

論文審査の要旨及び担当者

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	杉 本 真 也
論文審査担当者	主 査	内科学	金 井 隆 典	
	生理学	岡 野 栄 之	病理学	坂 元 亨 宇
	微生物学・免疫学	本 田 賢 也		
学力確認担当者：			審査委員長：岡野 栄之	
			試問日：平成30年 1月31日	
(論 文 審 査 の 要 旨)				
論文題名：Reconstruction of the Human Colon Epithelium <i>In Vivo</i> (生体内でのヒト大腸上皮の再構築)				
<p>本研究では、ヒトの腸管上皮幹細胞（オルガノイド）を免疫不全マウスの腸内へ同所異種移植する技術を確立し、ヒト大腸上皮構造をマウス腸管内で再構築することに成功した。CRISPR-Cas9を用いた遺伝子改変技術により細胞系譜を目的に作成したLGR5-CreER/rainbowオルガノイドの移植によって、これまで実験手法の制約から不可能であったヒト大腸上皮幹細胞の遺伝学的細胞系譜解析を達成し、ヒトLGR5陽性細胞が生体内で幹細胞として機能することを実証した。</p> <p>審査では、オルガノイド移植方法と組織修復動態について問われた。移植細胞としては単一幹細胞ではなくオルガノイドの細胞塊を用い、オルガノイドが障害粘膜に接着して表面を覆った後に陰窩が形成されていくと回答された。また、マウス陰窩底部が残存する部位では競合により移植したヒト幹細胞が排除されてしまうため、完全なマウス上皮の除去を目指してEDTAによる粘膜剥脱モデルを開発したと回答された。マウス腸内で再構築したヒト陰窩がマウス陰窩よりも大きい理由を問われ、環境因子の影響の他、幹細胞内在性のプログラムにより規定されるものであると回答された。さらに、ヒト陰窩とマウス陰窩の境界については、両種の細胞の大きさは異なるもののH&E染色で接合部の明瞭な境界が識別困難なほどスムーズであったと回答された。LGR5陽性細胞の増殖率について問われ、LGR5陽性細胞にも増殖細胞と静止細胞があること、ヒト手術標本と移植片が同様の結果であったことから、生体内ではヒトLGR5陽性細胞のKi67陽性率は20-30%程度とマウスに比して有意に低いものであると回答された。そのマウスとヒトの幹細胞増殖の差異の要因について問われ、ヒトのオルガノイドに<i>in vitro</i>でニッチ因子を添加するとLGR5陽性細胞は高い増殖能を示すようになる一方で、ニッチ因子の除去によって増殖能の低下を示すことから、ニッチ因子感受性の種差によるものと推測されると回答された。</p> <p>今後の展望として小腸の粘膜剥脱を行えないか問われ、本手法は経肛門アプローチのため困難だが、臨床的意義の大きな短腸症候群などの小腸疾患への応用を目指し、手術を組み合わせた小腸粘膜剥脱モデルを新たに開発中であると回答された。また、LGR5陽性幹細胞の詳細な挙動解析について問われ、<i>in vivo</i> live imagingのセッティングや、LGR5陽性細胞の特異的殺傷の検討を行っているとは回答された。ヒト腸管上皮と腸内細菌の相互作用の検討を行えないか問われ、腸内細菌が上皮に与える影響をRNAseq解析することは実験手法的に可能と思われるかと回答された。</p> <p>以上、本研究は今後さらに検討すべき課題は残されているものの、ヒトの上皮構造を生体内で構築することでヒト上皮特異的な検討を可能とする新たな研究領域を開拓した点、ヒトとマウスの上皮の差異を示唆する知見を提供した点において、有意義な研究であると評価された。</p>				