

## マウス ES 細胞を用いた消化管様構造の形成

### ***In vitro* formation of gut-like structures from mouse embryonic stem cells**

鳥橋 茂子

Shigeko Torihashi

名古屋大学大学院医学系研究科機能形態学講座分子細胞学分野

Dept. of Anatomy and Molecular Cell Biology, Nagoya University Graduate School of Medicine

#### **ABSTRACT**

Embryonic stem (ES) cells have pluripotency and give rise to many cell types and tissues including representatives of all three germ layers in the embryo. We previously reported that mouse ES cells formed contracting gut-like organs from embryoid bodies (EBs) (Stem Cells 20:41-49, 2002). These gut-like structures contracted spontaneously, and had large lumens surrounded by three layers, i.e., epithelium, lamina propria and muscularis. Ganglia were scattered along the periphery, and interstitial cells of Cajal (ICC) were distributed among the smooth muscle cells. In the present study, to determine whether they can be a model of gut organogenesis, we investigated the formation process of the gut-like structures in comparison with embryonic gut development. As a result, we found that the fundamental process of formation *in vitro* was similar to embryonic gut development *in vivo*. The result indicates that the gut-like structure is a useful tool not only for developmental study to determine the factors that induce gut organogenesis, but also for studies of enteric neuron and ICC development.

## 【緒言】

胚性幹細胞（ES細胞）は全能性を持ち、生殖細胞を含む生体や胎児のあらゆる細胞や組織を形成するが、近年マウスのES細胞が、*in vitro*で器官としての消化管様構造を分化させることがわかった。<sup>1-3,6</sup> これらは腸管に類似の形態を示し、上皮、結合組織（固有層）、筋層からなる三層構造を形成した。さらに消化管筋層に固有のカハールの介在細胞(interstitial cells of Cajal; ICC)が分化し、消化管に特有の自動運動能を示した。<sup>4,5</sup>

胚における消化管の器官形成は、他の内胚葉性器官の形成に比べて研究が遅れ、基本的な誘導機構もまだ明らかにされていない。その原因の一つは消化管の発生が、胚の三胚葉すべてに由来する細胞を含み、口側から肛門側まで領域特異な様々な部域からなる複合臓器であること、しかも管腔をとりまく同心円状の組織構築をもつという複雑性があげられる。そこでわれわれは、ES細胞を用いた*in vitro*系での腸管形成が胚発生における腸管の*in vivo*の器官形成と相同であるなら、これを用いた器官形成の研究は腸管の発生研究に大きな進歩をもたらすと考えた。本研究では*in vitro*の腸管様構造の形成過程を胚発生における*in vivo*の器官形成と比較し、その相同性を検討した。

## 【材料と方法】

ES細胞はEB3（理研丹羽先生より供与）を用い、LIFを1,000 U/mL含む培養液(Dulbecco's Modified Eagle Medium, 10% fetal calf serum)で分化を抑制しつつ培養した。トリプシン処理で細胞を解離させた後、LIFを含まない15 $\mu$ Lの培地ドロップ中で約1,000個の細胞をhanging drop法により6日間培養して胚様体を形成させた。この胚様体をディッシュに撒いて固着させ、LIFを含まない培養液で胚様体が二次元的に広がり、分化成長するようにして培養を継続した。また胎生10日—17日および新生マウスの腸管を材料とした。

免疫組織化学は材料をアセトン、またはザンボニ液で固定し、一次抗体としてICCを染める抗c-Kit抗体、神経を染める抗PGP9.5抗体、抗P75抗体、抗NOS抗体、抗vesicular acetylcholine transporter (VAcHT)抗体、抗tyrosine-hydroxylase (TH)抗体、その他抗Id2抗体を用いて染色し、共焦点顕微鏡により記録した。また、通常の電子顕微鏡法により微細構造を観察した。

## 【結果と考察】

### 1) 腸管様構造の形態

腸管様構造の外形はさまざまなものが見られたが、壁が薄く内腔の広いドーム状のものや、壁が厚く扁平で管腔の狭い腸管様構造が多く出現した。直径も 200-1,500 $\mu$  と様々であったが、毎分 3-15 回の頻度で周期的な自動収縮運動が観察された。トルイジンブルー準超薄切片および電子顕微鏡観察から、管腔を取り巻く上皮には吸収上皮細胞に加えて粘液細胞、内分泌細胞が認められ、上皮層の周囲には線維芽細胞と膠原線維が取り巻きこれは粘膜固有層に相当すると考えられた。さらにその外側には平滑筋が層を形成し最外部は漿膜に覆われていた。平滑筋層には消化管筋層に固有のカハールの介在細胞とグリアに覆われた神経節が散在していた。しかし神経節や線維は少なく、線維束や神経叢は存在せず、筋層内には終末線維が散在しているだけであった。従って、腸管様構造は腸管としての基本構造を示したが、神経が少なく、血管系が欠如していた。

### 2) 腸管様構造の形成過程

Hanging drop で形成された胚様体を二次元培養に移すと急速に成長し、ディッシュ上に伸び広がった。まず心筋細胞が規則的収縮を示した。さらに、二次元培養 4 日ごろに、間葉系細胞の集合が形成された。各集合体の中心部には、狭い管腔とこれを取り囲む Id2 陽性の上皮細胞層が形成された。二次元培養 10 日ごろ、周辺部には平滑筋のアクチンを発現する平滑筋細胞が分化し、14 日から 21 日かけて自発的な収縮運動が観察されるようになった。これらの経過はマウス胚 10 日、17 日、新生マウスにおける腸管形成過程に類似していた。形態学的な観察より、腸管様構造の *in vitro* の形成過程は胚発生における *in vivo* の腸管器官形成を踏襲していると考えられた。

### 3) ICC の発生

ICC のマーカーとなる、c-Kit の発現は免疫組織化学で二次元培養の初期より観察され、活性は徐々に顕著になった。始めは c-Kit 陽性細胞は細胞塊を形成していたが、やがて、陽性細胞と陰性細胞に分化し、腸管様構造に自動運動が見られる二次元培養 14 日から 21 日において陽性細胞はネットワークを形成した。その様相はマウス腸管の筋層間神経叢レベルに分布する ICC (IC-MY) によく似ていた。しかし微細構造や ICC の分布域から ICC のサブクラスを同定することはできなかった。

#### 4) 腸管神経の発生

PGP9.5 の免疫組織化学から、腸管様構造には神経の分布がマウス腸管に比べて少ないことが示された。しかし、腸管様構造の周囲の胚様体には VAcT、NOS、TH の免疫活性を示す多くの神経細胞が分化し、形態学的には機能しうる神経細胞が分化していることがわかった。さらに P75 免疫活性陽性の細胞が認められたことから、神経提由来の神経細胞が含まれることが示唆された。

以上の結果より、腸管様構造は形態学的にマウス胚腸管に極めて類似し、その発生過程も基本的に *in vivo* 腸管の器官形成を踏襲していた。従ってマウス ES 細胞を用いた腸管様構造は腸管の *in vitro* 器官形成モデルとして発生研究に大変有用である。

#### 【引用文献】

1. Donovan P, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 2001; **414**: 92-97.
2. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryo. *Nature* 1981; **292**: 154-156.
3. Hübner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De la Fuente R, Wood J, Strauss III JF, Boiani M, Schöler HR. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 2003; **300**: 1251-1256.
4. Huizinga JD, Thuneberg L, Klüppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A. *W/kil* gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 1995; **373**: 347-349.
5. Torihashi S, Ward SM, Sanders KM. Development of c-Kit-positive cells and the onset of electrical rhythmicity in murine small intestine. *Gastroenterology* 1997; **112**: 144-155.
6. Yamada T, Yoshikawa M, Takaki M, Torihashi S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizaka S, Tsunoda Y. In vitro functional gut-like organ formation from mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 2002; **20**: 41-49.