



## 腸上皮オルガノイドの簡便で効率的な培養法を開発 — 炎症性腸疾患の治療薬やワクチンの創製に向けて —



### 1. 発表者：

高橋 裕（日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所 研究員）  
佐藤 慎太郎（東京大学医科学研究所 炎症免疫学分野 客員准教授）  
清野 宏（東京大学医科学研究所 炎症免疫学分野 教授）

### 2. 発表のポイント：

- ◆レンチウイルスベクター（注1）を用いて、ヒト腸管上皮オルガノイド（注2）培養用の培地を安価かつ安定的に作製するシステムを樹立しました。
- ◆ヒトiPS細胞から腸管上皮オルガノイドを高効率で分化させることに成功しました。
- ◆ヒト腸管上皮オルガノイドを高効率で遺伝子導入する方法を確立しました。また、ヒト腸管上皮オルガノイドを浮遊培養することに成功しました。

### 3. 発表概要：

2009年にマウス腸管上皮オルガノイドの培養技術が報告されて以来、腸管上皮細胞に関する研究は飛躍的に進んでいます。日本たばこ産業株式会社の高橋裕研究員、東京大学医科学研究所の佐藤慎太郎客員准教授（現所属：大阪大学微生物病研究所 粘膜ワクチンプロジェクト）、清野宏教授らの共同研究グループは、ヒトiPS細胞から分化させた腸管オルガノイドの樹立、培養に関する検討を行い、1) 安価で簡便な培養用培地の調製、2) 未分化iPS細胞からの高効率な分化誘導、3) 高効率な遺伝子導入法の確立、4) 固体ゲルを使用しない浮遊培養による増殖といった、オルガノイドの取り扱いを容易にするためのさまざまな方法を確立しました。本研究成果により、腸管オルガノイドを扱うためのコスト面や技術面におけるハードルを下げる事が可能となり、今後、創薬や再生医療などの腸管オルガノイドを用いた応用研究がよりスムーズになることが期待されます。

本研究成果は、2017年12月7日正午（アメリカ東部時間）に米科学誌「Stem Cell Reports」にオンライン公開されます。

### 4. 発表内容：

#### [研究の背景]

オルガノイドは通常の株化細胞に比べて生理機能が高く、ヒト個体での現象をより正確に予測できるツールであると考えられています。そのため、近年、腸管オルガノイドに関する研究は盛んに行われています。しかし、腸管オ

ルガノイドの培養には通常、高価なサイトカインを必要とします。さらに、一般的に、固体ゲルの中などで三次元培養を行う必要があるため、簡便に高効率で遺伝子導入することが困難です。また、このような腸管オルガノイドの性質から、スクリーニングなどを目的とした大量培養を行うことも容易ではありません。

#### [研究内容]

東京大学医科学研究所と日本たばこ産業株式会社の共同研究チームは、汎用性が高いと考えられるヒトiPS細胞由来腸管上皮オルガノイドを用いて、その培養に関するさまざまな検討を行いました。まず、培地のコストを下げるため、オルガノイドの培養に必須のサイトカインを恒常的に安定発現するマウスL細胞を樹立しました。一般的に、リポフェクション法などの遺伝子導入により安定発現株を作製した場合、1遺伝子の安定発現株を得るまでに通常、1～2ヶ月の期間を要します。しかし今回、レンチウイルスベクターを用いることで、複数の遺伝子を同時かつ同じ細胞に1週間以内という短期間で恒常的に発現させることができ、さらにそれぞれの遺伝子を発現させるウイルスの力価を調整することで、オルガノイドの培養に必要なサイトカイン濃度が至適になるように調節することができました。

続いて、既報の分化方法を改変することで、ヒトiPS細胞から高効率で腸管オルガノイドに分化させる方法を確立しました。iPS細胞は株によって分化効率が大きく変わることが知られていますが、今回示した方法を用いれば、既存の方法では分化させることが難しいiPS細胞株においても、腸管オルガノイドに分化させることが可能になると考えられます。

また、腸管オルガノイドの維持、増殖には細胞塊の状態での三次元培養が必要であり、外来遺伝子を導入するためには、一旦、細胞をバラバラに分散した後、再度オルガノイドを形成させる必要があるため、時間と手間を要します。今回、研究チームは、物理破碎した腸管上皮オルガノイドを二次元培養しても、一時的に腸管上皮幹細胞を含む細胞が増殖することを見出しました。そして、この状態でレンチウイルスやリポフェクションによる遺伝子導入を行い、細胞を再度三次元培養してオルガノイドを形成させると、オルガノイドに高効率で遺伝子を導入できることが分かりました。本方法は、特殊な機器を必要とせず、二次元培養した細胞は通常の培養細胞と同様に扱うことができるという特長を有しています。

さらに、オルガノイドは通常、細胞外マトリクスを含んだMatrigelなどの固体ゲルの中で培養しますが、回収の手間が煩雑となるため、大量培養には不向きです。そこで今回、癌細胞のスフェロイド（細胞塊）培養用として販売されている浮遊培養用培地を用いて腸管上皮オルガノイドを培養したところ、オルガノイドは増殖し、さらに固体ゲル中で培養した場合と同程度でサイトカ

イン応答を示すことが分かりました。固体ゲルでの培養に比べると増殖能が低いという課題は残されていますが、本結果より、少なくとも細胞外マトリクスを含まない状態でもオルガノイドの増殖は可能であることが示されました。

[社会的意義]

本研究により、ヒトiPS細胞由来腸管上皮オルガノイドの扱いが容易になることから、これまでオルガノイド研究に従事していなかった研究者にとってもオルガノイドを用いた研究を進めやすくなることが期待できます。また、薬剤スクリーニングのような応用研究にもオルガノイドを活用しやすくなるが見込まれます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「Stem Cell Reports」

論文タイトル：「A refined culture system for human induced pluripotent stem cell-derived intestinal epithelial organoids」

著者：高橋裕、佐藤慎太郎、倉島洋介、山本智久、黒河志保、幸義和、武村直紀、植松智、頼貞儀、大津真、松野裕旨、大澤日出樹、水島恒和、西村潤一、林三樹夫、山口尚之、清野宏

DOI番号：10.1016/j.stemcr.2017.11.004

URL：<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.11.004>

6. 問い合わせ先：

<研究に関するお問い合わせ>

日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所

研究員 高橋 裕 (タカハシ ユウ)

E-mail: [yu.takahashi@jt.com](mailto:yu.takahashi@jt.com)

東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 炎症免疫学分野

客員准教授 佐藤 慎太郎 (サトウ シンタロウ)

(現所属：大阪大学微生物病研究所 粘膜ワクチンプロジェクト)

Tel: 06-6877-4781、Fax: 06-6877-4786

E-mail: [shintata@ims.u-tokyo.ac.jp](mailto:shintata@ims.u-tokyo.ac.jp) / [shintata@biken.osaka-u.ac.jp](mailto:shintata@biken.osaka-u.ac.jp)

東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 炎症免疫学分野

教授 清野 宏 (キヨノ ヒロシ)

Tel: 03-5449-5271、Fax: 03-5449-5411

E-mail: [kiyono@ims.u-tokyo.ac.jp](mailto:kiyono@ims.u-tokyo.ac.jp)

<報道に関するお問い合わせ>

東京大学医科学研究所 総務チーム

Tel: 03-5449-5601

7. 用語解説：

（注1）レンチウイルスベクター

ヒト免疫不全ウイルスを基にして開発された、外来遺伝子を細胞内で強制発現させる方法の一つ。外来遺伝子は逆転写酵素によって宿主細胞の染色体に組み込まれるため、安定的に発現する。また、ウイルスの力価を調整することで、発現量を調節することも可能である。

（注2）オルガノイド

臓器特異的幹細胞およびその幹細胞から分化した細胞群を含む細胞塊。脳や腎臓、脾臓など、さまざまな臓器特異的なオルガノイドが報告されており、mini-organとも呼ばれる。小腸オルガノイドには、小腸特異的幹細胞以外に、吸収上皮細胞、パネート細胞、杯細胞、腸内分泌細胞が含まれる。

8. 添付資料：

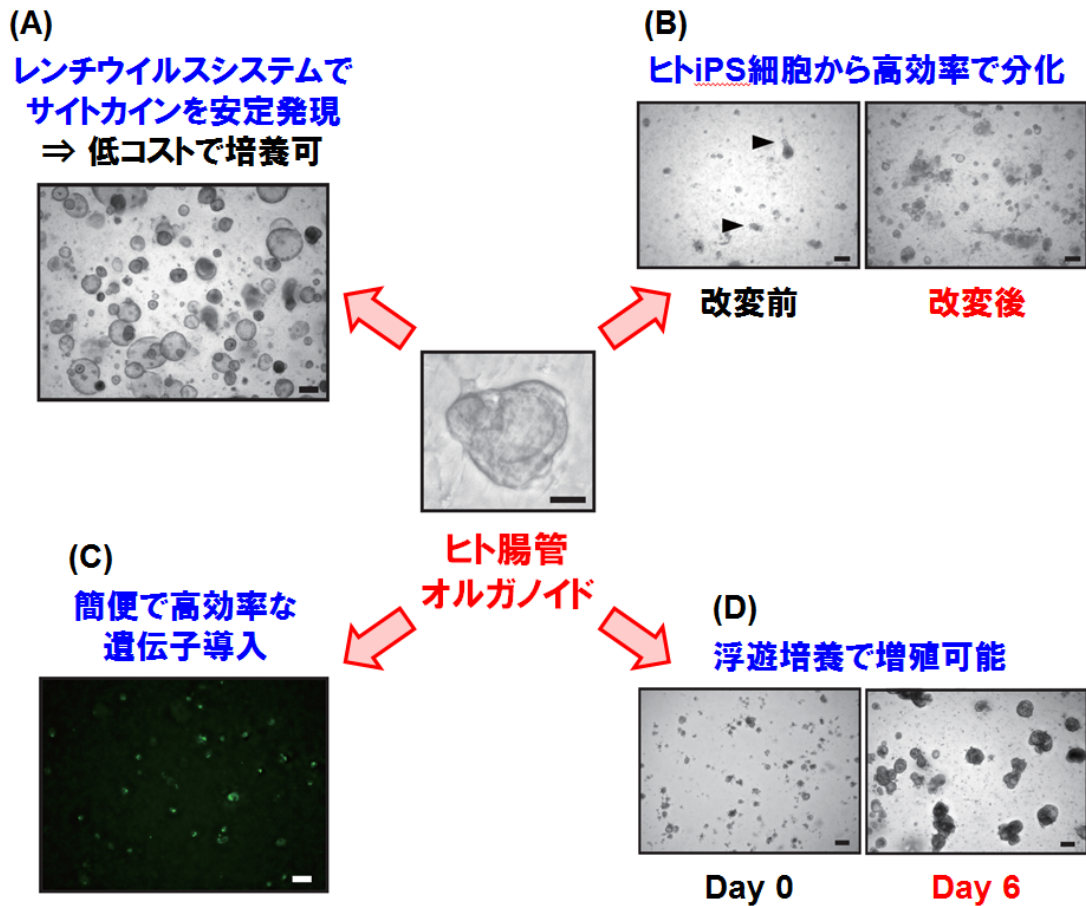


図. ヒト腸管オルガノイドを取り扱うためのさまざまな工夫

(A) レンチウイルスシステムで種々のサイトカインを強制発現させたL細胞の培養上清を用いて培養したヒト腸管オルガノイド。(B) ヒトiPS細胞から分化させた腸管オルガノイド。既存法の改变により分化効率は大きく向上。(C) 破碎したヒト腸管オルガノイドを二次元培養後、蛍光タンパク質（Venus）発現用のレンチウイルスを感染させることで、オルガノイドに遺伝子導入が高効率で達成できることを確認。(D) 市販の浮遊培養用培地でヒト腸管オルガノイドを培養したときの増殖の様子。Dayは継代後の日数。