

## 藤森科学技術振興財団 研究実施概要報告書

(西暦) 2025 年 5 月 30 日

公益財団法人藤森科学技術振興財団  
理事長 藤森 明彦 殿

藤森科学技術振興財団の助成金による研究が終了しましたので、下記のとおり報告をいたします。

所属機関 芝浦工業大学

職 名 准教授

氏 名 中村奈緒子



### 【提出書類】

(1) 研究実施概要報告書（本紙）

添付書類（A4 版 3 枚以内）：研究状況を示す写真等の資料

(2) 収支報告書

添付書類：助成金を充当した経費の領収書

領収書を添付しない場合：支払一覧表と支払部門担当者確認署名

⑤

(1) テーマ

※スペースが足りない場合は、

枠を追加いただいて構いません。

脱細胞化小腸を用いた微細構造模倣型生体外小腸モデルの構築

(2) 本研究の期間

(西暦) 2024 年 4 月 ～ 2025 年 3 月

(3) 本研究の目的

小腸は、栄養素および水分の吸収において中心的な役割を果たす臓器であり、ヒルシュスプルング病やクローン病などの消化器疾患の病態解明、新規治療法・薬剤の開発、ならびに吸収機能の評価を目的とした研究において、その機能を模倣した高精度な *in vitro* モデルの開発が求められている。

1990 年代以前は、主に動物実験が腸機能の評価に用いられていたが、動物モデルはヒトの生理機能を正確に再現できないことや、薬物応答に種特異的な違いがあるといった課題が指摘されてきた。その代替として、1989 年以降、ヒト結腸癌由来の Caco-2 細胞を用いた 2 次元培養モデルが広く用いられてきたが、これらのモデルは小腸に存在する絨毛や陰窩といった三次元的構造を欠き、絨毛を上行し先端で剥離するダイナミクス等の小腸固有の細胞挙動を再現するには不十分であった。

近年では、Caco-2 細胞や腸オルガノイドの分化と機能的成熟を促進する目的で、絨毛や陰窩の微細構造を模倣した三次元足場の開発が進められている。こうした足場上での Caco-2 細胞培養においては、分化マーカーであるアルカリホスファターゼ (ALP) 活性の上昇が報告されており、また腸オルガノイドにおいても、細胞形態のアスペクト比が増加するなど、分化の指標となる変化が示されている。

しかし、既存研究の多くはミクロスケールの三次元形状の模倣に注力しており、ナノスケールのより精緻な構造に対する検討は限定的であった。細胞が *in vivo* と同等の機能を発現するためには、組織構造のどのレベルまでを再現すべきか、明確な基準は存在しない。そこで本研究では、小腸の絨毛や陰窩の表面に自然に存在するナノ構造に着目し、これを *in vitro* 足場に付与することで、細胞機能の高度な再現が可能になるのではないかと仮説を立てた。

実際、これまでに小腸模倣足場にナノ構造を導入した先行研究はなく、そうした構造が Caco-2 細胞や腸オルガノイドの分化に及ぼす影響も不明であった。脱細胞化技術は、元の組織構造を保持したままナノスケールの情報を反映できる手法として有望であり、本研究では、基底膜のナノ構造を減法的に改変した脱細胞化小腸を作製し、その上で Caco-2 細胞を培養して分化の程度を評価することを目的とした。

本研究の成果は、より生体に近い構造と機能を有する 3 次元 *in vitro* 腸モデルの構築に貢献し、小腸に関連する病理学・薬理学・生理学分野への応用が期待される。

#### (4) 本研究の概要

小腸は生体において栄養素と水分の吸収という極めて重要な役割を担っており、関連する疾患也多岐にわたることから、その病態解明や新規治療法・薬剤開発のため、ヒトの小腸機能を高精度に模倣できる *in vitro* モデルの開発が強く求められている。従来、腸管研究には動物実験が広く用いられてきたが、ヒトの生物学的機能を十分に再現できないという限界があった。1989 年以降、ヒト結腸癌由来の Caco-2 細胞株を用いた 2D 培養モデルが普及したが、これは *in vivo* の小腸に特徴的な絨毛や陰窩といった三次元構造を欠いており、細胞が絨毛を這い上がり先端で剥離するといった固有の挙動が適切に制御されないという課題が残されていた。

近年、この課題克服を目指し、絨毛や陰窩の微細構造を模倣した三次元足場が開発され、Caco-2 細胞のアルカリホスファターゼ(ALP)活性の向上等の分化促進効果が報告されている。しかし、これらの先行研究の多くはマイクロスケールの三次元構造模倣に注力しており、さらに微細な、特に基底膜に存在するナノ構造の影響については十分に解明されていなかった。実際、*in vivo* の小腸基底膜には固有のナノ構造が存在することが知られており、細胞機能のより忠実な再現には、ナノレベルでの構造模倣が重要であるという仮説が立てられた。しかし、小腸模倣足場にナノ構造を付与した研究例はなく、その影響は不明であった。

本研究は、小腸模倣足場におけるナノ構造が Caco-2 細胞の分化に与える影響を解明することを目的とした。この目的のため、脱細胞化技術を用いて、基底膜のナノ構造が減法的に改変された 2 種類の脱細胞化ラット小腸を作製した。具体的には、界面活性剤である Triton X-100 の処理条件 (0.5% Triton 6 時間 vs 1% Triton 48 時間) を変化させることで、基底膜表面に固有の顆粒状ナノ構造を残存させた足場 (0.5% Triton 6 時間処理) と、ナノ構造が消失し平坦化した足場 (1% Triton 48 時間処理) を作製することに成功した。この顆粒状ナノ構造は基底膜の透明板層に特異的な構造であることが示唆された。これらの脱細胞化足場上で Caco-2 細胞を 21 日間培養し、その分化を ALP 活性および微絨毛密度を指標に評価した。

その結果、ALP 活性は、両方の脱細胞化足場上でプレート培養よりも有意に高い値を示したが、2 種類の脱細胞化足場間には有意差は認められなかった。これは、ALP 活性が微細構造の影響を強く受けることを示唆している。一方、微絨毛密度については、顆粒状ナノ構造を保持した 0.5% Triton 6 時間処理の脱細胞化足場上で培養した Caco-2 細胞が、他の条件 (1% Triton 48 時間処理の脱細胞化足場、メンブレン、プレート) と比較して有意に高い値を示した。特に、0.5% Triton 6 時間処理の足場では、ネイティブなラット小腸上皮細胞の微絨毛密度の 35% に達する高い密度が確認された。

これらの結果は、小腸基底膜、特に透明板層に存在する固有のナノ構造が、Caco-2 細胞の微絨毛形成 (成熟・分化の指標) を促進することを強く示唆している。したがって、絨毛・陰窩のマイクロ構造だけでなく、基底膜のナノ構造を模倣することが、より生体に近い *in vitro* 小腸モデルを構築する上で不可欠であることが明らかとなった。

本研究の知見は、より生理学的に適切な 3D *in vitro* 腸モデルの開発を加速させ、小腸に関連する病理学、薬理学、生理学を含む幅広い分野における研究応用への貢献が期待される。今後、透過性や流体・伸展刺激といった生理的因子を組み合わせることで、更なる細胞分化の促進が図られる可能性も示唆された。

## (5) 本研究の内容及び成果

## &lt;実験方法&gt;

Wistar ラットから小腸を摘出後（芝浦工業大学 動物実験承認番号 2024007）、生理食塩水を 500 ml 流すことで小腸内腔を洗浄した。小腸を 0.5% TritonTM X-100 水溶液に 6 時間（0.5% Triton 6 h）又は 1% TritonTM X-100 に 48 時間（1% Triton 48 h）、4 °C 下で浸漬させることで上皮細胞を除去した。脱細胞化評価として、HE 染色、SEM 観察、抗ラミニン抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。

96 well セルクラウンに 2 種類の脱細胞化小腸を設置し、Caco-2 を  $7.1 \times 10^3$  cells 播種して 21 日間培養した。Caco-2 を 12 well セルカルチャーインサート（membrane）に  $1.9 \times 10^5$  cells、24 well セルデスク（plate）に  $1.1 \times 10^5$  cells 播種し、21 日間培養した。Caco-2 の分化を評価するために、ALP 活性と微絨毛密度を計測した。

## &lt;結果&gt;

上皮細胞除去を評価した。HE 染色により、洗浄前未処理小腸では絨毛表面に単層状に並んだ上皮細胞、陰窩に密集した上皮細胞が確認された。0.5% Triton 6 h および 1% Triton 48 h では、上皮細胞が完全に除去された。SEM 観察により、どちらの脱細胞化小腸も絨毛と陰窩のマイクロ構造が保持されていることが確認された。

次に、基底膜成分の保持を評価するために基底膜の主成分であるラミニンの免疫蛍光染色を行ったところ、洗浄前未処理小腸の上皮細胞接着面にラミニンの存在が確認された。0.5% Triton 6 h と 1% Triton 48 h のどちらにも上皮細胞接着面にラミニンが残存していた。基底膜の表面構造を評価するために高倍率で SEM 観察をしたところ、0.5% Triton 6 h では、洗浄後未処理小腸の基底膜で確認されたナノスケールの粒状構造が残存していた。1% Triton 48 h では、粒状構造はなかった。

脱細胞化小腸上に播種された Caco-2 の分化の評価を行った。分化指標の一つである ALP 活性値の一元配置分散分析を行ったところ、plate 上の Caco-2 の ALP 活性は、0.5% Triton 6 h および 1% Triton 48 h 上の Caco-2 の ALP 活性に比べて有意に低い値であった。また、plate を除いた 3 条件間で有意差は確認されなかった。Caco-2 の分化指標である微絨毛密度の一元配置分散分析を行ったところ、0.5 % Triton 6 h 上で培養した Caco-2 の微絨毛密度は他の 3 条件と比べて有意に高く、本来の小腸上皮細胞の微絨毛密度の 35%であった。また、plate 上で培養した Caco-2 の微絨毛密度は他の 3 条件と比べて有意に低かった。

## (6) 本研究の考察

現在広く使用されている、半透膜上に Caco-2 細胞を培養する腸管 in vitro モデルは、細胞の挙動を適切に制御できていないという課題が指摘されている。その改善策として、絨毛や陰窩のマイクロ構造を模倣した足場の開発が進められてきた。本研究では、これに加えて、小腸基底膜に存在するナノ構造が Caco-2 細胞の分化に影響を与えるとの仮説に基づき、基底膜ナノ構造を減算的に変化させた脱細胞化小腸を作製し、その上で Caco-2 細胞を培養して分化を評価した。

作製した脱細胞化小腸のうち、0.5% Triton を 6 時間処理した試料では、基底膜表面にナノ構造が確認された。一方、1% Triton を 48 時間処理した試料では、界面活性剤の作用により基底膜のナノ構造が溶解し、フラットな表面が形成されていた。さらに、より強い作用を持つ 4% SDC を 24 時間処理した試料では、基底膜表面に繊維構造が観察された。基底膜は上皮細胞接着面から順に、透明板、基底板、繊維細網板の 3 層から構成されており、それぞれラミニン、IV 型コラーゲン、VII 型コラーゲンを主成分とする。4% SDC 処理によって繊維構造が露出した理由としては、透明板および基底板が溶解し、下層の繊維細網板が露出したことが考えられる。また、0.5% Triton 処理で観察された粒状構造が 1% Triton 処理では消失していたことから、この粒状構造は透明板に特有のものであると推察される。

基底膜のナノ構造が Caco-2 細胞の分化に与える影響を検討するために、2 種類の脱細胞化小腸、半透膜 (membrane)、および通常の培養プレート (plate) 上で Caco-2 を培養し、ALP 活性と微絨毛密度を評価した。その結果、0.5% Triton および 1% Triton 処理群と membrane 群の間に有意差は見られなかったものの、いずれも plate 上で培養した群に比べて有意に高い ALP 活性を示した。このことから、マイクロ構造を有する足場が Caco-2 の分化を促進する可能性が示唆された。

また、membrane 上で培養した Caco-2 細胞の微絨毛密度は、plate 上のものと比較して有意に高く、足場の透過性が微絨毛形成に影響を与えることが示唆された。さらに、0.5% Triton 処理群では、1% Triton 処理群と比較して微絨毛密度が有意に高く、小腸基底膜のナノ構造が Caco-2 の微絨毛形成を促進することが明らかとなった。ただし、最も高い微絨毛密度を示した 0.5% Triton 群においても、その密度は本来の小腸上皮細胞の約 35%にとどまった。

過去の報告では、小腸から筋層と漿膜を除去することで、足場に透過性を付与できることが示されており、さらに Caco-2 や腸管オルガノイドの分化には、流れ刺激や機械的伸展刺激が重要であることも報告されている。したがって、今後は流体刺激および伸展刺激を加えた環境下で、ナノ構造と透過性を併せ持つ脱細胞化小腸足場上で Caco-2 を培養することで、さらなる分化促進が期待される。

本研究では、基底膜構造を段階的に変化させた脱細胞化小腸の作製に成功し、特に透明板に由来するナノ構造が Caco-2 の微絨毛形成を促進することが示された。これにより、絨毛や陰窩のマイクロ構造のみならず、ナノレベルの構造も模倣することで、よりヒト小腸に近い腸管 in vitro モデルの開発に寄与する可能性が示された。

⑤

(7) 共同研究者（所属機関名、役職、氏名）

芝浦工業大学大学院理工学研究科 修士課程（2025 年 3 月修了）  
深田杜和

(8) 本研究の成果の公表先

< 学術論文（査読付き） >

1. Towa Fukada, Sin Lam U, Naoko Nakamura. Effect of ECM nanostructures in decellularized small intestine on differentiation of intestinal epithelial model cells, J Artif Organs, 2025  
<https://doi.org/10.1007/s10047-025-01509-8>  
<https://rdcu.be/em4sN>

< 学会発表 >

1. 深田杜和, 中村奈緒子. 三次元的な小腸模倣足場における基底膜成分が Caco-2 の分化に与える影響の解明, 第 63 回日本生体医工学会大会, 鹿児島, 5 月 23-25 日, 2024（ポスター）

[注] この報告書を当財団のホームページ等に掲載します。予めご了承ください。