

ヒト腸管オルガノイドおよび単層上皮細胞を活用した食品成分の機能解明

東京大学大学院農学生命科学研究科
高橋 裕

1. 研究の目的と背景

小腸は腸内細菌による代謝産物を含め、様々な栄養成分の取り込みを行うだけでなく、遊離脂肪酸をトリアシルグリセロールに再合成し、カイロミクロンとして末梢組織に運搬するという全身のホメオスタシス維持に必要な不可欠な脂質代謝を司る場でもある。その分子機構を解明するためのヒト小腸上皮細胞のモデルとして、これまで結腸癌由来の細胞株である Caco-2 細胞が汎用されてきた。しかし、Caco-2 細胞は吸収上皮細胞からのみ構成されていることに加え、染色体や脂質輸送能の異常、薬物応答の低下など、正常な上皮細胞とは異なる点が指摘されている^{1,2}。生理機能が正常な小腸上皮細胞を作製しその機能を解明することは、特に機能性食品の開発を目的とした食品科学領域において、重要な取り組みであると考えられる。

オルガノイドは臓器特異的な幹細胞およびその幹細胞から分化した細胞群から構成される三次元構造体と定義される³。これまでに脳、肺、肝臓、腎臓、膵臓、胃、腸など、全身の多くの臓器、組織由来のオルガノイドが樹立され、その培養法が確立されてきた。オルガノイドは実験動物に移植すると機能的な臓器を形成することから、高い生理機能を示すミニ臓器と見なされており、再生医療への応用が期待されている。さらにオルガノイドは臓器、組織からだけでなく、induced pluripotent stem (iPS) 細胞からも分化誘導することが可能である。特に iPS 細胞からオルガノイドへの分化過程は臓器の発生過程を模倣すると考えられており、発生学の分野で大きな注目を集めている。

腸内細菌により産生される脂肪酸代謝産物は腸管管腔や腸管組織に存在し、例えば通常食を用いて飼養した Specific-pathogen-free (SPF) マウスにおけるリノール酸由来代謝産物は、100 mg の小腸組織あるいは 100 μ L の血漿中あたり数百から数千 pg 存在することが報告されている⁴。今回、筆者らは入手のハードルが低く、ロット間差が少ないことが期待できるヒト iPS 細胞から分化誘導した小腸オルガノイドを実験材料として用いて、脂肪酸および腸内細菌によって産生される脂肪酸代謝産物の機能解析を試みることにした。ただし、オルガノイドは内側が腸管の内腔側（絨毛領域側）に相当するため、オルガノイドのままでは食品成分が内腔側から取り込まれる際の生理応答を正確に評価できない可能性がある。そのため、トランズウェルにオルガノイドを単層化し、上部が内腔側とな

るように模倣することで食品成分が吸収上皮細胞と直接的に接するように工夫し、評価を行った。

2. 研究の方法

2-1. 試料

乳酸菌由来脂肪酸代謝産物は京都大学の小川順教授、岸野重信准教授よりご供与頂いた。ヒト小腸オルガノイドはヒト胎児皮膚由来の iPS 細胞株である TkDN4-M を既報⁵に従って分化させ、樹立した。マトリゲル、トランズウェル (12 well) はコーニングより購入した。組換えタンパク質は R&D Systems から購入した。カラーゲンゲル培養キットは新田ゼラチンから購入した。ROCK 阻害剤である Y27632, p38 MAPK 阻害剤である SB202190 は MedChemExpress から購入した。抗 Apolipoprotein B (ApoB) 抗体は Abcam から購入した。その他の試薬、実験器具は Thermo Fisher Scientific, Sigma-Aldrich, ナカライテスク、もしくは富士フイルム和光純薬より購入した。

2-2. ヒトオルガノイド培養用培地の調製

レンチウイルスを用いて Wnt3a, R-spondin1, Noggin を安定的に発現させた L 細胞をコンフルエントの状態です 3 日間培養した上清 (L-WRN conditioned medium) を回収した。この培養上清を Advanced DMEM で 4 倍希釈し、さらに 50 ng/mL Epidermal growth factor, 50 ng/mL Hepatocyte growth factor, 10 μ M Y27632, 10 μ M SB202190, 0.5 μ M A83-01, 1% BSA となるように添加した各試薬を含む培地をオルガノイド培養用培地として用いた。

2-3. ヒト小腸オルガノイドの継代

Multidish 4 Well 上で培養したオルガノイドを Phosphate-buffered saline (PBS) (-) で洗浄後、TrypLE Express を 1 well あたり 0.5 mL 加え、15 mL チューブに回収した。37 $^{\circ}$ C の温浴で 5 分間インキュベートし、ピペッティングにより細胞塊をばらばらにした後、3 倍量の培地を加えて遠心した。上清を除去し培地を加えて懸濁し、マトリゲルに包埋後、Multidish 4 Well に 40 μ L ずつ播種した。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ インキュベーター内で 15 分間インキュベートすることでマトリゲルを固化させ、ヒトオルガノイ

ド培養用培地を 1 well あたり 500 μL 加え, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 インキュベーター内で培養した. 3 日毎に培地交換を行い, 6 日毎に継代操作を繰り返した.

2-4. ヒト小腸オルガノイドの単層化

Multidish 4 Well 上で培養したオルガノイドを PBS (-) で洗浄後, TrypLE Express を 1 well あたり 0.5 mL 加え, 15 mL チューブに回収した. 37 $^{\circ}\text{C}$ の温浴で 5 分間インキュベートし, ピペッティングにより細胞塊をばらばらにした後, 3 倍量の培地を加えて遠心した. 1 well 分あたり 400 μL のヒトオルガノイド培養用培地を加え, ピペッティングにより十分に懸濁した. コラーゲンゲル培養キットを用いて調製したコラーゲン溶液をトランズウェルにコートし, 1 well あたり 400 μL の細胞懸濁液を加えた. 底面のプレートには 1 well あたり 1.2 mL のヒトオルガノイド培養用培地を加え, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 インキュベーター内で培養した. 3 日毎に培地交換を行い, 6 日毎に継代操作を繰り返した.

3. 研究内容

小腸上皮細胞は膵リパーゼにより分解された食事由来のトリアシルグリセロールを遊離脂肪酸の形で取り込み, その後脂肪酸はトリアシルグリセロールに再合成され, カイロミクロンの形で基底側からリンパ管へと分泌される. 本研究では従来の株化細胞よりも高い生理機能を有するとされるヒト小腸オルガノイドを用いて, 腸内細菌により産生される様々な脂肪酸代謝産物がヒト小腸における脂質代謝に与える影響について解析を行った.

4. 研究の実施経過

まずは, ヒト iPS 細胞由来小腸オルガノイドを用いたカイロミクロン分泌の評価系構築を目指した. 破碎したヒト小腸オルガノイドをコラーゲンコートしたトランズウェルに播種した方法および評価の概要を **Figure 1** に示す. 今回の評価では, 細胞播種後, 経上皮電気抵抗値が上昇し十分に単層が形成されていることを確認後, 実験に用いることができる判断した (**Figure 2**). カイロミクロンには 1 粒子あたり 1 分子の ApoB-48 が含まれるため, ApoB-48 タンパク質量を解析することで分泌されたカイロミクロン量を推定することが可能である. ヒト小腸オルガノイドをコラーゲンコートしたトランズウェルに単層化後, オレイン酸を負荷し, 基底膜側への ApoB-48 分泌を調べたところ, 培養上清と細胞内の両方において ApoB-48 に相当する分子量にバンドが検出された (**Figure 3**) (精製した市販の組換えタンパク質を陽性対照として置いた). このバンドは, 脂肪酸の処理時間依存的に増加したことから, ApoB-48 であると考えられた. また, 頂端側への ApoB-

48 の分泌は基底膜側に比べて低く, 単層化した細胞は既報通り極性を有することが支持された. さらに基底膜側に分泌されたトリアシルグリセロール量をトリグリセライド E-テストワコーを用いて定量したところ, オレイン酸処理により増加したことから (**Figure 4**), ApoB-48 はカイロミクロンとして分泌されている可能性が高いと推察された.

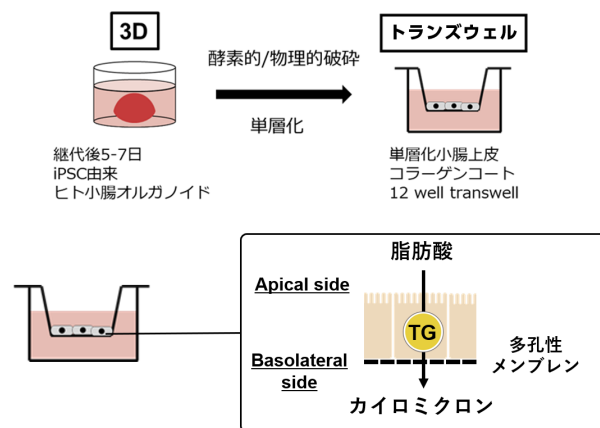


Figure 1. Development of monolayer intestinal epithelial cells (IECs) from organoids differentiated from human iPS cells on Transwells inserts (upper) and assay system for detection of chylomicron secretion (lower).

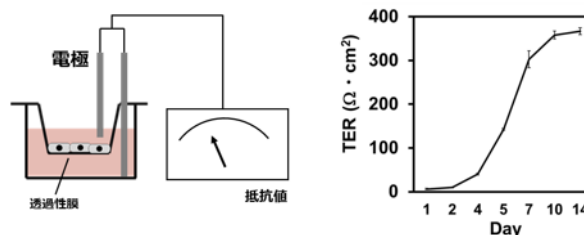


Figure 2. Assay system to evaluate transepithelial electrical resistance values of IECs (left) and their time-dependent increase after seeded on collagen-coated Transwell inserts (triplicate, mean \pm S.E.) (right).

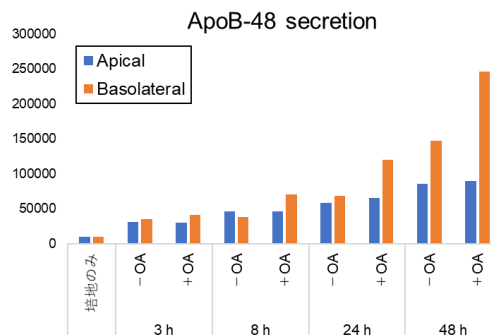


Figure 3. Time-dependent increase of apoB-48 secretion of IECs upon 500 μM oleic acid (OA) treatment. Quantification of bands detected by Western blot analysis was conducted using Image J software. $n=1$. Similar results were obtained from at least two independent experiments.

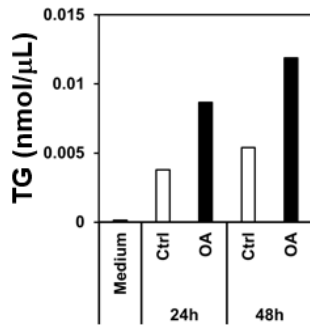


Figure 4. Increase of secreted triacylglycerol amounts in the basolateral side of IECs upon 500 μ M oleic acid treatment.

カイロミクロン分泌の増加は血中脂質の増加, 肝臓への脂質流入の増加に繋がり, その抑制は脂質異常症の改善, 予防に繋がることが期待される. そのため, 我々は本評価系を用いて, カイロミクロン分泌を抑制し得る食品成分を含む低分子化合物のスクリーニングを行った. その結果, 乳酸菌由来の脂肪酸代謝産物 1, 2 が ApoB-48 の分泌を抑制することを見出した (Figure 5). なお, 陽性対照化合物として脂質と ApoB-48 を会合することでカイロミクロン合成を司る Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) 阻害剤 CP346086 を用い, 分泌された ApoB-48 は MTP 依存的に起こることを確認した. またセルラセートを用いて細胞内に残存した ApoB-48 量を測定した結果, CP346086 と同様に脂肪酸代謝産物 1, 2 は細胞内 ApoB-48 発現量も減少させた (Figure 6).

ApoB-48 は MTP による脂質付加が起らないとユビキチン・プロテアソーム系で速やかに分解されることが知られている⁶. そこで脂肪酸代謝産物により細胞内 ApoB-48 が減少したのはタンパク質分解が亢進したためであると推測し, プロテアソーム阻害剤である MG-132 を処理した. その結果, CP346086 と同様に, 脂肪酸代謝産物 1, 2 で減少した ApoB-48 タンパク質量は, MG-132 処理により回復した (Figure 7). 以上の結果より, 同定した脂肪酸代謝産物 1, 2 は ApoB-48 の分解を介してカイロミクロン分泌を抑制する機能を持つことが明らかとなった.

5. 研究から得た結論・考察

本研究では, ヒト iPS 細胞由来小腸オルガノイドから構築した単層上皮細胞を用いて, カイロミクロンに含まれる ApoB-48 の分泌を評価するための新たな実験系を構築した. オレイン酸処理により ApoB-48 分泌の亢進を確認できた基底膜側の培地ではトリアシルグリセロール量が増加していたことから, 培地中の ApoB-48 のタンパク質量はカイロミクロン量を反映していると考えられた. カイロミクロン分泌を抑制する因子として, 乳酸菌由来の脂肪酸代謝産物を同定した. この脂肪酸代謝産物は細胞内 ApoB-48 のタンパク質分解を誘導することで ApoB-48 の細胞

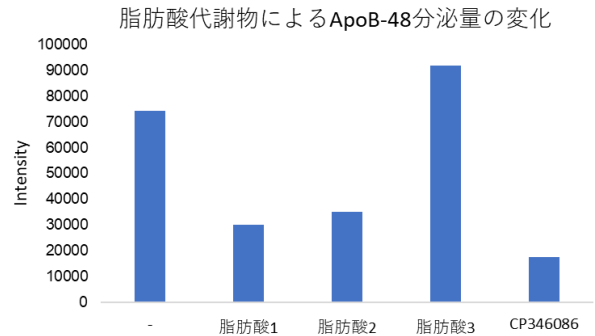


Figure 5. Inhibition of apoB-48 secretion into the basolateral side of the intestinal epithelial cells by treating 30 μ M fatty acid metabolites by *Lactobacillus acidophilus* or 1 μ M CP346086 for 24 h. Each group was loaded with 500 μ M oleic acid. Quantification of bands detected by Western blot analysis was conducted using Image J software. n=1. Similar results were obtained from at least two independent experiments.

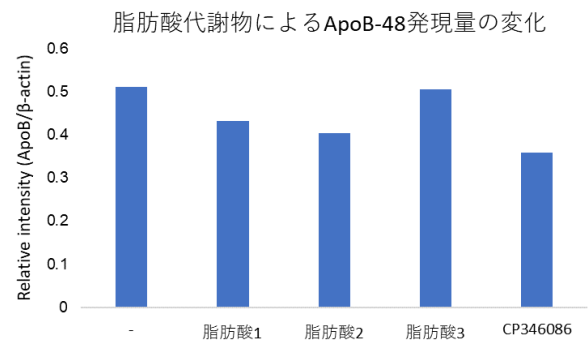


Figure 6. Inhibition of apoB-48 expression in IECs after exposed with 30 μ M fatty acid metabolites or 1 μ M CP346086 for 24 h. Each group was loaded with 500 μ M oleic acid. Quantification of bands detected by Western blot analysis was conducted using Image J software. n=1. Similar results were obtained from at least two independent experiments.

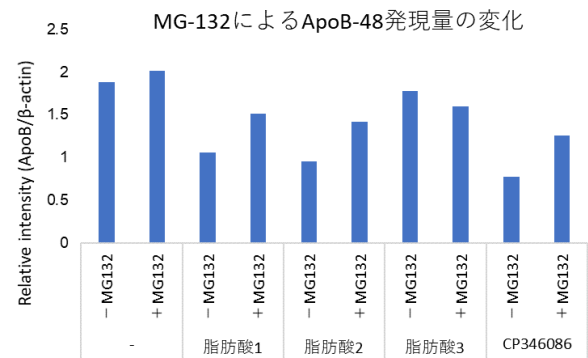


Figure 7. Inhibition of fatty acid metabolite-mediated proteasomal degradation of intracellular apoB-48 by 10 μ M MG-132. Each group was loaded with 500 μ M oleic acid. Quantification of bands detected by Western blot analysis was conducted using Image J software. n=1. Similar results were obtained from at least two independent experiments.

外分泌を抑制する作用を持つことが明らかとなった。

これまでヒト小腸上皮細胞様のモデルとして結腸癌由来細胞である Caco-2 細胞が汎用されてきたが、これまでの我々の研究結果から、ヒト小腸オルガノイド由来の単層上皮細胞では Caco-2 細胞とは異なり、吸収上皮細胞以外にもパネート細胞や杯細胞などの重要な生理機能を有する細胞が含まれること、上皮細胞のタイトジャンクションを示す経上皮電気抵抗の値が Caco-2 細胞では高い一方、我々の単層上皮細胞では生理的に妥当な値を示すことを見出している^{7,8}。そのため、カイロミクロン分泌という正常な小腸上皮細胞で起こる生理的な代謝の分子機構を解明する上で、Caco-2 細胞よりもオルガノイド由来単層上皮細胞を用いたほうが望ましいと考えられる。実際に、Caco-2 細胞では脂質輸送能は低いことが指摘されている²。

本研究結果より、乳酸菌由来脂肪酸代謝産物がカイロミクロン分泌を抑制することが示唆された。この脂肪酸の作用点は未知であるが、一つの可能性として、脂肪酸の吸収上皮細胞への吸収を抑制することで乳酸菌自体が脂肪酸を利用しやすくしていることが推察される。乳酸菌は宿主が摂取した脂肪酸から今回用いたような様々な代謝産物を生産することが報告されており⁴、今後、それらのさらなる生理的役割の解明が待たれる。

6. 残された問題、今後の課題

乳酸菌由来脂肪酸代謝産物の処理により ApoB-48 のタンパク質分解が亢進することは見出されたが、その分子機構は不明である。また、この乳酸菌由来脂肪酸代謝産物が実際に生体内でカイロミクロン分泌を抑制し、血中脂質プロファイルを改善できる作用を持つかについても不明である。今後は、これらの課題を解決することで本脂肪酸代謝産物の生理作用の詳細が明らかになるとともに、ヒト小腸オルガノイドの有用性についても理解が深まることが期待される。

7. 謝辞

本研究を遂行するにあたって、(公財)東洋食品研究所から多大なるご支援を戴きました。関係者の皆様に感謝致します。

8. 参考文献

1. Ghadimi, Michael B. *et al.* Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrations. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000, **27**(2), p. 183-190.

PMID: 10612807; PubMed Central PMCID: PMC4721570.

2. Mehran, M. *et al.* Lipid, apolipoprotein, and lipoprotein synthesis and secretion during cellular differentiation in Caco-2 cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 1997, **33**(2), p. 118-128. doi: 10.1007/s11626-997-0032-3.
3. Kretzschmar, K.; Clevers, H. Organoids: Modeling Development and the Stem Cell Niche in a Dish. *Dev. Cell*, 2016, **38**(6), p. 590-600. doi: 10.1016/j.devcel.2016.08.014.
4. Kishino, S. *et al.* Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, **110**(44), p. 17808-17813. doi: 10.1073/pnas.1312937110.
5. Takahashi, Y. *et al.* A Refined Culture System for Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Intestinal Epithelial Organoids. *Stem Cell Reports*, 2018, **10**(1), p. 314-328. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.11.004.
6. Wang, S. *et al.* The microsomal triglyceride transfer protein facilitates assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins and decreases cotranslational degradation of apolipoprotein B in transfected COS-7 cells. *J. Biol. Chem.* 1996, **271**(24), p. 14124-14133. PubMed PMID: 8662886.
7. Artursson, P. *et al.* Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. *Pharm. Res.* 1993, **10**(8), 1123-1129. doi: 10.1023/a:1018903931777.
8. Takahashi, Y. *et al.* Reciprocal Inflammatory Signaling Between Intestinal Epithelial Cells and Adipocytes in the Absence of Immune Cells. *eBioMedicine*, 2017, **23**, p. 34-45. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.07.027.