

ヒト細胞とブタ細胞外マトリックスから成る小腸モデルの開発

根 岸 淳*

Development of a Small Intestine Model Consisting of Human Cells and Porcine Extracellular Matrix

Jun NEGISHI*

Small intestine is composed of mucosal layer made of epithelial cells, submucosal layer made of various cells and extracellular matrix (ECM), muscular layer and serosa. Small intestinal epithelial cell models and model animals are used for food and small intestine research, but issues include reproducibility in areas other than the submucosa and species differences with humans. Therefore, new small intestine models are needed that include not only a mucosal layer composed of human small intestinal epithelial cells, but also small intestinal ECM and fibroblasts.

In this study, we created a small intestine model by introducing fibroblasts into decellularized porcine small intestine and seeding them with small intestinal epithelial cells. Fibroblasts were introduced into the decellularized porcine small intestine using a vacuum impregnation technique. Furthermore, by seeding human small intestinal epithelial cells using collagen gel, a villus-like small intestinal epithelial cell layer was formed on the surface of the decellularized porcine small intestine. Fibroblasts in the decellularized porcine small intestine increased the expression of transporter genes in small intestinal epithelial cells, establishing the basis for a small intestine model composed of small intestine-specific ECM and human cells.

1. 研究背景と目的

小腸は小腸上皮細胞からなる粘膜層、線維芽細胞などの細胞と細胞外マトリックス (ECM) からなる粘膜下層、筋層と漿膜で構成され、栄養吸収や免疫の役割を担っている。医薬品や食品の開発および小腸研究において、ヒト培養細胞モデルやモデル動物が利用されている。ヒト小腸上皮細胞の2次元培養モデルや3次元培養モデルは粘膜層の機能評価が可能だが、粘膜層以外が再現されていないことなどが課題である。また、モデル動物は小腸全体の評価ができるが、ヒトと動物の種間差や倫理面が課題となっている。以上から、ヒト小腸上皮細胞からなる粘膜層のみならず、小腸の ECM および線維芽細胞も有する新たな小腸モデルが必要とされている。

ヒトや動物の組織から免疫原となる細胞を除去した脱細胞化組織は、原料組織に特異的な ECM 組成や構造を有し、移植後にレシピエント細胞が浸潤することが報告されている。しかし、生体外で播種された細胞は脱細胞化組織に浸潤しにくいと、組織モデルなどへの応用は進んでいない。申請者の研究室では、金属や食品加工に使用されている含浸技術を多孔質材料への細胞導入に応用し、種々の多孔質材料内部まで細胞を到達させる技術を開発している⁽¹⁾。

本研究では、ヒトと組織のサイズや形状が類似しているブタから脱細胞化ブタ小腸を作製、含浸技術を用いて脱細胞化ブタ小腸への線維芽細胞導入を試みた。続いて、線維芽細胞を含有する脱細胞化ブタ小腸表面に小腸粘膜上皮細胞を播種、培養することで粘膜層

と小腸特異的ECMからなる小腸モデルの作製を目指した。また、作製した小腸モデルの機能評価を行い、小腸モデルとしての有用性の解明に取り組んだ。

ヒト小腸の構造		培養細胞モデル	モデル動物	本研究の小腸モデル
	粘膜層	ヒト小腸上皮細胞	マウスなど	脱細胞化ブタ小腸 + ヒト細胞
	筋層	ヒト粘膜層の評価 粘膜下層などがない	小腸全体の評価 ヒトとの種間差	ヒト粘膜層の評価 小腸特異的ECM

図1 ヒト小腸の構造と既存の小腸モデルおよび本研究の小腸モデルの特長。

2. 実験結果と考察

研究用ブタ小腸の粘膜層を取り除き、高静水圧印加と核酸分解酵素による洗浄を行い脱細胞化ブタ小腸を作製した。組織学的染色とDNA定量により、小腸ECM構造の維持とブタ細胞の除去を確認した。凍結乾燥した脱細胞化ブタ小腸に播種または真空含浸を用いて、線維芽細胞の導入を検討した。播種群では、脱細胞化ブタ小腸の表面に線維芽細胞に接着していたが、内部には線維芽細胞がほとんど観察されなかった。一方、真空含浸群では、脱細胞化ブタ小腸の内部に線維芽細胞が認められ、また、経時的な線維芽細胞の増殖が確認された。凍結乾燥した脱細胞化ブタ小腸は密な構造を有していたため、播種では細胞懸濁液が脱細胞化ブタ小腸内の空気に阻害され内部まで浸透しなかったと考えられる。真空含浸では、凍結バイアル内に真空密栓した脱細胞化ブタ小腸に細胞懸濁液を接触させたため、空気の阻害を受けずに線維芽細胞が脱細胞化ブタ小腸内部まで浸潤したと考えられる。

真空含浸を用いて線維芽細胞を導入した脱細胞化ブタ小腸表面にヒト小腸上皮細胞を播種し、一定期間培養することで粘膜層の形成を検討した。培地を用いた播種では、脱細胞化ブタ小腸への小腸上皮細胞の接着が確認されたが、積層化や柔毛様形態の形成は認められなかった。柔毛様形態の形成のため、コラーゲン溶液に小腸上皮細胞を混合して脱細胞化ブタ小腸に播種、コラーゲンをゲル化させて一定期間培養した⁽²⁾。組織学的染色により、脱細胞化ブタ小腸表面に柔毛様形態のヒト小腸上皮細胞が観察され、ヒト細胞と脱細胞化ブタ小腸からなる小腸モデルの作製が確認された。

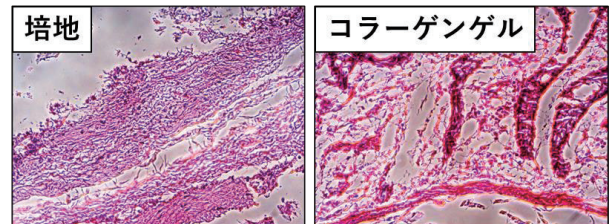


図2 培地またはコラーゲンゲル播種した小腸上皮細胞。

作製した小腸モデルにビタミン D3 を添加、トランスポーターの遺伝子発現量を解析した。線維芽細胞を含まない脱細胞化ブタ小腸と小腸上皮細胞の群と比較し、線維芽細胞を含んだ小腸モデルで遺伝子発現量が高くなった。しかし、線維芽細胞と共培養した小腸上皮細胞と比べると発現量は低かった。線維芽細胞との共培養により小腸上皮細胞の輸送関連遺伝子の発現が上昇することが報告されており⁽³⁾、小腸モデルでも線維芽細胞により遺伝子発現が上昇したが、ECMが小腸上皮細胞と線維芽細胞の相互作用を阻害したため、共培養系より発現量が低くなったと考えられる。

3. 今後の展望

本研究により、脱細胞化ブタ小腸とヒト細胞からなる小腸モデルの基盤が確立され、線維芽細胞と小腸上皮細胞の相互作用も再現可能なことが見出された。今後は、線維芽細胞の含有量の制御、リンパ球などの免疫関連細胞の導入および腸内細菌叢との併用などを検討し、幅広い評価系への応用が期待できる小腸モデルの開発に取り組む。

本研究の成果は新たな小腸モデルのみならず、小腸特異的ECMの細胞への影響や小腸機能への影響の解析にも応用が可能であり、生体組織の機能解明に向けた知見獲得への貢献も期待できる。

4. 謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご支援を賜りました公益財団法人豊田理化学研究所に心より感謝を申し上げます。

REFERENCES

- 1) K. Yanagisawa, *et al.*, *Tissue Eng Part C Method*, **26** (2020) 608-616.
- 2) N. Sachs, *et al.*, *Development*, **144** (2017) 1107-1112.
- 3) P. Simon-Assmann, *et al.*, *Cell Biol. Toxicol.*, **23** (2007) 241-256.