

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	堀田 伸勝
論文審査担当者	主 査 樗木 俊聡 副 査 田賀 哲也、中田 隆夫
論文題目	Fluorescent labelling of intestinal epithelial cells reveals independent long-lived intestinal stem cells in a crypt
(論文内容の要旨) 【要旨】 腸管の様々な機能とその制御において、腸管上皮幹細胞は重要な働きを担っている。これまで陰窩底部に存在する腸管上皮幹細胞が Lgr5 などの腸管上皮幹細胞マーカーを用いた遺伝子マーカー解析により同定され、陰窩底部に複数存在することが報告されている。しかしこれまでの蛍光タンパク質遺伝子を用いた解析では、1 つの陰窩における複数の腸管上皮幹細胞が同色に発色してしまうため個別の幹細胞解析が困難であった。今回我々はマウス小腸から培養を行ったオルガノイドにおける新規に確立したレンチウイルスを用いた遺伝子導入法を用いて、蛍光タンパク質 mCherry の発色を呈するオルガノイドの樹立に成功した。共焦点顕微鏡を用いたオルガノイドの全細胞を観察した 3 次元解析によって、遺伝子導入から 1 年以上経過したオルガノイドの陰窩に mCherry 陽性細胞が 1-5 個存在することを確認した。このことから 1 年以上の長期間に陰窩には、mCherry 陽性と mCherry 陰性の腸管上皮幹細胞の混在が示唆された。さらに経時的観察によって、初めて 1 個の mCherry 陽性腸管上皮幹細胞が陰窩から絨毛へ mCherry 陽性細胞を供給することを確認した。また 1 個の mCherry 陽性、mCherry 陰性腸管上皮幹細胞に由来したオルガノイドが異なる遺伝子発現パターンを示すことを確認した。今回我々が開発したレンチウイルスを用いた新規のオルガノイドに対する遺伝子導入法により、陰窩底部に複数存在する腸管上皮幹細胞がそれぞれ異なる分化細胞を陰窩から絨毛に供給している可能性が示唆された。今後のさらなる研究の進歩により、個別の腸管上皮幹細胞の制御機構や腸管上皮における絨毛機能制御の解明が期待される。 【緒言】 腸内環境は、食物や腸内細菌などの様々な物質の影響により絶えず変化している。このことから腸管上皮の恒常性維持のためには、腸管の機能は必要に応じた腸内環境への適応が要求される。腸管機能の発現には腸管上皮の絨毛に存在する複数の上皮細胞の協調性が不可欠である。この絨毛の上皮細胞を供給するのが腸管上皮の陰窩底部に存在する腸管上皮幹細胞であり、生涯にわたって常に新たな細胞を供給することが報告されている。腸管上皮幹細胞から分裂した細胞の、特定の細胞への分化には様々なシグナル伝達や転写因子が関与することが報告されている。しかし	

腸管上皮幹細胞の制御機構に関しては未解明な点が多く残っている。

近年腸管上皮幹細胞において、Lgr5, Olfm4, Bmi1, Lrig1, mTERT, HopX などの様々な腸管上皮幹細胞マーカーが同定され、遺伝子マーキング解析により 2 種類の幹細胞の存在が指摘された。即ち陰窩底部から+4 の位置に存在して緩徐に分裂する+4 細胞と、陰窩底部にパネート細胞に挟まれて存在する分裂周期の短い Crypt Base Columnar (CBC) 細胞である。そのうち CBC 細胞は 2009 年 Clevers らにより 1 つの陰窩に 14 個存在することが示された。

しかしこれまで腸管上皮幹細胞の同定に用いられてきた方法では次の 2 つの問題が考えられる。1 つは、遺伝子マーキングに用いられていたタモキシフェンにより一部の腸管上皮幹細胞の死滅と腸管上皮の再増殖を誘導してしまう点である。このことから生理的な腸管上皮幹細胞の数や分裂状態を反映していない可能性が考えられる。

もう 1 つの問題は、腸管上皮幹細胞マーカーに依存しない DNA ラベリングを用いたリニエージトレーシング法を用いた既報により、陰窩に存在し絨毛に細胞を供給する腸管上皮幹細胞の数はこれまでの報告よりも、より少ない可能性が指摘されたことである。

これらの問題を解決し、腸管上皮幹細胞の制御機構の解析を行うためには、腸管上皮幹細胞を個別に識別することのできる新規の解析方法の確立が必要である。近年 *in vitro* における腸管上皮幹細胞に由来したオルガノイド培養が確立され、腸管上皮幹細胞の可視化による動態解析や機能解析に有用であることが報告された。しかし培養に用いるマトリゲルにより、腸管上皮幹細胞の可視化のためオルガノイドに遺伝子導入を行うことが困難であることが指摘されている。今回我々は新規に考案した、蛍光タンパク質 mCherry 遺伝子を搭載したレンチウイルスをマトリゲルに混ぜて培養する感染方法により、レンチウイルスのオルガノイドへの直接接触が可能となり、遺伝子導入が成立し 1 年以上の長期間 mCherry 発色を有するオルガノイドの樹立に成功した。さらに陰窩に複数存在する腸管上皮幹細胞の、1 つの腸管上皮幹細胞の可視化に初めて成功し、個別の腸管上皮幹細胞解析が可能となった。この結果により陰窩には複数の腸管上皮幹細胞がそれぞれ独立して 1 年間以上の長期間生存し、異なる分化細胞を絨毛に供給していることが示唆される。

【方法】

既報で報告されたマウス小腸の空腸から単離された陰窩をマトリゲル内に包埋した、3 次元培養によりオルガノイド培養を行った。蛍光タンパク質遺伝子 mCherry を搭載したレンチウイルスをマトリゲルと混ぜて培養することでオルガノイドに遺伝子導入を行った。遺伝子導入により mCherry 発色がヘテロにみられるオルガノイドの単離、継代培養を行い、3 次元構造を保った状態で共焦点顕微鏡を用いて観察した。ヘテロオルガノイドの中で、陰窩の 1 つの腸管上皮幹細胞が mCherry 陽性であるものを用いて経時的観察を行った。ヘテロオルガノイドを個別の細胞に分け、mCherry 陽性、陰性腸管上皮幹細胞由来のオルガノイドを樹立し、ゲノム DNA、RNA を抽出して遺伝子発現解析を行った。

【結果】

蛍光タンパク質(mCherry)遺伝子を搭載したレンチウイルスを用いて、マウス小腸オルガノイ

ドへの新規遺伝子導入方法を開発した。遺伝子導入細胞は蛍光顕微鏡を用いて mCherry の発色を有する細胞として確認でき、オルガノイドを継代することで感染から 1 年後においても mCherry 発色細胞が認められた。オルガノイドを共焦点顕微鏡を用いて観察することで、陰窩から絨毛には mCherry 陰性細胞と mCherry 陽性細胞が混在するヘテロの発色が明らかとなった。同オルガノイドを用いて腸管上皮幹細胞のマーカーである Olfm4 を用いて蛍光免疫染色を行うと陰窩には mCherry 陽性幹細胞と mCherry 陰性幹細胞が混在していた。ヘテロオルガノイドの複数の陰窩には mCherry 発色を有する幹細胞が 1-5 個認められた。mCherry 発色を有する幹細胞が 1 個である陰窩を用いた経時的観察により、単一幹細胞の分裂、細胞供給を観察した。

感染 1 年後のヘテロオルガノイドを個別の細胞レベルに分け、単一幹細胞からの再培養を行うことで mCherry 陽性幹細胞由来の mCherry 陽性オルガノイドクローンと mCherry 陰性幹細胞由来の mCherry 陰性オルガノイドクローンが得られた。各々のオルガノイドクローンとヘテロオルガノイドから抽出されたゲノム DNA の解析では、全てのクローンにおいてレンチウイルス感染による mCherry 遺伝子の組み込みが認められ、かつオルガノイドクローン間で優位な差が認められた。mCherry 遺伝子の mRNA の解析では、mCherry 陽性オルガノイドはヘテロオルガノイドの約 2 倍の発現量が認められた。腸管上皮幹細胞マーカー解析では Lgr5、Olfm4、Bmi1、Lrig1 ではオルガノイド間で優位な差は認められなかった。分化制御因子解析では Atoh1 が mCherry 陰性オルガノイドが陽性、ヘテロオルガノイドに比して優位に低い結果となった。腸管上皮分化形質マーカーでは MUC2 に優位な差は認められなかったが、Lactase、Lysozyme、ディフェンシン 5、ディフェンシン 20 において優位な差が認められた。

【考察】

今回の我々の報告は陰窩に複数存在する腸管上皮幹細胞が、異なる細胞を絨毛に供給している可能性を示唆している。これまで報告されたマウス小腸オルガノイドへの遺伝子導入方法は、個別の細胞に分けられた腸管上皮幹細胞をマトリゲルを除いた状態でレトロウイルスを用いて行うものである。この方法により、蛍光タンパク質遺伝子を導入された単一の腸管上皮幹細胞に由来したオルガノイドは、全ての細胞が発色してしまうため腸管上皮幹細胞の個別の解析が困難であった。また単一の腸管上皮幹細胞から樹立されたオルガノイドは *in vivo* における生理的な陰窩の環境を反映していない可能性が示唆される。

しかし我々の開発した遺伝子導入方法は、生理的な陰窩の構造体を保った状態のオルガノイドを用いて、蛍光タンパク質遺伝子を搭載したレンチウイルスとマトリゲルと混ぜて培養することで、陰窩の細胞群に対してランダムに遺伝子導入を行うことで、陰窩に存在する個別の幹細胞レベルで遺伝子導入の成立と不成立が混在するヘテロな遺伝子導入状態の確立に成功し、個別の幹細胞の区別が可能となった。さらに初めて陰窩に複数存在する腸管上皮幹細胞の 1 つの細胞の可視化に成功し、経時的観察により単一の幹細胞の動態解析が可能となった。継代培養により 1 年以上の長期間陰窩に mCherry 発色細胞が保たれていたことから、遺伝子導入された腸管上皮幹細胞は長期間独立して生存する可能性のある腸管上皮幹細胞であることが示された。

また mCherry 発色の有無によって 2 つに分けられた単一の腸管上皮幹細胞に由来したオルガノイドを用いた遺伝子解析によって、長期間生存した腸管上皮幹細胞が異なる細胞を絨毛に供給

している可能性が示唆された。これまで我々はヒトの小腸の全長では、長軸方向に絨毛の分化細胞の構成が異なることを報告しているが、その制御が長軸方向の陰窩に存在する腸管上皮幹細胞の構成により行われている可能性が示唆される。今後のさらなる研究の進歩により、*in vivo*における単一の腸管上皮幹細胞のマーキングとその経時的観察を行う系の確立が可能となることで、さらなる腸管上皮幹細胞制御機構の解明の進歩が期待される。

【結論】

新規に開発したマウス小腸オルガノイド培養に対する遺伝子導入方法を用いて、1つの陰窩に独立して長期間生存する腸管上皮幹細胞が、異なる上皮細胞を供給していることが示唆された。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	甲 第 4704 号	堀 田 伸 勝
論文審査担当者	主 査 樗 木 俊 聡 副 査 田 賀 哲 也、中 田 隆 夫	
(論文審査の要旨) 腸管上皮の生理的再生は、陰窩底部に存在する腸管上皮幹細胞によって担われている。近年の関連分野研究の進歩により、Lgr5 などの腸管上皮幹細胞マーカーが同定され、レポーターマウスの作成により、1つの陰窩底部に Lgr5 陽性腸管上皮幹細胞が 14・16 個程度存在することが示された。しかしながら、この方法ではすべての腸管上皮幹細胞が同色に発色してしまうため、個々の幹細胞の解析が困難であった。申請者は、マウス小腸のオルガノイド培養系（腸の3次元培養）を用いて、レンチウイルスによる蛍光タンパク質 mCherry 遺伝子導入法を確立した。さらに長期オルガノイド培養により1つの腸管上皮幹細胞の可視化に初めて成功し、同幹細胞から絨毛上皮が供給されることを証明した。 これら一連の研究は、1つの陰窩に独立して長期間生存する機能的腸管上皮幹細胞の存在を明らかにしたものであり高く評価できる。本遺伝子導入技術は、今後 <i>in vivo</i> における単一の腸管上皮幹細胞のマーキング・遺伝子導入技術開発への展開を期待させるものである。		