

論文審査の要旨及び担当者

報告番号	(甲) 乙 第	号	氏 名	石 渡 景 子
論文審査担当者	主 査	内科学	金 井 隆 典	
分子生物学	塩 見 春 彦	内科学	矢 作 直 久	
生理学	岡 野 栄 之			
学力確認担当者 :			審査委員長 : 塩見 春彦	
			試問日 : 2023年 1月13日	
(論 文 審 査 の 要 旨)				
論文題名 : Identification of Quiescent LGR5 ⁺ Stem Cells in the Human Colon (ヒト大腸における静止期LGR5 ⁺ 幹細胞の同定)				
<p>本研究では、遺伝子改変技術を用いたヒトオルガノイドのマウス大腸への同所移植を用いて、休止期LGR5⁺細胞を観察し、細胞系譜解析により定常時、傷害再生時の幹細胞性を実証した。マウスLgr5⁺細胞は増殖が速く傷害で死滅し、脱分化が起こりやすいが、ヒトLGR5⁺細胞は増殖が遅く傷害に耐性があり、再生時に増殖が速くなり脱分化は起こりにくいことを示した。</p> <p>審査ではマウス腸管幹細胞の歴史と最新知見につき問われた。昔は、Label Retaining Cell (LRC; 蛍光標識が長期維持される分裂が遅い細胞) が陰窩最底部から4番目の位置に存在し幹細胞と考えられていたが、その後、細胞系譜解析により陰窩最底部の増殖が速いLgr5⁺細胞が真の幹細胞であることが実証された。マウスLRCは定常時にはやや分化し幹細胞性はないが、傷害でLgr5⁺幹細胞死滅時のみ、その機能を補填しクローン増殖を起こし、脱分化すると回答された。p27レポーターの導入がクローナルか問われ、Ki67と相反して染色され、EGFR inhibitorの添加でp27発現が増加するクローンを選定したと説明された。split-Creの薬剤投与間隔が適切か問われ、休止期LGR5⁺細胞の標識には2剤の投与間隔を十分にあげるのが理想で、in vitro live imagingにて4日間隔をあけ、その後数日単一細胞で存在したクローンを選定したが、大腸同所移植では同間隔にて組み換わらず、間隔の短縮に至ったと回答された。最終投薬3日後において標識細胞は単一細胞であり、休止期LGR5⁺Ki67⁺細胞であったと回答された。続いてTGFβシグナルがオルガノイド維持に必要なか、また、TGFβリガンドの供給源につき問われた。マウス培養ではTGFβR inhibitorが必ずしも必要ないが、ヒトでは必須であると回答された。また、1細胞RNAseq解析では、マウスとヒトいずれも血管内皮細胞からTGFβリガンドが供給されていたが、生物種が異なるため発現量の差は比較困難であり、in vitro実験から種の感受性の差異である可能性を説明された。一方、TGFβR2ノックアウト細胞のマウス同所移植にてLGR5⁺細胞の増殖率上昇が認められたため、間質だけでなく上皮内制御も考えられると回答された。ヒトの脱分化制御機構を問われ、LGR5⁺細胞の死滅によるニッチの空白化が最重要と考えるが、何らかのシグナルが脱分化を制御している可能性も説明された。同所移植の生着効率上昇のため、休止期を人為的に増殖させる方法はあるか問われ、移植前の細胞培養では増殖ニッチ因子を最大限に添加しているため、更なる増殖の活性化は現状では困難と回答された。</p> <p>以上、本研究は、ヒト正常大腸休止期幹細胞の機能解析、可塑性を実証した初めての成果であり、休止期幹細胞の再生時の重要性を示した有意義な研究であると評価された。</p>				