

嫌気性腸内細菌とヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞 (F-hiSIEC)の共培養における相互機能評価

Interaction between anaerobic gut microbes and human iPSC-derived intestinal epithelial cells (F-hiSIEC) by in vitro co-culture system

2023年6月27日

富士フイルム株式会社

○山崎 奈穂¹, 若林 彰², 繁定 啓司², 今倉 悠貴¹, 諸橋 康史¹, 望月清一¹, 岩尾 岳洋³,
松永 民秀³, 遠藤 摂¹, 加藤 寛¹

¹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, ²富士フイルム株式会社
精密プロセス技術センター, ³名古屋市立大学 大学院薬学研究科 臨床薬学分野

COI 開示；腸内細菌学会

筆頭者氏名 山崎奈穂（富士フイルム株式会社）

研究責任者 望月清一（富士フイルム株式会社）

当財団の規定に従いCOI開示をする。

発表演題に関連し開示すべき事項を以下に示す。

1. 役員・顧問：なし
2. 株保有状態：なし
3. 特許使用料：なし
4. 講演料・原稿料：なし
5. 研究費：あり（富士フイルム株式会社）
6. 奨学寄付金：なし
7. 寄付講座所属：なし

本研究の背景・目的

腸内細菌が宿主に及ぼす影響を解析するために、ヒト腸管を再現した評価モデルが必要



iPS関連細胞技術
×
分化誘導技術



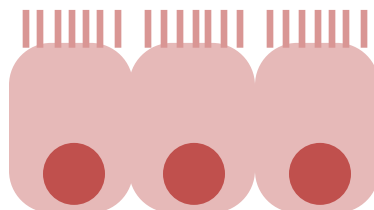
名古屋市立大学
大学院薬学研究科
臨床薬学分野
松永 民秀 教授

2019年にヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞 (F-hiSIEC)を開発

ヒトiPS細胞

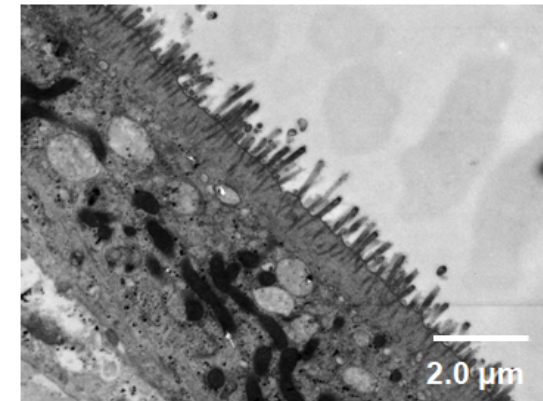
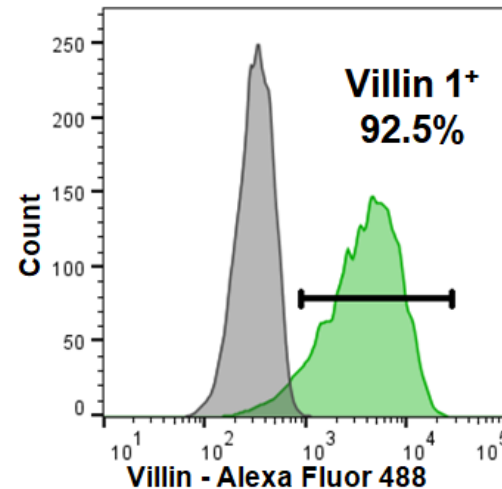
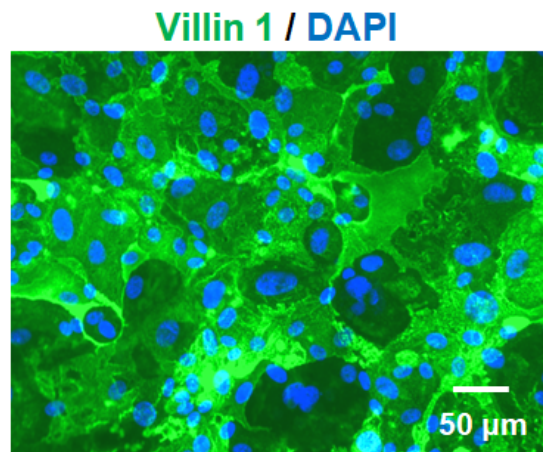
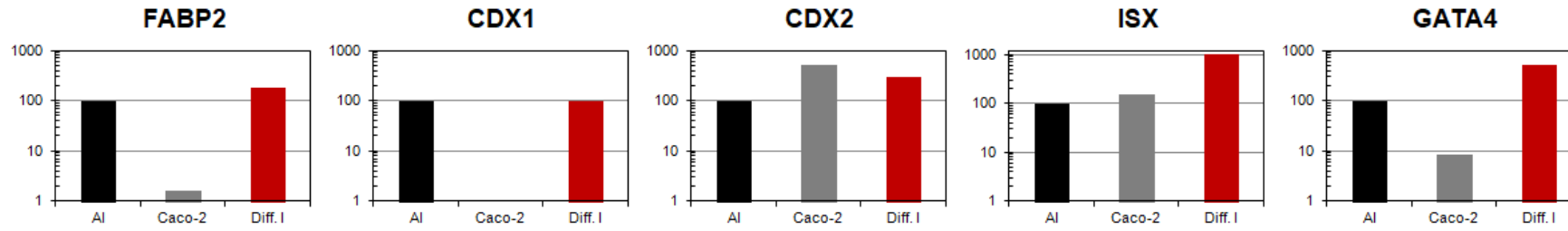


腸管上皮細胞



F-hiSIECを用いて腸内細菌の機能評価系を構築することを目的とした

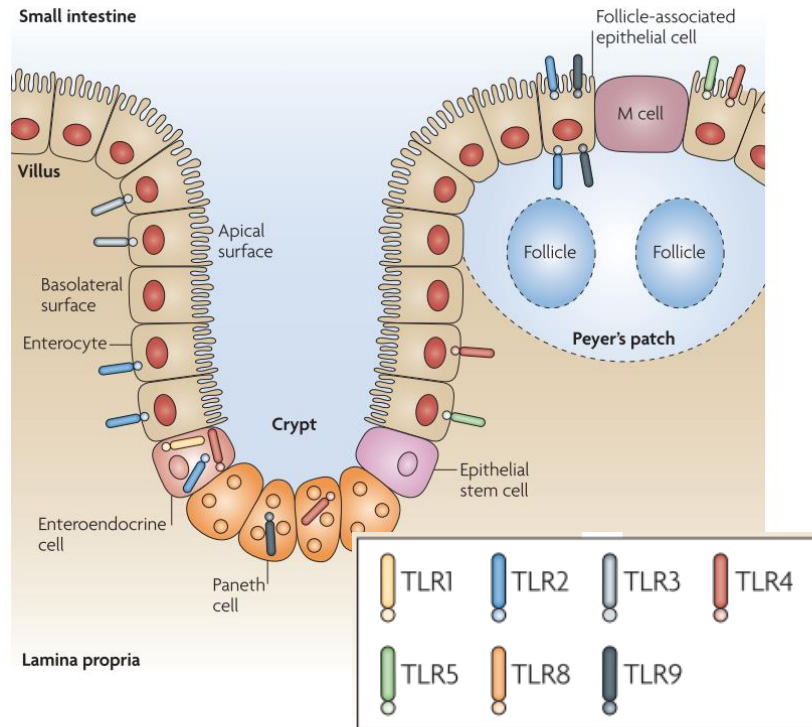
F-hiSIECの特徴 -腸管上皮細胞らしさ-



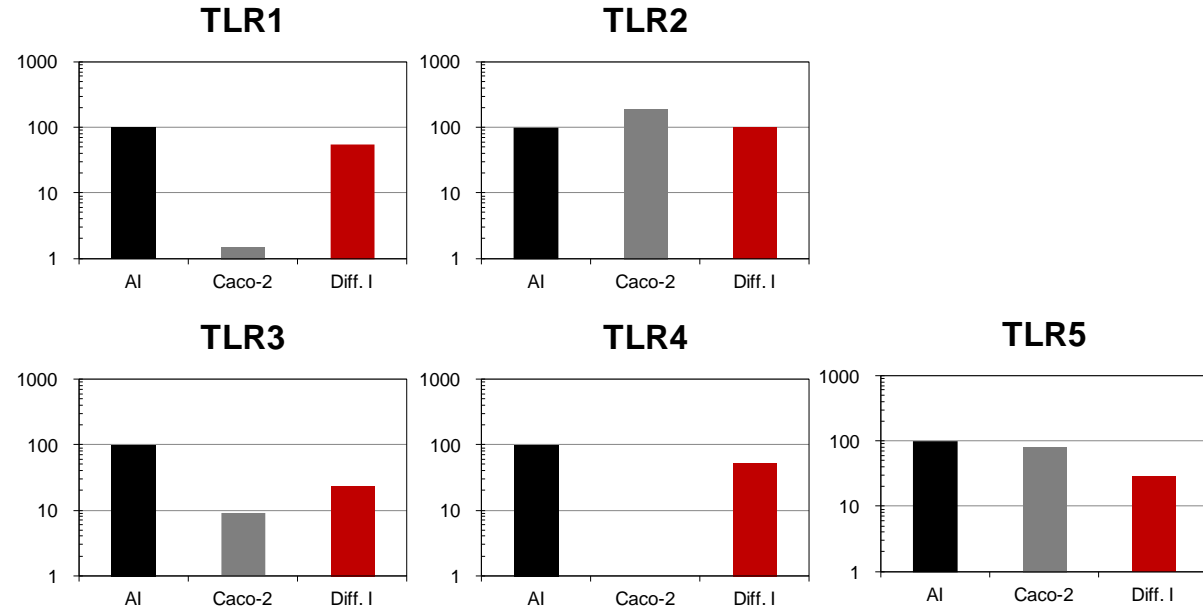
- 各種腸管上皮細胞マーカーについて、生体小腸同等の遺伝子発現を示した。
- 90%以上の細胞が Villin 1 陽性であった。
- 電子顕微鏡での観察により、微絨毛の形成が確認された。
- F-hiSIECは主要な代謝酵素・トランスポーターを生体小腸同程度に発現しており、各種CYP活性を示すことを確認している。

F-hiSIECにおけるパターン認識受容体 (TLRs) の発現

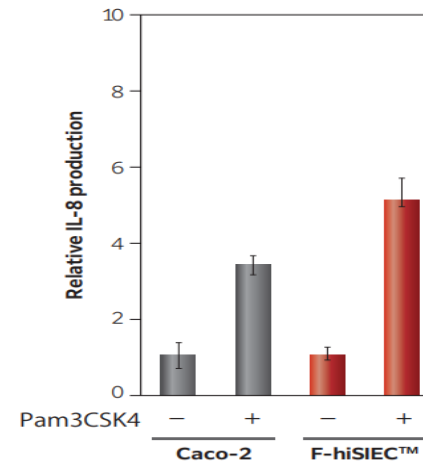
Toll Like Receptors (TLRs)



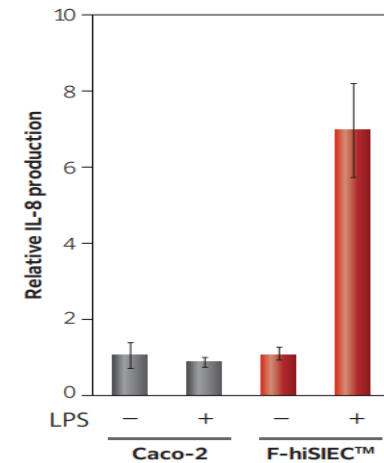
Nat Rev Immunol., 2010. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2707>



TLR2/1による免疫応答



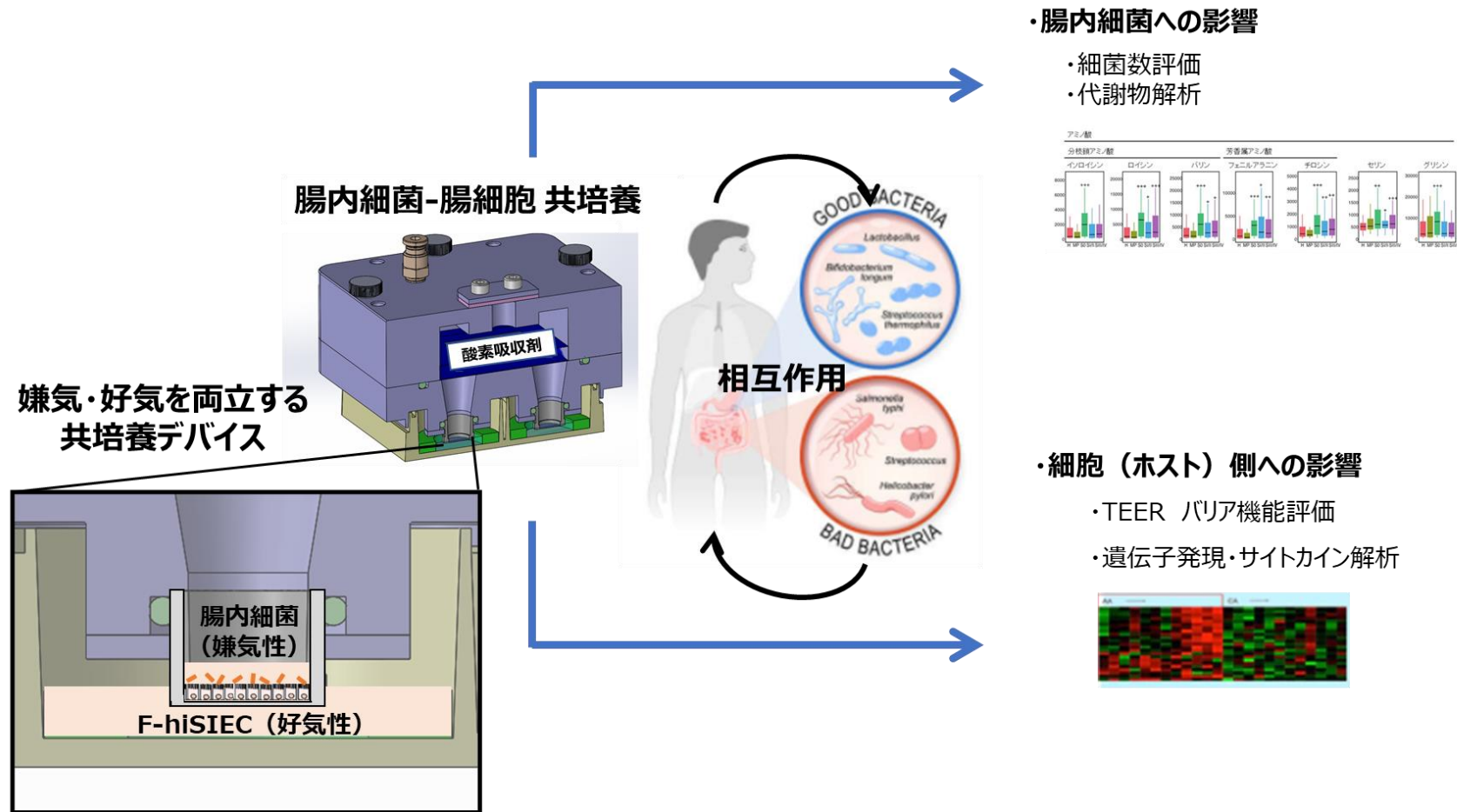
TLR4による免疫応答



腸内細菌の認識に重要な主要TLRについて、F-hiSIECは生体小腸と同程度の遺伝子発現を示し、TLR1/2および4のリガンドに応答することを確認した

F-hiSIECを用いた嫌気性腸内細菌との共培養システム

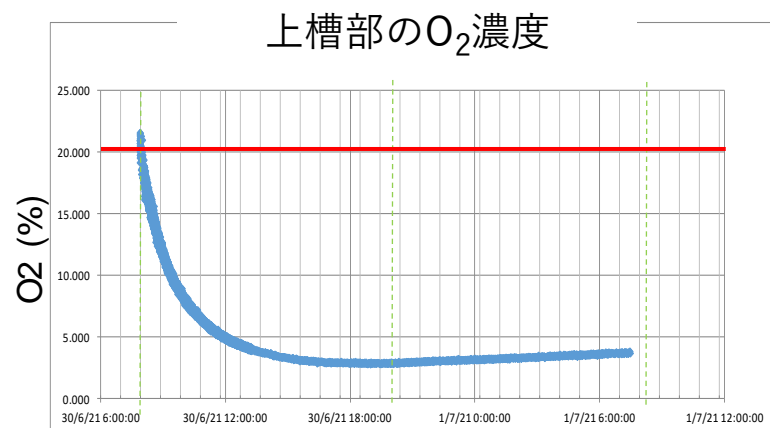
腸内細菌の多くは嫌気性であるため、細菌のみを嫌気条件に維持する共培養系を構築した



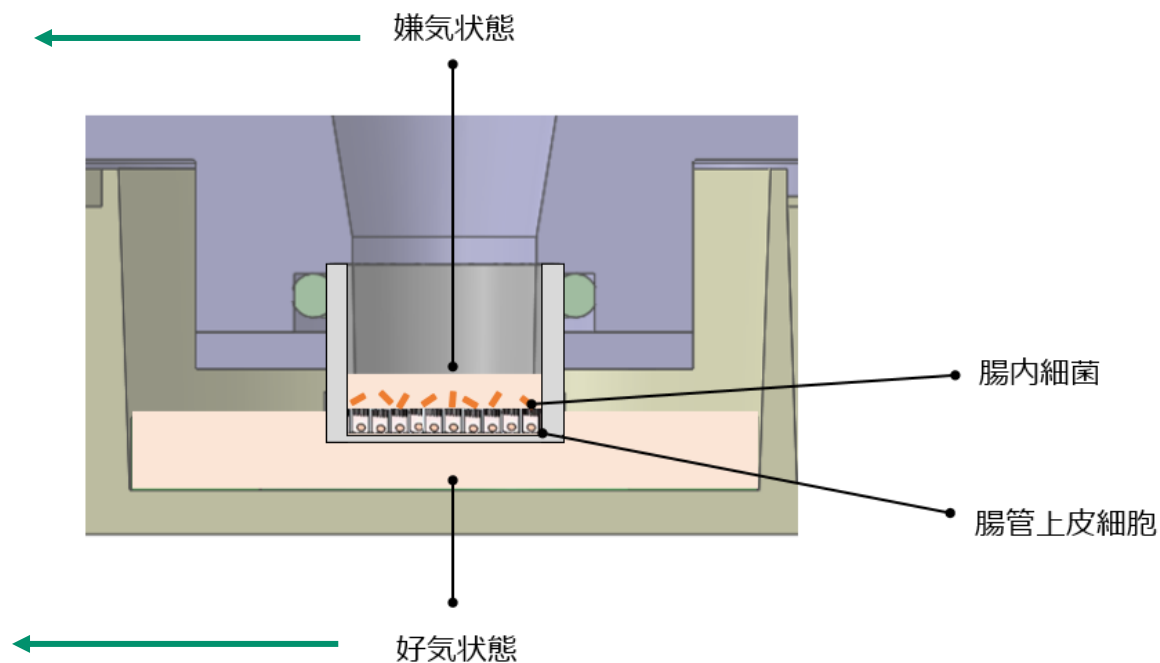
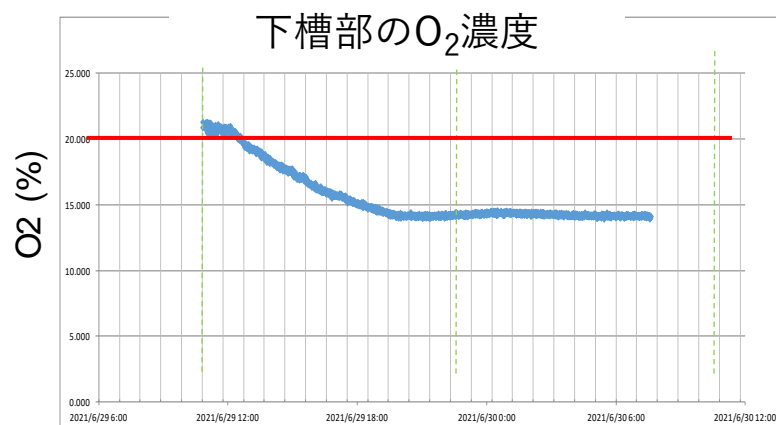
嫌気性・好気性条件を両立する共培養デバイスを開発した
通常のCO₂インキュベーターで培養可能

共培養デバイスの酸素濃度検証

大気中の
酸素濃度
20%



大気中の
酸素濃度
20%

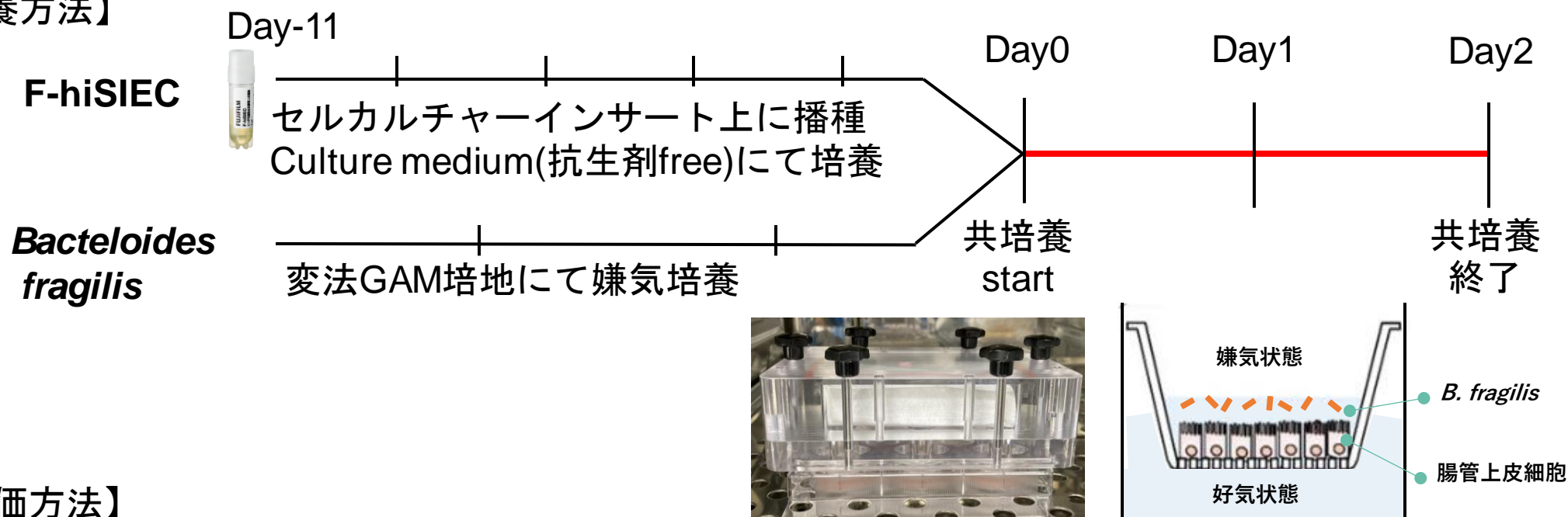


酸素濃度計PreSens Measurement Studio 2

想定通りデバイスの上槽を嫌気条件で、下槽を好気条件で72hr以上維持することが可能

実験方法

【培養方法】

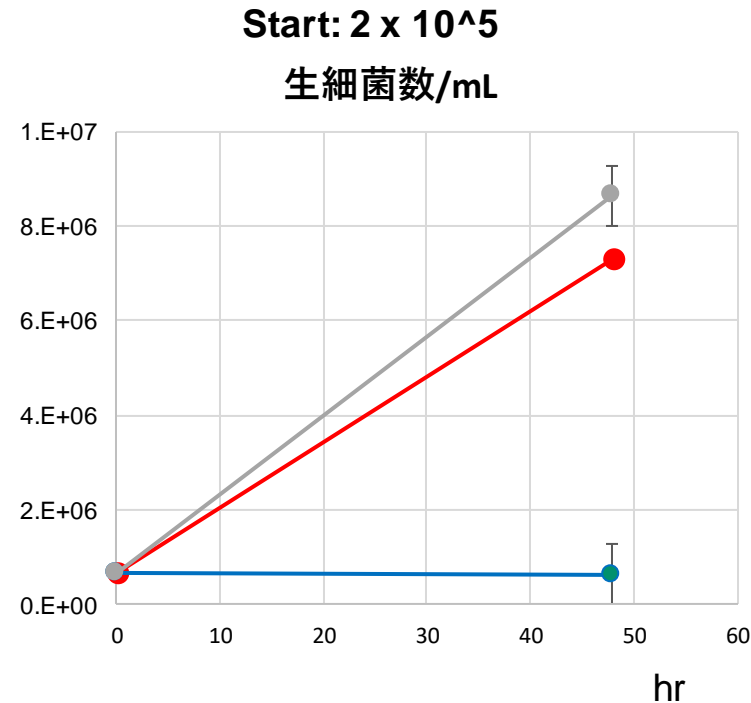
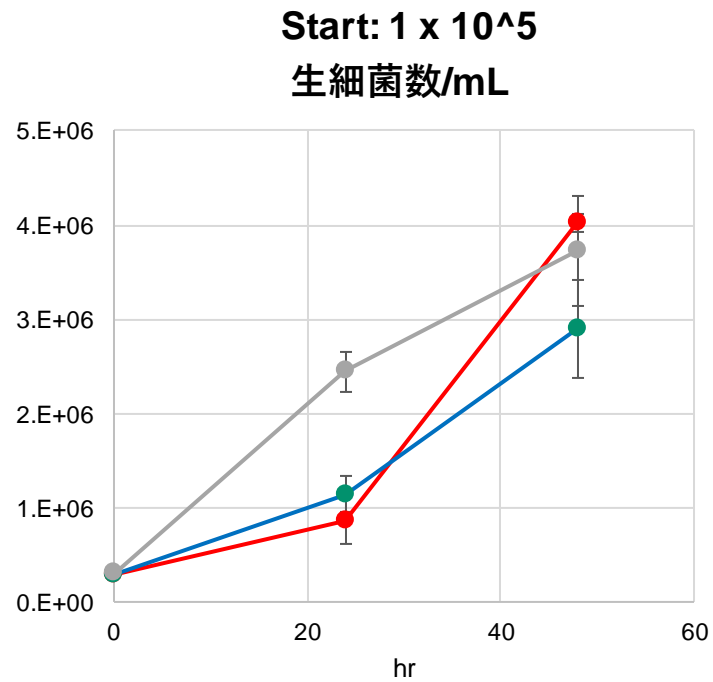


【評価方法】

- ・ 菌数測定（フローサイトメトリー）
- ・ バリア機能 TEER測定
- ・ 腸管上皮細胞の遺伝子発現測定

- ・ *B.fragilis*は免疫調節・バリア強化作用が報告されている偏性嫌気性腸内細菌
- ・ F-hiSIECと*B.fragilis*をそれぞれ前培養しておき、約10日後にデバイスを用いて共培養開始
共培養後の菌数変化、バリア機能と遺伝子発現を測定した

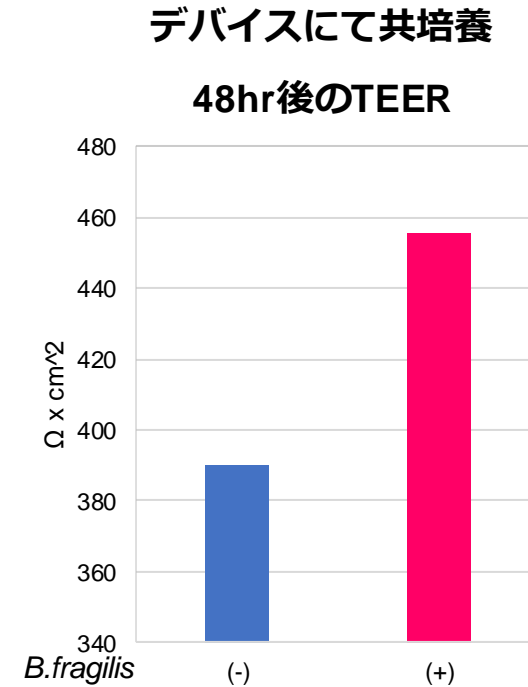
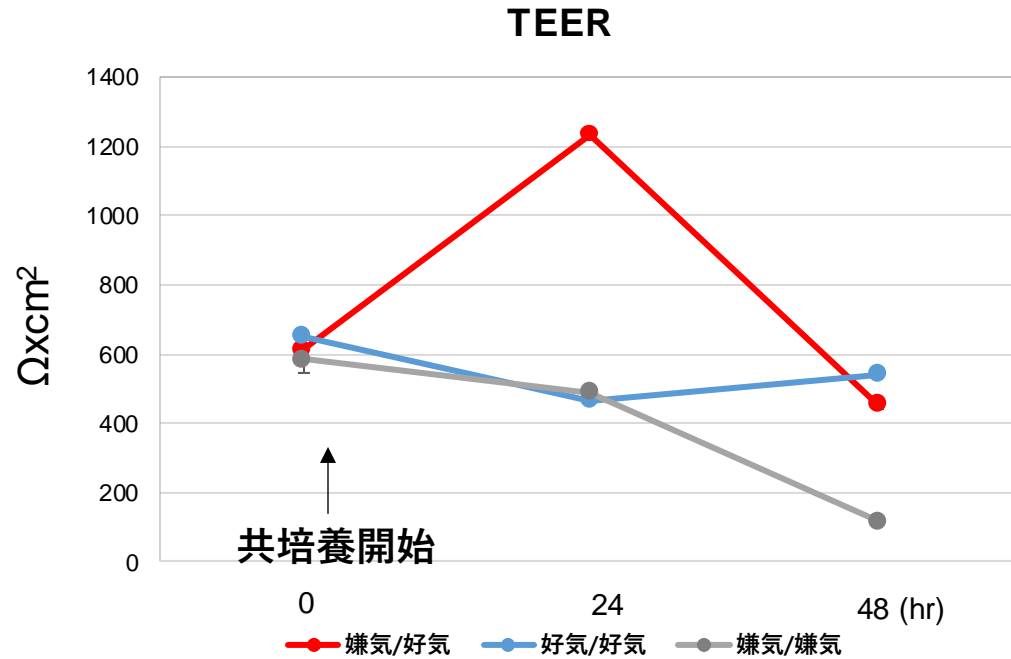
【結果】 共培養時の *B. fragilis* の菌数変化



	Apical(上)	Basal(下)
— (Red)	嫌気	好気
— (Blue)	好気	好気
— (Grey)	嫌気	嫌気

共培養デバイスにて上槽を嫌気条件で下槽を好気条件で培養した場合、上下嫌気培養と同程度に細菌が増殖した
一方、両方好気条件で培養すると、細菌の増殖率が低下した

【結果】 共培養によるバリア機能TEERの変化



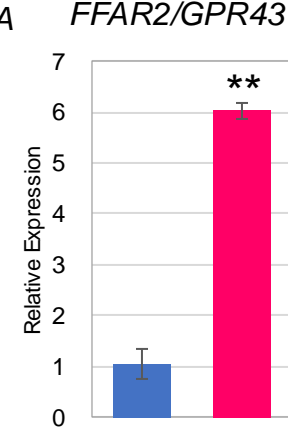
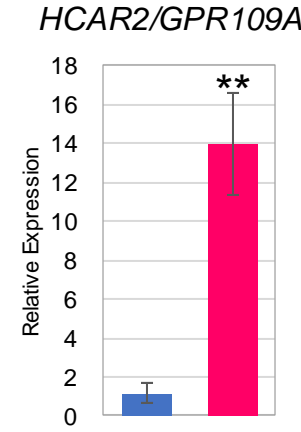
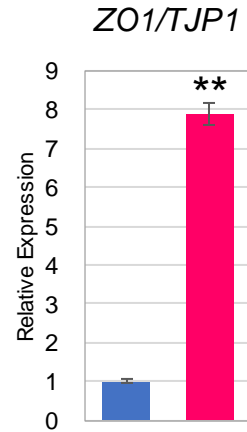
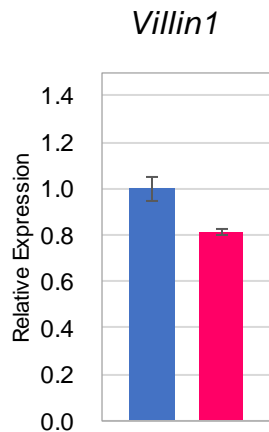
デバイス共培養では、1日後のTEERが上昇していた
上下槽を嫌気条件で培養するとTEERが低下した
デバイスにて*B. fragilis*とF-hiSIECを共培養すると共培養しない場合と比較して
TEERが上昇した

【結果】 *B.fragilis*と共培養48h後のF-hiSIECの遺伝子発現変化

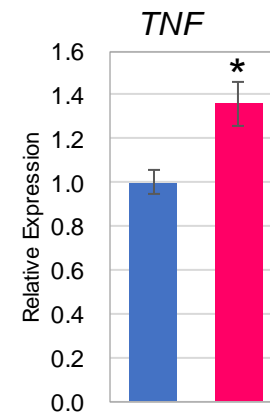
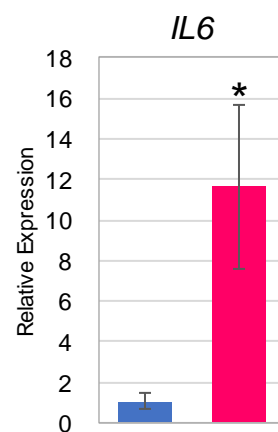
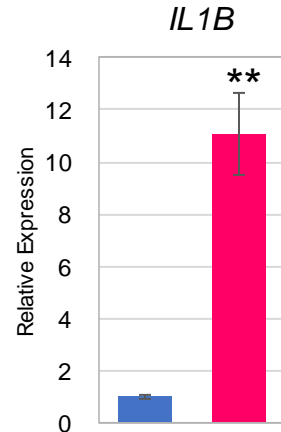
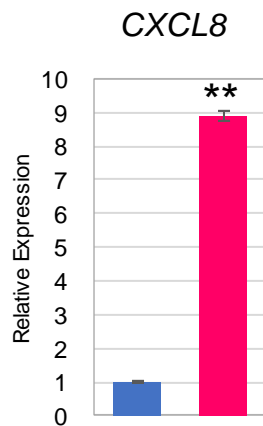
腸管上皮細胞

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



N=3, Mean ± SD
**p<0.01
* p<0.05

***B.fragilis*の共培養により、F-hiSIECのタイトジャンクション遺伝子、短鎖脂肪酸受容体、炎症性サイトカイン遺伝子の発現が上昇した**

まとめ

- 嫌気性腸内細菌と好気性F-hiSIECの共培養デバイスを開発した。
- デバイスにて嫌気性腸内細菌*B.fragilis* とF-hiSIECを共培養した結果、*B.fragilis*はデバイス内で嫌気環境と同様の増殖が認められた。
- 共培養により、F-hiSIECのTEER値が上昇したことから、*B.fragilis*は腸のバリア機能を強化する機能があることが示唆された。
- 共培養により、F-hiSIECにおけるタイトジャンクション関連遺伝子や短鎖脂肪酸受容体および炎症性サイトカインの発現が上昇したことから、*B.fragilis*は腸のバリア機能を強化する機能や腸の免疫を調節する機能があることが示唆された。
- 通性嫌気性乳酸菌*Lactococcus lactis*についても同様に共培養化可能であることを確認している。

【考察】

- F-hiSIECは腸内細菌との共培養が可能であり、腸内細菌の機能評価に有用であることが示された。
- 今後、共培養による腸内細菌の代謝物解析やF-hiSIECの網羅的発現解析等により、さらに詳細に細菌の機能を評価することが可能となると考えられる。
- 炎症性腸疾患(IBD)モデルとの併用により腸内細菌の免疫調節作用の評価にも応用が期待される。

本発表にご興味をお持ちの方は富士フイルムまでご連絡下さい

FUJIFILM
Value from Innovation