

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

(Development of human gut organoids with resident tissue macrophages as a model of intestinal immune responses)

青森県立中央病院
弘前大学大学院医学研究科 消化器外科学講座
鶴田 覚

【背景】

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 *in vitro* 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。その中でも、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では、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^{1,2)}。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、しかし、現在、免疫応答をも観察できる高機能腸管オルガノイドの報告はない。腸管オルガノイドに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に応用し、創薬開発へ繋がることが期待される。

【対象と方法】

我々は、先行研究としてヒトPSCを用いて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³⁾。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を用いて単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】

導入・共培養に先立って、ヒトiPSCを用いて誘導された腸管オルガノイドがマクロファージ分化に必要な組織微小環境を有しているか検証した。生体では、局所における単球から組織マクロファージへの分化にはTGF- β とIL-8の因子が重要とされるが、誘導された腸管オルガノイドは無刺激下でそれら因子の恒常的な遺伝子発現を示し、免疫蛍光染色では組織学的にも生体腸管と同様な発現分布を示し分化へ必要な微小環境を有していることが確認された。続いて、ヒトiPSCにサイトメガロウイルスプロモーターを用いてEGFPを導入し緑色蛍光タンパク質であるGFPを恒常発現するiPSCを作成、GFP陽性iPSCからの単球系細胞の分化誘導も可能でありことを確認しGFP標識による単球系細胞の追跡が可能となった。腸管オルガノイドの上皮の頂端側が外側を向き、間質組織が内部に存在する構造的特徴と約10から15mmまでのサイズを呈する特徴を活かし、ヒトiPSCを用いて単球系細胞(pMC)を分化誘導し、腸管オルガノイドの嚢胞内に直接注入する。マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)存在下(腸管オルガノイド維持培地+M-CSF)で2週間以上の共培養を行い腸管マクロファージ様細胞(pGMAC)に誘導する方法を確立した。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。pGMACの免疫染色では、マクロファージ成熟マーカーであるIBA1(ionized calcium-binding adapter molecule 1)およびCX3CR1

は検出されたが CD14 は検出されなかった。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 などの発現を認め、炎症性 (M1) および抗炎症性 (M2) マクロファージ極性マーカー両方の恒常的発現増加を認めた一方で、Toll-like receptor などの外来抗原認識に関与する受容体の発現低下を認め既報の腸管マクロファージと同様の特徴を有していた。続いて、pGMAC を内在した腸管オルガノイド (マクロファージ内在腸管オルガノイド) の組織学的、機能的な変化の検証を行った。上皮成分では導入前の腸管オルガノイドでの上皮構造は損なうことなく、成熟腸上皮幹細胞マーカーである OLFM4 や MUC2 の発現増加を認めた。間質組織では、神経マーカーである PGP9.5 陽性細胞は単球系細胞導入後に増加および集簇を示し、遺伝子発現解析でも PGP9.5 および腸管神経系発達に関与する因子である BMP2 の遺伝子発現増加を認めていた。また、マクロファージ内在腸管オルガノイドは、腸管蠕動様の収縮運動を導入以前と同様に示し、組織構造的に導入による傷害・障害が起きていないことを確認した。次に、マクロファージ内在腸管オルガノイドを腸管免疫応答再現モデルとして用いることを検証した。マクロファージ内在腸管オルガノイドの上皮側が外を向き、内部に間質を有し、培養上清と内容液を分離する球形構造をとる点に着目し、腸管粘膜面への抗原・薬剤暴露を反映する上清液 (SF)、間質組織側・サイトカイン分泌による免疫応答環境を反映する内容液 (CF) に分けてマイクロニードルを用いた回収が可能であることを確認した。まず、吸光度定量を用いた分子透過性検証では、単球注入による内部への低分子および高分子透過性上昇はなく、同様に蛍光可視化した LPS の暴露においても間質側への透過は制限され、上皮バリア機能の維持が示唆された。このマクロファージ内在腸管オルガノイドの区画化された上清と内用液を有する特徴を生かして 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。マクロファージ内在腸管オルガノイドで観察された 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 感受性蛍光色素標識された大腸菌菌体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 iPS 細胞からも同様にマクロファージ内在腸管オルガノイド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 (Figure 1)。導入された pMC が炎症性・抗炎症性両方の特徴を示した点は、生体内の腸管マクロファージに関する既報と同様であり、腸管特異性を獲得したことが示唆された。また、腸管マクロファージの恒常性維持への寄与や腸管免疫寛容の後天的獲得に関する報告から、腸管オルガノイド内部に導入された単球系細胞は、成熟性と免疫寛容の再現に寄与している可能性が考えられた。マクロファージ内在腸管オルガノイドはその他のリンパ球などの免疫担当細胞やパイエル板などの構造物、腸内細菌叢は再現出来ていない点、そして、生体ヒト腸管における免疫応答性に関する生理学的機能・病理学的所見をどの程度反映しているかは明らかでない点が課題として挙げられるものの、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になると考えられる。

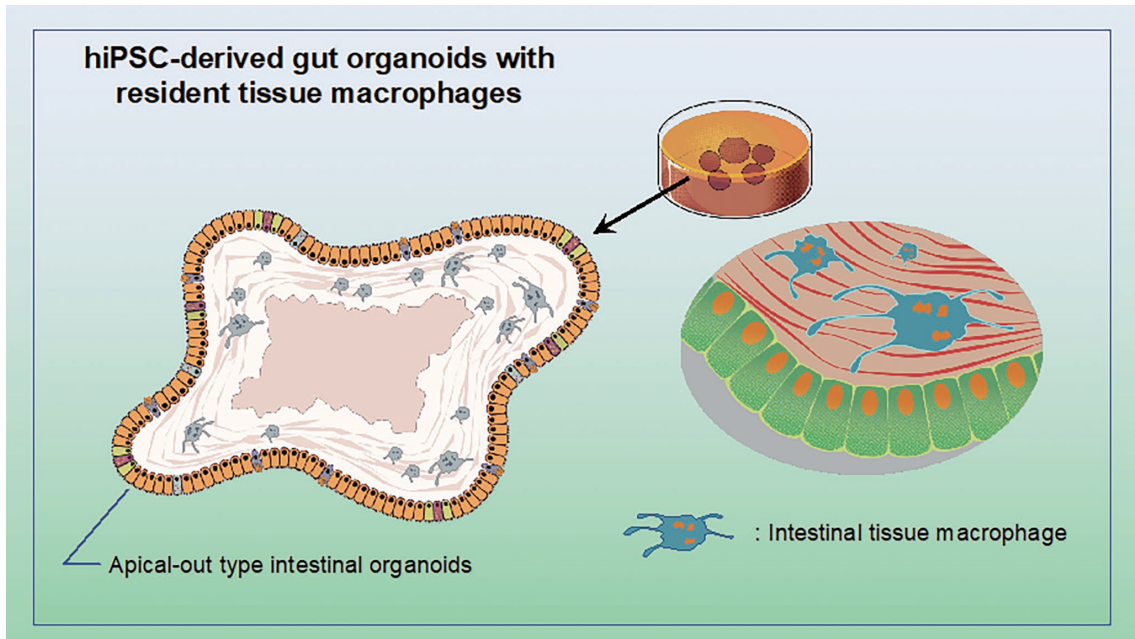


Figure 1

【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。

【参考文献】

- 1) Tsuruta S, Uchida H, Akutsu H. Intestinal Organoids Generated from Human Pluripotent Stem Cells. *JMA J* 2020;3(1):9-19.
- 2) 鶴田覚, 阿久津英憲. 腸管オルガノイド研究の進歩とその展望. *再生医療*. 2019;18(3):270-289.
- 3) Uchida H, et al. A xenogeneic-free system generating functional human gut organoids from pluripotent stem cells. *JCI Insight* 2017;2:e86492.