

Title	オルガノイド培養技術と腸管分化誘導技術を組み合わせた高機能なヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の開発
Author(s)	乾, 達也
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/96138">https://doi.org/10.18910/96138</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 乾 達 也 )

## 論文題名

オルガノイド培養技術と腸管分化誘導技術を組み合わせた高機能なヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の開発

## 論文内容の要旨

経口投与された医薬品は、最初に小腸で吸収・代謝・排泄を受ける。この一連の反応は医薬品の体内動態に大きな影響を与えるため、小腸における薬物動態をin vitroで評価することは創薬研究において重要な検討項目となっている。現在、上記の反応をin vitroで評価するために実験動物由来の小腸組織やヒト結腸癌由来細胞株であるCaco-2細胞を用いた評価系が創薬研究の現場で汎用されている。しかしながら、前者には種差があるためヒトへの外挿性に懸念があり、後者ではCYP3A4等の薬物代謝酵素をはじめとした薬物動態分子の発現がヒト小腸上皮細胞と比べて著しく低い、および癌細胞特有の遺伝子変異が蓄積している等の問題がある。そのため、ヒト小腸における薬物動態を正確に評価できる新たな系の確立が求められている。

そのような評価系として新たに開発が進められてきたのがヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞である。iPS細胞は採取が容易な血液細胞などからも樹立でき、増幅培養が可能であるため安定した供給が可能である。ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞を分化誘導する研究はこれまで盛んに行われており、機能的なヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞が開発されてきた。しかしながら、いずれも培養系の迅速な供給に問題がある点、機能面でロット間差が大きくなりやすい点などの課題があった。一方で、腸管オルガノイドについても近年盛んに研究されている。腸管オルガノイドは生体の腸管上皮幹細胞から樹立される3次元培養体であり、腸管上皮の機能を保ったまま長期に渡りin vitro継代・維持培養が可能である。しかし、元となる生体組織の供給に限られる上に侵襲性の高い外科的な手法で採取されるため利用に関して制約が大きい。そのような課題を解決するため、ヒトiPS細胞から直接腸管オルガノイドを分化誘導する手法も開発されているが機能面で未だ課題が多いのが現状である。

以上の背景を踏まえて、筆者は創薬研究に応用可能な腸管上皮細胞モデルとして、入手・増幅が容易なヒトiPS細胞から継代・維持培養ができる高機能な腸管オルガノイドを開発することを目指した。第一章では、ヒトiPS細胞由来腸管オルガノイドが抱える課題を明確にするため、ヒトの小腸生検組織から作製された腸管オルガノイドとの比較を行った。研究に際してcytochrome P450 (CYP) などの薬物動態分子の遺伝子発現量や活性は個人差が大きいことを考慮し、同一個人からヒト生検オルガノイド (b-I0) およびヒトiPS細胞の樹立、および樹立したヒトiPS細胞からヒトiPS細胞由来腸管オルガノイド (i-I0) を樹立した。その後、樹立した両オルガノイドの特性を比較した。まず、両オルガノイドの3次元培養状態における性状について様々な面から比較した。位相差顕微鏡像と透過型電子顕微鏡像を確認した結果、b-I0は単層で構成され密な微絨毛構造を有していたが、i-I0は複数の細胞層で構成され微絨毛もb-I0より未発達であった。両者の増殖能を評価した結果、増殖速度はb-I0、増殖能の持続性はi-I0の方が高かった。またFACS解析では、b-I0の方が上皮細胞の割合が高かった。さらに遺伝子発現プロファイルをqRT-PCRで解析した結果、b-I0の方がi-I0より薬物トランスポーターや薬物代謝酵素の遺伝子発現レベルが高かった。これらの結果から、b-I0の方が腸管として成熟していることが示唆された。次に両オルガノイドの2次元培養状態における性状について比較した。膜の緊密性をTEERで評価したところi-I0の方が高い値を示した。続いて、qRT-PCRにより遺伝子発現プロファイルを解析した結果、両オルガノイドとも2次元培養により多くの遺伝子発現レベルが向上したものの、その傾向は3次元培養状態と変わらなかった。一方、両2次元培養系における薬物輸送能と薬物代謝能を評価した結果、検討した全ての項目においてb-I0の方が高い活性を示した。これらの結果から薬物動態評価系としてはb-I0の方が高機能であることが示唆された。さらに両オルガノイドの各培養状態についてRNA-seq解析を行った結果、3次元培養状態において、b-I0では腸管上皮細胞分化、腸管吸収、消化、上皮細胞分化に関する遺伝子群、i-I0では神経細胞、血管内皮細胞、間葉系ニッチに関する遺伝子群が高発現していた。2次元培養状態ではそれらとあわせて、b-I0では脂質代謝に関わる遺伝子群、i-I0では形態形成に関わる遺伝子群が高発現していた。以上の結果より、薬物動態学的应用にはb-I0の方が適しており、i-I0は腸管としての機能をより高める必要があることが示された。

第二章では、新規評価系としての高機能なヒトiPS細胞由来腸管オルガノイドを作製することを目指した。先の検討

でヒトiPS細胞由来腸管オルガノイドの機能が低かったのは未熟な腸管細胞を用いたためだと考えられた。そこで当研究室が開発したヒトiPS細胞由来腸管上皮様細胞 (ELC) の分化誘導法を参考に、ヒトiPS細胞から成熟した腸管上皮細胞を分化誘導した後、その細胞から腸管オルガノイド (ELC-org) を樹立した。樹立したオルガノイドおよびその単層膜についてその特性を評価した。はじめに最適なELC-orgの培養方法およびELC-orgの最適な単層膜培養法について検討を行った。その結果、ELC-orgの単層膜 (ELC-org-mono) はELC作製に使用する最終分化培地で培養すると薬物動態分子の遺伝子発現レベルが顕著に向上すること、およびそのCYP3A4活性は培養期間の応じて高くなり、P-gp活性は培養初期の方が高くなることがわかった。続いて、ELC-orgおよびELC-org-monoについて形態学的評価を行った。まず、位相差顕微鏡および透過型電子顕微鏡による観察では、両者とも単一の細胞層で構成されており、微絨毛構造はELC-org-monoの方がより発達していた。続いて上皮細胞の割合をFACSで解析した結果、両者とも上皮細胞のみで構成されていた。さらに腸管に存在する分化細胞の存在を免疫蛍光染色で確認した結果、両者とも内分泌細胞やパネート細胞が存在しており、ELC-org-monoでは杯細胞も存在していた。これらの結果から、ELC-orgは成熟した腸管細胞のみで構成されていることが示唆された。次にELC-org-monoにおける薬物動態能を確認するため種々の評価を行った結果、CYP3A4やCES2の薬物代謝能、P-gp、BCRP、PEPT1の薬物輸送能が確認され、一部は長期培養したELC-orgを用いても確認された。次に、ELC-org-monoの各種CYPの薬物代謝活性をLC-MS/MSで解析した結果、CYP3A4、CYP2D6、CYP2C9についてヒト初代小腸細胞と同等の活性があった。これらの結果から、ELC-orgはヒト小腸に近い薬物動態能を持つ優れた培養系であることが示唆された。最後に、ELC、ELC-org、ELC-org-monoの遺伝子発現パターンの変化を分析するため、RNA-seq解析を行った。その結果、ELCからELC-orgを経てELC-org-monoを作製する過程で消化に関する遺伝子群の発現が上昇していた。さらに元となったELCよりELC-org-monoではELCより代謝プロセスに関する遺伝子群が発現上昇しており、間葉系細胞に関する遺伝子群が発現低下していた。これにより、ELCに含まれていた間葉系細胞がELC-org-monoでは排除されており、創薬応用する際の利便性が向上すると考えられる。

上記の結果に加えて、ELC-org-monoがCYP3A4の誘導能を有していること、凍結保存したELC-orgの細胞懸濁液から作製したELC-org-monoでも十分高い機能を有することを明らかにしている。以上の結果より、洗練された分化誘導法により、ヒトiPS細胞からヒト小腸に近い機能を有した腸管オルガノイドの培養系を開発できた。この培養系は既存系より様々な点で優れており、そのような新規評価系の社会実装実現へ大きく近づくものである。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 乾 達也 )	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 水口 裕之 副 査 教授 辻川 和丈 副 査 教授 近藤 昌夫
<p><b>論文審査の結果の要旨</b></p> <p>経口投与された医薬品は、最初に小腸で吸収・代謝・排泄を受けるため、小腸における薬物動態を <i>in vitro</i> で評価することは創薬研究において重要な検討項目となっている。現在、上記の反応を <i>in vitro</i> で評価するために実験動物由来の小腸組織やヒト結腸癌由来細胞株であるCaco-2細胞を用いた評価系が創薬研究の現場で汎用されている。しかしながら、既存の評価系ではヒト生体を再現しきれず新規評価系の確立が望まれている。</p> <p>新規評価系として近年開発が進められてきたのがヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞である。iPS細胞は容易に樹立・増幅培養が可能であるため安定して供給できる。しかし、ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞を分化誘導する研究はこれまで盛んに行われてきたが、いずれも培養系の迅速な供給に問題がある点、機能面でロット間差が大きくなりやすい点などの課題があった。一方で、腸管オルガノイドについても近年盛んに研究されている。腸管オルガノイドは生体の腸管上皮幹細胞から樹立される3次元培養体であり、長期に渡る <i>in vitro</i> 継代・維持培養が可能である。しかし、元となる生体組織の供給やその採取手法から利用に関して制約が大きい。そのような課題を解決するため、ヒトiPS細胞から直接腸管オルガノイドを分化誘導する手法も開発されているが機能が不十分であるのが現状である。そこで本研究では創薬研究に応用可能な腸管上皮細胞モデルとして、入手・増幅が容易なヒトiPS細胞から継代・維持培養ができる高機能な腸管オルガノイドを開発することを目指した。</p> <p>ヒトiPS細胞由来腸管オルガノイドが抱える課題を明確にするため、ヒトの小腸生検組織から作製された腸管オルガノイドとの比較を行った。研究に際してcytochrome P450 (CYP) などの薬物動態分子の遺伝子発現量や活性は個人差が大きいことを考慮し、同一個人からヒト生検オルガノイド (b-I0) およびヒトiPS細胞の樹立、および樹立したヒトiPS細胞からヒトiPS細胞由来腸管オルガノイド (i-I0) を樹立した。その後、樹立した両オルガノイドの3次元培養状態および2次元培養状態における性状について、形態や増殖能、遺伝子発現パターン、薬物動態分子の活性あなどの様々な面から比較した。</p> <p>当研究室ではこれまでヒトiPS細胞由来腸管上皮様細胞 (ELC) の分化誘導法を開発してきた。それらを参考に、ヒトiPS細胞から成熟した腸管上皮細胞を分化誘導した後、その細胞から腸管オルガノイドを樹立した。樹立したオルガノイドおよびその単層膜について、最適な培養条件や培養期間について検討した後、形態や遺伝子発現パターン、薬物動態分子の活性等の様々な面から両者の特性を評価した。</p> <p>本研究により以下の結果を得た。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 既存の分化誘導法で樹立されたヒトiPS細胞由来腸管オルガノイドは機能面で生検由来腸管オルガノイドに劣っており、その原因は腸管上皮への分化が不十分であることが考えられた。</li> <li>2. 分化誘導法を改良することで、高機能なヒトiPS細胞由来腸管オルガノイドおよびその単層膜の作製に成功した。</li> <li>3. 作製された単層膜は生体に近い薬物代謝能と創薬研究に適した薬物輸送能を有していたばかりか、1年以上の長期培養を経たオルガノイドや凍結保存した細胞からも腸管モデルを提供できる高い汎用性を有していた。</li> </ol>	

以上のことから、本論文は、ヒトiPS細胞から高機能な腸管モデルの開発に成功しており、既存の評価系が抱えていた様々な課題を一挙に解決できていることから極めて革新性が高く、博士(薬科学)の学位論文に値するものと認める。