



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1950号
学位記番号	第1380号
氏名	管野 琢也
授与年月日	令和5年3月24日
学位論文の題名	Protective effect of Irsogladine against aspirin-induced mucosal injury in human induced pluripotent stem cell-derived small intestine (ヒト人工多能性幹細胞由来小腸におけるアスピリン誘発粘膜傷害に対するイルソグラジンの保護効果) Medicina. 2022 ;59(1):92.
論文審査担当者	主査： 瀧口 修司 副査： 加藤 洋一, 日比 陽子

論文内容の要旨

背景と目的

アセチルサリチル酸 (ASA) その中でも低用量アスピリンは、現在、高齢化社会を背景に脳血管障害や心血管障害の予防に世界で広く使用されている。消化管粘膜障害は、アスピリン使用時の主な合併症の一つであり、重篤な消化管出血を引き起こす可能性がある。NSAIDs による胃粘膜障害に対する薬剤は確立されているが、アスピリンによる小腸粘膜傷害を予防する薬剤は未だ確立されていない。またアスピリン粘膜傷害を研究するモデルにも課題が残っている。本研究の目的は、アスピリンによる小腸粘膜傷害を検討するためのヒト実験モデルを確立することである。さらに、ヒト人工多能性幹細胞由来 2 次元単層陰窩絨毛様構造小腸モデル(human induced pluripotent stem cell-derived 2D monolayer crypt-villus structural small intestine :2D-hiPSC-SI)を用いて、胃粘膜保護薬であるイルソグラジンのアスピリン誘発小腸粘膜傷害に対する保護作用を評価した。

材料と方法

ヒト iPS 細胞を用い、ヒト腸管オルガノイドを作成しシングルセル化しトランスウェル上に播種した。その後、気相液相界面培養法で培養し、2D-hiPSC-SI を確立した。また、ルシファーイエローを用いて 2D-hiPSC-SI の透過性を評価した。アスピリン添加後の 2D-hiPSC-SI の構造および粘膜透過性の経時変化を確認し、腸管上皮関連マーカーの変化をリアルタイム qPCR および免疫蛍光染色で評価した。さらに、イルソグラジンを培養液に添加し、イルソグラジンのアスピリン粘膜傷害予防効果を検討した。

結果

培養した 2D-hiPSC-SI は、吸収細胞、杯細胞、腸管内分泌細胞、パネート細胞からなる小腸上皮への多系統分化を示し、それぞれ CD10、MUC2、Chromogranin A、Lysozyme を発現することがわかった。さらに RNA in situ hybridization により、Lgr5 を発現する腸管幹細胞が検出された。また、ASA 投与により、2D-hiPSC-SI の粘膜透過性が上昇することが確認された。ASA で傷害を受けた 2D-hiPSC-SI は、腸管幹細胞マーカー Lgr5 だけでなく、多系統小腸細胞マーカーの mRNA 発現が減少していた。2D-hiPSC-SI の基底膜側にイルソグラジンを投与すると、48 時間後の 2D-hiPSC-SI による Mki67 と Muc2 の mRNA 発現が対照群に比べ有意に増加した。ASA 誘発小腸傷害モデルに ASA400 μ g/mL に加えイルソグラジンを投与したところ、2D-hiPSC-SI の粘膜透過性が ASA 単独投与群に比べ有意に低下した。さらに免疫蛍光染色において、イルソグラジンは、通常状態および 400 μ g/mL ASA 投与下で MUC2 の蛍光強度を有意に増加させた。

結論

ヒト iPSC 由来小腸上皮を用いた新しい ASA 誘発小腸傷害モデルを確立した。イルソグラジンは ASA 誘発小腸傷害に対して粘膜透過性を維持する効果を示し、杯細胞の分化を促進する。

論文審査の結果の要旨

【背景・目的】 アセチルサリチル酸 (ASA) その中でも低用量アスピリンは、現在、高齢化社会を背景に脳血管障害や心血管障害の予防に世界で使用されている。消化管粘膜障害は、アスピリン使用時の主な合併症の一つであり、重篤な消化管出血を引き起こす可能性がある。アスピリンによる小腸粘膜傷害を予防する薬剤は未だ確立されていない。またアスピリン粘膜傷害を研究するモデルにも課題が残っている。本研究の目的は、アスピリンによる小腸粘膜傷害を検討するためのヒト実験モデルを確立することである。また、ヒト人工多能性幹細胞由来 2 次元単層陰窩絨毛様構造小腸モデル (2D-hiPSC-SI) を用い、イルソグラジンのアスピリン誘発小腸粘膜傷害に対する保護作用を評価した。

【方法】 ヒト iPS 細胞を用い、ヒト腸管オルガノイドを作成しシングルセル化しトランスウェル上に播種した。その後、気相液相界面培養法で培養し、2D-hiPSC-SI を確立した。また、ルシファーイエローを用いて 2D-hiPSC-SI の透過性を評価した。アスピリン添加後の 2D-hiPSC-SI の構造および粘膜透過性の経時変化を確認し、腸管上皮関連マーカーの変化をリアルタイム qPCR および免疫蛍光染色で評価した。さらに、イルソグラジンを培養液に添加し、イルソグラジンのアスピリン粘膜傷害予防効果を検討した。

【結果】 培養した 2D-hiPSC-SI は、吸収細胞、杯細胞、腸管内分泌細胞、パネート細胞からなる小腸上皮への多系統分化を示し、それぞれ CD10、MUC2、Chromogranin A、Lysozyme を発現することがわかった。さらに RNA in situ hybridization により、Lgr5 を発現する腸管幹細胞が検出された。また、ASA 投与により、2D-hiPSC-SI の粘膜透過性が上昇することが確認された。ASA で傷害を受けた 2D-hiPSC-SI は、腸管幹細胞マーカー Lgr5 だけでなく、多系統小腸細胞マーカーの mRNA 発現が減少していた。2D-hiPSC-SI の基底膜側にイルソグラジンを投与すると、48 時間後の 2D-hiPSC-SI による Mki67 と Muc2 の mRNA 発現が対照群に比べ有意に増加した。ASA 誘発小腸傷害モデルに ASA400 μ g/mL に加えイルソグラジンを投与したところ、2D-hiPSC-SI の粘膜透過性が ASA 単独投与群に比べ有意に低下した。さらに免疫蛍光染色において、イルソグラジンは、通常状態および 400 μ g/mL ASA 投与下で MUC2 の蛍光強度を有意に増加させた。

【結語】 ヒト iPSC 由来小腸上皮を用いた ASA 誘発小腸傷害モデルを確立した。イルソグラジンは ASA 誘発小腸傷害に対して粘膜透過性を維持する効果を示し、杯細胞の分化を促進する。

【審査内容】 主査の瀧口教授からは、①アスピリン粘膜傷害の機序について、②小腸モデルの limitation は何か、③イルソグラジンを選択した理由について、などにつき計 5 項目の質問がなされた。第一副査の加藤教授からは、①オルガノイド作成時の増殖因子などそれぞれの添加因子の機序について、②オルガノイドをシングルセル化し播種する理由について、③小腸オルガノイド作成での ALI 培養の必要性について、など計 7 項目にわたり質問がなされた。第二副査の日比教授からは、①気相部分での細胞生存への影響について、②アスピリン投与濃度の設定根拠について、③イルソグラジンの薬理的機序について、など計 7 項目にわたり質問がなされた。これらの質問に対し、一部答弁に窮することもあったが概ね的確に返答し、学位論文の主旨を十分理解していると判断した。本研究は、ヒト iPS 由来小腸上皮を用い ASA 誘発小腸傷害モデルを確立し、これを用いてイルソグラジンが ASA 誘発小腸傷害に対して粘膜透過性を維持する効果、杯細胞の分化を促進することを示した。よって、これらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者は博士 (医学) の学位を授与するに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 瀧口 修司 教授 副査 加藤 洋一 教授 日比 陽子 教授