



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬科学）
報告番号	甲第1961号
学位記番号	第392号
氏名	小川 勇
授与年月日	令和5年3月24日
学位論文の題名	ヒトiPS細胞由来腸管オルガノイドの新規培養法の確立
論文審査担当者	主査： 湯浅 博昭 副査： 松永 民秀， 頭金 正博， 田中 正彦

学位論文内容要旨

ヒトiPS細胞由来腸管オルガノイドの新規培養法の確立

小川 勇

【序論】

昨今、非常に多くの医薬品が開発され医療の発展に貢献してきた。しかし、臨床試験では多くの候補薬がドロップアウトしているのが現状である。原因として、未だ多くの疾患の機序が解明されていないことや、非臨床試験と臨床試験のギャップが大きいことがあげられ、基礎研究や非臨床試験の重要性が再認識されている。

医薬品の大半を占める経口薬の有効成分は小腸にて吸収される。そのほとんどが膜透過による経細胞経路や傍細胞経路での受動輸送により吸収されるが、発現するトランスポーターやチャンネルを介した能動輸送により吸収され体内に運ばれる薬物も多い。さらに小腸には cytochrome P450 (CYP) 3A などの薬物代謝酵素も発現していることから、消化管吸収過程は非常に複雑である。そのため、経口薬の体内動態評価は消化管での吸収率 (F_a) と代謝回避率 (F_g) およびが肝臓での代謝回避率 (F_h) を同時に評価する必要がある。しかし、最も汎用されている消化管吸収評価モデルである Caco-2 細胞はヒト結腸がん由来株化細胞であり、薬物トランスポーターの発現パターンが正常ヒト腸管上皮細胞とは異なる。CYP3A4 などの薬物代謝酵素の発現も極めて低く、腸管の吸収代謝を正確に評価できる評価系はない。そのため薬物代謝酵素および薬物トランスポーターを考慮した消化管吸収過程の評価の重要性が高まっている。

2007年にはヒト人工多能性幹 (induced pluripotent stem : iPS) 細胞が樹立され、創薬研究や再生医療への利用に向け研究が進められている。iPS 細胞は様々な細胞に分化可能な分化多能性やほぼ無限の増殖能を有し、その入手も容易である。iPS 細胞を分化誘導することで得られる細胞は新たな創薬研究支援材料として期待されており、小腸上皮細胞への分化誘導法も数多くの報告がなされている。特に小腸幹細胞の維持培養方法として報告されたヒト腸管オルガノイド (HIOs) は腸管を構成する様々な細胞種を有することから、生体組織と類似した性質を有していると考えられている。しかし、HIOs の培養にはいくつかの課題があり、Matrigel 包埋法という培養の不安定性や、三次元構造に起因する用途の限定である。本研究ではこれらの課題に対して解決を試みた。

まず Matrigel 包埋法に用いる Matrigel はマウス肉腫由来の細胞外マトリックスであり、その性質はマウスの状態に依存するためロット間差が大きく、作製する腸管オルガノイドの性質が安定しない。そのため、精度の高い、安定した評価が求められる創薬研究において、Matrigel 包埋培養で作製した腸管オルガノイドの使用は不向きである。また、再生医療分野においては、安全性の観点から異種動物由来成分である Matrigel は使用できない。第一章では Matrigel の代替として多糖類を使用し、HIOs の浮遊培養が可能かどうか検証を行った。

また HIOs は生体と近い性質を持つとされているが、中空球状構造であるため、外表面しか培養液に触れることができず、薬物などの化合物が腸管をどのように透過するかを観察することが困難であった。また、HIOs の大きさや成熟度はそれぞれの固体で異なるため、データが不安定となる。そのため、HIOs は薬物動態試験などの創薬研究の評価系としては適さない。そこで第二章において、HIOs を再播種して一般的に使用されている培養プレート上に 3 次元構造を形成する腸管細胞を作製する方法を検討した。

【本論】

第一章 多糖類を用いたヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドの浮遊培養法の開発

1. 背景と目的

HIOs の培養には、細胞外マトリックス等で HIOs 同士の接着を防ぐ必要がある。近年、アルギン酸ナトリウムやポリエチレングリコールなどを使用したオルガノイドの包埋培養法が開発されているが、機能の低さや培養の煩雑さが課題となっている。さらに、包埋培養は細胞外マトリックスを模したゲルの中に細胞を固定して培養するが、その操作は煩雑であり大量培養は難しい。一方、天然高分子多糖類のジェランガムを使用することで iPS 細胞の浮遊培養に成功したとの報告があり、ジェランガム誘導体である FP001 を用いることで様々な癌細胞の浮遊培養に成功したとの報告もある。浮遊培養は包埋培養と比較して非常に簡便な培養方法であり、大量培養が容易であると考えられる。また、FP001 は Matrigel とは異なり性質が安定しており、ロット間差も小さい。そのため、作製した HIOs の性質も安定すると考えられる。さらに、これらは異種動物由来成分を含まない材料であることから、作製した HIOs の利用の幅を大きく広げると考えられる。そこで、FP001 やその類似体を合わせた計 5 種類の多糖類類を使用した浮遊培養において、十分な機能を有する HIOs を作製することができるか調べるために検討を行った。

2. HIOs の浮遊培養に適した多糖類類の探索

基本的な分化誘導は図に示したプロトコールで行い、ジェランガム誘導体の FP001 と FP003、さらに他の多糖類である結晶セルロース、キチン、ナノセルロースを用いて、Matrigel と比較検討を行った (Figure 1)。分化誘導終了後、Matrigel および FP001、FP003 を使用した群において細胞の

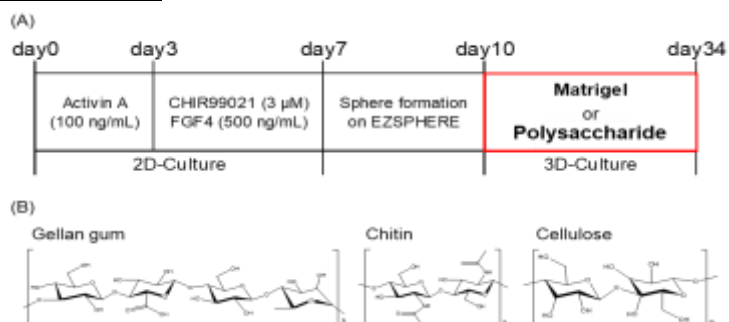


Figure 1. The scheme of HIO culture. (A) HIO differentiation protocol. Human iPS cells were differentiated into mid- or hindgut-like cells. Spheres were formed using EZSPHERE. HIOs were produced by three-dimensional culture using Matrigel or polysaccharides. (B) The structural formulae of the main components of polysaccharides are shown; Gellan gum is the main component of FP001 and FP003.

凝集が抑制され、HIOs 特有の管腔構造の形成が確認された (Figure 2A)。一方、結晶セルロース、キチン、ナノセルロースを使用した場合、細胞凝集を抑制することができず、複数の HIOs

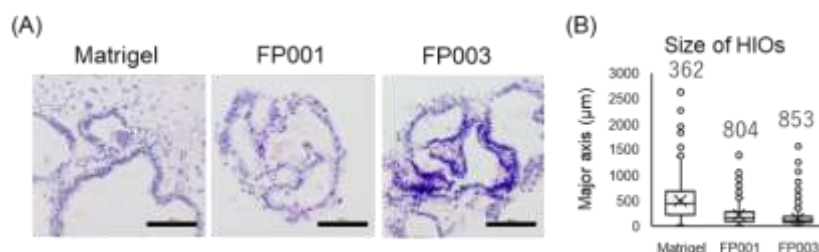


Figure 2. Fabrication of HIOs using natural polysaccharides. (A) Images of HIO cross-sections by H&E staining. Hematoxylin stained the cell nuclei blue, and eosin stained the cytoplasm red. Scale bars = 100 μm. (B) The size of the HIOs was indicated. Individuals with a major axis diameter of less than 10 μm were excluded. The numbers in the graph represent the number of HIOs.

が結合した細胞塊が形成された。Matrigel と FP001、FP003 で作製した HIOs のサイズおよび数量を測定したところ、FP001 および FP003 を使用した HIOs は小さく、数が多いことが判明した (Figure 2B)。この結果より、FP001 および FP003 は Matrigel 以上に凝集抑制の効果が高いことが示唆された。

3. 作製した HIOs の遺伝子発現および薬物動態学的機能評価

HIOs の培養が可能であると判明した FP001 および FP003 について、腸管関連遺伝子や薬物動態関連遺伝子等の分化マーカーについて遺伝子発現を調べた。FP001 では頂端膜マーカーである sucrase-isomaltase や杯細胞マーカーである MUC2 の発現量の上昇が認められた。

また、腸管幹細胞マーカーである LGR5 の発現量は FP001、FP003 とともに上昇した (Figure 3)。さらに FP001 で作製した HIOs において、薬物トランスポーターや

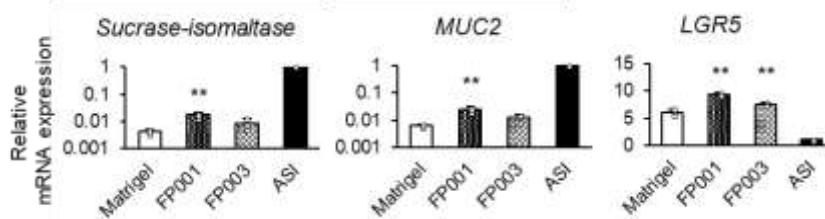


Figure 3. mRNA expression in the HIOs using 0.015% FP001 or FP003. mRNA expressions were measured by PCR after culture and compared with that of the HIOs cultured using Matrigel. Mean ± S.D. Matrigel, FP001, and FP003: $n = 3$, adult small intestine (ASI): $n = 1$. All values were standardized to ASI's value of 1. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Matrigel. The white dots in the graph indicate individual data.

代謝酵素の発現量の上昇、もしくは上昇傾向が見られた。さらに免疫蛍光染色において、これらの蛋白質が発現していることも確認された。

最後に、作製した HIOs の薬物動態学的機能を確認するため、CYP3A4 の代謝活性および薬物排出トランスポーターP-gp、BCRP の輸送活性を評価した。CYP3A4 の代謝試験では、基質のミダゾラムの主要代謝物が検出され、阻害剤であるケトコナゾールの添加により、30%以下まで低下した。排出トランスポーターを介した基質輸送試験では HIOs の内部に基質の蓄積が認められ、阻害剤の添加により蓄積量が減少した。

4. 小括

以上の結果より、FP001 および FP003 を Matrigel の代替として HIOs の培養が可能である

ことが示された。特に FP001 は薬物動態関連遺伝子の発現量の上昇も確認され、Matrigel よりも優れた HIOs 培養材料であることが示唆された。FP001 と FP003 は異種動物由来成分を含まないため、HIOs の再生医療への応用も可能と考えられる。本研究では、HIOs を用いた移植実験は行わなかったが、FP001 および FP003 の主成分である脱アシル型ジェランガムは食品添加物としても使用されており、他の培養材料よりも安全性における懸念が少ないと考えられる。今後、実験動物への移植実験を行っていくことにより、その有用性と安全性を確認することで、さらに応用の可能性が広がると考えている。

第二章 気相液相界面培養と分化誘導因子の組み合わせによる腸管構造形成

1. 背景と目的

近年、生体腸管組織と近い性質を持つとされる HIOs に対する関心が高まっており、数多くの研究が行われている。HIOs の平面培養も進められているが、非常に複雑なマイクロデバイスによるものや、生体腸管組織から採取した細胞を使用したものに限られている。薬学研究に幅広く利用されるためには細胞の機能だけでなく、性質の均一性や供給の安定性も重要であると考えられる。これらの課題を解決するため、ヒト iPS 細胞から分化誘導した HIOs を利用し、簡便に三次元構造を有する腸管細胞を作製する方法を開発した。

2. 陰窩絨毛様構造を形成する培養条件の検討

まず HIOs の分化誘導期間のなかで二次元培養に移行する最適なタイミングを検討した。HIOs 特有の管腔構造形成後の 22、28、34 日目の HIOs を細胞剥離操作を行い、二次元培養を開始した。22 日目と 28 日目の HIOs は二次元培養後の細胞増殖も良好である。一方、34 日目の HIOs は細胞剥離が困難なほど細胞間接着が強く、二次元培養には適さないことが判明した。

次に、二次元培養した HIOs の機能向上および立体構造の形成を目的とした培養法の検討を行った。気相液相界面

(ALI) 培養は、生体組織由来の細胞を培養する際に機能を向上させるとの報告があり、CHIR99021 は HIOs 培養で重要な wnt シグナルを活性化させることが知られている。検討の結果、ALI 培養と CHIR99021 を併用した群

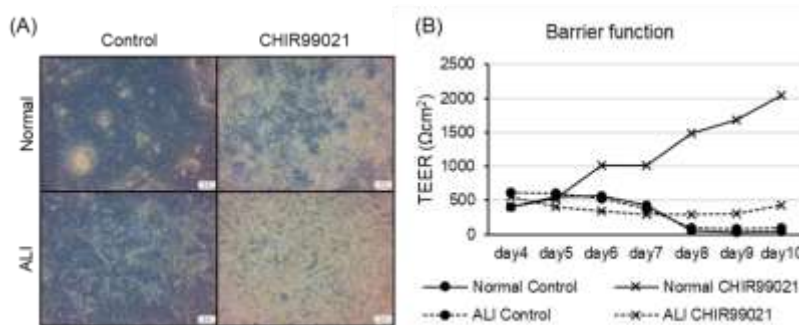


Figure 4. ALI culture and CHIR99021 are essential for hICs to form three-dimensional structures. (A) Single-celled HIOs cultured on cell culture inserts for 10 days were photographed. Normal: normal liquid-phase culture, Control: CHIR99021 nonadditive. Scale bars = 100 μm. (B) TEER was measured every day after 4 days of two-dimensional culture. Mean ± S.D. *n* = 3.

において細胞密度および細胞の厚みが増加し、TEER も安定していた (Figure 4)。ALI 培養を開始する時期についても検討を行った。二次元培養 2 日目もしくは 3 日目に ALI 培養を開始した群において、陰窩絨毛様の凹凸構造が観測された。さらに分化誘導因子について詳細な検討を行った結果、CHIR99021 の他に cyclic AMP シグナルを活性化させる forskolin や TGF- β 受容体阻害剤である A-83-01 も陰窩絨毛様構造の構築に不可欠であることが判明した (Figure 5)。

3. 細胞の形質評価

Cell3iMager Estier を使用し、形成される陰窩絨毛様構造を経時的にかつより鮮明に観測した。ALI の培養日数に応じて細胞の厚みが増し、培養 6 日目以降に凹凸構造が急速に生成されることが明らかとなった。また、培養 8 日目以降は細胞の厚みと凹凸数の変化がなくなり、状態が安定していることが示唆された (Figure 6)。細胞表面の微小構造については、10 日間培養後に透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて観察した。タイトジャンクションはコントロール群と同様に形成され、微絨毛は ALI 培養により、長く高密度に形成された。ALI 培養群の細胞上部には粘液様の物質が蓄積している様子も観測され、ムコ多糖類を主成分とする粘液層の形成が推察される。

4. 長期培養方法の検討

ここまでの検討では培養期間を 10 日間としていたが、それ以降は陰窩絨毛様構造が維持できず平坦な形状に戻ることが確認された。そこで、HIOs 培養において頻繁に使用される Wnt3a、Noggin、R-Spondin 1 の 3 因子 (WNR) を加えて培養を行うことで、培養期間の延

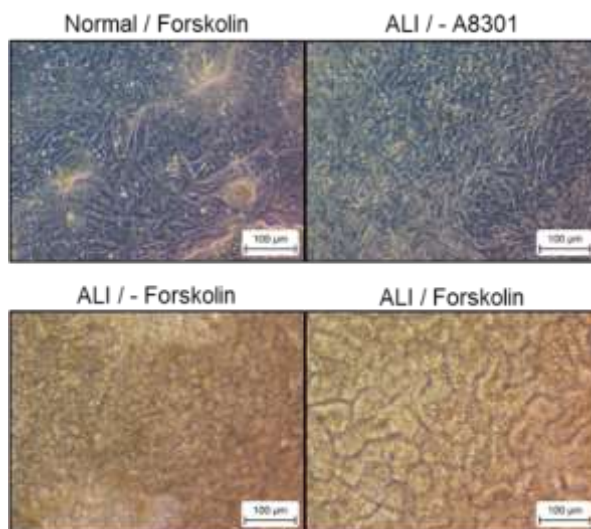


Figure 5. cAMP signaling and TGF- β signaling play important roles in intestinal conformation.

The culture period was 10 days, and ALI culture was performed from day 4 to day 10. A-83-01: 500 nM, forskolin: 30 μ M. Scale bars = 100 μ m.

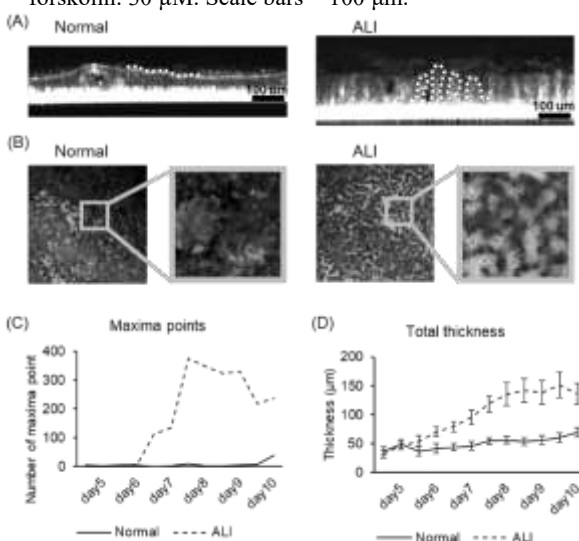


Figure 6. The crypt-villus-like structure grows rapidly from day 6 in culture.

(A) Cells were imaged over time using Cell3iMager Estier, and the images were processed using ImageJ. The figure shows a cross section; the white dotted line indicates the apical surface. Scale bars = 100 μ m. (B) The Z-section image was projected onto the Z-plane. Dots in the magnified image indicate the maxima points. (C) The number of maxima was counted over time. $n = 1$. (D) Cell height from day 5 to day 10 was recorded every 12 h. Values are averages within plots.

長を試みた。3 因子の添加により 22 日まで TEER が安定し、遺伝子発現の維持も確認された。特に腸管幹細胞マーカーである LGR5 や OLFM4、Paneth 細胞マーカーである Lysozyme、増殖性細胞マーカーの Ki67 の遺伝子発現が高く維持されており (Figure 7)、陰窩絨毛様の立体構造の維持に重要であることが示唆された。

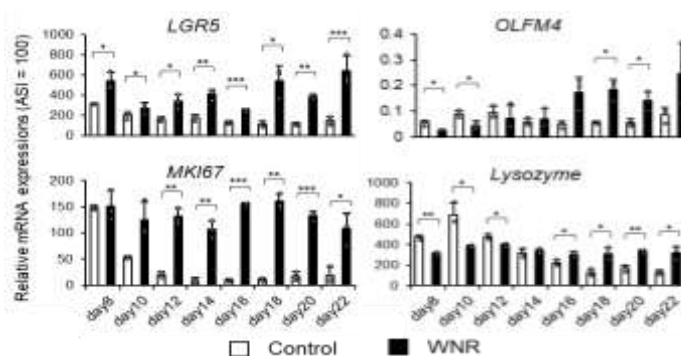


Figure 7. WNR also contributes to the maintenance of the degree of hICs differentiation. Expression levels of mRNA for intestinal-related genes were measured by qPCR. The delta-delta method was used, and data were normalized by HPRT. Relative values obtained from adult small intestine (ASI) as 100 are shown. White dots indicate individual values, and bars indicate mean \pm S.D. $n = 3$. * $P < .05$. ** $P < .01$. *** $P < .001$.

5. 小括

これらの結果は腸管細胞や HIOs の二次元培養に関する研究において、非常に画期的なものであると考えている。HIOs のような複雑な形状の細胞を、セルカルチャーインサートという極めてシンプルな培養プラットフォームで培養することに成功し、長期間の培養も可能にした。この細胞は生体の腸管組織とよく似た特徴を有しており、従来の腸管培養細胞よりも優れた評価系となり得る。特に、長期間の試験が必要な薬物の慢性毒性試験や、治療薬を用いた炎症回復試験等、幅広い評価が可能であると考えられる。

【総括】

第 1 章では HIOs の性質安定性の向上や再生医療への応用に繋がる HIOs の新規培養法を開発し、第 2 章ではヒト iPS 細胞から分化誘導した HIOs を利用してセルカルチャーインサート上で陰窩絨毛様構造を有する立体的な腸管細胞を作製することに成功した。これまで HIOs は生体組織に近い特徴を持つことから、創薬研究や移植実験等の様々な分野で研究が進められてきたが、Matrigel 包埋法という特殊な培養法や球体という形状の扱いにくさから、実用化に至った例はほとんどない。本論文ではこれらの課題を解決し、腸管に関する研究の発展に大きく寄与するものと考えられる。

【基礎となる報文】

1. **I. Ogawa**, D. Onozato, S. Anno, H. Hayashi, T. Kanaki, T. Iwao, T. Matsunaga.
Suspension culture of human induced pluripotent stem cell-derived intestinal organoids using natural polysaccharides
Biomaterials., **288**, 121696 (2022)
2. **I. Ogawa**, T. Iwao, T. Matsunaga.
A combination of air-liquid interface culture and differentiation factors promotes the formation of intestinal structure
Submitted