

# 論文内容の要旨

申請者氏名 TRINH THI THUY LINH

ヘリコバクター・ピロリ菌の感染は、胃炎や胃潰瘍を引き起こすことが報告されている。ピロリ菌の病原因子の一つとして細胞毒素関連遺伝子 A (CagA) が知られている。本研究では、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) を分化誘導して成熟した胃組織 (胃オルガノイド) を作製した。さらにこの胃オルガノイドで CagA 遺伝子を過剰発現させ、ピロリ菌病原因子依存的な胃疾患モデルを作製し、CagA 依存的な胃の病態形成の過程を解析した。具体的には、先行研究で報告された胃オルガノイド分化条件を改良し、新たに最適化した条件を用いて ES 細胞を内胚葉、胃前駆組織、成熟胃オルガノイドへと順次分化させた後、Tet-off 発現誘導系で CagA を過剰発現させ、CagA が胃オルガノイドの各種構成細胞に及ぼす影響を種々の細胞特異的マーカータンパク質の免疫染色により解析した。

マウス ES 細胞を用いた内胚葉から胃前駆組織への分化方法に関しては、FGF4、CHIR99021、LDN193189、レチノイン酸を組み合わせることで、胃前駆細胞マーカーである Sox2 が特異的に発現誘導され、腸の前駆細胞マーカーである Cdx2 の発現が抑制されることを確認した。さらにこのオルガノイドを成熟分化させることで単層の胃上皮細胞が多層の間葉系細胞に囲まれた腺構造を有する胃オルガノイドを作製した。これらの上皮細胞には、表層粘液細胞やホルモンを産生する内分泌細胞、頸部粘液細胞、および増殖性の頸部前駆細胞が含まれていることを免疫蛍光染色により確認した。さらに、この胃オルガノイドで CagA を過剰発現させると、DNA 二本鎖切断や細胞増殖抑制、粘液分泌細胞への分化促進、および上皮細胞の伸長現象が観察された。

本胃オルガノイドで観察された CagA 発現による胃上皮細胞の細胞増殖抑制や粘液分泌細胞の分化促進は、ピロリ菌感染に伴う萎縮性胃炎の初期表現型を部分的に模倣していると考えられた。なお、CagA 過剰発現による胃上皮細胞増殖の抑制は、先行研究でも観察されており、DNA 二本鎖切断に伴う細胞周期停止である可能性が考えられる。一方、特筆すべき新たな発見として、CagA の過剰発現により胃オルガノイドで粘液分泌細胞の分化が促進されることが見いだされた。また、CagA を発現させた胃上皮細胞では、細胞の高さが伸長しており、これは CagA 依存的な細胞骨格の再配列によるものであると思われる。このような現象の詳細なメカニズムはまだ解明できていないが、本研究では CagA が生体内の正常健常胃上皮にどのような影響を与えるのか、*in vitro* モデル系を構築して詳細な解析できることを示した。

やむを得ない事由 [ 図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ( ) ] により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 TRINH THI THUY LINH

1982年バリー・マーシャル博士とロビン・ウォレン博士らにより、胃炎や胃潰瘍の患者からこれらの粘膜病変を引き起こす原因として、らせん状のヘリコバクター・ピロリ菌が発見された。現在では、ピロリ菌は抗生物質の投与により除菌できるが、ピロリ菌がどのようにしてこのような粘膜病変を引き起こすのかについては、現在も研究が進められている。これまでの研究から、ピロリ菌の病原因子として、ピロリ菌が胃上皮細胞に注入する CagA タンパク質が特に問題であることが示唆されているが、CagA が正常胃組織でどのように病態を引き起こすのか十分明らかにされていない。

申請者は、この病原因子 CagA が正常胃組織にどのような影響を与えるのかについて、特にその初期段階を詳細に解析するため、昨今病態解析への応用が進んでいるオルガノイドを利用して CagA の正常胃上皮細胞への影響を詳細に解析した。申請者は、先行研究で報告された培養条件をベースにマウス ES 細胞を用いた胃オルガノイド分化誘導条件を改良し、2 カ月にわたる長期培養で成熟胃オルガノイドを作製する条件を新たに構築した。特に、20 種類近い培養条件の組合せの中から、FGF、Wnt アゴニスト、BMP 阻害剤とレチノイン酸を組み合わせた培養条件を最適化し、内胚葉から前方の消化管組織である胃前駆細胞を特異的に分化誘導する培養条件を改良し、qRT-PCR と免疫蛍光染色を用いた解析でその有効性を確認した。さらに、長期成熟培養で、各種成熟胃上皮細胞を含む胃腺上皮組織が何重もの間葉組織で覆われた胃オルガノイドを分化させた。また、Tet-off 発現誘導型 ES 細胞を用いて CagA を過剰発現した成熟胃オルガノイドを作製し、正常胃上皮細胞への影響を免疫蛍光染色で解析し、CagA が DNA 二本鎖切断や胃上皮細胞の増殖抑制、粘液分泌細胞への分化促進、粘液分泌細胞の伸長現象を引き起こすことを見出した。

本研究で申請者は、CagA が正常胃上皮細胞の粘液分泌細胞への分化を特異的に促進すること、顕著な細胞形態変化を誘導することを新たに発見しており、本胃オルガノイドを用いた CagA 過剰発現系がピロリ菌感染に伴う萎縮性胃炎の初期表現型を解析する上で有用であることを示した点についても新規性がある。

以上のように、ピロリ菌の病態解析については2次元の培養細胞や動物個体を使った系でさまざまな実験がされているが、本研究は独自に改良した3次元胃オルガノイドの系で CagA が正常胃上皮細胞で引き起こす初期の応答の解析に成功しており、上記のどちらの系にもないユニークな病態解析系と考えられることから、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認め

やむを得ない事由[ 図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ( ) ]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】