

消化管上皮の物質透過・吸収試験に対する新たなモデル系の提供

大 浜 剛

山口大学農学部獣医学科生体機能学講座獣医薬理学教室 准教授
(現：山口大学共同学部獣医学科生体機能学講座獣医薬理学教室 准教授)

緒 言

結腸陰窩の底部には結腸上皮幹細胞 (IESC) が存在し、自己複製と分化のバランスを保ちながら、結腸上皮層を構成する様々な細胞の源となっている¹⁾。IESC の幹細胞性や規制的な分化・増殖は、消化管上皮としての正常な機能の維持、すなわち恒常性の維持に必須であり、その破綻は様々な疾患の原因となる。組織幹細胞の分化・増殖の制御には、周辺の微小環境 (ニッチ) が重要な役割を果たすことが知られている。IESC の基底膜側には筋線維芽細胞 (SEMF) が接着してその足場を形成しており (図1)、ニッチとして重要な役割を果たしている²⁾。

医薬品のみならず健康食品や機能性食品などの有効性と安全性を知る上で、消化管上皮の透過・吸収に対する影響を検討することは極めて重要である。現在、消化管上皮の物質透過・吸収の研究・試験には、単層培養したCaco-2細胞やMDCK細胞を用いた系が広く用いられている。しかしながら、Caco-2は癌組織由来である上に、完全な単層上皮に分化するまでに20日前後かかるという欠点をもつ。またCaco-2細胞を用いた系は、細

胞層を受動輸送で吸収されるような成分の吸収評価においては一定の評価を得ているが、トランスポーターを介した能動輸送に関しては、ヒトの吸収実験の結果とあまり相関を示さず、モデル系としての限界がある。一方、MDCKは3、4日で完全な単層上皮となるが、イヌの腎臓上皮由来であり完全な消化管吸収のモデル系とは言い難い。実際の上皮層には吸収上皮細胞の他に、杯細胞やパネート細胞、腸内分泌細胞など様々な細胞群が混在し、また上皮細胞はそれと接して存在するSEMFによって様々な制御を受ける。しかし、従来方法は上皮細胞だけを培養したものであり、またSEMFの存在を無視している点でも不十分であると言える。

そこで本研究は、①単離したIESCを分化させることで様々な細胞群を含む上皮細胞単層モデルと、②株化上皮細胞-SEMF 2層モデル、の2種の新規物質透過・吸収試験モデルの構築を目的とし、本年度は①IESC単離法の確立とその表現型の解析、②株化SEMFの樹立と表現型の解析、を行った。

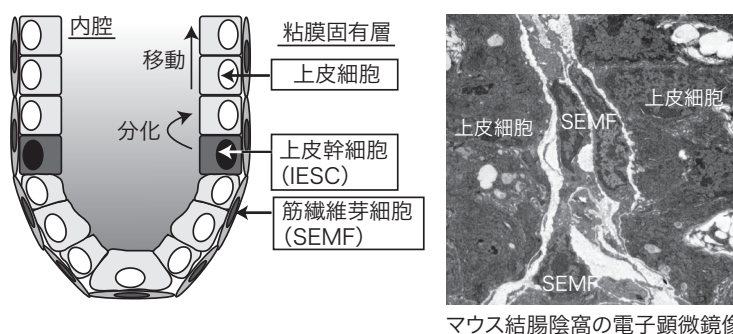


図1 消化管上皮筋線維芽細胞と上皮幹細胞

消化管上皮筋線維芽細胞 (SEMF) は上皮幹細胞 (IESC) や上皮細胞の足場として存在する。右はマウス結腸陰窩底部の電子顕微鏡像で、上皮細胞とSEMFが接している様子を示している。

方法および結果

1. IESC 単離法の確立と表現型解析

分化した上皮細胞は接着しないと死滅する（アノイキス）のに対して、IESC は浮遊状態でも生存する性質を持つ。そこで、マウス結腸よりカルシウムキレート剤を用いて単離した上皮細胞群を、超低付着性ディッシュを用いて培養を行うことで IESC を単離する方法の確立を行った。麻酔下でマウスの血管にヘパリン生食を還流させることで、血球系細胞の混入を防いだ。摘出された結腸を EDTA 含有 Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) でインキュベートし、剥離してきた細胞を上皮細胞群として採取した。採取した細胞は Trypsin-EDTA HBSS でインキュベートし、フィルターを通すことでシングルセルの状態にした。これらの細胞を超低付着性ディッシュ内で LIF および EGF を含む培地を用いて培養を行った。培養 2 日後に遠心することで死細胞を除去し、さらに 7 日目まで培養を行うことで IESC を得た。

これまでの報告から IESC は単一の細胞群ではなく、マーカータンパク質で識別可能な複数のサブタイプが存在すると考えられる^{3), 4), 5), 6)} (図 2)。そこで各種 IESC マーカーに対する抗体を用いて免疫染色および FACS 解析を行い、今回単離された IESC サブタイプの組成を検討した。単離直後の上皮細胞群 (Before) と培養 7 日目の上皮細胞群 (After) について IESC マーカーである CD133 に対する免疫染色を行った (図 3 A)。単離直後の細胞群では、CD133 陽性の細胞はごくわずかであったのに対して、培養 7 日目では分化した上皮細胞が死滅し、95% 以上の細胞が CD133 陽性であった。その蛍光強度の違いから、発現レベルの異なる細胞群が

混在していると考えられた。また、培養 7 日目の IESC について CD133 と DLCK1 の共染色を行ったところ、ほぼすべての細胞が CD133 と DCLK1 両方に陽性であるものの、発現強度には細胞間で差があることが確認された (図 3 B)。

次に、FACS による細胞表面マーカーの解析を行ったところ、培養 7 日目の細胞において CD133 陽性細胞の増加が観察された。また、これらの細胞は上皮細胞マーカーである CD326 に陽性であり、血球系マーカーである CD45 に陰性であった。以上のことから、本方法によってマウス IESC を効率的に単離できることが示唆された。

2. 消化管上皮下筋線維芽細胞株の樹立

SEMF は、 α -SMA と vimentin に陽性、desmin に陰性の細胞として消化管粘膜層の他の細胞と識別される。これまでのところ、マウス SEMF の細胞株は存在しない。SEMF の単離には約 1 か月間を要し、またこの細胞は継代を 6、7 回と繰り返すと細胞増殖が停止して表現型が変化してしまうという欠点を持つ。そこで、我々は単離したマウス SEMF にレンチウイルスベクターを用いて SV40 Large T antigen を導入することで不死化し、マウス SEMF 細胞株の樹立を行った。

ウェスタンブロットおよび免疫染色の結果、樹立された細胞株 (mcMF) は、 α -SMA 陽性、desmin 陰性、vimentin 陽性であり、SEMF の性質を維持していることが確認された (図 4)。mcMF は少なくとも 20 回継代が可能であり、目立った表現系の変化も観察されなかった。

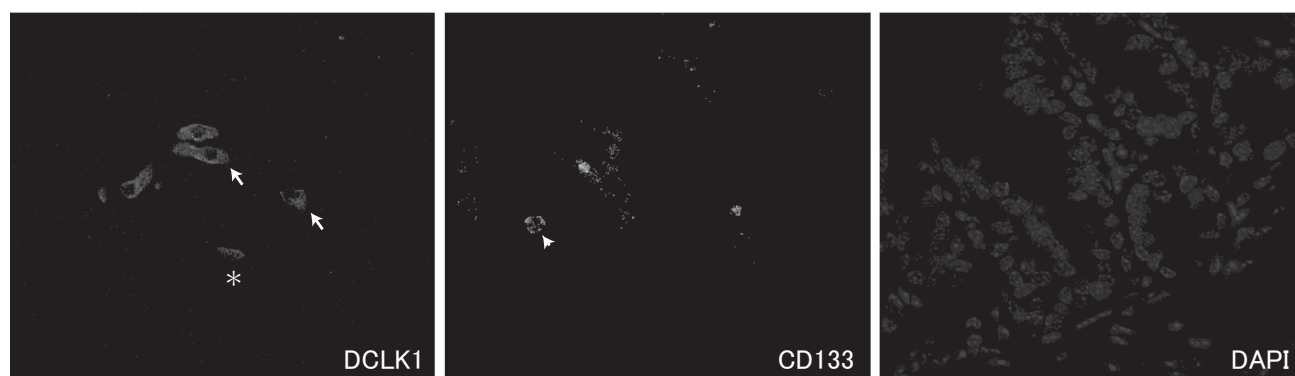


図 2 IESC にはいくつかのサブタイプが存在する

マウス結腸陰窩の免疫染色像。陰窩には IESC マーカーである DCLK1 (左) と CD133 (中央) に陽性の細胞がごく少数観察される。DCLK1 のみに陽性 (アスタリスク)、CD133 のみに陽性 (矢頭)、両方に陽性 (矢印) の細胞群が存在する。

また、機能解析として、以前報告された LPS に対する反応性を検討した。mcMF は TLR4、CD14、MD2 といった LPS シグナルに必要な受容体を発現しており、LPS 刺激により、I κ B α の分解や p38 MAPK のリン酸化が観察されたことから、SEMF と同様に LPS に対する反応性を維持していることが確認された。

考 察

本研究は、①単離した IESC を分化させることで様々な細胞群を含む上皮細胞単層モデルと、②株上皮細胞-SEMF 2 層モデル、の 2 種の新たな物質透過・吸収

試験モデルを構築することを目的としている。①においてはさまざまなマーカー解析により、IESC の単離法がある程度確立されたと考えている。しかし、IESC に関しては、Lgr5 陽性細胞が IESC 本体であることで決着が着いたかに思われたが³⁾、最近 Lgr5 陽性細胞が存在しなくても上皮層はほぼ正常に形成されることが報告され⁶⁾、再び混沌としている。おそらく Lgr5 陽性細胞は IESC ではなく、より分化の進んだ増殖性の高い前駆細胞であると考えられる。我々の方法で単離された細胞も、mRNA レベルでは Lgr5 の発現を確認できなかった。我々の方法では単離できる細胞数が限られているため、

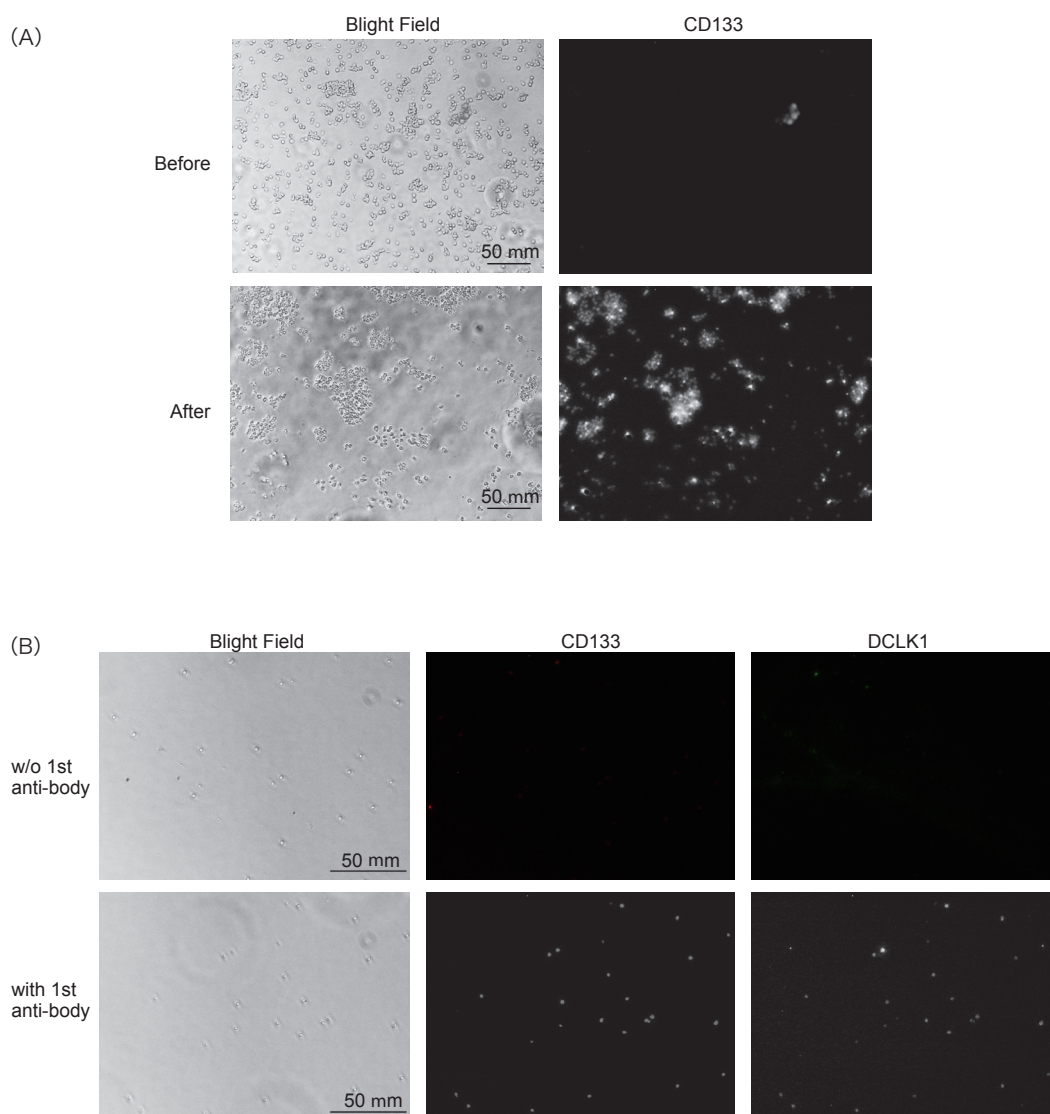


図 3 アノキス耐性の細胞のほとんどが IESC マーカー陽性である

(A) 単離した直後の上皮細胞群 (Before) では CD133 陽性の細胞はほとんど存在しない。培養 7 日目 (After) には、分化した上皮細胞は死滅し、ほとんどの細胞が CD133 陽性となった。

(B) CD133 と DCLK1 の共染色。ほとんどの細胞が両方のマーカーに陽性だが、DCLK1 の発現強度には差が存在した。

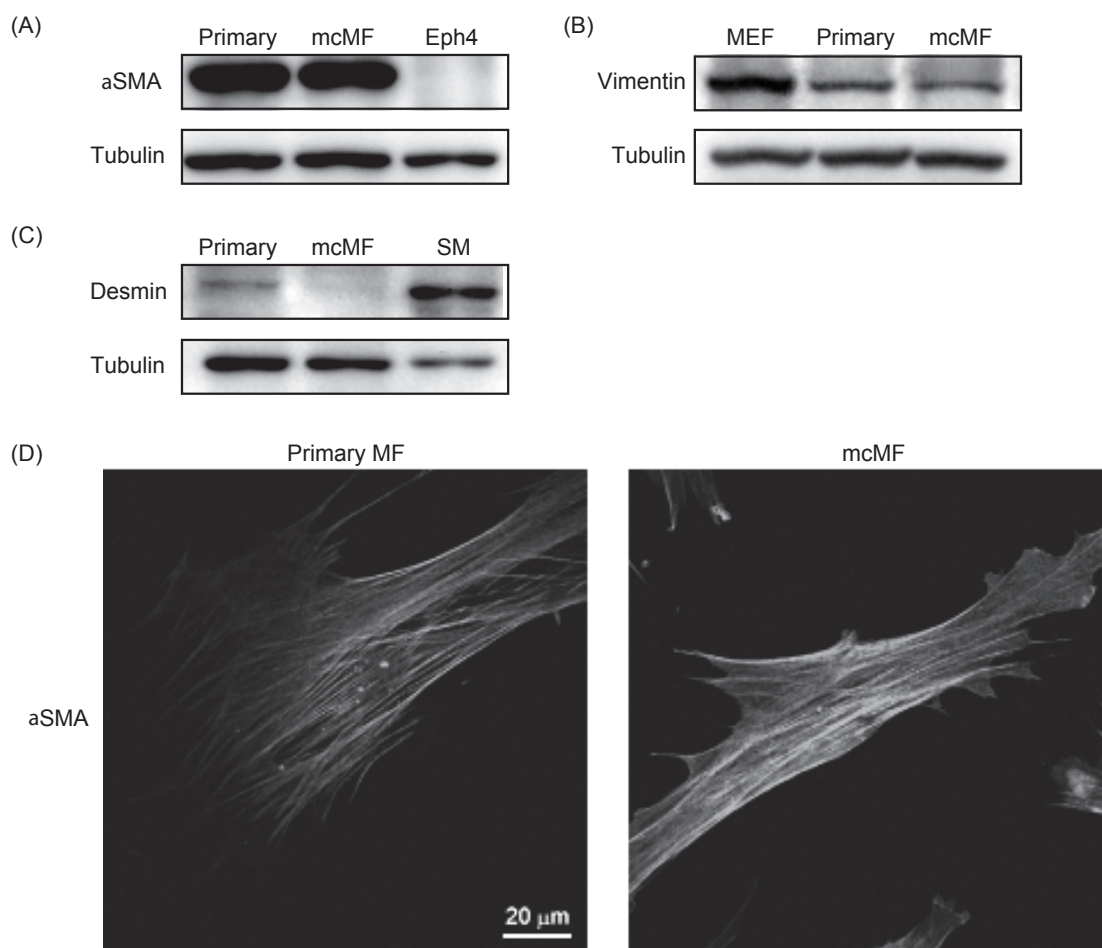


図 4 mcMF は消化管上皮下筋線維芽細胞マーカーを発現している

SV40 Large T antigen を発現させることで不死化した SEMF 細胞株 (mcMF) は、初代培養 SEMF と同様に α -SMA 陽性 (A、D)、Vimentin 陽性 (B)、Desmin 陰性 (C) であった。

現状ではウェスタンブロットなどによる機能解析を行うことが困難である。今後は IESC の増殖・分化を誘導する方法を確立するとともに、IESC 株の作成についても行っていきたい。

②に関して本研究で樹立された mcMF は、我々の知る限り世界初のマウス結腸 SEMF 株であり、TGF- β 刺激なしでも α -SMA を発現しているという点においては、唯一の哺乳類 SEMF であると言える。SEMF の不死化に際しては、Cre recombinase を発現させることで Large T antigen の遺伝子を除去することが可能であるように設計されており、今後さらに doxycyclin などの薬剤により Cre recombinase 発現を誘導できる mcMF を樹立する予定である。これにより細胞増殖を停止させて、消化管上皮細胞株との共培養により上皮細胞-SEMF ニッチを再構築し、SEMF による上皮細胞の制

御も含めた新たな物質透過・吸収試験モデルを作成したい。また、本方法と同時並行で 3T3 method による自然不死化 SEMF 株も作成しており、こちらは現在表現型の確認の最中である。こちらも含めて、本研究の最終目標への到達に使用していきたい。

要 約

本研究は、既存の消化管上皮透過・吸収試験の問題点を解決するために、①単離した IESC を分化させることで様々な細胞群を含む上皮細胞単層モデルと、②株化上皮細胞-SEMF 2層モデル、の2種の新たな物質透過・吸収試験モデルを構築することを目的としている。本年度は、① IESC 単離法の確立とその表現型の解析、② 株化 SEMF の樹立と表現型の解析、を行った。IESC マーカーの解析から、超低付着性ディッシュを用いた方法

がIESCの単離法として有用であることが示された。また、これまでSEMFには細胞株が存在せず研究進展の妨げとなっていたが、今回我々はマウス結腸SEMF株を樹立することができた。今後はこれらの方法・ツールを用いて、全く新しい物質透過・吸収試験モデルを構築したい。

謝 辞

本研究にご支援賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に深謝申し上げます。本研究は開始したばかりの基盤的研究であり、セットアップのために貴財団の助成金は不可欠のものでした。また、本研究では、山口大学獣医薬理学研究室の佐藤晃一教授、川崎秀吉氏、吉田哲也氏、東京大学獣医薬理学研究室の堀正敏准教授、福井大

学の堀口和秀講師にご助力頂いており、感謝致します。なお、本研究報告書の内容は現在投稿準備中であることを申し添えます。

文 献

- 1) Quante M and Wnag TC: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 6, 724-737, 2009
- 2) Mifflin RC et al. : *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 300 (5) , G684-96, 2011
- 3) Barker et al.: *Nature*, 449, 1003-1007, 2007
- 4) May R et al.: *Stem Cells*. 26, 630-637, 2008
- 5) Sangiorgi E Capecchi MR: *Nat Genetics*, 40, 915-920, 2008
- 6) Tian H et al.: *Nature*, 478, 255-259, 2011