

<平成 30 年度助成>

新規霊長類オルガノイドを用いた消化管センサー細胞の解析

岩槻 健¹⁾・今井 啓雄²⁾

(¹⁾ 東京農業大学 応用生命科学部 食品安全健康学科、(²⁾ 京都大学 霊長類研究所 ゲノム細胞研究部門)

研究目的

消化管は栄養の吸収にとどまらず、食品成分や環境因子の認知、生体防御、バリア機能、ホルモンのコントロールなど様々な機能を有している。消化管を健康に保つ事は生命活動に不可欠であるが、現代人の消化管は外界からの異物に常に曝されているほか、精神的ストレスや過剰栄養摂取による代謝異常などで、慢性的な炎症状態にある。さらに近年、消化管には機能性胃腸症、クローン病、潰瘍性大腸炎など原因不明な疾患が増加傾向にある。こうした消化管の不具合の解消には、消化管の幹細胞やそこから分化した上皮細胞が炎症・食品成分・ストレスなどによりどのような影響を受けるかという基礎的理解が必要である。しかしながら、消化管機能を *in vitro* にて解析する実験系は限られており、研究のボトルネックとなっている。最近になり、消化管幹細胞が特定され、続いて消化管幹細胞の三次元培養系（オルガノイド培養系）が開発されたことで、これまで困難であった *in vitro* での消化管細胞実験が可能となり、各種因子が消化管の細胞に与える影響を簡単に観察できるようになった。

本研究では、ヒトへの応用研究を見据え研究対象を霊長類に置き、1) オルガノイド培養法を用いてサル消化管培養系を構築し、2) *in vitro* において消化管上皮に存在するセンサー細胞である味細胞様細胞へ分化が可能かを確認することを目的とした。将来、本研究結果で得られた霊長類の消化管細胞を、食品食品の安全性や有用性を解析するプラットフォーム細胞として活用し、栄養科学、食品科学、病理学、生理学等への貢献を目指す。

研究手法

本研究では、1) オルガノイド培養法にてこれまで存在しなかったサル消化管細胞培養系を構築し、2) サル消化管に存在するセンサー細胞の分化誘導を試みた。また、3) 霊長類の甘味受容体 T1R2 に対するペプチド抗体の作製を行い、甘味受容体を発現している栄養センサー細胞を同定可能なツール作りを目指した。

まず、京大・霊長類研究所においてサルの消化管（小腸）を採取し、直ちに東京農業大学へ移送し、オルガノイド培養を開始した。具体的には、クリプトを組織から取り出し、マトリゲルに包埋した後、EGF、Wnt3a、R-Spondin、Noggin、Nicotinamide、SB202190 等含む DMEM/F12 培地を重層し培養を開始した。なお、Wnt3、R-Spondin、Noggin については、株化細胞にそれぞれのタンパクを発現させ、その培養上清（Conditioned medium）を用いた。

次に、作製された消化管オルガノイド培養系において、消化管本来の性質を有する分化細胞が出現するかを調べるために、Wnt3a、Nicotinamide、SB202190 を除き 3 日間培養し、分化したセンサー細胞が誘導されるかを免疫染色にて確認した。

上記と並行して、これまででないツール作りを試みた。特に、霊長類の消化管内分泌細胞に発現すると考えられている、甘味受容体である T1R2 を検出するための抗体作製を行った。抗原ペプチドとしてヒトおよびサル T1R2 の共通配列を選定し、2 種類の合成ペプチドを作製した。その後、キャリアタンパクである KLH と結合させ、ウサギに合計 6 週にわたり免疫、採血後の血清を一部アフィニティー精

製したものを抗 T1R2 抗体とした。抗体が免疫組織化学染色に利用できるかは、HEK293 細胞にヒト T1R2 発現ベクターをトランスフェクションし、蛍光免疫染色を行うことで判断した。

結 果

サル小腸からのオルガノイド作製

クリプトを単離しマトリゲルに包埋し培地を添加した 6 時間後に観察すると、クリプトの千切れた端が融合し膨れる様子が見られた (図 1、6 hr)。翌日にはクリプトが球状になり、オルガノイドが形成されていることが確認された (図 1、Day 1)。2 日目、3 日目にはオルガノイドが成長し、直径 300 μ m 以上になるものも確認され (図 1、Day 2 および 3)、その後の継代や凍結も可能であった。現在までにサル消化管オルガノイドは、一年以上継代可能であることが確認されている。

サル小腸オルガノイドにおける消化管センサー細胞の誘導

本培養系では、Wnt3a が常に培養液に添加されているため、オルガノイドは増殖性の細胞が多くなり、球形を保ち成熟分化した細胞はほとんど観察されない (data not shown)。そこで、作製したサル小腸オルガノイドを分化誘導するため、Wnt3a、Nicotinamide、SB202190 を抜いて 72 時間培養し、免疫染色を行った結果、Tuft 細胞やセロトニン産生細胞が存在する事が確認された (図 2)。このことから、サル腸管オルガノイドを Tuft 細胞や内分泌細胞へ分化誘導できることが判明した。

霊長類抗 T1R2 抗体の作製とその評価

作製した霊長類甘味受容体 T1R2 が、免疫染色に利用できるかを調べるため、HEK293 細胞にヒト T1R2 を強制発現させ、今回作製した抗体が認識するかを蛍光免疫染色にて確認を行なった。その結果、

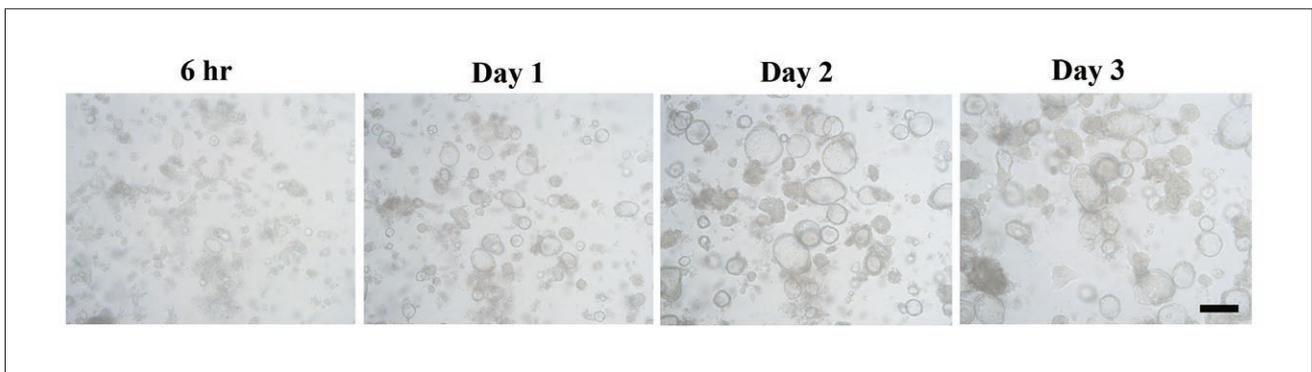


図 1 サル小腸オルガノイドの経日的形態変化
クリプト単離後 6 時間から 3 日までの経日的変化。1 日後には多くの球状のオルガノイド形成が観察され、2 日目、3 日目になるに徐々に大きく成長する。Bar: 200 μ m

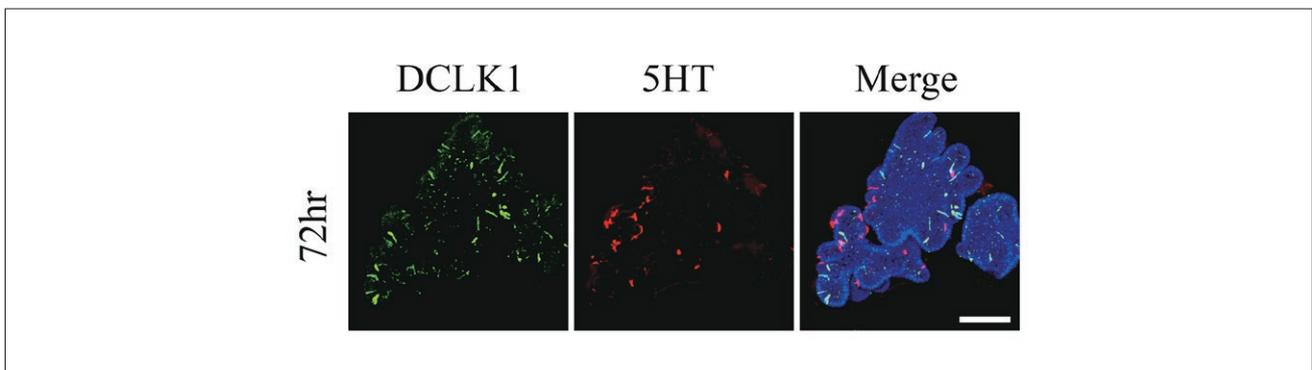


図 2 サル小腸オルガノイドにおけるセンサー細胞の可視化
分化誘導培地に切り替え 72 時間後の免疫染色像。左から抗 DCLK1 抗体、抗 5HT (セロトニン) 抗体にてそれぞれ検出した。右端は DAPI 染色とそれぞれの抗体染色像を重ね合わせたもの。Bar: 100 μ m

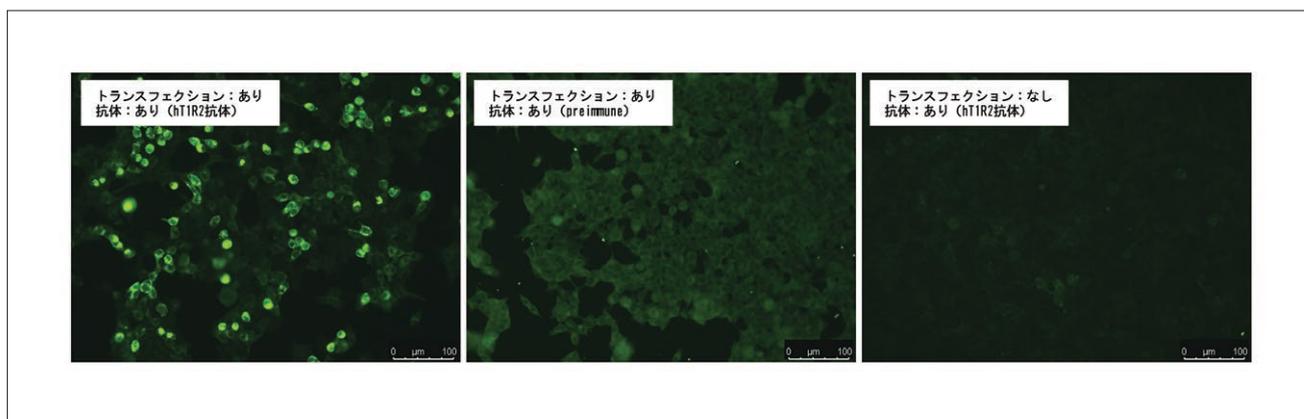


図3 作製した甘味受容体に対するヒト T1R2 発現細胞の反応
HEK293 細胞にヒト T1R2 を強制発現させ、作製したヒト T1R2 (hT1R2) 抗体を反応させ、488 Alexa anti-Rabbit IgG を用いて検出した (左)。免疫前の血清 (中)、トランスフェクションなし (右)。

受容体を発現させた細胞においてのみ特異的な染色が観察された (図 3)。一方、免疫前血清を使った場合およびヒト T1R2 を発現させなかった細胞群では染色が観察されず、作製した抗体はヒト T1R2 を特異的に認識することが示された。

考 察

霊長類ではヒトの消化管オルガノイドが既に存在するが、ヒトのサンプルの入手が困難なことなどから、ヒトの代替となる動物の存在は重要である。これまで食品機能および栄養学の研究には、げっ歯類が用いられてきた。しかし、味覚センサーをはじめとするセンサー機能を解析する上で、げっ歯類と霊長類では隔たりがある。甘味、うま味、苦味に対する応答の違いは、行動学実験や細胞生物学実験で明らかとなっている。これらの違いの多くは、受容体の数や構造の違いに起因していることが分かっている。また、ヒトや霊長類が有する消化管ホルモンであるモチリンは、げっ歯類には存在しない。このようなことから、ヒトの細胞機能の多くを有するサルを研究材料にする意義はある。

我々は本研究において、ヒトの消化管モデルになる可能性を秘めたサル消化管オルガノイドを構築し、内分泌細胞や Tuft 細胞など味覚受容メカニズムを有するセンサー細胞を分化誘導できることを明らかにした。さらに、センサー研究に必要な不可欠な抗

体である、霊長類の甘味受容体の作製に成功した。今後の更なる確認は必要であるが、甘味受容体が生体内のどこで発現するかなどの解析に利用することができる。げっ歯類を用いた先行研究では、味覚受容体は体の多くの器官で発現すると報告されている。特に甘味受容体は消化管内分泌細胞、膵臓や精巣での機能に注目が集まっている。本研究で作製した抗体を使い、霊長類組織やオルガノイドにおける甘味受容体の発現と機能についても調べていきたい。

今回、霊長類の消化管研究に必要なツールである消化管オルガノイドと抗体を揃えたことで、様々な消化管研究に利用されることが期待できる。例えば、オルガノイドを用いることで、消化管上皮細胞による食品因子の吸収や毒性解析が可能となっている。また、本研究により、内分泌細胞や Tuft 細胞などのセンサー細胞への分化誘導が可能であると分かったことから、将来は内分泌学や免疫学の分野で霊長類消化管オルガノイドの利用が進むと考えられる。具体的には様々な食品因子による種々のホルモン分泌についての解析、あるいは寄生虫や常在細菌と消化管上皮細胞との関係についての解析に活用されるであろう。オルガノイドを扱う技術は日々洗練化されており、最近ではオルガノイドを単層培養化することが可能になっており、従来困難であった細胞の頂端側からの外来因子の暴露による影響などについても解析が進められている。

このように、霊長類消化管オルガノイドはセンサー細胞研究のためのツールを与えてくれただけでなく、栄養科学、食品科学、病理学、生理学等の分野へ新たな知見を加える様々な研究に利用されることが期待されている。

謝 辞

本研究は、公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団による研究助成により遂行された。ここに深く感謝いたします。

Analysis of intestinal chemosensory cells using nonhuman primate organoids

Ken IWATSUKI¹⁾, and Hiroo IMAI²⁾

¹⁾ *Department of Nutritional Science and Food Safety, Faculty of Applied Biosciences, Tokyo University of Agriculture*

²⁾ *Department of Cellular and Molecular Biology, Primate Research Institute, Kyoto University*

Abstract

Several types of chemosensory cells exist in gastrointestinal tracts to sense nutrition and contaminants such as bacteria or parasites. Although rodent tissues are used extensively as a human gut model, recent studies show that the chemical sensing system in rodents differs from that in humans. For instance, rodents do not produce hormones such as motilin, while human and other primates do. In addition, the specificity and selectivity of taste receptors are known to differ slightly between rodents and primates. This suggests that performing experiments using rodents may not always represent the optimal choice. Nonhuman primates in biomedical research are valuable animal models for advancing our understanding of biological responses in humans, as the availability of human tissues is limited. It has been reported that a 3D organoid culture produces functional gastrointestinal epithelial cells *in vitro*, and can be generated from both animal and human tissues. Herein, we report the generation of intestinal chemosensory cells from nonhuman primates, macaques, using an organoid culture system. We were able to maintain monkey intestinal organoids in proliferation medium for more than one year. Upon switching to differentiation medium, we observed a drastic change in organoid morphology and chemosensory cell marker protein expression. In order to detect chemosensory cells within the organoids, we have generated antibodies that are capable of detecting the primate sweetness receptor.

In summary, we have generated intestinal organoids from a nonhuman primate. The organoids that were generated in this study are suitable for studying the functions of primate chemosensory cells *in vitro*.