

○今倉 悠貴、山崎 奈穂、諸橋 康史、望月 清一、中村 健太郎 (富士フイルム株式会社 バイオサイエンス&エンジニアリング研究所)
会員外共同研究者：岩尾 岳洋、松永 民秀 (名古屋市立大学 大学院薬学研究科 臨床薬学分野)

0. 背景・目的

腸管は、食品の吸収・代謝を担う消化器官としての役割に加え、人体最大の免疫器官として、また各種腸内細菌の生息場所としても知られている。食品成分や腸内細菌が人体に及ぼす影響を解析し、その作用メカニズムを明らかにするためには、ヒト腸管の機能を再現した評価モデルが必要である。現在、ヒト腸管の代替モデルとしてCaco-2細胞や実験動物が用いられているが、各種トランスポーター・代謝酵素・受容体の発現量の違いや種差等により、ヒト生体との乖離が問題となっている。また近年、動物愛護の観点から、動物実験の代替となる評価モデルの開発が期待されている。そこで我々は、ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞を分化誘導し、ヒト腸管に近い性質を有する *in vitro* モデルの構築を試みた。

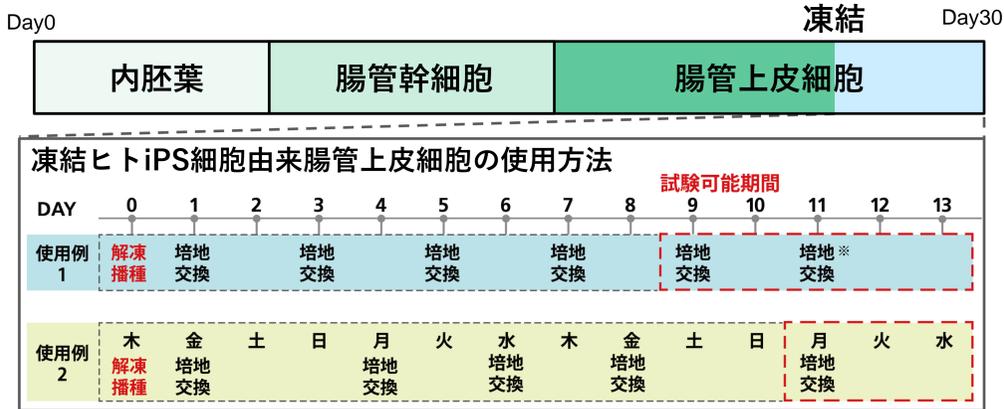
現行のヒト腸管の代替モデルには課題がある

本研究の概要



1. 方法

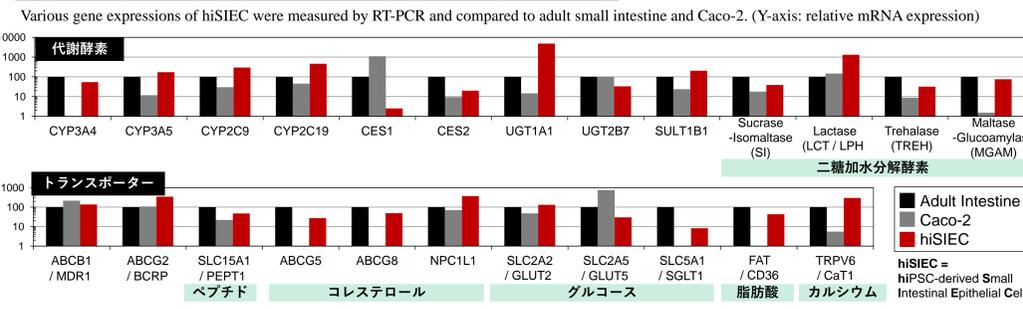
分化誘導プロトコルの概要



凍結保存可能なヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞を開発し、特性を評価した。

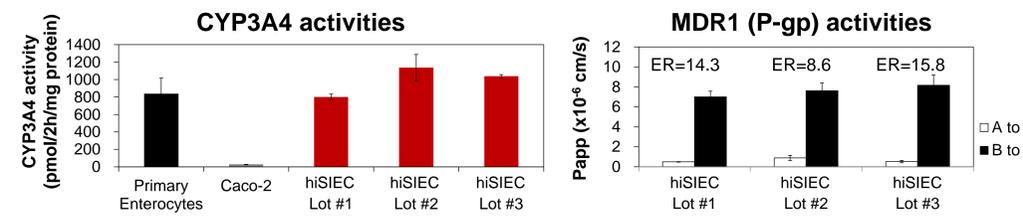
2. 低分子成分の腸管吸収

代謝酵素・トランスポーターの遺伝子発現



開発したヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞は、ヒト生体小腸同等の遺伝子発現を示した。

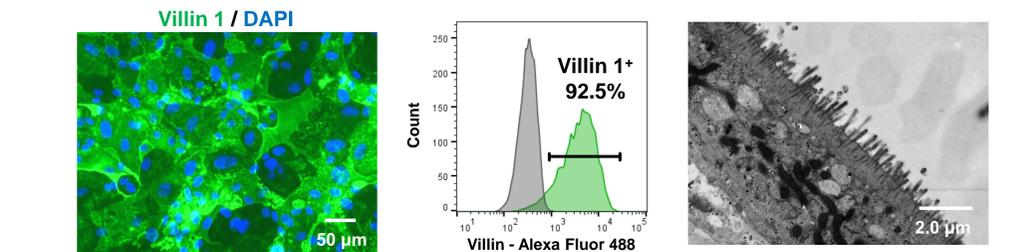
代謝酵素活性・トランスポーター活性とロット間差



Each cell was incubated with 5 μM midazolam for 2h at 37°C. CYP3A4 in hiSIEC was measured with manufacturer's assay medium. Human Enterocytes (purchased from In Vitro ADMET Laboratories, Inc.) were used as primary small intestinal cells. 10 μM digoxin was used as a substrate. Additionally, HBSS containing 10 mM HEPES (pH 7.4) was used as a transport buffer. After the preincubation, the transport buffer containing the substrate was added to the apical or basal chambers, and the cells were incubated at 37°C for 60 min.

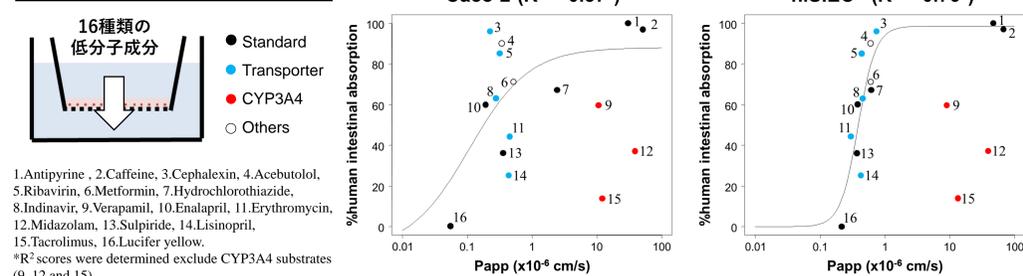
ヒト初代培養腸管上皮細胞と同等のCYP3A4活性を示した。またCYP3A4活性とP-gp活性について、ロット間で性能が安定していることが示された。

腸管上皮細胞としての特徴



腸管上皮細胞の特徴として、微絨毛の形成等が確認された。

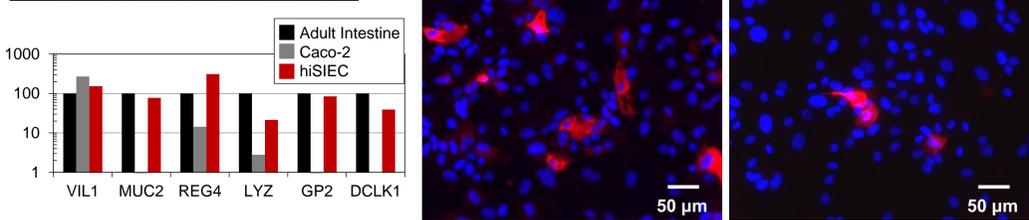
腸管吸収予測性の評価



低分子成分の透過係数(Papp)とヒト腸管吸収率に相関が見られた。

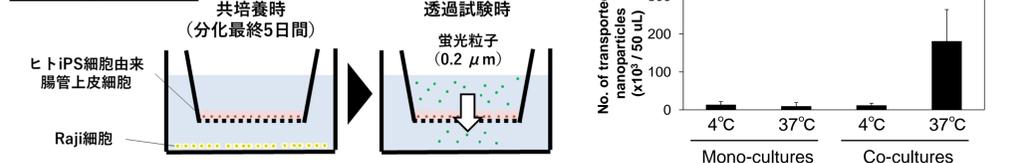
3. 各種腸管上皮細胞に関する特性

各種腸管上皮細胞の存在



腸管免疫に関わる、杯細胞(MUC2)、内分泌細胞(REG4)、パネート細胞(LYZ)、M細胞(GP2)、タフト細胞(DCLK1)の存在が示された。

M細胞モデル

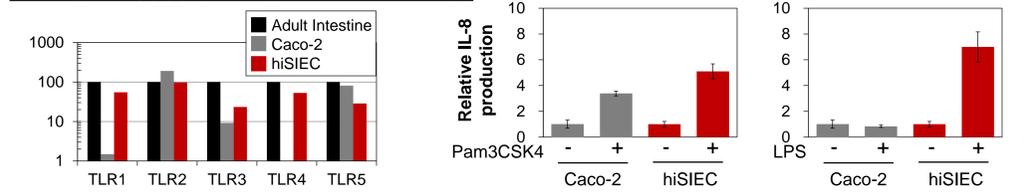


Five days after cell seeding, the cells were cultured on cell culture inserts, and Raji cells (lymphoblast-like cells) were co-cultured on the basal side of the cell culture inserts. On day 10, fluorescent particles (0.2 μm) were added to the apical side and incubated for 2h. The number of fluorescent particles passed through to the basal side was counted by flow cytometry.

Raji細胞との共培養により、M細胞による取り込みを評価できることが示唆された。

4. 免疫応答・炎症モデル

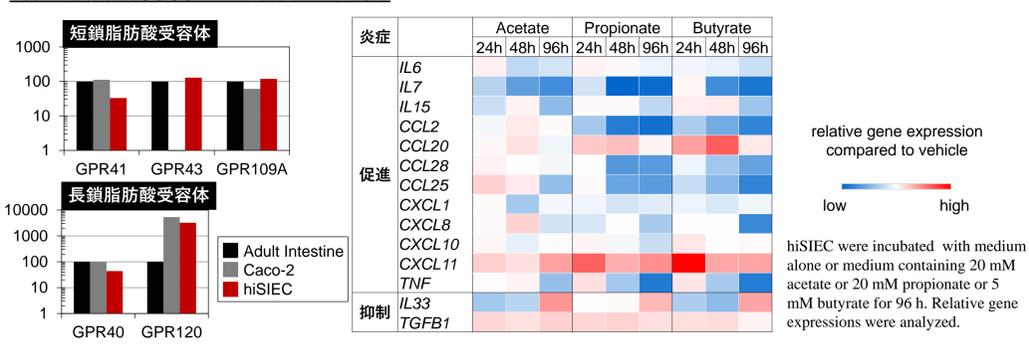
Toll様受容体(TLR)の発現と応答



Caco-2 or hiSIEC were incubated with medium alone or medium containing 50 μg/mL Pam3CSK4 or 100 ng/mL LPS for 24 h. Supernatants were assayed for IL-8 secretion. Data are expressed as relative production as compared with control.

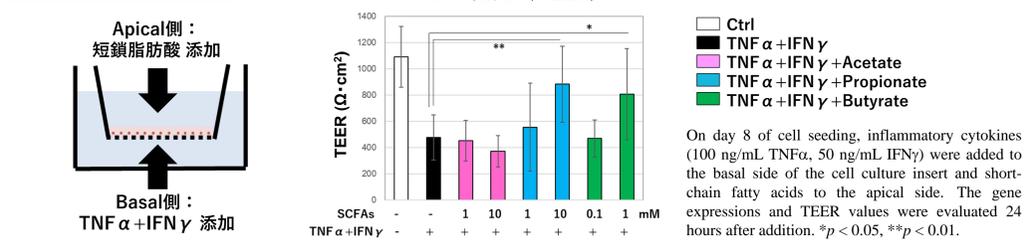
腸管上皮細胞の免疫応答として、Toll様受容体を介した応答を評価できることが示された。

脂肪酸受容体の発現と応答



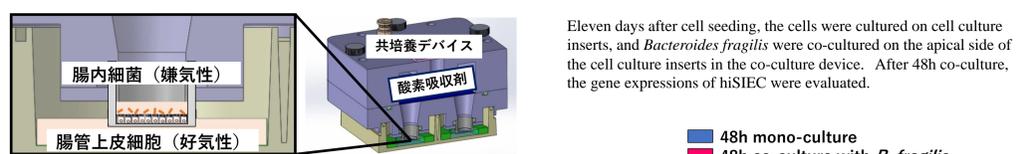
脂肪酸受容体を介した免疫応答を評価できることが示された。

腸管炎症モデル



炎症状態によるTEER値低下・炎症性サイトカイン遺伝子発現上昇は、短鎖脂肪酸の添加により抑制された。

5. 腸内細菌との共培養



嫌気性腸内細菌 *B. fragilis* との共培養により、腸管上皮細胞のタイトジャンクション・短鎖脂肪酸受容体・炎症性サイトカインの遺伝子発現が上昇した。

結論：本ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞は、免疫機能に影響を与える食品成分の評価やその作用機序の解明に、有用なツールとなることが期待される。