

“ヒト未熟細胞の新たな体外培養法により、成熟過程の機構を解明”

上皮研究、再生医療・がん研究開発の新たなツール

愛知医科大学 病理学講座 猪子 誠人(いのこ あきひと)講師を中心とする研究チームは、ヒトの上皮組織のもととなる未熟な基底細胞(※1)を体外で長期的に増やし、さらにこれを短期間で成熟(分化)(※2)させる新手法を併せて開発しました。このモデルにより、未熟な上皮が成熟していく過程の仕組みの一端が明らかになりました。これは分化技術を必要とする再生医療(※3)を推進する上で重要な研究成果です。

上皮とは皮膚に代表されるような体表を覆うシート状の組織で、その強固なバリア構造で生体を外界から守っています。この構造は、最下層に蓄えられた基底細胞が適宜上皮細胞へと分化することで維持されます。しかし、上皮は他の組織に比べ頑丈で、分化の過程の観察や再現はなかなか困難でした。そのため、基底細胞が成熟へと向かう分化スイッチの仕組みには不明な点がまだまだありました。

そこで本研究では、まず YDAC(※4)と名付けた薬剤のカクテルを用い、ヒト乳腺の基底細胞を体外で長期に増殖させました。さらにこの細胞の培地から YDAC を除去することで、逆に基底細胞を効率良く上皮細胞に分化させる方法を開発しました(図1A)。このシンプルな分化誘導法により、分化前後の比較解析が実現し、分化スイッチの仕組みの発見につながりました。これらの細胞解析の結果は、生体組織やオルガノイドなどの三次元培養でも多角的に検証されました。

さらに本発見では、未熟な正常基底細胞とがんの間に意外な共通点を見出しました。それは、「上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)」(※5)と呼ばれる現象の一部で、がんでは悪性化(浸潤や転移など)に関与することが知られています。このように本培養技術は上皮成熟過程の研究だけでなく、再生医療やがん研究などさまざまな医療開発への応用展開が期待されます。

本研究成果は、2025年4月9日の *Scientific Reports* 誌オンライン版に掲載されました。

【本研究成果のポイント】

- ヒトの未熟な基底細胞を体外で長期的に増やす新たな培養法を開発
- 薬剤の除去のみで簡便かつ効率的な上皮分化誘導が可能
- 未熟な基底細胞に、がんと類似の EMT 分子経路の関与を確認
- オルガノイドや生体組織でも関連性を再検証
- 再生・がん医療開発の新たな研究資源

1. 研究の背景

上皮組織は私たちの体を外界から守る重要なバリアです。このバリア機能は「タイトジャンクション」と呼ばれる分化上皮特有の細胞間構造によって保たれ、その中心となるタンパク質が Claudin(※6)です。これまでの研究で Claudin の機能は詳しく調べられてきましたが、上皮の成熟過程での Claudin の挙動(発現・局在変化)について詳細は不明でした。その理由のひとつとして、未熟な上皮を体外で再現よく分化させる技術がこれまで乏しかったことが挙げられます。

本技術開発は、昔からある初代培養法(※7)を進化させたものです。50年ほど昔の1975年、医学者ハウアード・グリーンとジェームズ・ラインウォルドは、ヒト上皮の長期的な初代培養に初めて成功しました(文献1、2)。これは皮膚細胞とその増殖を助ける細胞(フィーダー細胞)と一緒に培養することで達成されました。彼らはこの方法で重度熱傷患者から皮膚のもととなる細胞を増やし、さらに自家移

PRESS RELEASE

植することで実際に患者の命を救いました。そして2013年、この培養法はアメリカの病理医リチャード・シュレーゲルらによる ROCK 阻害剤 Y-27632 の添加により改良され、がんの培養へも適用の可能性が広がりました(文献3)。また2016年には、2つの SMAD 阻害剤 DMH-1 と A-83-01 が培地に添加され、これまで必要だったフィーダー細胞が不要になりました(文献4)。これらの方法および類似する様々な方法が、基底細胞の長期増幅法として編み出されました。にもかかわらず、「基底細胞を体外で再現よく分化させる技術」はこれまで限定的でした。

II. 概要と成果

本研究では、まず昔から初代培養に使われる培地「F-medium(※8)」をベースに、YDAC と名付けた薬剤のカクテルを加えた培地を新たに作成し、ヒト正常乳腺から初代培養した基底細胞が平らな容器の上で長期増殖可能なことを確認しました(詳細は論文参照)。画期的なことに、「この状態から化合物を除去した培地に交換すると、平らな二次元のまま短期間で効率よく上皮に分化する」ことを発見しました(図1A)。また、基底細胞を二次元で過増殖させると、やがて生体組織に類似した階層状の構造をとることを確認しました(図1B)。さらに、既存のオルガノイド法(※9)を用いることで、この基底細胞がより生体に近い三次元的な嚢胞状の構造体に分化可能なことも確認しました(図1C)。

詳細な分子解析は、二次元分化培養法を用いて効率的に進めました。まず最新の包括的な遺伝子発現解析を行い、分化前後の遺伝子の発現変化を確認しました(図1D)。論文では分化後に乳腺上皮に特徴的な遺伝子群の発現上昇を認めたことから、本分化法が Claudin に限定されない、より生体乳腺に近い分化状態を再現できていることが確認出来ました。

さらに論文では、分化前と分化後に転写因子 EGR1 と ELF3 がそれぞれ強く発現していることが、この包括解析から示されました。それで実際に細胞でこれらを除く実験を行ったところ、「それぞれの転写因子が Claudin の発現抑制と局在化に関わっている」ことが実際に確認出来ました(図2)。これまでの研究で、EGR1 の発現および ELF3 の欠失はがんの EMT と関わるということが知られており、本発見は「がんと正常基底細胞の間に意外な接点を見出した」点で貴重です。

このような体外での細胞解析は、生体内と結果が異なることがあります。そこで論文では乳腺組織やオルガノイド法でも念のため結果の関連性を調べ、最終的に妥当であると判断しました。

図1：正常な乳腺基底細胞の体外分化誘導法（新開発）

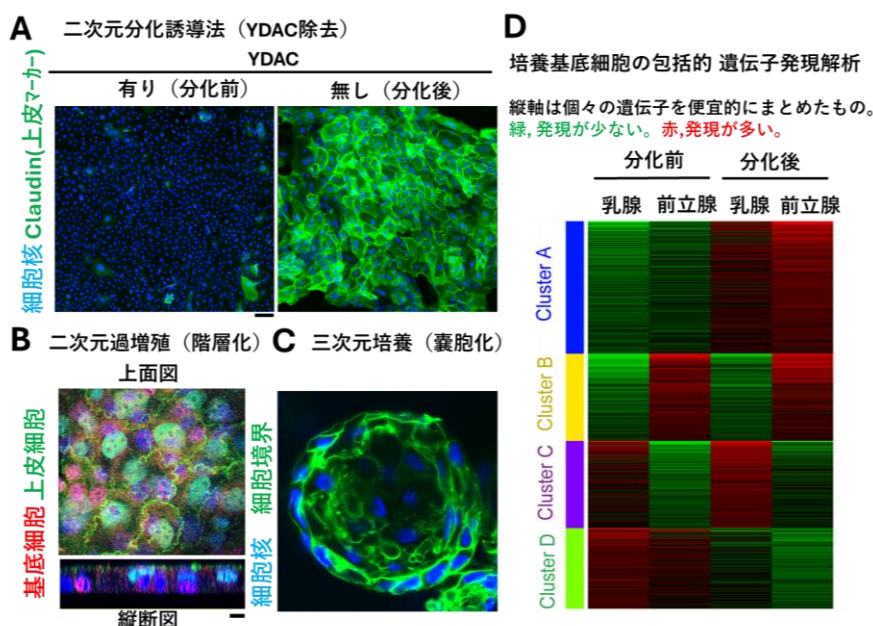
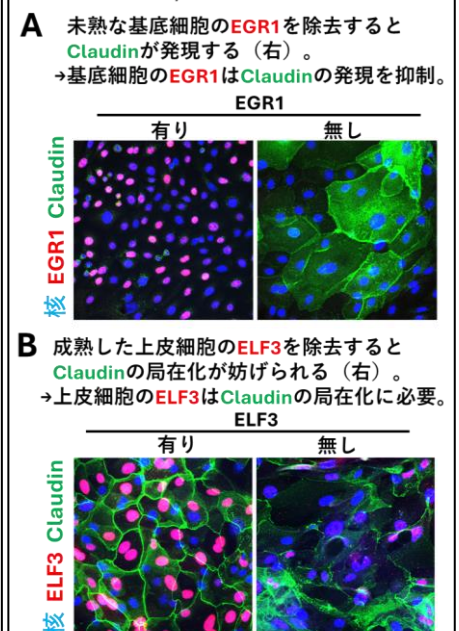


図2：EGR1, ELF3の細胞機能解析



PRESS RELEASE

Ⅲ. 今後の展開

本開発技術は、ヒト上皮のもととなる未熟な細胞を体外で増やし、かつ分化させることのできる、簡易的な生体模倣モデルです。産業的には未熟な上皮の薬剤感受性試験や再生医療の研究資源となるため、**企業との共同医薬開発**が期待できます。

本培養技術の最大の利点は、「**二次元で均一に近い分化・未分化状態を構築できる**」点にあります(図1A)。最近のオルガノイド法は、生体組織に近い複雑で不均一な構造を目指した開発を目指しています。これは医療開発としては重要ですが、**細胞生物学のような基礎研究**では単純なモデルのほうが研究に有利な場合もあります。我々の二次元分化誘導法は、素早く高純度な解析が可能で、生体再現性もあったことから、結果的にはオルガノイドなどの高度な応用研究を後押しすると期待されます。

本研究は**がんの基礎研究**でもあります。我々が正常基底細胞に見出した EGR1 は、がんでは EMT に関与することが知られていました。また、我々が正常分化上皮に見出した ELF3 の胆管がんでの欠失は、EMT に関与することが知られていました(文献5)。このように私たちの研究成果は、正常細胞であった頃の仕組みが、がんではどのように利用されるようになったかを考察していく上でとても重要です。特に論文の中では EGR1 や ELF3 の遺伝子を操作することで、実際には上皮と間葉の特性が混じった状態を正常細胞から作り出すことが出来ました。これは、「**部分的 EMT**」と呼ばれる状態で、がんではこれまで以上に悪性化に関与すると考えられています(文献6)。今後さらなる特性解析が期待されます。

このような基礎研究以外には、培養技術の適用拡大が期待されます。特にがんの初代培養はこれまでの研究でも適用が限られており、我々のチームは**がん検体で条件最適化**を進めています(文献7)。

Ⅳ. 用語説明

※1 **基底細胞(basal cell)**: 上皮組織の最下層に位置する細胞。上皮のもととなる未熟な細胞(上皮幹細胞や上皮前駆細胞)を含んでいることが知られている。

※2 **分化**: 未熟な細胞が特定の機能や形態をもつ専門的な細胞へと変化する事。体内の多くの細胞は、最初は幹細胞に代表されるような「未分化」状態にあるが、分化が進むことで神経細胞、筋肉細胞、皮膚細胞など、異なる役割を持った細胞になる。

※3 **再生医療**: 体内の幹細胞や ES 細胞、iPS 細胞などの細胞を分化させて、失われた組織・臓器の構造と機能を回復・再生させる医療。上皮は血球などに比べ幹細胞が回収しにくく、開発が遅れている。

※4 **YDAC**: 4 種の薬剤(ROCK 阻害剤 Y-27632、SMAD 阻害剤 DMH1 と A-83-01、Wnt 活性化剤 CHIR99021)の混合物。本研究で Wnt 活性化剤の添加は分化・未分化状態を明瞭化できることがわかった。なお、Y-27632 は万能細胞(ES, iPS)やオルガノイド(ミニ臓器)の培養にも使われる。もともとは吉富製薬(現田辺三菱製薬の前身のひとつ)と京都大学の成宮周博士によって開発された。

<https://pharmacol.or.jp/cms/wp-content/uploads/2020/03/ebashi2011.pdf>

※5 **上皮間葉転換(EMT)**: がんに見られる現象のひとつで、上皮細胞が本来なかった間葉系細胞の性質(接着性低下・運動能亢進等)を獲得すること。浸潤・転移などががんの悪性化に関わるとされる。

※6 **クローディン(Claudin)**: 細胞間接着装置「タイトジャンクション」の主要構成タンパク質。上皮バリアの形成に必須。1998 年に日本の研究者が発見(京都大学 月田・古瀬博士ら)。

<https://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%82%AF%E3%83%AD%E3%83%BC%E3%83%87%E3%82%A3%E3%83%B3>

※7 **初代培養法(primary culture)**: 組織から採取した細胞を専用培地に浸し、平らな二次元の容器の上で増殖・維持する方法のこと。上皮では未熟な基底細胞を含む。やや難易度が高く一般的な技術ではないが、研究に広く使われている不死化細胞(株化細胞)と違い、細胞の性質をより自然に近い状態で保持できる利点がある。そのため、再現性を重視した最近の医療開発で注目されつつある。また初代細胞の自家移植は拒絶反応が起こりにくい利点がある。下記も参照。

初代細胞 <https://www.setsurotech.com/glossary/primary-cultured-cells/>

不死化細胞 <https://www.cosmobio.co.jp/support/technology/a/about-cell-culture.asp>

PRESS RELEASE

医療開発応用 <https://www.amed.go.jp/content/000129544.pdf>

皮膚自家移植 https://saisei-navi.com/hiza/regenerative_medicine/skin/

※8 F-medium: 基礎培地として Ham's F-12、DMEM と呼ばれる液体培地の混合物を用い、アデニン、ヒドロコルチゾン、コレラ毒素、インスリン、上皮成長因子、胎児ウシ血清を添加した培地。用途により培地の比率や添加物にいくつかのバリエーションがある。

※9 オルガノイド法: 未熟な細胞を特殊な担体(マトリゲル)の中で培養し、多細胞種から成る生体に近い構造や機能を再現させた立体物(ミニ臓器)を作成する方法。元の臓器の再現性は高い一方で、担体の使用・混入や細胞不均一性のため、実験・解析の難易度は高い。

V. 参考文献

- 1) [https://en.wikipedia.org/wiki/Howard_Green_\(physician\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Howard_Green_(physician))
- 2) [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(75\)80001-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(75)80001-8)
- 3) <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.10.036>
- 4) <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.05.012>
- 5) <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2988>
- 6) <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
- 7) <https://researchmap.jp/inoko>

VI. 研究成果の公表

【論文題名】 Long-term expansion of basal cells and the novel differentiation methods identify mechanisms for switching Claudin expression in normal epithelia
(基底細胞の長期培養増幅法とその新たな分化方法は、正常上皮細胞におけるクロードイン発現切替えスイッチの分子機構を明らかにする)

【著者名】 猪子 誠人(責任著者)¹、曾我 倫久人^{1,2,*}、鈴木 美奈子¹、清野 透³、池ノ内 順一^{4,**}、小島 崇宏²、佐藤 良勝⁵、齋藤 大介⁴、宮本 達雄⁶、五島 直樹⁷、伊藤 秀明¹、笠井 謙次¹

1, 愛知医科大学医学部・病理学講座

2, 愛知県がんセンター・泌尿器科部

3, 国立がん研究センター・先端医療開発センター 4, 九州大学・理学院・生物科学部門

5, 名古屋大学・ITbM

6, 山口大学大学院・医学系研究院・分子細胞生理学講座

7, 産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センター

*, 現 津泌尿器科皮膚科診療所 院長

**, 現 九州大学・医学研究院・生化学講座

【掲載誌】 *Scientific Reports*, <https://doi.org/10.1038/s41598-025-95463-3>

本件に関するお問い合わせ先(研究内容)

愛知医科大学医学部 病理学講座

講師 猪子誠人

TEL: 0561-62-3311 FAX: 0561-61-2350

e-mail: inoko.akihito.288@mail.aichi-med-u.ac.jp

(報道に関すること)

愛知医科大学 庶務課

Tel: 0561-61-5396 (直通), Fax: 0561-62-6690

e-mail: syomu@aichi-med-u.ac.jp