

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	稲葉 明彦
論文題目	マカクサル由来腸管オルガノイド培養系の樹立と機能的なマカク腸管tuft細胞の作出		
(論文内容の要旨)			
<p>腸管上皮にわずかに存在するtuft細胞は、マウスでは腸内寄生虫等を認識して自然免疫系を活性化する等の働きを担っていることが報告されている。しかしながら、このような希少な細胞種を解析する手段は限られており、これまで非ヒト霊長類では確立されていない。本研究では、ヒトと同様に雑食性かつ、高品質のゲノム情報が入手可能な非ヒト霊長類であるマカク (アカゲザル及びニホンザル) を対象として、種間比較のためにオルガノイド培養系を用いた「腸管上皮細胞の新規in vitro解析系の樹立」および「同培養系を用いた機能的な腸管tuft細胞の作出」を行っている。</p> <p>第2章では、ヒト腸管オルガノイドの培養条件を参照して、マカクの腸管組織から単離した幹細胞画分を培養したところ、十二指腸から結腸までの腸管各部位から増殖性を示す細胞体 (オルガノイド) を作出することに成功したことを報告している。作出したマカクサル由来の腸管オルガノイドはヒト由来のものと同等の栄養要求性を示し、マウス由来のものとは異なっていた。これらのオルガノイドは自己増殖能と腸管tuft細胞を含む成熟細胞への多分化能を有することが示され、同培養系がマカクサルの腸管上皮細胞の機能を反映するin vitro解析系であると考えられた。</p> <p>第3章では、同培養系を用いて作出された腸管tuft細胞が機能的であるかどうかを検討するために、Th2サイトカイン (IL-4 / IL-13) を作用させ、その影響を解析した。サイトカインを作用させたオルガノイドでは、tuft細胞関連遺伝子や、免疫応答関連遺伝子の発現量が増加した。しかし、マウスのtuft細胞において主要な役割を果たすIL-25等は、ヒトの知見と同様に検出されなかった。一方、マウスやヒトと同様に、Choline acetyltransferase (ChAT) がtuft細胞特異的に発現し、ACh合成能を有していることが確認された。これらの結果は、マカク腸管オルガノイド中のtuft細胞AChを合成するという意味において機能的な細胞であることを示している。</p> <p>第4章では、マカク腸管オルガノイドにおいてゲノム編集を用いた遺伝子改変技術の応用性を検討した結果、本培養系において腸管tuft細胞特異的なレポーター遺伝子のノックインに成功した。このことは本培養系で遺伝子のノックアウトを含めた幅広い機能解析が可能であることが示しており、本培養系の有効性を支持している。本研究で樹立したマカク腸管オルガノイドはtuft細胞機能の多様性、さらには腸管機能の多様性の理解に貢献できると考えられる。</p> <p>以上の結果を元に、第5章ではヒト、マウス、マカクのtuft細胞の特性と機能について考察した。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本研究はマカクの腸管上皮オルガノイド作製と、その中にわずかに含まれる tuft 細胞の性質を解明するための技術開発を目指した研究である。Tuft細胞は、これまで機能が不明であったが、2016年あたりからマウスの解析により、寄生虫排除等の自然免疫に関わっていることが示されてきた。しかし、ヒトを含む霊長類においてはその機能は依然として分かっていないことが多く、マウスと同様に自然免疫に関わるかどうかさえも不明である。審査の過程では、霊長類の寄生虫で免疫により排除される物は希であるとの意見も出された。そのため、第1章ではこれまでの知見が動物種や器官を分けて体系的にまとめられたことは、今後の研究の基礎になると評価できる。

第2章では、腸管上皮オルガノイドの作製を試みた結果、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸由来のオルガノイド作製に成功している。また、十二指腸、空腸、回腸オルガノイドを用いて、それぞれに含まれる希少細胞のマーカー遺伝子発現を検討した。その結果、増殖培地では幹細胞マーカーである LGR5 の発現量が多かったが、分化誘導培地では MUC2 (杯細胞)、NEUROG3 (腸内分泌細胞)、POU2F3 (tuft細胞) 等の分化細胞マーカーの発現量が増加したことを示した。また、免疫染色により、これらのマーカーを発現する細胞の割合が増えたことも丁寧に示したことは評価できる。

第3章では自然界でおこっている tuft 細胞系の分化誘導機構をアイデアとして用い、IL-4 または IL-13 を培地に添加することにより、tuft 細胞を含む関連の細胞を増幅することに成功したことは評価できる。また、その遺伝子変動を網羅的に解析した結果、アセチルコリン (ACh) 合成に関わる酵素 (ChAT) 等の tuft 細胞マーカーの量が増加していたことを見いだした。さらに、全体として ACh の量も増加したため、増加した tuft 細胞が ACh を合成する能力を有することを強く示唆した。

第4章では独自のアイデアに基づき、ゲノム編集技術を用いて tuft 細胞マーカー遺伝子座に蛍光ラベルを導入することにチャレンジしたことが評価される。残念ながら発現量がそれほど多くなかったため改良が必要だが、技術的には様々な細胞のラベルに用いることができると期待できる。

第5章で以上の結果と文献を比較し、総合討論を行っている。結果と文献に基づいてマカクの tuft 細胞の特性について適切に議論し、ヒトを含む霊長類の tuft 細胞の特性を示唆したことは高く評価できる。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6月13日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行い、その結果をもって令和5年6月15日に霊長類学・野生動物系教員会議で合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降