

概要

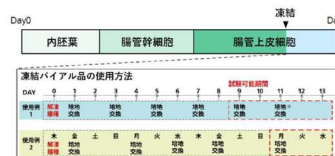
経口剤や健康食品の開発において腸管吸収を評価することは、化合物の有効性や毒性を予測する上で極めて重要です。現在の評価系ではCaco-2細胞を使用した*in vitro*試験や、マウス/ラットなどをを用いた動物実験が行われていますが、代謝酵素/トランスポーターの発現量の違いや種差などによってヒト生体小腸の吸収を十分に予測することが難しい実状があります。F-hiSIEC™は富士フィルムのグループ会社であるFUJIFILM Cellular Dynamics社が持つiPS関連細胞技術と、名古屋市立大学 松永秀先生が確立した分化誘導技術を組み合わせて開発された、ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞です。F-hiSIEC™は従来ヒト小腸研究で用いられてきた細胞と比較して、よりヒト小腸に近い特徴を持ち、*in vitro*で腸管吸収評価、薬物動態解析、腸内細菌との相互作用をはじめとした幅広い研究にご使用いただけます。

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞 F-hiSIEC™
2019年9月発売

FUJIFILM Cellular Dynamics
iPS関連細胞技術 × 分化誘導技術

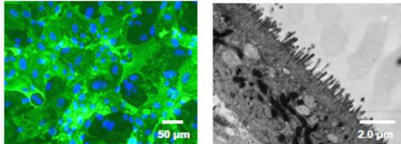
名古屋市立大学
松永秀先生
名古屋市立大学大学院医学研究科 腸管分子生物学 准教授

形態、遺伝子発現

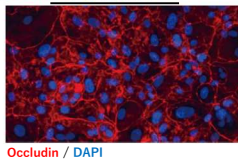


F-hiSIEC™は生体発生を模して分化誘導する。凍結品を解冻・播種後、約10日間培養して各種アッセイに使用する。

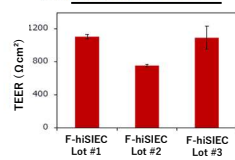
Villin1 / DAPI



Occludin の免疫染色像

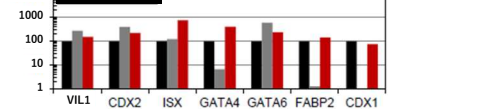


凍結播種後9日目のTEER値



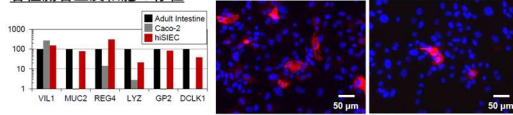
腸管上皮細胞の特徴として、微絨毛の形成やバリア機能が確認された。

小腸マーカー



F-hiSIEC™はCaco-2細胞よりも成人小腸細胞に近い小腸マーカー発現を示した。

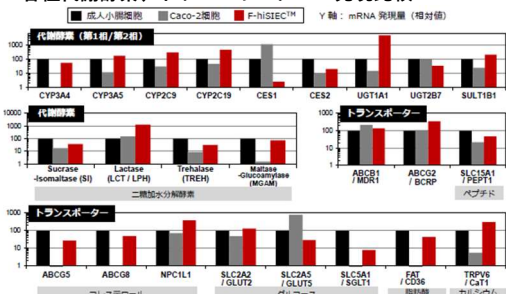
各種腸管上皮細胞の存在



腸管免疫に関わる、杯細胞 (MUC2)、内分泌細胞 (REG4)、パネート細胞 (LY2)、M細胞 (GP2)、タフト細胞 (DCLK1) の存在が示された。

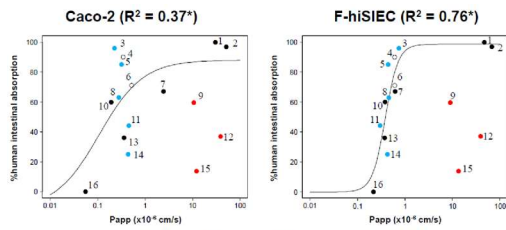
代謝酵素、トランスポーター活性評価

・各種代謝酵素、トランスポーターの発現比較



ヒト小腸に類似した代謝酵素、トランスポーターの遺伝子発現を示した。

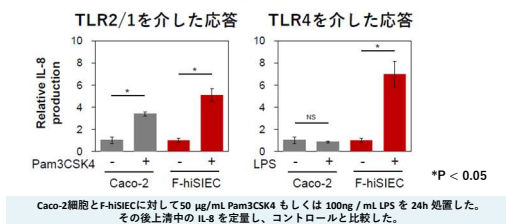
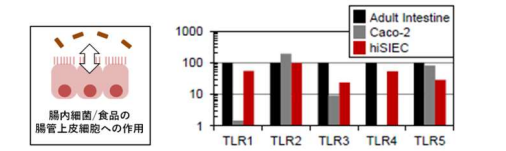
腸管吸収性予測性能の評価



1.アンチピリン、2.カフェイン、3.セファラシリン、4.アセプトロール、5.リバリリン、6.メトフォルミン、7.フィドロクロロアジド、8.インジナビル、9.ペラパミル、10.エナラプリル、11.エスロマイシン、12.ミダゾラム、13.スルピリド、14.シニプリル、15.タクロリムス、16.シシファイエロー R²値はCYP3A4 基質を除外後決定した

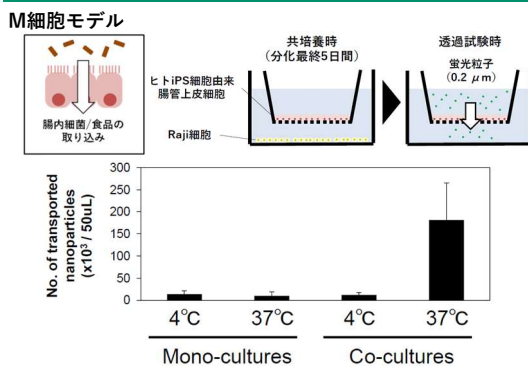
薬物の透過係数 (Papp) とヒト腸管吸収率に相関がみられ、腸管吸収を予測するための代替モデルとしての有用性が示された。

Toll様受容体 (TLR) の発現と腸管免疫



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

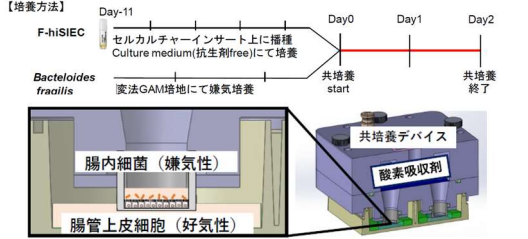
嫌気性細菌、腸内細菌代謝物との共培養



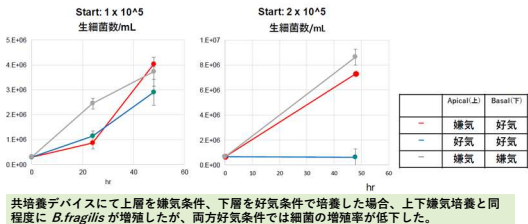
F-hiSIEC をセルカルチャーインサートへ播種後、5 日からセルカルチャーインサート底部へ Raji 細胞と共培養し、10 日目で蛍光粒子(2μm)を上側に追加2時間培養した。その後底側へ取り込まれた蛍光粒子をフローサイトメトリーによって定量した。

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。

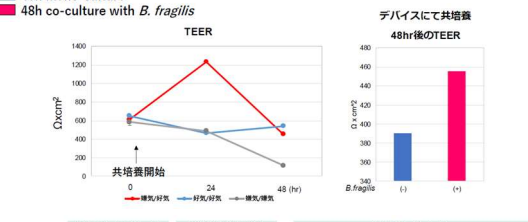
嫌気性細菌 B.fragilis との共培養



F-hiSIEC をセルカルチャーインサート播種後 11 日目から B. Fragilis を上側に播種し共培養デバイス内で 48 時間培養した。48 時間後、F-hiSIEC の TEER 値と遺伝子発現量を評価した。

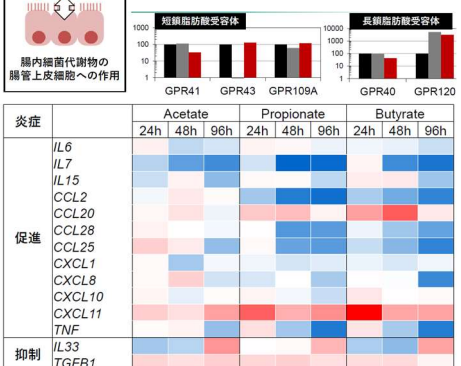


共培養デバイスにて上層を嫌気条件、下層を好気条件で培養した場合、上下嫌気培養と同程度に B.fragilis が増殖したが、両方好気条件では細菌の増殖率が低下した。



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 Junction、短鎖脂肪酸受容体、炎症性サイトカイン遺伝子発現が上昇した。

短鎖脂肪酸シグナル伝達

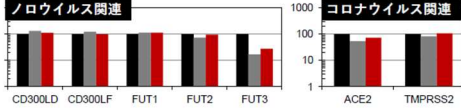


代表的な短鎖脂肪酸 (Acetate, Propionate, Butyrate) を F-hiSIEC に添加し、経時でのサイトカイン・ケモカイン14遺伝子の発現をqPCRにて測定した。

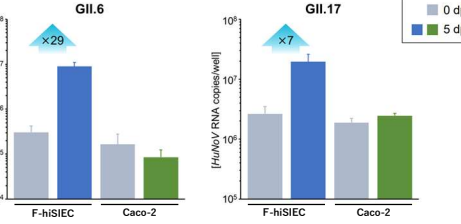
短鎖脂肪酸を添加すると炎症促進性の遺伝子発現が低下し、抑制系の発現が上昇した。

腸管感染性ウイルスの培養

腸管感染性ウイルス関連遺伝子の発現とウイルス増殖評価



ウイルス感染に関わる膜タンパク質についてヒト生体と同等の遺伝子発現が示された。



ヒトノロウイルス (HuNoV) を播種後 11 日目の F-hiSIEC に接種し、接種5日後の培養上清を回収して HuNoV RNAコピー数をリアルタイムPCR法で測定した。

各種細胞へ HuNoV を接種した結果、培地中の HuNoV RNA コピー数はF-hiSIECで増加したが、Caco-2 では変化が無かった。

富士フィルム富山化学では F-hiSIEC を利用した In vitro ヒトノロウイルス 消毒効果評価サービスを実施しております。

詳しくはこちら →

まとめ

- F-hiSIECは各種トランスポーターや代謝酵素の発現がみられ、Caco2細胞よりも精度高くヒト消化管吸収を予測でき、*in vitro* 評価系として有用である。
- M細胞が発現していることから腸内細菌の取り込み可能性が示唆されており、*B.fragilis* などの腸内細菌が及ぼす影響や、腸内細菌の代謝物による影響も評価可能である。
- F-hiSIEC改良法により、CYP3A4等の代謝活性が向上し、ヒトFg値より精度高く予測可能になった。

F-hiSIEC を皆様の研究にご活用いただくと幸いです。

Wako F-hiSIEC のお見積りはこちら →

販売元：富士フィルム和光純薬株式会社