

バイオ材料工学技術による再生腸組織の作製

土 戸 優 志

1 はじめに

医薬品開発などの安全性評価では、臨床試験における被験者への危険を低減させる目的で、その有効性や安全性が未知である化合物をヒトに投与する前に、動物実験で評価・判断を行っている。動物福祉・倫理的な観点から、これらの動物実験を代替する方法の開発が社会的に強く求められており、化粧品分野では既に動物実験が禁止されている国が数多く存在している。このような中、医薬品開発においても生体模倣システム（MPS）や人工知能（AI）のような先端技術を組み合わせた新たな安全性試験を考えていく新しいアプローチや方法論（new approach methodologies, NAMs）を実現する取り組みが進められている¹⁾。動物の苦痛軽減や使用する動物数の削減が進められているものの、データの信頼性を担保するために、今もなお一定の動物実験が必要とされている。このような背景から、これらの評価の代替となるようなモデル再生組織の開発が近年大きな注目を集めている。本稿では、消化管、特に腸に着目した再生組織の開発動向について叙述する。

2 小腸の構造と生理学的機能

小腸は胃と大腸の間に位置する消化器官であり、ヒトの健康や生理的機能に対して非常に重要な機能を果たしている。小腸は体の中の臓器で最も長く、ヒトでは6～7 m、直径は2～3 cmである。小腸は胃側から順に十二

指腸・空腸・回腸の3領域に分類される。十二指腸が最も短い約25 cmで、胃の幽門から続いている。続いて口側のおよそ2/5が空腸、残りの3/5が回腸とされており、空腸と回腸には明確な解剖学的境界は存在せず、回盲括約筋のところで大腸と連結している。小腸壁は他の消化管と同様に4層構造になっており、管腔側から順に粘膜、粘膜下層、筋層、漿膜からなっている。小腸の粘膜表面には輪上のひだがあり、そのひだには絨毛（villi）とよばれる無数の突起が存在する（図1）。絨毛は上皮細胞が単層に連なって形成されており、その内部の粘膜固有層には毛細血管やリンパ管などが張り巡らされている。さらに、上皮細胞の表層には微絨毛（microvilli）と呼ばれる、電子顕微鏡で観察できる小さな突起が無数に存在している。小腸の表面積はこのような複雑な立体構造によって著しく増加しており、腸管腔を円筒と仮定した場合の表面積の約600倍に達していると言われている。

このように、腸管の内腔と外側とで生物学的・機械的・化学的な差異をもつ、不均一で複雑な構造を有する中空臓器である小腸は、口から取り込まれた食物を分解して栄養素や水の吸収を行っており、栄養素は約9割が小腸で吸収される。また、代謝や免疫システムの向上性の維持、消化酵素やホルモンなどを分泌している。生理条件下では、腸壁の筋層が腸壁に沿って波状に収縮・弛緩することにより、血管拡張や血管収縮がおき、管腔内の腸液もリズムカルに蠕動運動する。また、腸内に共

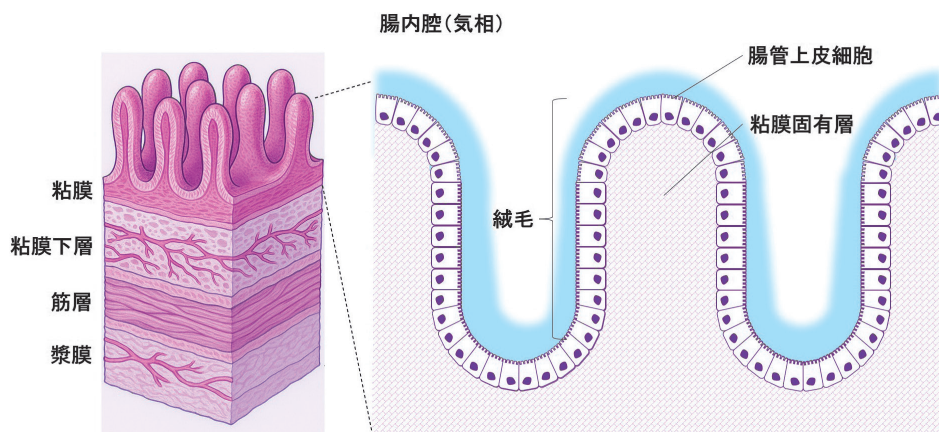


図1 腸の構造

生する細菌の酸素消費により、腸は胃から大腸への管腔内酸素濃度勾配が存在する。このような腸管の複雑な構造や生理学的機能が何らかの要因でその恒常性が崩れると、様々な腸疾患を引き起こすことがわかっている。例えば、腸の炎症は蠕動収縮の抑制を引き起こす可能性があり、腸の偽閉塞をもたらす。また、通常の腸管上皮細胞は、酸素分圧が動的に変化するなかで機能しているが、炎症性腸疾患（IBD）では、その機能が調節不全となっている。このように、疾患の病態解明や創薬、治療法開発のためにヒト腸管を人工的なモデルで再現することは非常に大きな意義があり、生体内での微小環境の性質を再現することが重要である。

3 オルガノイド

腸の機能を人工的に再現する手段として、3次元腸モデルの一つであるオルガノイドが注目されている。腸のオルガノイドは、多能性幹細胞やヒトやマウスの陰窩から採取した腸幹細胞に成長因子を加えて培養することによって作製できる。2009年にSatoらによって、マウス小腸のLgr5陽性幹細胞が、マトリゲル中でWnt3a, Noggin, R-spondin1の添加によって自己組織的に腸管構造を形成することが報告された¹⁾。これは、自己複製しながら間葉系細胞を用いることなしに腸絨毛様構造の形成に成功した点が画期的な点であった。また、Satoらは2011年にヒト腸上皮由来のオルガノイドが長期にわたり維持可能であることを実証した²⁾。同年にSpenceらは、ヒトES/iPS細胞から腸管前駆細胞への分化誘導に成功し、腸オルガノイドを作製した³⁾。これらの報告を皮切りに、ヒトの腸オルガノイドを用いた疾患モデリングや創薬への応用研究が進んでいった。例えば、van de Weteringらは、個別化医療の基盤技術となる、大腸がん患者由来の腸オルガノイドのライブラリ（biobank）を構築し、それを用いて薬剤スクリーニングを行った⁴⁾。さらに、近年では腸オルガノイドとの共培養による研究や再生医療への応用展開が進んでおり、Puschhofらは、腸がんオルガノイドと免疫細胞を共培養にすることによって、PD-1阻害剤に対する免疫応答を評価することに成功した⁵⁾。Sugimotoらは、ヒト腸オルガノイドをマウスの傷害部位に移植して再上皮化し、腸粘膜再建の

実証を行い、再生医療や炎症性腸疾患の新規治療戦略として期待し得る結果を示した⁶⁾。

腸オルガノイドの研究動向についてまとめたものを以下に示した（表1）。腸オルガノイドの研究において、上皮の周辺組織との相互作用の再現が不十分であることが今もなお課題として残されている⁷⁾。腸内細菌との相互作用を再現するために、マイクロインジェクションを利用したり⁷⁾、極性を反転させた腸オルガノイド（頂端側が外向き）を使用することによる研究も進められているが⁸⁾、オルガノイド内部の分析や薬剤の吸収性評価が困難であることが課題である^{7)~9)}。加えて、形態と機能を制御するための操作が複雑であり、人的・金銭的なコストがかかる点で課題が残されている⁷⁾⁹⁾。

4 マイクロ流体デバイス

近年、半導体加工技術のmicro electro mechanical system（MEMS）技術を用いて、作製した微小空間の中で生体環境を再現した、臓器チップ（organ-on-a-chip）の研究が注目を集めている。チップの流路に培地を連続的に流しながら培養する灌流培養を行うことによって、組織構造を模倣したモデルを作製できると考えられており、腸においてもMEMS技術を用いた腸管チップの開発が進んでいる。

初期のGut-on-a-Chipデバイスとして、Kimらは、ヒト結腸がん由来腸管上皮細胞（Caco-2細胞）を多孔質ポリジメチルシロキサン（PDMS）膜上で培養することによって、せん断応力と周期的な伸縮刺激を再現した臓器チップを報告している¹⁰⁾¹¹⁾。Kasendraらは、ヒト小腸オルガノイドを解離してPDMS製チップに播種し、栄養吸収やバリア機能、分化マーカーが生理的に近い挙動を示すことを明らかにし¹²⁾、Delonらは、マイクロ流体環境に応じたせん断応力を加えることによって、Caco-2細胞の表現型や機能の変化、粘液産生が変化することを明らかにし、Caco-2細胞がせん断応力への感受性が高いことを報告している¹³⁾。近年では、Gazzanigaらが微細加工技術によってマイクロ構造を作製したチップ内で腸絨毛の立体的形成に成功しており、腸の形態形成過程を*in vitro*で精密に再現可能にした点で画期的な成果を報告している¹⁴⁾。さらに、腸管チップをヒト肝細胞と接続することによって、小腸から肝臓への薬物動態も再現

表1 腸オルガノイド研究の研究動向

時期	主要進展	キーワード
2009年以前	幹細胞の同定	Lgr5陽性幹細胞
2010年代初頭	3Dオルガノイドの確立	マトリゲル, Wntシグナル, 自己組織化
2015年以降	疾患モデル・バイオバンク	がんオルガノイド, 個別化医療
2020年代	共培養・免疫・再建	マイクロバイオーム, 免疫共培養, 移植応用

表2 マイクロ流体デバイスによる腸組織モデルの研究動向

時期	主要進展	キーワード
2010年代初頭	Gut-on-a-Chipの基盤確立	Caco-2, せん断応力, 微生物共培養
2015年以降	オルガノイド融合・複雑系	Organoid-on-a-Chip, 患者由来細胞
2020年代	多細胞系, 再生医療, 多細胞	絨毛形成, 免疫細胞, 肝との連携, AIとの統合

する研究も進んでおり¹⁵⁾，薬物代謝，吸収評価への応用展開が進められている。

マイクロ流体デバイスによる腸組織モデルの研究動向についてまとめたものを以下に示した（表2）。

5 セルカルチャーインサート

セルカルチャーインサートは半透明の多孔質膜からなる頂端面側と，通常のディッシュである基底面側の二つのコンパートメントから構成される培養基材である（図2）。*in vitro*における薬物の透過試験や食品の吸収性評価にも使用され，最も一般的に用いられている。セルカルチャーインサートの一般的な多孔質膜の孔サイズは0.4～1 μm ，孔の密度は $4 \times 10^6 \text{ pores cm}^{-2}$ 程度である。セルカルチャーインサートの多孔質膜上に，Caco-2細胞を播種して21日間培養することによって，単層の腸上皮組織が形成され，タイトジャンクションや微絨毛の形成がみられる。この組織に対して頂端面側に目的物質を加え，基底面側のコンパートメントに漏れ出た量を測定することにより，物質の透過性を測定することができる¹⁶⁾。

しかし，Caco-2細胞に発現するトランスポーターは培養日数や培養条件により変化し，発現するトランスポーターの数が生体に比べて少ないとされている¹⁷⁾。そのため，セルカルチャーインサートによる腸組織モデルは，受動輸送される物質に対してはヒトと高い相関関係があるものの，吸収/排泄トランスポーターを介して能動輸送される物質に対しては，相関性が低いとされている。

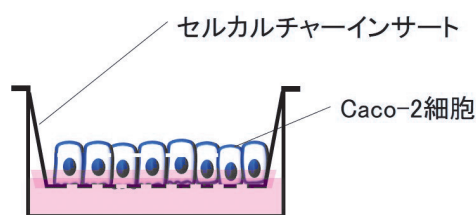


図2 セルカルチャーインサートの構造

る。また，セルカルチャーインサートによる腸組織モデルは，絨毛や陰窩の構造がなく，生体と比較して粘液産生が少ない，免疫機能がないという特徴がある。加えて，生体と比較すると薬物代謝酵素の活性が低いため，バイオアベイラビリティの違いがある点が課題である。生体の腸では上皮が絨毛-陰窩軸に沿って組織を形成して周辺組織と複雑に相互作用しており，平面モデルではそれらの相互作用の再現は難しい¹⁶⁾¹⁸⁾。

そこで近年，生体では腸管上皮細胞は頂端側が気相に接している点に着目し，細胞の基底側が培地に，頂端側が空気に接しているという気液界面培養（air-liquid interface culture, ALI culture）が注目を集めている。気液界面培養は，一般的にセルカルチャーインサートなどの多孔質膜の上に細胞を播種し，下側から培地を供給することで，上側は気相に，下側は液相に接する状態を保つことによって，生体内での上皮組織の環境を模倣している。この培養法は，細胞への酸素供給が液内培養に比べて促進されることで知られている。Antunesらは腸上皮細胞をセルカルチャーインサートに播種し，従来の液内培養と気液界面培養を比較し，腸上皮モデルとしての性能を評価した¹⁹⁾。電子顕微鏡観察によって気液界面培養でより微絨毛が発達し，腸上皮に類似した形態を示した。また，免疫染色によってタイトジャンクションのマーカーであるZO-1, Claudin-1, Occludinの免疫染色によって気液界面培養での発現が明確に増加していることが分かった。また，TEER値が気液界面培養によって有意に増加し，バリア機能が向上していることが分かった。このように，従来法で作製した腸組織モデルに比べて気液界面培養による方法で作製すると，腸管上皮細胞の形態や機能が促進されることがわかっている。

6 二層基材

これまでに，動物実験の代替法として様々な手法によって腸モデル組織の開発が進められていることを述べてきた。これらの手法で作製されたモデル組織は，生体と異なる構造であったり，機能面で不十分であったり，

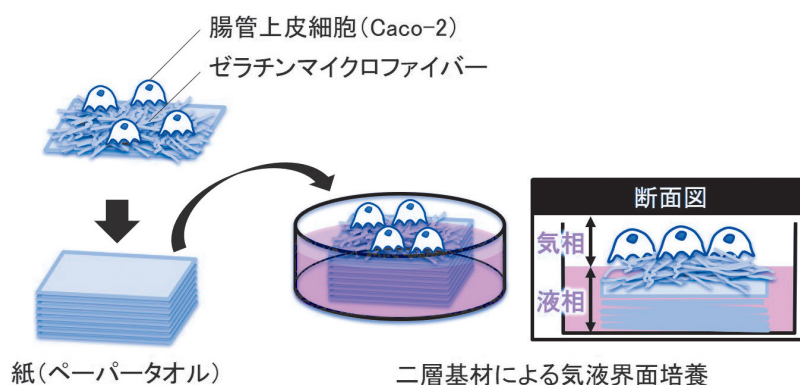


図3 二層基材の構造

それぞれの手法で解決すべき課題が残されている。モデル組織の作製には、生体環境を模倣した方法で作製することが有効であり、灌流や伸縮などの物理的刺激を負荷する培養法が広く試みられてきた。その中で、生体において腸管上皮細胞が気相に接する環境下にあることに着目し、気液界面培養法による腸モデル組織作製を進めてきた。Caco-2 細胞の培養足場材料として、細胞接着層および培養層として利用するゼラチンマイクロファイバーを、培地保持および灌流層として機能する紙にエレクトロスピンニングした二層構造の培養基材を作製した(図3)²⁰⁾。この二層基材は、使用時に任意の適切な大きさに切断することができることが特徴である。先に述べたように、Caco-2 細胞の頂端側が空気にさらされ、基底側が培地に接する気液界面培養は、腸管腔表面の環境をよく模倣することができ、より生体に近い人工腸組織を作製するのに適していると考えられる。

二層培養基材の下層として、市販の紙(ペーパータオル)を用い、その高い吸水力により培地の保持と細胞底面からの培地供給の実現を狙った。また、細胞接着の場として、細胞接着にかかわるアミノ酸配列として知られている RGD (アルギニン(R)-グリシン(G)-アスパラギン酸(D)) 配列を有する生体由来のゼラチンをマイクロファイバー化して紙の上に紡糸することによって、細胞接着性と細胞への通液性を付与した。エレクトロスピンニング法により、直径がマイクロメートルオーダーのゼラチンファイバーをドラムコレクターへ巻きつけた紙に対して紡糸し、グルタルアルデヒドの蒸気に一定時間曝露後、熱処理して架橋することによってファイバーを不溶化させて二層培養基材を作製した。培養液中に浸漬させたこの基材を、経時変化観察することによって安定性を評価したところ、細胞培養条件下においてもファイバーの径や形態の大きな変化は見られず、二層培養基材は長期間安定であった。そこで、二層培養基材に Caco-2 細胞を播種して通常の液内培養を一定期間行って細胞を接着させたのち、折り重ねて培地を含浸させた紙上に二層基材を設置して気液界面培養を行った。10~12 日間培養した Caco-2 細胞について、形成した腸組織の形態や上皮細胞特有のタイトジャンクションと微絨毛の形成の有無、アミノペプチダーゼ (ANPEP) や薬物代謝酵素 (CYP3A4) 活性、腸組織の粘液産生量などの機能面を評価した。まず、作製した腸組織について顕微鏡観察したところ、気液界面培養においてのみ、小腸特有の絨毛構造様の三次元構造(高さ約 60 μm) を形成していることがわかった。この三次元構造を形成した Caco-2 細胞は、腸管上皮細胞に分化したことを示す微絨毛やタイトジャンクションを形成し、従来法で作製した腸組織の系と同等の ANPEP 活性や CYP3A4 活性を示した。また、作製した腸組織が産生した粘液をアルシアンブルー色素を用いて染色し、色の三要素である HSV (色相 (Hue)・彩

度 (Saturation)・明度 (Value)) を用いた画像解析を行い、粘液産生量の定量化を試みた。その結果、興味深いことに、従来法である液内培養で作製した二次元組織では微量であった粘液の分泌が、気液界面培養で作製した三次元組織では 3 倍程度促進されていることがわかった。これは、二層培養基材の下層である紙による毛細管現象によって細胞下層から十分量の培地を安定に供給し、生体を模倣した気液界面環境を構築できていたために達成できたと考えている。以上より、二層基材を用いた気液界面培養法により、生体を模倣した腸モデル組織を構築することができ、さらなる応用展開が期待できる。

7 おわりに

本稿では、再生腸組織の作製に関する研究動向をまとめて紹介した。人工的に作製した再生腸組織は、動物実験と比較すると概して個体差が小さいため、倫理的問題やコスト面での問題解決だけでなく、データの再現性・信頼性の向上も見込まれる。そのため、薬学、栄養学、生物学などの研究の基盤となるツールとして今後の応用展開が大いに期待できる。

文 献

- 1) T. Sato, R. G. Vries, H. J. Snippert, M. V. D. Wetering, N. Barker, D. E. Stange, J. H. V. Es, A. Abo, P. Kujala, P. J. Peters, H. Clevers : *Nature*, **459**, 262 (2009).
- 2) T. Sato, D. E. Stange, M. Ferrante, R. G. J. Vries, J. H. V. Es, S. V. D. Brink, W. J. V. Houdt, A. Pronk, J. V. Gorp, P. D. Siersema, H. Clevers : *Gastroenterology*, **141**, 1762 (2011).
- 3) J. R. Spence, C. N. Mayhew, S. A. Rankin, M. F. Kuhar, J. E. Vallance, K. Tolle, E. E. Hoskins, V. V. Kalinichenko, S. I. Wells, A. M. Zorn, N. F. Shroyer, J. M. Wells : *Nature*, **470**, 105 (2011).
- 4) M. V. D. Wetering, H. E. Francies, J. M. Francis, G. Bounova, F. Iorio, A. Pronk, W. V. Houdt, J. V. Gorp, A. T. Weiner, L. Kester, A. M.-Douglas, J. Blokke, S. Jaksani, S. Bartfeld, R. Volckman, P. V. Sluis, V. S. W. Li, S. Seepo, C. S. Pedamallu, K. Cibulskis, S. L. Carter, A. McKenna, M. S. Lawrence, L. Lichtenstein, C. Stewart, J. Koster, R. Versteeg, A. V. Oudenaarden, J. S.-Rodriguez, R. G. J. Vries, G. Getz, L. Wessels, M. R. Stratton, U. McDermott, M. Meyerson, M. J. Garnett, H. Clevers : *Cell*, **161**, 933 (2015).
- 5) V. Koh, J. Chakrabarti, M. Torvund, N. Steele, J. A. Hawkins, Y. Ito, J. Wang, M. A. Helmrath, J. L. Merchant, S. A. Ahmed, A. Shabbir, J. B. Y. So, W. P. Yong, Y. Zavros : *Cancer Letters*, **518**, 59 (2021).
- 6) S. Sugimoto, Y. Ohta, M. Fujii, M. Matano, M. Shimokawa, K. Nanki, S. Date, S. Nishikori, Y. Nakazato, T. Nakamura, T. Kanai, T. Sato : *Cell Stem Cell*, **22**, 171 (2018).
- 7) T. Nakamura : *International Immunology*, **31**, 13 (2019).
- 8) J. Y. Co, M. M.-Català, X. Li, A. T. Mah, C. J. Kuo, D. M. Monack, M. R. Amieva : *Cell reports*, **26**, 2509 (2019).
- 9) F. Perrone, M. Zilbauer : *Exp. Mol. Med.*, **53**, 1451 (2021).
- 10) H. J. Kim, D. Huh, G. Hamilton, D. E. Ingber : *Lab on a Chip*, **12**, 2165 (2012).
- 11) H. J. Kim, D. E. Ingber : *Integrative Biology (Camb)*, **5**, 1130 (2013).

- 12) M. Kasendra, A. Tovaglieri, A. S.-Phelps, S. J.-Firoozinezhad, A. Bein, A. Chalkiadaki, W. Scholl, C. Zhang, H. Rickner, C. A. Richmond, H. Li, D. T. Breault, D. E. Ingber : *Scientific Reports*, **8**, 2871 (2018).
- 13) L. C. Delon, Z. Guo, A. Oszmiana, C.-C. Chien, R. Gibson, C. Prestidge, B. Thierry : *Biomaterials*, **225**, 119521 (2019).
- 14) S. J.-Firoozinezhad, F. S. Gazzaniga, E. L. Calamari, D. M. Camacho, C. W. Fadel, A. Bein, B. Swenor, B. Nestor, M. J. Cronce, A. Tovaglieri, O. Levy, K. E. Gregory, D. T. Breault, J. M. S. Cabral, D. L. Kasper, R. Novak, D. E. Ingber : *Nat. Biomed. Eng.*, **3**, 520 (2019).
- 15) J. Yang, Y. Hirai, K. Iida, S. Ito, M. Trumm, S. Terada, R. Sakai, T. Tsuchiya, O. Tabata, K. Kamei : *Communications Biology*, **6**, 310 (2023).
- 16) X. Ding, X. Hu, Y. Chen, J. Xie, M. Ying, Y. Wang, Q. Yu : *Trends in Food Science & Technology*, **107**, 455 (2021).
- 17) I. J. Hidalgo, J. Li : *Adv. Drug Delivery Rev.*, **22**, 53 (1996).
- 18) P.-A. Billat, E. Roger, S. Faure : *Drug Discovery Today*, **22**, 761 (2017).
- 19) C. Nossol, A.-K. Diesing, N. Walk, H. F.-Zuschratter, R. Hartig, A. Post, J. Kluess, H.-J. Rothkötter, S. Kahlert : *Histochem. Cell Biol.*, **136**, 103 (2011).
- 20) M. Nagasawa, M. Onuki, N. Imoto, K. Tanaka, R. Tanaka, M. Kawada, K. Imato, K. Iitani, Y. Tsuchido, N. Takeda : *Biofabrication*, **16**, 035029 (2024).



土戸 優志 (TSUCHIDO Yuji)

芝浦工業大学 SIT 総合研究所 (〒337-8570 埼玉県さいたま市見沼区深作 307).
東京医科歯科大学大学院生命情報科学教育部高次生命科学専攻 博士 (理学). 《現在の研究テーマ》分子認識, 細菌と相互作用する生体組織・材料に関する研究.

E-mail : tsuchido@shibaura-it.ac.jp

原 稿 募 集

創案と開発欄の原稿を募集しています

内容：新しい分析方法・技術を創案したときの着想, 新しい発見のきっかけ, 新装置開発上の苦心と問題点解決の経緯などを述べたもの。但し, 他誌に未発表のものに限ります。

執筆上の注意：1) 会員の研究活動, 技術の展開に参考になるよう, 体験をなるべく具体的に述べる。物語風でもよい。2) 従来の分析方法や装置の問題点に触れ, 記事中の創案や開発の意義, すなわち主題の背景を分かりやすく説明する。3) 図や

表, 当時のスケッチなどを用いて理解しやすくすることが望ましい。4) 原稿は図表を含めて 4000 ~ 8000 字 (図・表は 1 枚 500 字に換算) とする。

◇採用の可否は編集委員会にご一任ください。原稿の送付および問い合わせは下記へお願いします。

〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2

五反田サンハイツ 304 号

(公社)日本分析化学会「ぶんせき」編集委員会

[E-mail : bunseki@jsac.or.jp]