

(続紙 1)

| | | | |
|--|---|----|-------|
| 京都大学 | 博士 (理 学) | 氏名 | 矢ヶ崎 怜 |
| 論文題目 | Gut contractile organoids: a novel model system to study the cellular synchronization in gastrointestinal motility (腸収縮性オルガノイドを用いた消化管運動における細胞間同調性の研究) | | |
| <p>(論文内容の要旨)</p> <p>消化管運動は内容物の消化や吸収、排泄などに重要な役割を担う。これまでの研究から、この運動は平滑筋や腸管神経、そしてペースメーカー細胞として知られるカハール介在細胞(interstitial cells of Cajal: ICCs)によって制御されていることが知られているが、その詳しい協調メカニズムは未解明であった。そこで消化管運動のメカニズムを細胞レベルで解明することを目的とし、この目的に適したニワトリ胚消化管を用いた解析を行った。</p> <p>まず、ニワトリにおいてICCを可視化するため、ICCのマーカーであるc-Kitタンパク質に対するポリクローナル抗体を作製した。ウェスタンブロットやc-Kit強制発現細胞を用いた免疫染色、そしてin situ hybridization法との比較を行い抗体の有用性を検証し、得られた抗体がニワトリ胚組織内のc-Kitタンパク質を特異的に検出することを確認した。続いて、この抗体を用いてニワトリ胚の後腸領域の免疫染色を行い、ICCの可視化に成功した。マウスやヒトなどと同様に、双極性と多極性の2種類のICCが認められた。</p> <p>次に、細胞レベルでの解析を目指して消化管運動に特化した新たな培養モデルの作製を試みた。15日目胚後腸から筋肉層のみを単離し細胞をマトリゲル上で培養した。無血清培地とマトリゲルを用いた条件下において、繰り返し収縮を示す細胞塊(スフェロイド)の形成が認められた。抗c-Kit抗体を用いた解析により、スフェロイド中央にICC、そしてそれを覆うように平滑筋が配置されており、腸管神経はほとんど含まれていなかった。これらの特徴をふまえ、このスフェロイドを「腸収縮性オルガノイド」と名付けた。</p> <p>平滑筋やICCの活性にはCa²⁺シグナルが重要であることが知られていた。そこで、Ca²⁺可視化タンパク質であるGCaMP6s遺伝子を腸収縮性オルガノイド構成細胞内で発現させたところ、オルガノイドの収縮リズムに一致したCa²⁺の振動リズムが観察された。続いて、オルガノイド内のICCと平滑筋の排他的局在を利用して、ICC間、平滑筋間、ICC-平滑筋間それぞれでのCa²⁺振動同調性を解析したところ、全ての組み合わせにおいてその同調が認められた。このことからオルガノイド内での細胞間相互作用が示唆された。先行研究により消化管運動を構成する細胞間でのギャップ結合の重要性が示唆されていたため、今回開発した腸収縮オルガノイド培養にギャップ結合阻害薬を添加しその寄与を調べた。予想に反し、ICC間やICC-平滑筋間では阻害薬の影響は認められず、平滑筋間においてもその影響はわずかであった。よって腸収縮性オルガノイド内でのシグナル伝達はギャップ結合非依存的であるといえる。</p> <p>また、この腸収縮性オルガノイドは互いに融合するという特徴が認められ、異なる収縮リズムをもっていたオルガノイド同士が融合すると収縮リズムが同調するというこれまでにない興味深い現象を見出した。この振動同調の機構を解析するために、3Dハイドロゲル(京大医師研永楽教授のご厚意による)を用いて互いの融合を妨げつ</p> | | | |

つ、両者の同調を媒介する細胞の特定を試みた。結果、オルガノイド由来の平滑筋がオルガノイド間をブリッジすることで両者の振動周期同調を媒介することがわかった。本研究で確立した腸収縮オルガノイドは、消化管に沿った局所的かつ横断面にみられる収縮同調を模していると考えている。

本研究で新たに確立した腸収縮性オルガノイドの解析から、これまでの定説とは異なり、消化管運動を構成する細胞間でのシグナル伝達はギャップ結合非依存的であることが示唆された。したがって、腸収縮性オルガノイドは消化管運動のメカニズムを細胞レベルで解析するために有用なモデルであるといえ、今後の消化管運動研究の促進に寄与すると期待される。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

オルガノイドとは、*in vitro*において組織の機能のある程度模した「ミニチュア器官」的な細胞集団を意味する。近年、様々な器官の機能を発揮するオルガノイドが作製され、単に発生過程を観察するだけではわからなかった新規知見が得られるなど、その有用性が注目されている。申請者は腸組織に由来する細胞を用いて、腸蠕動運動機能を模したオルガノイドの作製を世界で初めて成功させた。そこでは、腸蠕動運動にみられる収縮振動リズムが再現され、また腸平滑筋細胞とカハール介在細胞 (Interstitial Cells of Cajal; ICC) との相互作用が高解像度で解析できることがわかった。従来の腸蠕動運動研究では、平滑筋やICCの他に神経細胞など複数の細胞タイプが重要であることが示唆されてきたものの、これらの細胞がどのような制御機構を受けるのかについては未解明な点が多かった。本研究では、申請者が作製した腸収縮性オルガノイドを用いることで、平滑筋とICCに特化した解析が可能となり、多くの新規知見を得ている。

本研究で確立したオルガノイドは、ニワトリ胚の細胞由来である。ニワトリ胚は発生生物学的な手法が確立しており多くの利点があるが、その一方で課題もあった。それは哺乳類などでICCを追跡するためのマーカーとして知られるc-Kitタンパク質に対する抗体が無かったことである。そこで申請者はChapter1においてこれらの問題を克服し、ウェスタンブロットと免疫組織化学染色法を用いて、ニワトリc-Kitタンパク質を検出できる抗体を得た。

Chapter 2においては、規則的な収縮を呈するオルガノイドの構成やその機能をより詳細に解析した。その際、Chapter1で得た抗c-Kit抗体を用いることで、オルガノイドの内部にICCが存在し、そのまわりを平滑筋細胞が包み込むように存在していることを明らかにした。さらに内部のICCと平滑筋細胞は、それぞれNカドヘリン陽性と陰性であることから、Nカドヘリンの発現の差異が両者の乖離に貢献しているという可能性を提示した。オルガノイド構成細胞への遺伝子導入法を最適化し、細胞内Ca²⁺濃度を可視化できるGCaMP遺伝子を用いてCa²⁺ダイナミクスのライブイメージング解析を行い、Ca²⁺レベルの変化がオルガノイド収縮変化と一致していることを示した。重要なことに、ICC同士、平滑筋同士、そしてICCと平滑筋の間で、Ca²⁺の振動変化が同期するという興味深い現象を見出している。これらの振動同期のメカニズムに迫るためにギャップ結合阻害剤を添加したところ、その影響は軽微であったことから、ギャップ結合以外の関与の可能性が示された。これらの分子機構の解明に向けてさらなる解析が待たれる。

また、オルガノイド同士が融合すること、そして融合後にはオルガノイド間のCa²⁺振動周期が同期するという興味深い現象を見出している。3穴ハイドロゲルを京大医生物研究所の永樂教授研究室と共同で考案し、オルガノイド間の振動同期を引き起こすメカニズムの解析系を立ち上げた。

以上の研究は、腸蠕動運動における細胞間コミュニケーションの機構解明のみならず、異なる振動周期の同期機構という生物学における本質的な問題の解決において、大きな貢献をしたと評価される。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和5年1月26日に論文内容とそれに関連した口頭試問をおこなった結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降