

令和4年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 国際共同研究推進助成金
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
研究課題名	腸組織の発生・再生における細菌叢-幹細胞コミュニケーションの意義	
研究者所属・氏名	研究代表者： 近畿大学病院高度先端総合医療センター 再生医療部 寺村 岳士 共同研究者： 農学部応用生命化学科 倉田 淳志	

1. 研究目的・内容

ヒトの腸管内には膨大な数の細菌が存在しており、腸内細菌叢と呼ばれる共生システムを形成している。近年、腸内細菌叢は宿主組織・臓器と連絡し、発生・再生・疾病と深く関わることが明らかになってきた。一方、細菌叢-宿主間コミュニケーションを媒介する物質やその機序については殆ど分かっていない。我々は腸内細菌が産生する膜小胞(Membrane Vesicle: MV)に着目した。MVはタンパク質や核酸を含有する情報のコンテナであり、宿主血中にも検出されることがわかっている。

本研究では、宿主側の受容器官(細胞)として、間葉系幹細胞(MSC)と腸管上皮細胞に着目した。MSCは腸管組織をはじめ全身に分布しており、欠損組織の再生だけでなくサイトカインやエクソソームの分泌を介し広く情報を拡散させる機能も有している。腸管上皮細胞は細菌叢と近接した細胞でありながら、技術的問題により研究が困難であったが、近年iPS細胞を用いた腸管再現系(オルガノイド)が開発され、新たな展開を迎えている。本研究では、MVを介した細菌叢-宿主間コミュニケーションに対し、申請者の専門領域である幹細胞の高解像解析法やヒトiPS細胞を用いた臓器オルガノイド作成技術を用いてアプローチする。これにより、腸管を始めとした組織発生・再生における腸内細菌叢-宿主間コミュニケーションの意義を解明する。

2. 研究経過及び成果

腸内細菌が放出する膜小胞は宿主の免疫賦活作用を示すため、ワクチンアジュバントへの応用が期待されている。しかし膜小胞によって増強される免疫応答は不明であり、膜小胞による宿主細胞への作用機序も不明である。倉田らは、新たにスクリーニングした独自の膜小胞を対象に、抗体の産生誘導活性を担う物質の同定、膜小胞に対する腸管細胞層の応答や透過性の解明、細菌による膜小胞の形成・分泌機構の解明を進めてきた。これらの成果については、原著論文として報告している。当該年度は、*Lactiplantibacillus* 属細菌、*Bifidobacterium* 属細菌の膜小胞中のタンパク質に注目して、細胞外膜小胞特異的な蛍光色素や抗体を用いて、膜小胞や膜小胞画分に含まれるタンパク質による宿主細胞への作用機序と、これらによって惹起される細胞応答を明らかにした。さらに膜小胞の高生産条件を検討して、膜小胞高生産株の育種を試み、超高効率に経口投与用膜小胞の製造する方法を開発した。

一方、寺村は膜小胞の作用を明らかにするためのモデル開発を進めており、当該年度には腸管上皮をはじめとする多くの組織で幹細胞ニッチを構成する高未分化性間葉系幹細胞を同定し選択的に抽出する方法を開発した。寺村らは、再生組織では **Tgfb** シグナルと **TWIST1** の発現が一過的に生じることに着目し、**NET-CAGEseq** 解析を用いて両シグナルで誘導される細胞表面タンパク質を解析した。その結果、**LRRC15** タンパク質の発現によりニッチ構成に寄与しうる能力をもつ間葉系幹細胞を同定可能であることを発見した。この成果については海外専門誌に投稿し、掲載された。また、この **MSC** を用いて体外でオルガノイドを誘導できることを確認した (図1)。さらに、本研究を達成するため、腸管原器を含有するオルガノイドの開発を進め、マウス **ES** 細胞から三胚葉を含む原腸期オルガノイドを効率よく誘導する方法を開発した (図2)

現在、この2つの研究を統合し、膜小胞を作用させたオルガノイドにおける遺伝子発現の変化、腸管発生の変化を詳細に解析している。

図1. CellHD-256 と高未分化 MSC を用いたオルガノイド誘導

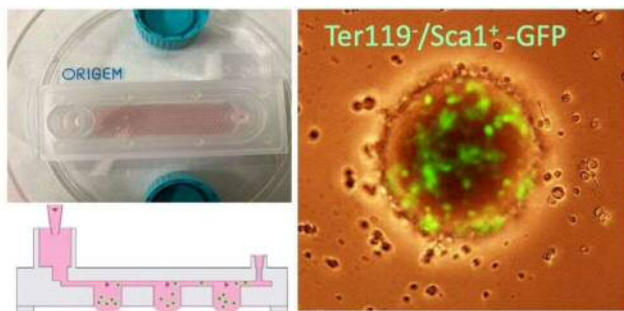
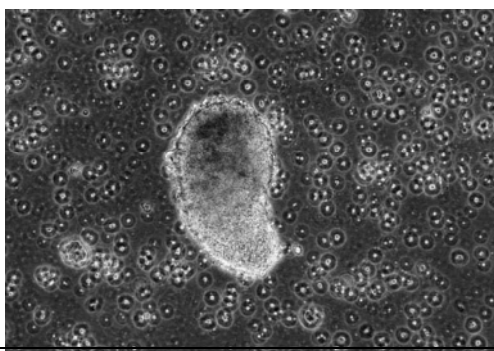


図2. マウス ES 細胞から誘導した原腸期オルガノイド



3. 本研究と関連した今後の研究計画

腸管細菌叢を構成する微生物からの膜小胞の高効率な合成・濃縮法が確立された。また、腸管の発生や動態を観察するための人工組織オルガノイドもほぼ使用可能な状態になっており、今後は両研究を統合し、宿主-微生物の連関と組織インテグリティの関連性についてモデル研究を進めていく。

また、導出を目的とした研究として、倉田らが合成、標識した膜小胞を用い、本学医学部（寺村）においてマウスへの経口投与と体内での挙動を観察する予定である。

いずれも学術的に新規性が高い試みであり、また、将来的にサプリメントや新規医薬品の開発に結びつく可能性のある、実学性の高い研究であると考えている。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類（著書・雑誌・口頭）	発表年月日（予定を含む）
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	雑誌	2023年1月
Scientific Reports	雑誌	2022年8月
iScience	雑誌	2023年5月