成体型オルガノイドの大腸移植

大腸炎免疫不全マウスの大腸にヒト誘導腸幹細胞由来のオルガノイドを移植した。まず、生着の有無を調べるためにヒト CK8/18 抗体で免疫染色を行った。その結果、マウスの大腸中でヒト CK8/18 を発現するヒト誘導腸幹細胞由来のオルガノイドの生着が確認された。つづいて、HE 染色を用いた組織学的解析を行った結果、移植した細胞は大腸中でヒト小腸様構造を形成していることが示された。そこで、誘導腸幹細胞由来のオルガノイドが生着した部分の免疫染色を行ったところ、小腸上皮細胞マーカーである Sucrase-Isomaltase の発現が確認された。さらに、生着した組織の陰窩では Lysozyme 陽性の細胞も観察され、小腸に存在するパネート細胞にも分化していることがわかった。その他の腸幹細胞マーカーや分化細胞マーカーについても発現が観察された。このことから、誘導腸幹細胞由来のオルガノイドは、ヒトの小腸組織として生着し、分化可能であることが示された。

本研究によって、誘導腸前駆細胞を誘導腸幹細胞へと成長させる新たな方法を確立できた。これまでの方法では陰窩-絨毛様構造を有するオルガノイドは作製できなかったことから、本研究の方法は大変画期的な成果である。胎児の生体から採取した腸前駆細胞においても培養下で腸幹細胞へと成長させる方法は確立おらず、その方法の確立が望まれていた。よって、本研究の方法は、*in vitro* で腸の発生研究を行うための新しい方法となりうるかもしれない。このように、本研究は腸の研究の発展にも貢献できる可能性がある。また、*in vitro* だけではなく生体内でも小腸の細胞として生着できることが明らかになった。今後は、この方法を利用して自己の細胞からヒト誘導腸幹細胞を作製することによって、生体由来の細胞の代わりとして短腸症などの小腸の疾患に対する治療に利用することが期待される。本研究での結果をもとに、今後はヒトの血液由来の細胞から誘導腸幹細胞の作製を試みたいと考えている。申請者は、本研究期間中に血液由来の細胞の培養方法を習得済みである。また、ウイルスの感染効率等、基礎データも取得済みである。血液由来の誘導腸幹細胞は、免疫拒絶の問題を解決できるとともに、患者一人一人の遺伝的背景を含めた細胞を作製できるため、移植や創薬研究に利用できる。また、ゲノムへの遺伝子の挿入がない方法（プラスミドやセンダイウイルス、アデノウイルスなど）を利用して血液由来誘導腸幹細胞を作製できれば、実際に臨床応用可能な新たな細胞として、様々な腸の疾患への利用も期待できる。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------