

研究区分	教員特別研究推進 地域振興
------	---------------

研究テーマ	小腸オルガノイド由来単層上皮機能測定系の確立				
研究組織	代表者	所属・職名	食品栄養科学部・助教	氏名	石塚 典子
	研究分担者	所属・職名		氏名	
		所属・職名		氏名	
		所属・職名		氏名	
	発表者	所属・職名	食品栄養科学部・助教	氏名	石塚 典子

講演題目	小腸オルガノイド由来単層上皮機能測定系の確立
研究の目的、成果及び今後の展望	<p>小腸上皮は吸収機能を有する絨毛部と分泌機能を有する陰窩部の2つから構成されている。陰窩部の底には、自己複製能と上皮細胞への分化能を持った腸幹細胞が存在する。腸幹細胞は、絨毛へ移行しながら分化し、管腔内に脱落することにより数日で小腸上皮を作り変え、様々な栄養状態に対応している。小腸の吸収・分泌機能を <i>in vitro</i> で評価するために、小腸のモデル細胞株である Caco-2 細胞の単層培養系や動物個体から摘出した標本が使われてきた。しかし、Caco-2 は大腸由来であること、摘出小腸では絨毛の立体的な構造のため吸収機能のみの定量的な測定などは困難であるなど問題点があった。近年、単離培養した腸幹細胞を用い、生体内の腸組織に似た「小腸オルガノイド」の培養技術が開発された。小腸オルガノイドは、管腔を内面に向けた球状の構造体であり、測定すべき栄養素などを投与することができない。このため本研究では、小腸オルガノイドの単層培養法を確立し、栄養素吸収機能評価系を確立することを目的とした。</p> <p>トランズウェル上で経上皮電気抵抗 (TEER) を経時的に測定すると、分化誘導後 2 日目で最大となった。また、アクチン染色像を共焦点顕微鏡で観察すると、分化 2 日目で、皮質アクチンは均一な大きさの敷石状の細胞構造を示した。分化誘導前は、微絨毛のアクチン構造は、まばらであったが、分化 2 日目では、ほとんど全ての細胞で強いシグナルとして観察された。しかし、分化誘導後 3 日目以降では、TEER の低下と一致し、皮質アクチン染色像では細胞の欠落が観察された。小腸上皮細胞の代謝回転を考慮するとアポトーシスが惹起されたことが示唆された。クローディン 15 は小腸の上皮細胞のタイト結合蛋白に発現している。分化誘導前はクローディン 15 のシグナルは細胞内に拡散した点状の構造として観察された。分化誘導後は、タイト結合に集積したシグナルが観察され、タイト結合が形成されたことが示唆された。分化誘導前後の遺伝子発現を比較すると、幹細胞マーカーである <i>Lgr5</i> は、分化後に有意に減少した。小腸の主要なグルコース輸送体である <i>SGLT1</i> は分化後に増加傾向を示し、Cl^- 分泌に関与する <i>CFTR</i> は分化前に有意に多く発現していた。次に分化誘導前後の単層上皮を用い栄養素吸収機能を、グルコース誘発性短絡電流上昇 (I_{sc}) として評価した。分化誘導前では粘膜側のグルコース添加では I_{sc} の上昇は観察されなかったが、Cl^- 分泌活性は観察された。分化誘導後にはグルコース添加では I_{sc} の上昇が観察された。以上観察より、トランズウェル上でオルガノイド由来細胞に分化誘導を行うことで単層培養機能測定系が確立できた。</p>