



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Novel transgenic enteroid to establish platform for investigating mechanisms of intestinal epithelial cell function [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	大平, 修也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第15306号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89650
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Shuya_Ohira_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (生命科学) 氏名 大平 修也

審査担当者	主査	准教授	中村 公則
	副査	教授	芳賀 永
	副査	教授	相沢 智康
	副査	教授	綾部 時芳
	副査	特任助教	横井 友樹

学位論文題名

Novel transgenic enteroid to establish platform for investigating mechanisms of intestinal epithelial cell function
(新規遺伝子改変 enteroid を用いた小腸上皮細胞機能解析プラットフォームの開発)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

小腸は食、病原体や腸内細菌叢などの外部環境に常に暴露され、栄養吸収、代謝や免疫など様々な機能を担うことで生体恒常性維持に貢献している。小腸上皮細胞は吸収系統の吸収上皮細胞、分泌系統の腸管内分泌細胞、杯細胞および Paneth 細胞からなる最終分化細胞とこれらを供給する腸管上皮幹細胞で構成され、絨毛-陰窩を覆うことで外部環境と内部の上皮下組織を直接分け隔てることから、腸管機能における重要性が注目されている。さらに、幹細胞と、陰窩基底部に隣接する Paneth 細胞は幹細胞ニッチを形成して、小腸上皮細胞の増殖と分化を制御することが知られている。しかし、小腸上皮細胞機能の分子メカニズムの多くは未だ不明である。

小腸上皮細胞の機能解析に、全系統の最終分化細胞を含んだ絨毛様および陰窩様構造を形成する三次元培養系である enteroid が用いられ、主にリガンドや阻害剤などの生化学的方法や抗体などの生物学的方法によって評価されている。これらの方法は標的分子の isoform などの選択性や結合および阻害活性の濃度依存性などを示すことから、分子機能を明らかにする上で限界がある。したがって、発現ベクターで遺伝子導入することで標的遺伝子発現を特異的に制御することが可能な遺伝子改変 enteroid が作出された。

しかし、単一細胞まで分離した幹細胞への遺伝子導入によって作製する従来法は収率が約 15% と低いこと、分離操作などが煩雑で時間がかかることが大きな問題であった。また、遺伝子改変 enteroid で標的とする遺伝子の探索法は従来の single cell RNA-sequencing (RNA-seq) では網羅性が低いことが課題であった。すなわち、小腸上皮細胞機能解析のための、新規遺伝子改変 enteroid と網羅性の高い標的遺伝子の探索系を組み合わせたプラットフォームの開発が待たれていた。

本論文は、幹細胞と Paneth 細胞からなる幹細胞ニッチが維持された生体より摘出直後の小腸単離陰窩を用いて幹細胞への遺伝子導入を行うことで、高効率で素早く簡便に遺伝子改変 enteroid が作製可能かどうかをまず検討した。蛍光タンパク質 tdTomato と puromycin 耐性遺伝子を EF1 α promoter 下で発現させるレンチウイルスベクターで遺伝子導入した単離陰窩を培養し、薬剤選択を行ったところ、day 2 から導入遺伝子 tdTomato を発現し始め、day 7 で全細胞が導入遺伝子を発現する遺伝子改変 enteroid が得られ、その収率は 56 \pm 7.4%であった。また、day 2 の遺伝子導入された enteroid に対する幹細胞マーカーOlfm4 の免疫蛍光染色によって、Olfm4⁺ 幹細胞に導入されることを示した。さらに、tdTomato を導入した遺伝子改変 enteroid の継代培養を 7-9 日ごとに 3 回行い、tdTomato の蛍光強度を測定したところ、1 か月間各継代培養で強度が維持されていた。

以上より、単離陰窩の幹細胞への遺伝子導入によって、高効率で素早く簡便な遺伝子改変 enteroid の作製法を樹立した。加えて、マーカーの免疫染色によって、遺伝子改変 enteroid で Villin⁺ 吸収上皮細胞、Muc2⁺ 杯細胞、Chromogranin A⁺ 腸管内分泌細胞およびα-defensin⁺ Paneth 細胞の比率が intact と同等であったことから、遺伝子導入操作が幹細胞の多分化能に影響しないことを明らかにした。薬物輸送体 P-glycoprotein の基質である Rhodamine123 (Rh123)を用いて薬物輸送能を評価したところ、遺伝子改変 enteroid は時間経過に伴う Rh123 強度の増加を示したことから、遺伝子導入操作は薬物輸送能に代表される吸収システムの機能に影響を与えないことを明らかにした。さらに、コリン作動性刺激である carbamylcholine (CCh)を用いて Paneth 細胞顆粒分泌能を評価したところ、遺伝子改変 enteroid の Paneth 細胞は CCh 添加直後から 30 分後まで顆粒を分泌したことから、遺伝子導入操作は Paneth 細胞顆粒分泌能に代表される分泌システムの機能に影響しないことを明らかにした。以上より、新規遺伝子改変 enteroid が intact な腸管機能を維持することを示した。最後に、腸管自然免疫、腸内細菌叢制御および幹細胞ニッチを担う Paneth 細胞を標的として、fluorescence activated cell sorting (FACS)で単離した細胞集団を用いた RNA-seq によって標的遺伝子を探索した。Paneth 細胞顆粒特異的な亜鉛に対するプロープ Zinpyr-1 を用いた FACS によって、亜鉛陽性顆粒を持つ Paneth 細胞が 93.0±1.3%と高純度に単離された。単離した Paneth 細胞の RNA-Seq によって 8973 遺伝子が抽出され、*P2rx4* や *Thr5* などのパターン認識受容体、*Fgf11* や *IL22ral* などのサイトカイン受容体、および *Rab3d* や *Tmed10* などの小胞輸送や *Vamp8* や *Napa* などの膜融合に関連する分子の遺伝子が検出された。すなわち、Paneth 細胞機能に関する標的遺伝子を同定した。以上より、網羅的に標的遺伝子を探索する方法を樹立し、Paneth 細胞の外部および内部環境の認識から顆粒分泌への関与が示唆される標的遺伝子を同定するに至った。

本論文は、幹細胞ニッチを保った小腸単離陰窩への遺伝子導入による高効率で素早く簡便な新規遺伝子改変 enteroid 作製法と標的細胞集団の単離による網羅的な標的遺伝子の探索法からなるハイスループットな小腸上皮細胞機能解析プラットフォームを初めて開発したものであり、生体恒常性維持における小腸上皮細胞機能の理解に対し貢献するところ極めて大である。以上の理由より、著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格を有するものと認める。