

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	腫瘍制御科学領域 消化器外科学教育研究分野 鶴田 覚
<p>(論文題目)</p> <p>Development of human gut organoids with resident tissue macrophages as a model of intestinal immune responses (腸管免疫応答モデルとしての組織マクロファージ内在ヒト腸管オルガノイドの開発)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>【緒言】</p> <p>近年、iPS細胞やES細胞等の多能性幹細胞(PSC)や三次元培養技術の発展により <i>in vitro</i> でのミニ臓器である三次元器官様構造体(オルガノイド)が様々な臓器で作製され、創薬や再生医療へ応用されている。中でも、三胚葉組織が複雑に相互作用し吸収などに加え免疫応答制御などの重要な役割を示す臓器である消化管においては、既存動物モデルと異なる種特異的なバイオツールとして腸管オルガノイドの開発が活発に進められている。ヒト PSC から誘導される腸管オルガノイドは、粘膜上皮バリア機能や腸管感染における初動モデルや腸内細菌叢研究への応用が報告されている。本来腸管では免疫細胞が腸内に動員され腸管上皮や他の組織と相互作用し自然免疫反応や恒常性維持に関与することがわかっているが、これまで免疫応答までも観察できる高機能腸管オルガノイドの報告はない。腸管オルガノイドへ免疫担当細胞を導入し腸管免疫を再現することで、炎症性腸疾患(IBD)などの原因となる免疫学的異常が不明で治療法も確立されていない難病の病態解明や薬剤評価への応用し創薬開発へ繋がることが期待される。</p> <p>【対象と方法】</p> <p>我々は、先行研究としてヒト PSC から腸粘膜上皮に加え平滑筋、腸管神経などの複雑な間葉系組織を含むユニークな構造のヒト腸管オルガノイドの開発を報告している。本研究では腸管免疫制御において司令塔となる組織マクロファージに着目し、PSC から単</p>	

球系細胞を異なる誘導系により作製後、腸管オルガノイドへ導入するための共培養の最適条件を検証し、共培養した新規腸管オルガノイドの検証と特性評価を行った。

【結果】

ヒト iPSC から単球系細胞 (pMC) を分化誘導し腸管オルガノイドの嚢胞内に直接注入し、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) 存在下で腸管マクロファージ様細胞 (pGMAC) への誘導を行った。pGMAC は腸管オルガノイド内部に均一に分散し、免疫染色の 3 次元画像解析および電子顕微鏡により間質組織内に樹状突起を持つ pGMAC が確認された。pGMACs の免疫染色では IBA1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1) は検出されていたが CD14 は検出されず、シングルセルソーティングに基づく PCR 解析では TNF、NOS2、HLA-DB1、IL-6、KLF4、VEGFA などのマクロファージ極性マーカーの発現を認め既報の腸管マクロファージの特徴を有していた。pGMAC を内在した腸管オルガノイド (MC-XF-HIO) は蠕動様運動伴う嚢胞状構造を示し、区画化された上清と内用液を有するという特徴を生かして Multiplex サイトカインアッセイを用いたサイトカイン・ケモカイン産生・分泌能の網羅的解析を行った。潜在的な炎症刺激としてリポポリサッカライド (LPS) を用いたが、IL-4 以外の炎症性サイトカインは LPS 曝露後に統計的に有意な変化を示さなかった。一方で、分化誘導前の pMCs は LPS に強い反応性を示した。MC-XF-HIO で観察された LPS に対する低反応性は、腸管オルガノイド上皮における Toll 様受容体 4 (TLR4) の低発現や CD14 陰性 pGMAC の寄与が示唆された。MC-XF-HIO 上皮上の外来抗原に対する pGMAC の貪食能は pH 感受性蛍光色素を用いた検出系により観察可能であった。また、健常 PSC に加え IBD の 1 つであるクローン病患者 (n=3) 由来の疾患 iPSC 細胞からも同様に MC-XF-HIO の作製が可能であった。

【考察】

ヒト腸管マクロファージの発生を異種由来成分非存在下 (xenogeneic-free) の培養条件) で再現することで共培養系を開発し、組織学的所見、遺伝子発現、サイトカイン産

生から腸管オルガノイドと内在マクロファージとの相互作用を観察した。マクロファージ内在腸管オルガノイドの遺伝子発現解析や LPS 反応系から、*in vivo* 腸管免疫の再現および研究ツールとしての応用可能性が示唆された。また MC-XF-HIO の重要な特徴の一つは、腸管オルガノイドとマクロファージの両方が同一の PSC 株から誘導可能な点である。疾患 iPS 細胞由来高機能腸管オルガノイドは、いまだ原因不明の IBD 疾患研究において遺伝的素因や環境因子によるエピジェネティック機構などの発症・病態メカニズムの解明や新薬開発の革新的なプラットフォームとなると考えられる。

【結語】

我々は PSC の分化誘導により腸管組織とマクロファージからなる革新的な *in vitro* ヒト腸管モデルを開発した。今後、腸管免疫系や腸管炎症性疾患のメカニズムや腸内物質や薬剤の影響の検証系への発展的な応用が期待される。