

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	野崎 賢吾
論文審査担当者	主査 榑木 俊聡 副査 烏山 一、中村 正孝
論文題目	Co-culture with intestinal epithelial organoids allows efficient expansion and motility analysis of intraepithelial lymphocytes
<p style="text-align: center;">(論文内容の要旨)</p> <p><要旨></p> <p>腸上皮内リンパ球 (Intraepithelial Lymphocyte; IEL) は、腸管上皮内で上皮細胞間に挟まれ存在するリンパ球である。IEL が生体での免疫調節に多彩な機能をもつことはさまざまな動物実験により明らかにされてきた。しかしながら、体外での維持が困難であることから、IEL の性質や挙動を <i>in vitro</i> で解析する研究はこれまで不十分であった。本研究では、近年著しく進歩した腸管上皮細胞 (Intestinal Epithelial Cell; IEC) 培養技術を応用し、三次元的に培養される IEC と共存しながら IEL を維持する新規の培養法を構築した。本法では、IEL は上皮オルガノイド構造の内外に分布し、TCR$\alpha\beta$、TCR$\gamma\delta$ 陽性サブセットの割合を保ちつつ 2 週間で約 4 倍に増加した。ライブイメージング解析では、IEL がオルガノイドに接しながら、あるいはオルガノイド内外を活発に移動する様子が明らかとなった。細胞移動の定量解析では、$\alpha\delta$T IELs と $\gamma\delta$T IELs の移動に大きな差を認めない一方で、選択的 MEK1/MEK2 阻害剤の存在下ではこれら 2 群が異なる応答を示すことが明らかとなった。この新規共培養法は、$\alpha\delta$T IEL、$\gamma\delta$T IEL を含む IEL を広く増殖させることが可能で、かつ IEC と IEL とのダイナミックな相互作用を <i>in vitro</i> で研究する有効なツールになりうると考えた。</p> <p><緒言></p> <p>腸管組織の最内側に位置し管腔内容と接する上皮細胞層は、吸収・分泌など物質輸送の場であると同時に、さまざまな非自己物質に対する免疫応答の場としても重要であり、宿主生体防御や免疫恒常性維持の機能を担う。</p> <p>腸管上皮は一層の細胞からなり、これらは陰窩底部の上皮幹細胞から分化する複数種の細胞から構成される。以前よりこの上皮層には、上皮-上皮細胞間に存在するリンパ球、すなわち IEL の存在が指摘されてきた。IEL は大腸よりも小腸により豊富に存在し、例えば固定した小腸組織の解析によれば、絨毛の上皮細胞 5-10 個あたりに 1 個の割合で存在する。IEL は異なる細胞集団を含み、TCR$\alpha\beta$ 陽性細胞を中心とする Type a IEL と、TCR$\gamma\delta$ 陽性細胞を中心とする Type b とに大きく分けられる。いずれの細胞集団も、生体防御や粘膜バリア機能、免疫恒常性の維持に寄与していることが示されてきたものの、その詳細はいまだに不明な点も多い。</p>	

IEL の性状や機能の解析が不十分であった理由の一つには、IEL が体外で容易にアポトーシスに陥りやすく、したがって *in vitro* 解析が難しかったことが挙げられる。このことは、生体内で IEL の生存・増殖に不可欠なニッチ因子を近接する腸管上皮が供給する可能性を示唆するものであり、実際に IEL の体外培養に上皮由来因子や上皮細胞自身が良好な効果をもつとの報告も散見される。しかしながら実際に体外で IEL を十分に維持する培養技術は存在しなかった。

近年 IEC の体外培養技術が大きく進み、単離した正常な IEC を嚢胞状構造体（オルガノイド）として三次元的に培養することが可能となった。さらに、例えば単離し培養した小腸上皮オルガノイドは、体外で培養した後再び個体に戻しても体内で正常小腸上皮を再構築しうることから、培養過程においても小腸上皮の性質を保持することも示された。

これらを背景とし、本研究ではオルガノイド培養技術を、新しく IEL の共培養システム構築に利用することを目的とした。また、IEL を培養するこの新技术を、IEL が 3 次元環境下で上皮オルガノイド構造をとる IEC とどのように相互作用するかの細胞動態解析に応用することを目的とした。

<方法>

IEC のオルガノイド培養および IEL の単離は既報にしたがった。IEL と IEC の共培養では、IEC を 2 日間培養し、これを単離直後の IEL と混合しマトリゲル内で培養する手法を開発した。上皮オルガノイド用培地に加え、いくつかのサイトカインを添加しその IEL 培養への作用を検討した。固定したサンプルを用いた IEL の性状解析には、マトリゲルのまま 3 次的に免疫染色する技法を確立しこれを用いた。単離した IEL の表面抗原あるいは細胞内蛋白発現の解析は、フローサイトメトリーでおこなった。また IEL の可視化のために全細胞で EGFP 蛍光を発する EGFP-tg マウス、あるいは核のみで EGFP 蛍光を発するヒストン H2B-EGFP マウスから IEL を単離し共培養に用いた。全視野蛍光顕微鏡を用いた生細胞イメージングは、EGFP をもつ IEL をオルガノイドと共培養し、全細胞の核を Hoechst33342 で染色することで可視化しおこなった。細胞動態の定量解析は、上記で得られた生細胞イメージングデータをもとに、イメージ解析ソフト（Imaris）を用いておこなった。

<結果>

最初に、小腸上皮培養法として報告された手法において、ともに単離されてくる IEL が存在するのか、またこれら IEL が上皮とともに培養維持されるかを確認した。その結果、既法にしたがい培養したオルガノイドには、培養開始日（Day1）の時点で少数（ 0.21 ± 0.06 個/オルガノイド）の CD3 陽性細胞が含まれることがわかったが、これら IEL は Day3 ですべて消失することから、上皮培養法のみでは IEL の維持は困難であると考えた。次に、個別に単離する IEL と IEC を混ぜることで IEL の維持が可能となるかを検討した。異なる組合せの検討の結果、IEC を 2 日間培養しこれを単離直後の IEL と混合し 3 次的に培養することで、IEL 培養効率が著明に改善（ 6.9 ± 0.8 個/オルガノイド、100%）することを見いだした。ここでオルガノイド上皮間に見られる GFP 陽性細胞はすべて CD3 陽性であることから、本法では IEL がその性状を維持したまま IEC と共存することが示された。しかしながら本法においても、Day7 において IEL が著減す

ることから、さらなる培養手法の改良を試みた。IEL 維持効果をもつ添加因子の検討の結果、上皮培養に用いる培地に IL-2,IL-7,IL-15 を加えて培養を行うと、Day7 において培養開始時の約 2 倍、さらにもう 1 週間の培養継続により計 2 週間でおよそ 4 倍まで IEL が増加することを明らかにした。ここで得られる IEL の性状を解析した結果、 $\alpha\beta$ T IEL と $\gamma\delta$ T IEL が同等に見られることから、新しく確立した本 IEL 培養法が、特定の IEL サブセットではなく、広く全 IEL 集団を維持し増やす方法であることが示唆された。

この新しい IEL 培養法を応用し、IEL と IEC の相互作用や IEL の動態解析に用いることを試みた。EGFP-tg マウスより得た IEL をオルガノイドと共培養し、ライブイメージングで観察した結果、IEL がさかんに細胞形態を変えながら、オルガノイド内を活発に行き来する様子が観察された。中には、オルガノイドから外方へ離れる細胞や、外部からオルガノイド内へ入り込む細胞も観察され、まったく動かない IEC に対し IEL が本質的に動的な細胞であることが明瞭になった。これら IEL の動態を定量評価するために H2B-EGFP-tg マウス由来 IEL と WT マウス由来 IEC を共培養し、四次元蛍光イメージングを行った。得られたデータを用いて各々の細胞の軌跡解析を行った結果、本実験系における IEL の平均速度と平均最大速度はそれぞれ 5.07 ± 0.27 、 $9.67 \pm 0.60 \mu\text{m}/\text{min}$ であることが分かった。最近、*in vivo* 顕微鏡を用いて、生体小腸組織における $\alpha\beta$ T IEL の平均速度、平均最大速度 (3.8 ± 0.1 、 $7.7 \mu\text{m}/\text{min}$) を求めた結果が報告されたが、本研究での *in vitro* における IEL の動態解析結果は、この *in vivo* におけるデータと近似することから、本 *in vitro* 実験系が IEL の動態解析にも有用であると考えられた。さらに、これまで解析されたことのない $\alpha\beta$ T IEL の平均速度や平均最大速度が、 $\gamma\delta$ T IEL と明らかな差がないことも示された。一方、興味深いことに、MEK1/MEK2 阻害剤である PD184532 を培地に添加すると、 $\alpha\beta$ T IEL の速度が 20%程度低下する一方、 $\gamma\delta$ T IEL ではその速度は変化しないことから、 $\alpha\beta$ T IEL と $\gamma\delta$ T IEL 間で、その動態に関わる細胞内分子機構には異なる調節がある可能性も示された。

<考察>

新規に構築したオルガノイドとの共培養系で、IEL が $\alpha\beta$ T IEL、 $\gamma\delta$ T IEL の割合を変えずに増殖することが分かった。この結果は、立体構築を維持した三次元的なオルガノイドが *in vitro* において IEL に十分なニッチを提供している可能性を示唆するものと考えられ、これらを今後明らかにすることが重要であると思われた。また、 $\alpha\beta$ T IEL と $\gamma\delta$ T IEL が一部異なる細胞内分子機構を介した移動の仕組み有することも、今後詳細に解析することは意義があるものと考えた。

<結論>

腸上皮内リンパ球と腸管上皮細胞からなる新規三次元共培養系を構築した。本培養系は、IEL がオルガノイド内を活発に動き回り動態解析にも有用であった。

論文審査の要旨および担当者

報告番号	甲第 5047 号	野崎 賢吾
論文審査担当者	主査 樗木 俊聡 副査 烏山 一、中村 正孝	
【論文審査の要旨】		
1. 論文内容		
本論文は、小腸上皮オルガノイドと小腸上皮間リンパ球の共培養系モデルを構築し、腸管上皮間リンパ球の増殖効率や動態を解析した研究である。		
2. 論文審査		
<u>1) 研究目的の先駆性・独創性</u>		
腸上皮間リンパ球（以下、IEL）は TCR $\alpha\beta$ 型と TCR $\gamma\delta$ 型に大別され、生体防御や腸上皮バリア機能の維持に寄与していることが示唆されているが、 <i>in vitro</i> での培養が困難なことから、詳細な解析が行われていない。このような背景の下、申請者は、近年確立された腸上皮オルガノイド培養技術を用いて IEL との共培養系を確立し、さらに IEL の動態解析を行っており、その着想は評価に値するものである。		
<u>2) 社会的意義</u>		
本研究で得られた主な結果は以下の通りである。		
1. 腸上皮オルガノイドと腸上皮間リンパ球の共培養系に IL-2, IL-7, IL-15 を添加することで IEL の効率的増加・維持を可能にした。		
2. 確立された共培養系を用いて IEL の動態解析を行った結果、平均速度 5.07 ± 0.27 , 平均最大速度 9.67 ± 0.60 $\mu\text{m}/\text{min}$ であることが判明した。		
2 の結果は、既報 <i>in vivo</i> での測定結果と近似しており、この共培養系が腸上皮と IEC の相互作用を解析するツールとして有用なことを示唆する研究成果であるといえる。		
<u>3) 研究方法・倫理観</u>		
さまざまな培養条件を検討し、最終的に2日間培養した腸上皮を単離直後の IEL と混合してマトリゲルに封入・培養することで最適化した。また、ヒストン H2B-EGFP マウスから IEL を単離して共培養に用いることで IEL の可視化を可能にした。さらに全視野蛍光顕微鏡及び解析ソフトで動態の定量分析を行った。		
<u>4) 考察・今後の発展性</u>		
申請者が確立した腸上皮と IEC の共培養系は、IEL のニッチ環境の分子基盤、腸上皮と IEC		

の相互作用を明らかにするための有用なツールになると思われ、腸粘膜系の恒常性維持機構、さらには炎症性腸疾患や大腸がんを含む病態に関する理解と治療法の開発が進むことが期待される。

3. その他

4. 審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。