



## Epithelial-derived factors induce muscularis mucosa of human induced pluripotent stem cell-derived gastric organoids

上原, 慶一郎

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2022-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8398号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100477824>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

### Epithelial-derived factors induce muscularis mucosa of human induced pluripotent stem cell-derived gastric organoids

上皮由来の因子がヒト iPS 細胞由来胃オルガノイドの粘膜筋板を誘導する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

病理診断学

(指導教員：伊藤 智雄 教授)

上原 慶一郎

#### 背景

胃粘膜筋板は、粘膜と粘膜下層を分ける平滑筋の薄い層で、胃腺の内容物の排出を促し、胃上皮と胃内容物との接触を高めて消化を促す役割がある。胃上皮の発生には、様々なシグナル伝達経路が関与することが報告されているが、胃間葉系発生は十分に解明されておらず、ヒトの胃粘膜筋板がどのように誘導されるかは明らかにされていない。ヒト多能性幹細胞 (ES 細胞、iPS 細胞) から様々な組織が誘導できるようになり、ヒトの組織発生過程とそのメカニズムを研究できるようになった。McCracken らによって、ヒト多能性幹細胞から胃オルガノイドへの分化誘導が報告されたが、上皮下平滑筋組織である粘膜筋板はみられなかった。本研究では、ヒト iPS 細胞から粘膜筋板を伴った胃オルガノイドを誘導し、どのような因子が粘膜筋板形成に関わっているかを明らかにすること目的とした。

#### 粘膜筋板を伴う胃オルガノイドの誘導

まず、既報と同様に、ヒト iPS 細胞から Activin A を用いて胚体内胚葉に分化し、その後、GSK3 阻害剤、FGF4、Noggin によって後部前腸に分化させ、スフェロイドを形成した。次にそのスフェロイドをマトリゲルによる三次元培養に移した。その後、既報よりも 3 週間長い全 8 週間、培養を維持した。

作製されたオルガノイドには腺管状構造を示す上皮が認められ、胃上皮マーカーである MUC5AC および TFF-1 が陽性であった。経時的観察では、上皮下には aSMA 陽性的紡錘形細胞が 6 週目に出現し始め、8 週目に粘膜筋板に類似した帶状構造を形成した。これらの結果から、ヒト iPS 細胞由来の粘膜筋板を伴った胃オルガノイドを作製することができたと考えられた。

RNA-seq を用いて iPS 細胞から胃オルガノイドへの分化誘導過程の経時的な遺伝子発現パターンを解析した。iPS 細胞以外のサンプルで TPM 値 2 以上の 8594 遺伝子を用いた主成分分析では、iPS 細胞から徐々に胃へと近づいてゆく様子が示された。また、胃上皮と間葉系発生・成熟マーカー、平滑筋マーカー発現は 8 週目に向かって増加傾向を示し、最終的に胃と類似した発現を示した。興味深いことに、胃上皮マーカーの発現は平滑筋マーカーの発現より先に認められた。このことから、胃の上皮成熟後に上皮下平滑筋細胞が分化を開始しており、その分化には、上皮由来の因子が関与しているという仮説を立てた。

そこで、この粘膜筋板を伴った胃オルガノイド作製技術を用いて、粘膜筋板分化の分子機構の検討を進めた。

#### ヘッジホッグシグナル発現解析とその阻害剤による胃オルガノイドの粘膜筋板形成抑制

まず、免疫染色と in situ hybridization (ISH) による評価で、胃オルガノイド誘導中の Sonic 及び Indian hedgehog 発現は、分化誘導開始後 3 週から 8 週目にかけて上皮内で増加していた。このことから上皮由来のヘッジホッグシグナルが上皮下の細胞分化に関わっている可能性が示唆された。

3週目からヘッジホッギングシグナル阻害剤であるシクロバミンを培地に添加すると、 $\alpha$ SMA陽性の上皮下紡錘形細胞が減少した。一方、上皮のTFF-1陽性細胞は認められたことから、ヘッジホッギングシグナル阻害下でも胃上皮分化は維持されることが分かった。平滑筋分化の転写調節因子であり、腸管間葉系細胞におけるヘッジホッギングシグナルの標的因子であるMyocardin (MYOCD) の発現は、シクロバミンによって減少した。これらの結果から、上皮由来のヘッジホッギングシグナルが、MYOCDを介して $\alpha$ SMAの発現を亢進させ、粘膜筋板形成を正に制御していると考えられた。

#### TGF- $\beta$ シグナル発現解析とTGF- $\beta$ R1阻害剤による胃オルガノイドの粘膜筋板形成抑制

ISHと免疫染色にて、胃オルガノイドの上皮でTGF- $\beta$ 1の発現が認められ、3週から8週目にかけて増加した。そのレセプターであるTGF- $\beta$ R1の発現も上皮では免疫染色にて増加し、上皮下細胞でも3週目以降発現を認めた。TGF- $\beta$ R1阻害剤SB431542を3週目から投与すると、オルガノイドの上皮は胃上皮マーカーTFF-1が免疫染色にて陽性すなわち胃分化は保たれていたが、 $\alpha$ SMA陽性の上皮下細胞は認められず、TGF- $\beta$ シグナルの阻害により胃オルガノイドの粘膜筋板形成が抑制されることが示された。qRT-PCR、ウェスタンプロットでもSB431542の添加により $\alpha$ SMAの発現が有意に低下することが示された。これらから、上皮由来のTGF- $\beta$ シグナルが粘膜筋板形成に寄与していると考えられた。

#### 機械的環境による上皮下 $\alpha$ SMA発現の亢進

分化誘導中、Matrigelの層を超えて培養皿底面にオルガノイドが接触すると紡錘形細胞が周囲に広がる現象が観察され、培養皿への接着が平滑筋分化を誘導しているとの仮説が考えられた。この仮説を検証するために、3週目の胃オルガノイドを超低接着プレートと接着プレートに移し、2週間培養した。接着した胃オルガノイドの周囲の紡錘形細胞は免疫染色にて $\alpha$ SMA陽性であり、接着プレートで培養したオルガノイドは低接着プレートで培養したものと比べて $\alpha$ SMA発現が増大したことがウェスタンプロットおよびqRT-PCRで確認された。3週目の胃オルガノイドには、間葉系間質細胞マーカーであるCD146やCD44陽性の上皮下細胞があり、上皮由来TGF- $\beta$ の下で機械的環境の影響を受け、平滑筋細胞へと分化したことが示唆された。

#### TGF- $\beta$ シグナルがヘッジホッギングシグナルや細胞外基質の機械的性質に及ぼす影響

TGF- $\beta$ は、様々なヒトの細胞や癌細胞株において、ヘッジホッギングシグナル下流のGLI2の発現を誘導することが報告されている。qRT-PCRにて、GLI2の発現は、SB431542によって減少し、胃オルガノイドのGLI1陽性上皮下紡錘形細胞が免疫染色にて減少したことから、TGF- $\beta$ シグナルとヘッジホッギングシグナルが、胃オルガノイドにおける粘膜筋板の誘導に協調的に作用することが示唆された。

胃オルガノイド誘導でのTGF- $\beta$ シグナル阻害による反応をみるためにRNA-seqを行った

ところ、SB431542の添加により、70以上の遺伝子においてlog<sub>2</sub>TPM値が10以上亢進し、66遺伝子において抑制されていた。これら発現変動遺伝子についてパスウェイ解析を行うと、細胞外基質などに関わるカテゴリーが含まれていた。さらに、Gene Set Enrichment Analysisの結果、“Collagen Fibril Organization”と“Extracellular Matrix Structural Constituent”に関する遺伝子セットが有意に変化していた。これらの結果は、TGF- $\beta$ シグナルが、細胞外基質の硬さに寄与し、その結果、胃オルガノイドの粘膜筋板形成を促進する可能性があることを示唆した。

#### 胃粘膜筋板の再生

内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)後の胃粘膜では粘膜筋板の再生に先行して上皮の再生がみられ、上皮由来の因子が粘膜筋板の再生にも関与している可能性が示唆された。TGF- $\beta$ 1が粘膜筋板の再生に関与しているか調べるため、ESD後の潰瘍標本に対してTGF- $\beta$ 1免疫染色を行った。正常胃粘膜では24例中4例、ESD後の潰瘍や潰瘍瘢痕度18例中13例が陽性を示した。上皮由来のTGF- $\beta$ 1が発生過程だけでなく、成人の組織損傷後の胃粘膜筋板の再生にも関与していることが示唆された。

#### 考察

本研究では、粘膜筋板を伴うヒトiPS細胞由来胃オルガノイドの作製に初めて成功した。ヒトの胃粘膜固有層には平滑筋細胞が散在しており、粘膜筋板と連続することや上皮下の筋線維芽細胞も平滑筋マーカーを様々な程度で発現することから、粘膜筋板の存在の有無を判断するためには、細胞マーカー発現評価のみでは不十分であり組織構造を評価することが必要である。そこで、本研究においては上皮下の $\alpha$ SMA陽性紡錘形細胞束を胃オルガノイドにおける粘膜筋板と定義した。McCrackenらが報告したヒト多能性幹細胞由来胃オルガノイドでは、5週間の培養で明らかな粘膜筋板は形成されていなかった。一方、Noguchiらが報告したマウスES細胞由来胃オルガノイドやUchidaらが報告したヒトES細胞由来腸管オルガノイドでは、8週間以上培養し、上皮下に平滑筋マーカー陽性紡錘形細胞の束状構造がみられた。これらは、粘膜筋板が上皮よりも遅れて形成されるものであり、粘膜筋板の形成には5週より長期の培養が必要であることを示唆するものであると同時に、上皮由来の因子が粘膜筋板の形成に重要な役割を果たすという我々の仮説を支持するものである。

上皮由来のTGF- $\beta$ 1がヒトの粘膜筋板形成に関わっていることを示した報告は今までなかった。しかし、公開されているRNA-seqデータを解析すると10~20週のヒト胎児の胃でTGF- $\beta$ 1の発現がみられたことと、TGF- $\beta$ 1存在下で基質の硬さが間葉系細胞を平滑筋に分化させたという所見から、上皮下間葉系細胞がTGF- $\beta$ 1と基質の硬さの影響を受けて平滑筋に分化している可能性が示された。また、TGF- $\beta$ シグナル阻害によって胃オルガノイドのGLI2が抑制されることから、ヘッジホッギングシグナルとTGF- $\beta$ シグナルが関連する可能性が示唆された。

ESD後胃潰瘍再生上皮でTGF- $\beta$ 1発現が有意に亢進していたことから、成体胃においても

発生を模倣したオルガノイドと同様に、TGF- $\beta$  シグナルが細胞外マトリックスタンパク質を増加させ、平滑筋マーカー発現の上昇、粘膜筋板再生につながっている可能性が考えられた。

以上、上皮由来のヘッジホッギングシグナルと TGF- $\beta$  シグナル、上皮下の機械的性質が、胃オルガノイドの上皮下細胞の平滑筋分化、粘膜筋板形成に関与していることを本研究で明らかにした。さらに、TGF- $\beta$  シグナルは、粘膜筋板の発生だけでなく、再生でも作用していることが示唆された。今後の研究により、これらの因子と粘膜筋板が再生することなく、胃癌が粘膜下層に浸潤する仕組みとの関連を明らかにできる可能性がある。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第3189号	氏名	上原 慶一郎
論文題目 Title of Dissertation	<p>Epithelial-derived factors induce muscularis mucosa of human induced pluripotent stem cell-derived gastric organoids</p> <p>上皮由来の因子がヒト iPS 細胞由来胃オルガノイドの粘膜筋板を誘導する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 梅 岳 先 Chief Examiner</p> <p>副査 井地 亮 介 Vice-examiner</p> <p>副査 須本 康 行 Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

ヒト多能性幹細胞 (ES 細胞、iPS 細胞) から様々な組織が誘導可能となり、ヒトの組織発生過程とそのメカニズムを研究できるようになった。2014 年に、ヒト多能性幹細胞から胃オルガノイドへの分化誘導が報告されたが、上皮下平滑筋組織である粘膜筋板はみられなかった。本研究ではヒト iPS 細胞から粘膜筋板を伴った胃オルガノイドを誘導し、どのような因子が粘膜筋板形成に関わっているかを明らかにすることを目的とした。研究に用いた方法と、得られた結果は以下のとくである。

まず既報と同様にヒト iPS 細胞から分化誘導しマトリゲルによる三次元培養を行い、既報よりも 3 週間長い全 8 週間培養を維持した。作製されたオルガノイドには腺管状構造を示す上皮が認められ、MUC5AC が陽性であった。経時的観察では上皮下には  $\alpha$ -SMA 陽性の紡錘形細胞が 6 週目に出現し始め、8 週目に粘膜筋板に類似した帶状構造を形成した。これらの結果からヒト iPS 細胞由来の粘膜筋板を伴った胃オルガノイドを作製することができたと考えられた。RNA-seq を用いて iPS 細胞から胃オルガノイドへの分化誘導過程の経時的な遺伝子発現パターンを解析すると、最終的に胃と類似した発現を示した。また、胃上皮マーカーの発現は平滑筋マーカーの発現より先に認められ、粘膜筋板形成には上皮由来の因子が関与しているという仮説を立てた。そこで、この粘膜筋板を伴った胃オルガノイド作製技術を用いて粘膜筋板分化の分子機構の検討を進めた。

まず免疫染色で胃オルガノイド誘導中の Sonic 及び Indian hedgehog 発現は上皮内で増加しており、上皮由来のヘッジホッギングシグナルが上皮下の細胞分化に関わっている可能性が示唆された。3 週目からヘッジホッギングシグナル阻害剤であるシクロパミンを培地に添加すると、 $\alpha$ -SMA 陽性の上皮下紡錘形細胞が減少した。これらから上皮由来のヘッジホッギングシグナルが、 $\alpha$ -SMA の発現を亢進させ、粘膜筋板形成を正に制御していると考えられた。

免疫染色にて胃オルガノイドの上皮で TGF- $\beta$ 1 の発現が認められ、3 週から 8 週目にかけて増加した。そのレセプターである TGF- $\beta$ R1 は上皮下細胞でも 3 週目以降発現を認めた。TGF- $\beta$ R1 阻害剤 SB431542 を 3 週目から投与すると、 $\alpha$ -SMA 陽性の上皮下細胞は認められず、TGF- $\beta$ シグナルの阻害により胃オルガノイドの粘膜筋板形成が抑制されることが示された。このことから上皮由来の TGF- $\beta$ シグナルが粘膜筋板形成に寄与していると考えられた。

分化誘導中マトリゲルの層を超えて培養皿底面にオルガノイドが接触すると紡錘形細胞が周囲に広がる現象が観察され、培養皿への接着が平滑筋分化を誘導しているとの仮説が考えられた。この仮説を検証するために、3 週目の胃オルガノイドを超低接着プレートと接着プレートに移し 2 週間培養した。接着した胃オルガノイドの周囲の紡錘形細胞は免疫染色にて  $\alpha$ -SMA 陽性であった。機械的環境の影響を受け平滑筋細胞へと分化したことが示唆された。

SB431542 投与で胃オルガノイドの GLI1 陽性上皮下筋細胞が減少したことから、TGF- $\beta$  シグナルとヘッジホッジシグナルが、胃オルガノイドにおける粘膜筋板の誘導に協調的に作用することが示唆された。また RNA-seq を行ったところ、発現変動遺伝子についてパスウェイ解析を行うと、細胞外基質などに関わるカテゴリが含まれていた。さらに、Gene Set Enrichment Analysis の結果、コラーゲン生成や細胞外基質に関する遺伝子セットが有意に変化していた。これらの結果は、TGF- $\beta$  シグナルが、細胞外基質の硬さに寄与し、胃オルガノイドの粘膜筋板形成を促進する可能性があることを示唆した。

TGF- $\beta$  1 が粘膜筋板の再生に関与しているか調べるために、内視鏡的粘膜下層切開剥離 (endoscopic submucosal dissection, ESD) 後の潰瘍標本に対して TGF- $\beta$  1 免疫染色を行った。ESD 後の潰瘍や潰瘍瘢痕で正常粘膜に比し有意に陽性上皮の頻度が高く認められ、上皮由来の TGF- $\beta$  1 が発生過程だけでなく、成人の組織損傷後の胃粘膜筋板の再生にも関与していることが示唆された。

以上本研究では上皮由来のヘッジホッジシグナルと TGF- $\beta$  シグナル、上皮下の機械的性質が、胃オルガノイドの上皮下細胞の平滑筋分化、粘膜筋板形成に関与していることが明らかとなった。さらに TGF- $\beta$  シグナルは粘膜筋板の発生だけでなく、再生でも作用していることが示唆された。

本研究はヒト iPS 細胞からの胃オルガノイドの発生・分化を実験的に研究したものであるが、従来ほとんど行われていなかった試験管内の粘膜筋板の誘導の分子メカニズムについて重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。