FUJIFILM
Value from Innovation

第94回日本細菌学会

WS 9-1
ODP-175

Charactarization of human iPS cell-derived Small Intestinal Epitherial like Cells (F-hiSIEC™) and their Application to Evaluate the Intestinal Bacterial Functions

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞 F-hiSIEC（ｴﾌ・ﾊｲｼｰｸ）の特性と腸内細菌機能評価系への応用

山﨑　奈穂[1]、美馬　伸治[1]、今倉　悠貴[1]、岩尾　岳洋[2]、松永　民秀[2]、永田　幸三[1]、谷口　雅彦[1]

[1]富士フイルム株式会社　R&D統括本部　バイオサイエンス&エンジニアリング研究所
[2]名古屋市立大学　大学院薬学研究科　臨床薬学分野

本日のアジェンダ

- F-hiSIEC™の特性
- F-hiSIEC™を用いた腸内細菌機能評価系

本日のアジェンダ

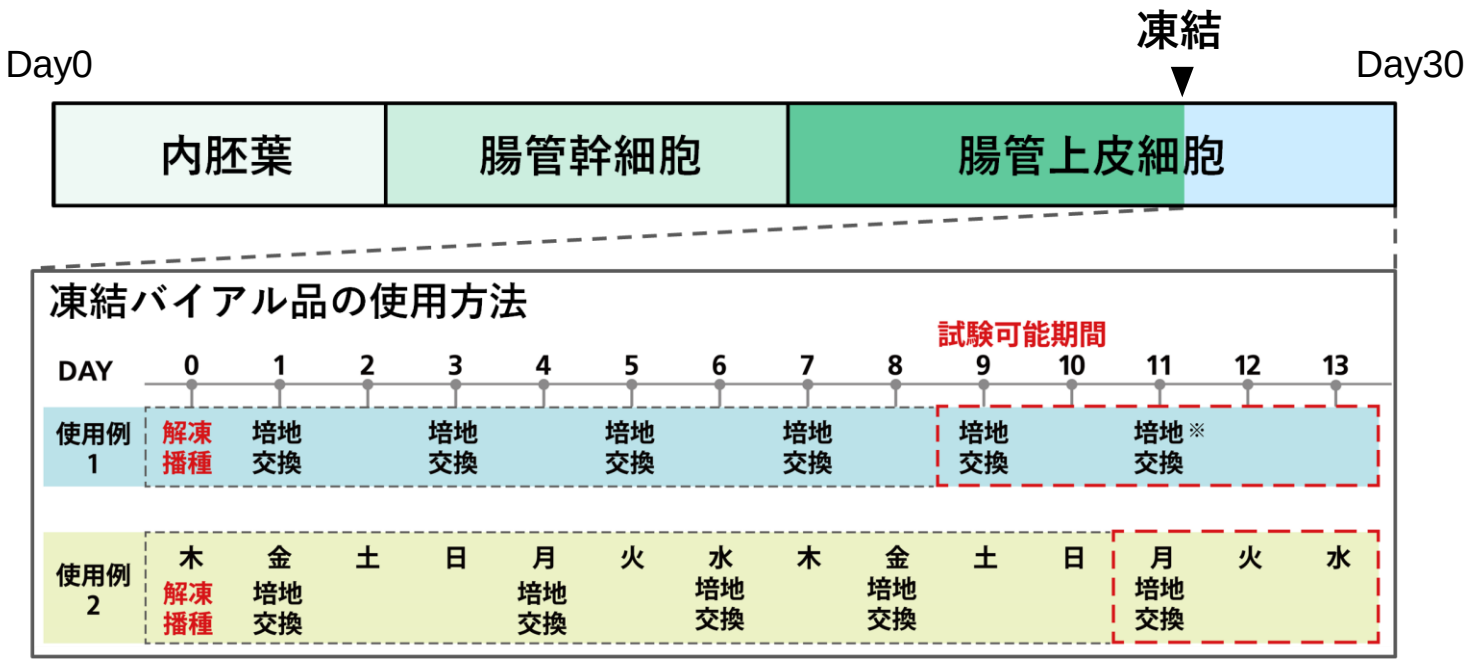
- **F-hiSIEC™の特性**
- F-hiSIEC™を用いた腸内細菌機能評価系

F-hiSIECの特徴

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞

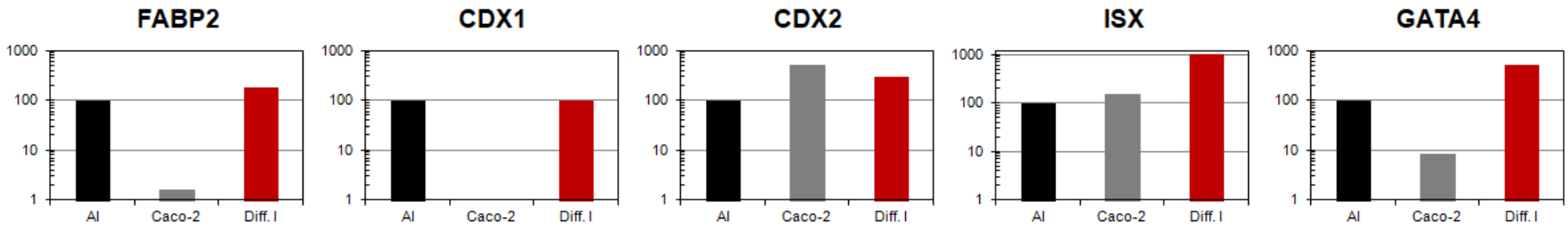
F-hiSIEC™

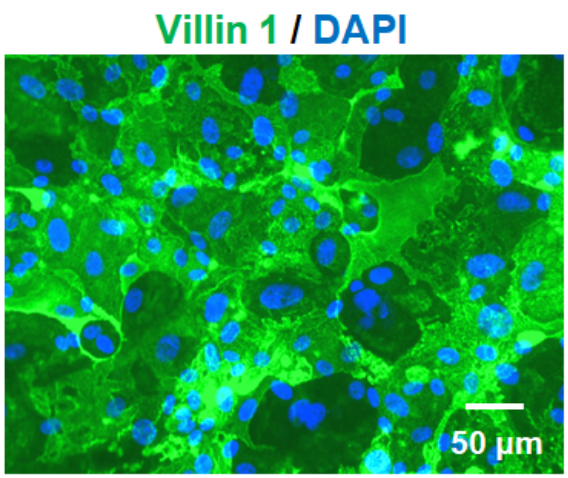
FUJIFILM human iPS-derived Small Intestine Epithelial like Cell

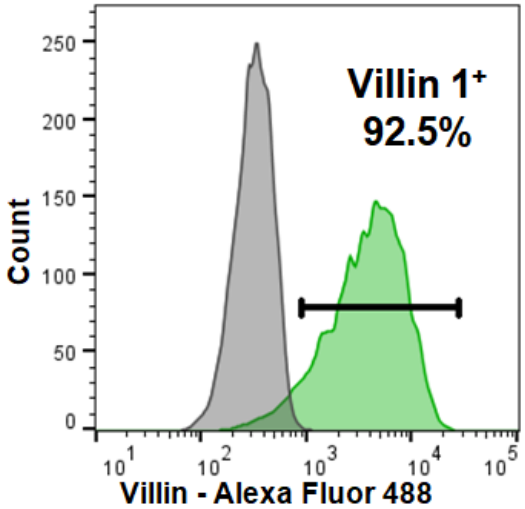


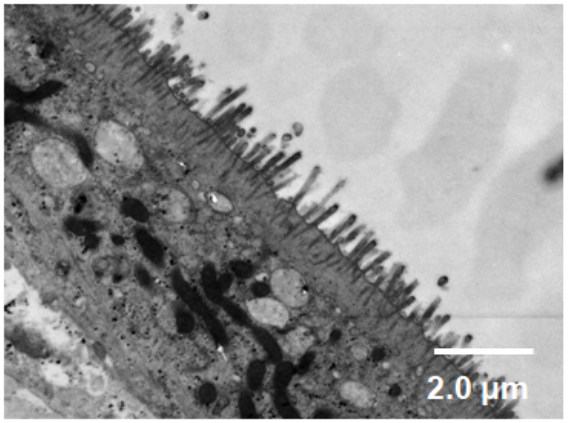
- 分化途中の細胞を凍結保存し、F-hiSIEC™として開発
- 細胞解凍後、9-11日培養で成熟した腸管上皮細胞として使用可

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。

本日のアジェンダ

・F-hiSIECTMの特性

・F-hiSIECTMを用いた腸内細菌機能評価系

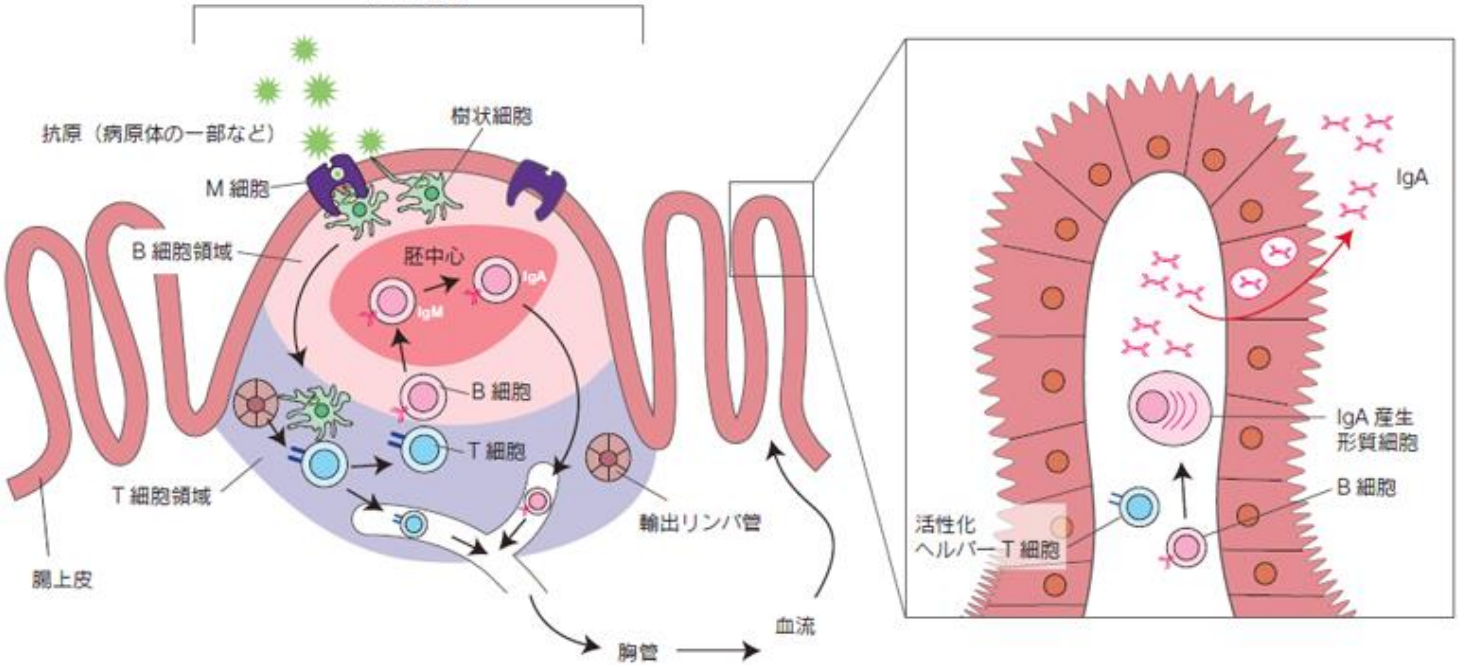
免疫器官としての小腸

FUJIFILM
Value from Innovation

・小腸は腸管上皮細胞を挟んで体外と体内の境界となる臓器

・体内最大の免疫器官であり、有害な因子は排除し、無害な抗原には応答しない（免疫寛容）高度な免疫システムを獲得（腸管免疫）

パイエル板　小腸に局在する免疫組織。
腸管内の抗原を取り込み、モニタリングしている。



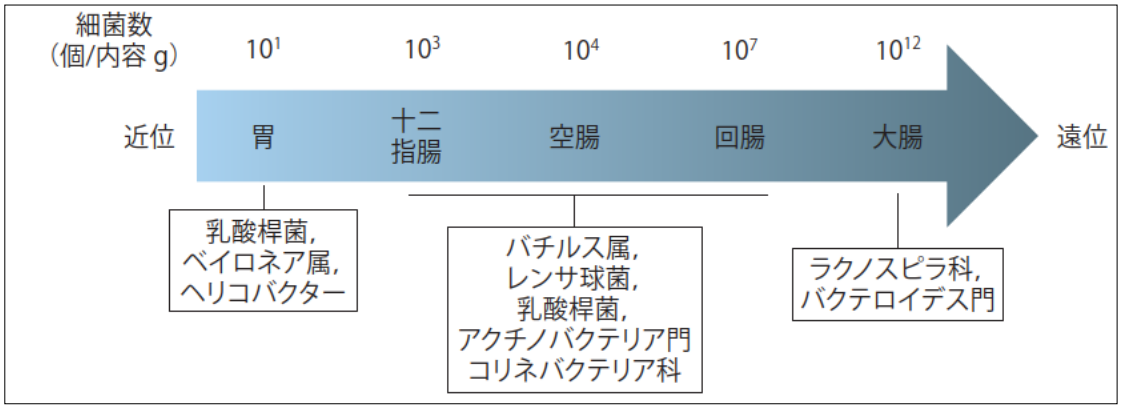
https://ruo.mbl.co.jp/bio/product/allergy-Immunology/article/gut-immunity.html

NEVER STOP

腸内細菌と腸管免疫

FUJIFILM
Value from Innovation

腸管に存在する腸内細菌の分布



もっとよくわかる！腸内細菌叢

・腸内細菌数は大腸が最大

・胃から離れた空腸、回腸では乳酸桿菌などの細菌が分布している

小腸にも多様な腸内細菌が存在している

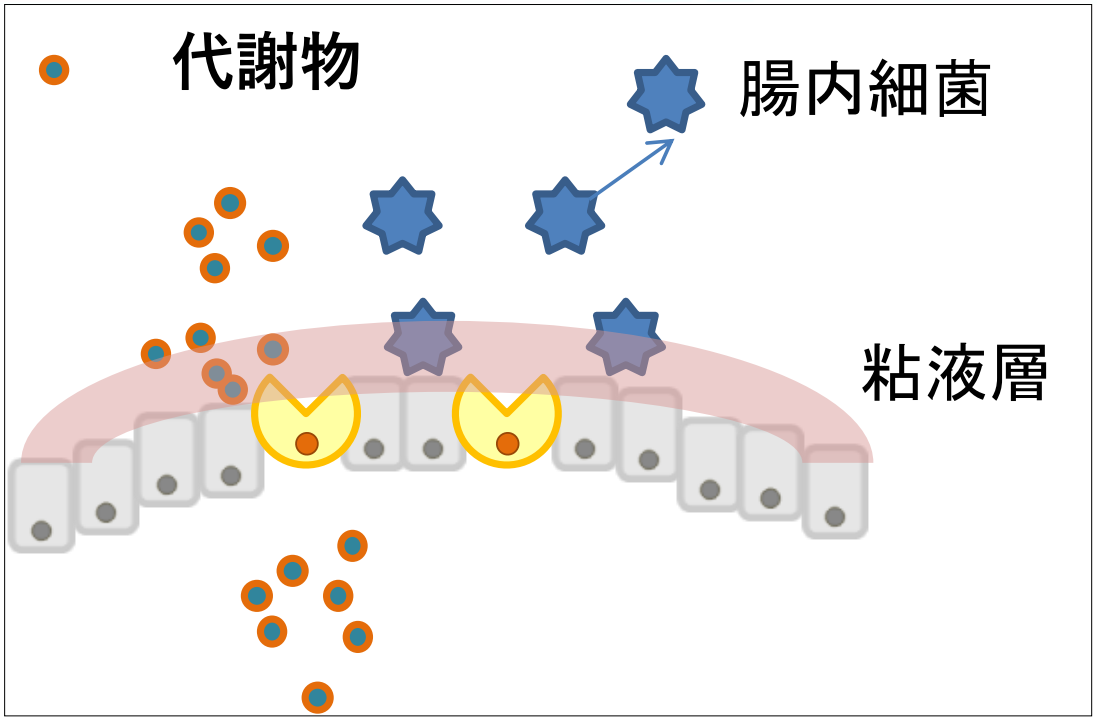
腸内細菌と腸管免疫の関係

- **腸内細菌が存在しない無菌マウスではパイエル板の数が減少していた**
- **無菌マウスでは免疫寛容が成立しない**

腸内細菌は腸管免疫に重要な役割を果たしている

NEVER STOP

F-hiSIECと腸内細菌



腸内細菌と生体小腸が相互作用する経路

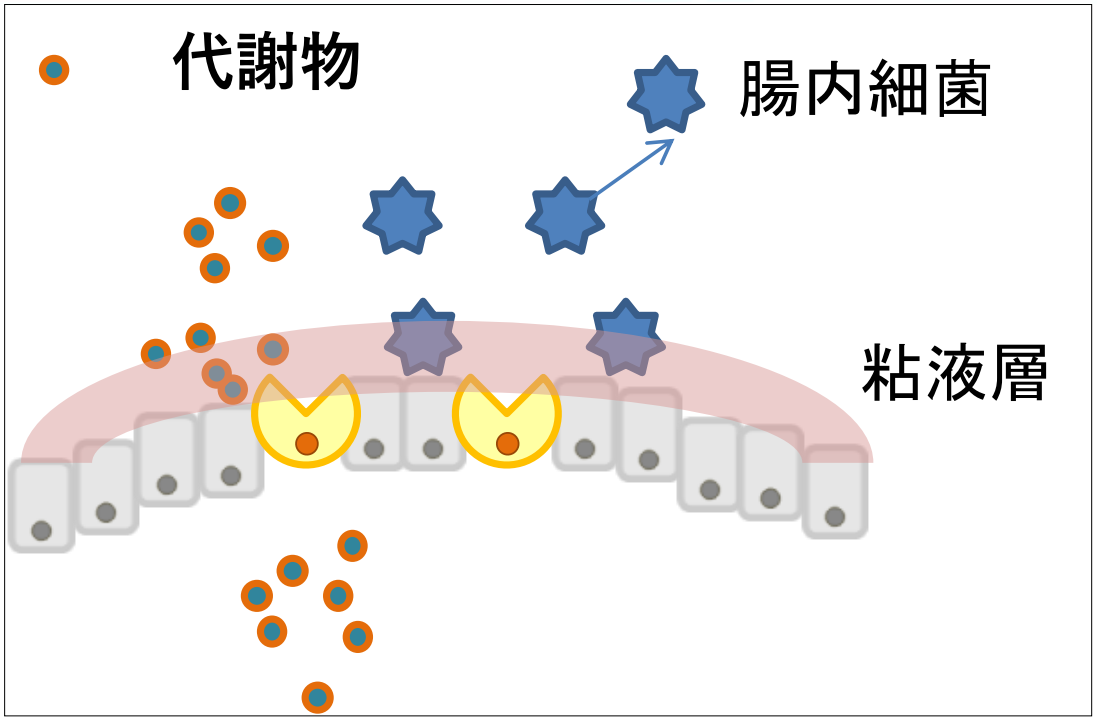
①細菌（抗原）を取り込む。

②腸内細菌が直接上皮細胞に接触する。

③腸内細菌が産生する代謝物（短鎖脂肪酸）が上皮細胞に作用する。

それぞれの経路についてF-hiSIECの応答性を検討した

F-hiSIECと腸内細菌



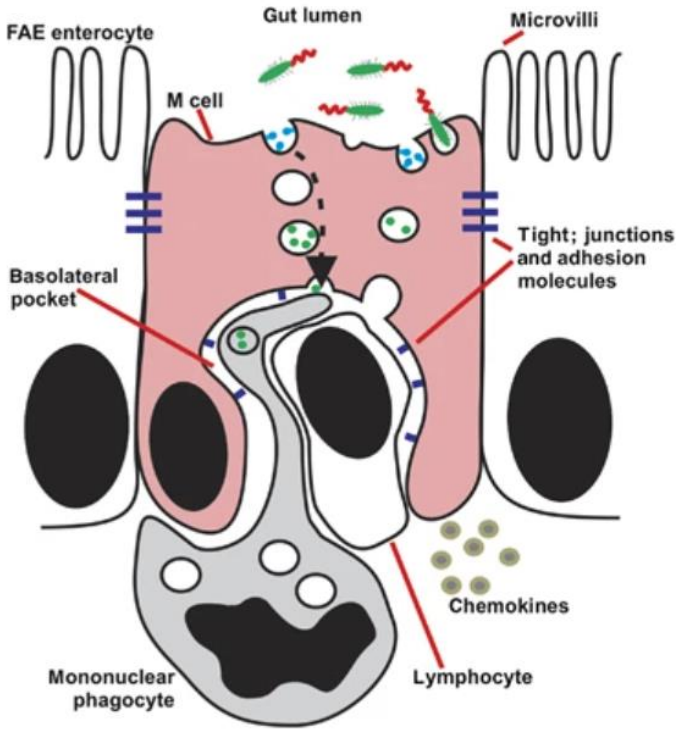
腸内細菌と生体小腸が相互作用する経路

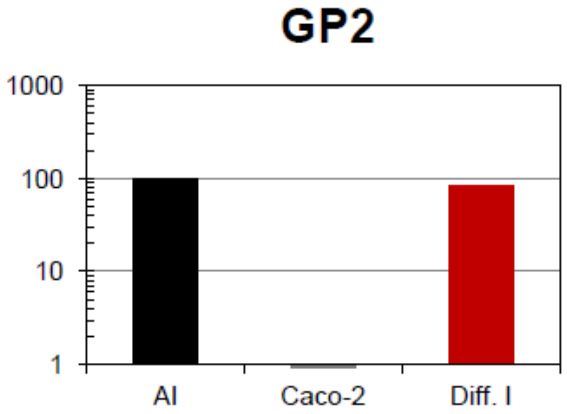
<u>①細菌（抗原）を取り込む。</u>

②腸内細菌が直接上皮細胞に接触する。

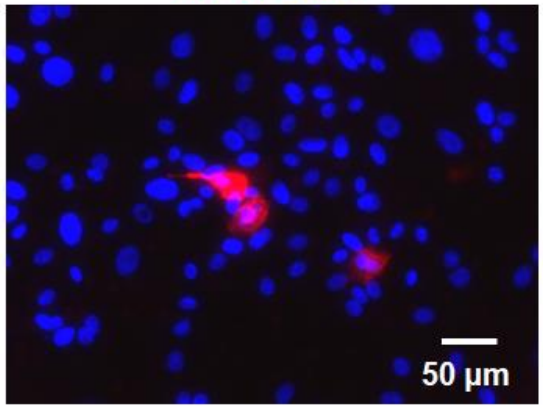
③腸内細菌が産生する代謝物（短鎖脂肪酸）が上皮細胞に作用する。

F-hiSIECにはM細胞が存在する





M cell marker GP2 / DAPI



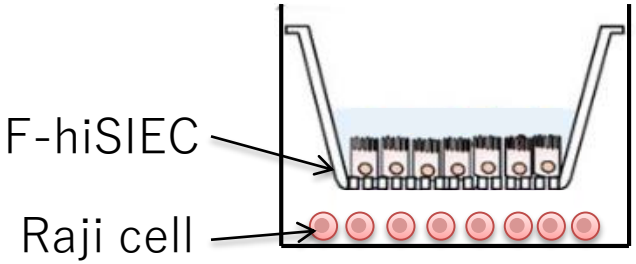
・M細胞は腸管幹細胞より分化した上皮細胞の一種。
・細菌・ウイルス・微粒子などの抗原の取り込み(トランスサイトーシス)機能を有する。

F-hiSIECにおける抗原取込み能を評価した

実験方法

試験可能期間

DAY	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
使用例1	解凍 播種	培地 交換		培地 交換		培地 交換		培地 交換		培地 交換	培地 交換			



Raji cell 共培養

Raji除去

TEER

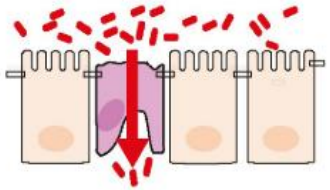
透過試験

遺伝子発現評価

免疫染色

抗原取り込み能

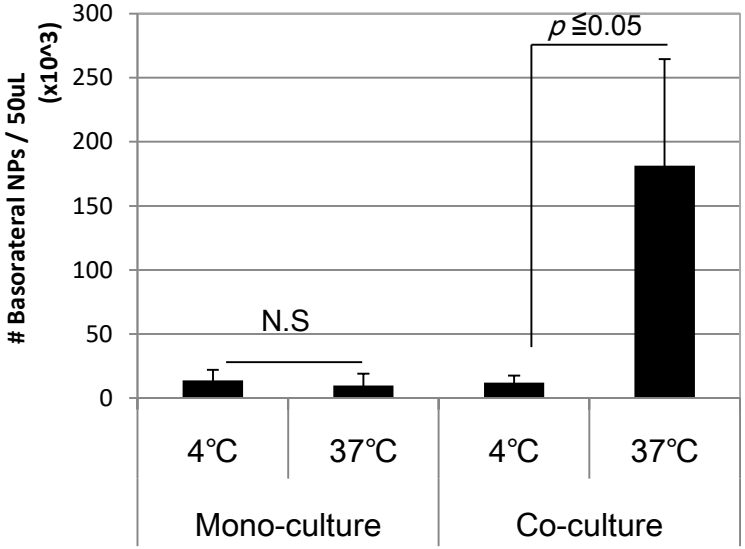
蛍光粒子(FluoSphere 0.2um) 透過試験



フローサイトメトリーにて透過能を評価

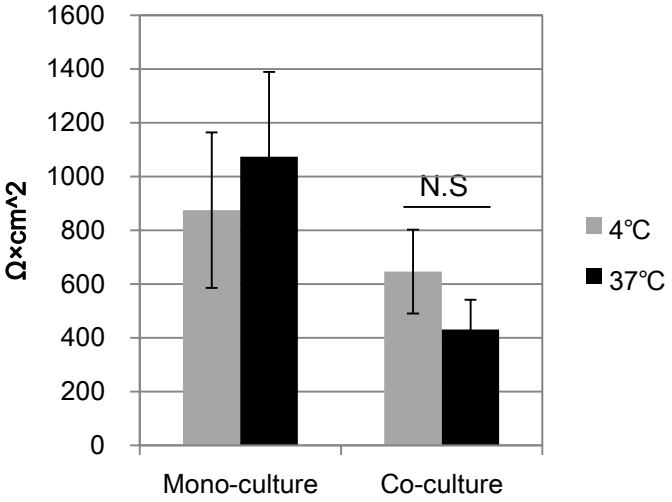
蛍光粒子透過能とバリア機能

蛍光粒子（0.2um）透過数　（2h）



N=4

透過試験直前のTEER



・F-hiSIEC単培養の場合、エンドサイトーシス阻害条件（4°C）と37°Cでの透過能に差がなかった。
・F-hiSIECとRajiの共培養の場合、37°Cでのみ蛍光粒子の透過が確認された。
・4°Cと37°C条件下で、F-hiSIECのTEER値には差がなかった。

Raji細胞との共培養により粒子の透過能を評価することができた

抗原透過能評価モデルとしての検討　–まとめ–

FUJIFILM
Value from Innovation

✔F-hiSIECにはM細胞マーカーGP2を発現する細胞が存在する。

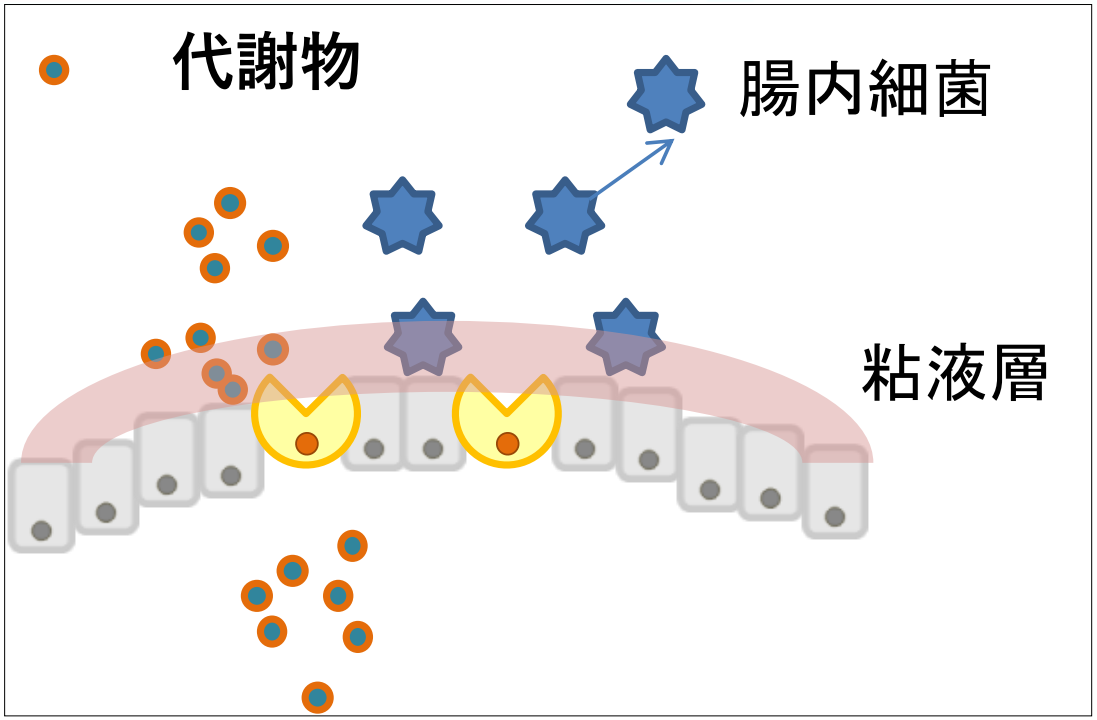
✔F-hiSIECはRaji細胞と共培養することにより、抗原取り込み能の評価が可能となった。

✔F-hiSIECはGP2以外にM細胞分化に必要なSPIBやRANKが発現しており、Rajiと共培養することによりM細胞の極性が誘導されることが示唆された。

F-hiSIECは抗原の透過能評価モデルとしての応用が期待できる

NEVER STOP

F-hiSIECと腸内細菌



腸内細菌と生体小腸が相互作用する経路

①細菌（抗原）を取り込む。

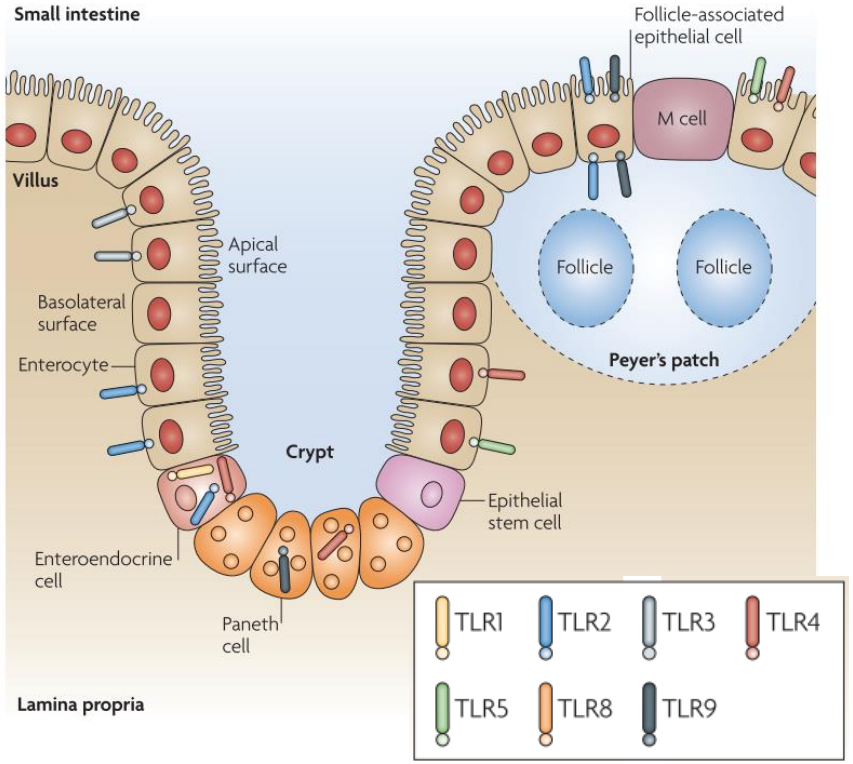
②腸内細菌が直接上皮細胞に接触する。

③腸内細菌が産生する代謝物（短鎖脂肪酸）が上皮細胞に作用する。

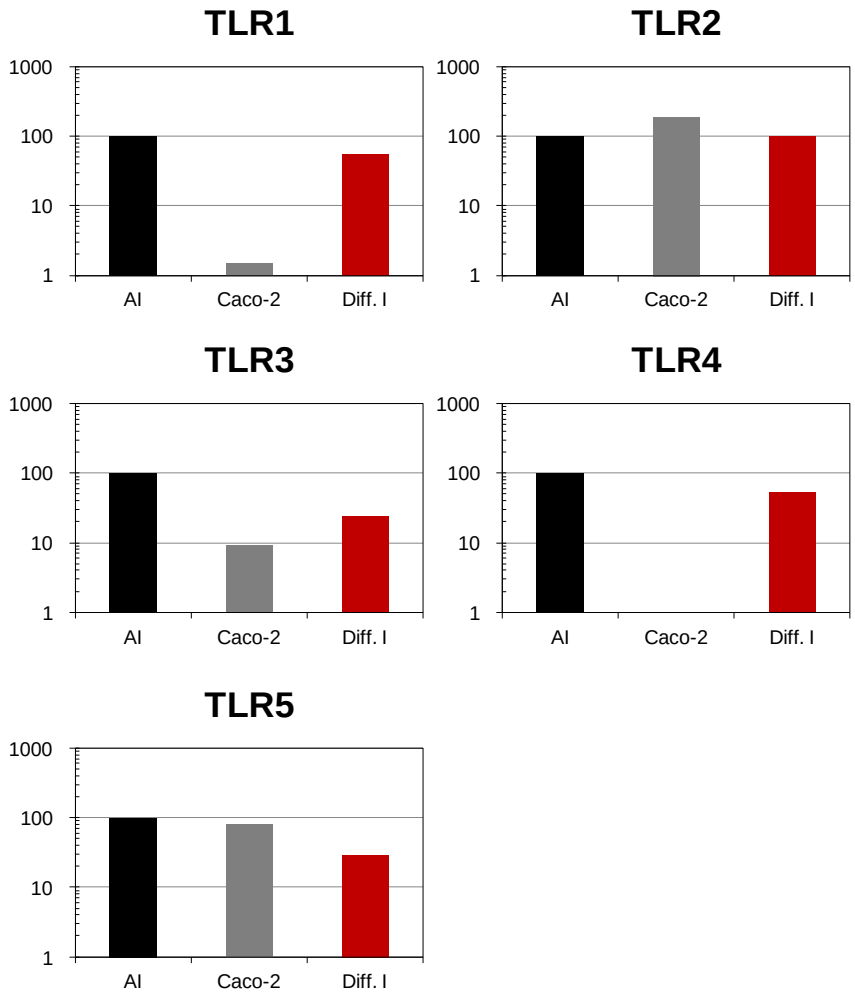
F-hiSIECにおけるパターン認識受容体（TLRs）の発現

FUJIFILM Value from Innovation

Toll Like Receptors (TLRs)



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



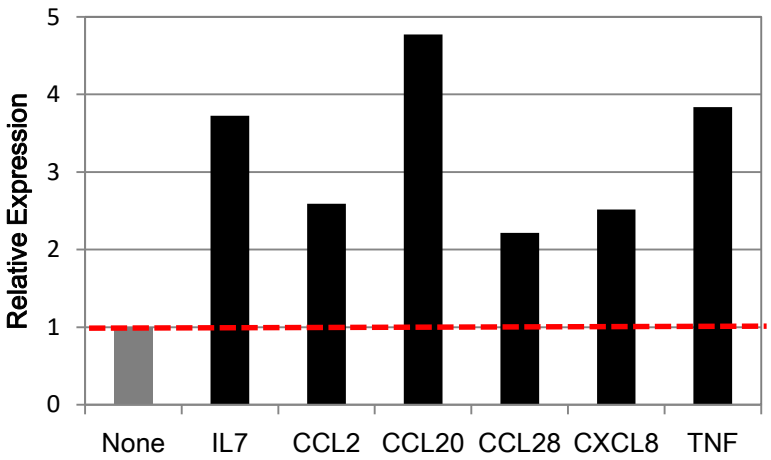
腸管上皮の主要なToll-like receptor(TLR)は、生体小腸と同程度の遺伝子発現を示した

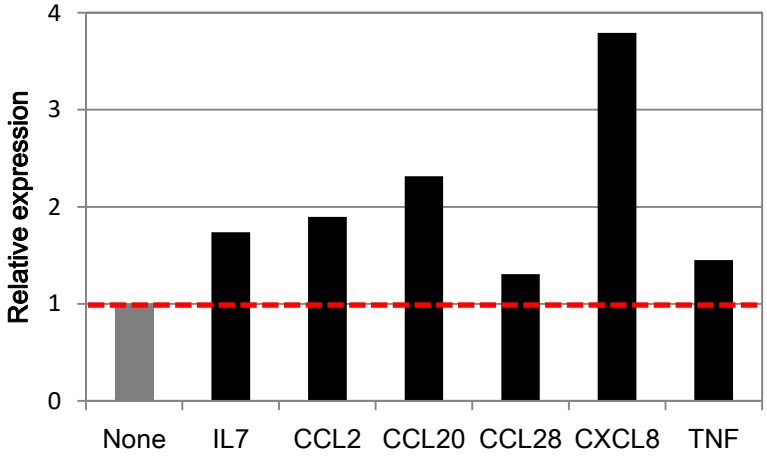
NEVER STOP

TLR リガンドを添加後のサイトカインの発現変動

FUJIFILM
Value from Innovation

Pam3csk4 (50ug/mL) またはLPS (100ng/mL)をF-hiSIECに添加し24h後のサイトカイン遺伝子発現をqPCRにて計測した

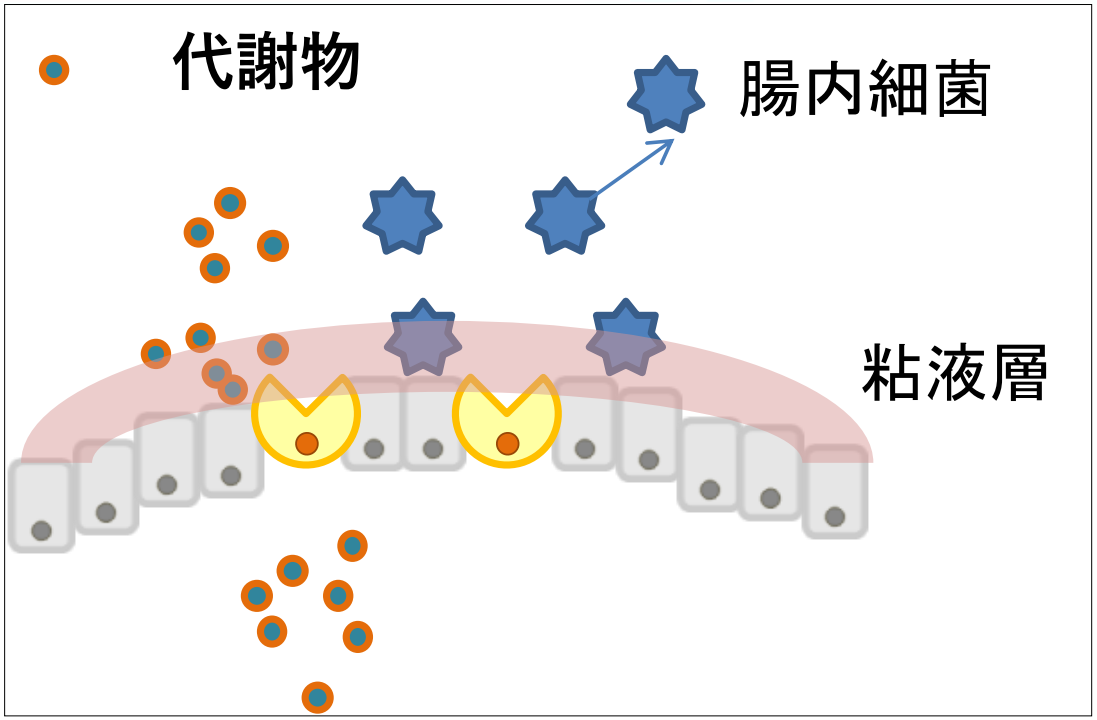




LPS（TLR4リガンド）およびPam（TLR1/2リガンド）の添加によって、炎症を促進させるサイトカインの発現量が上昇した

NEVER STOP

F-hiSIECと腸内細菌



腸内細菌と生体小腸が相互作用する経路

①細菌（抗原）を取り込む。

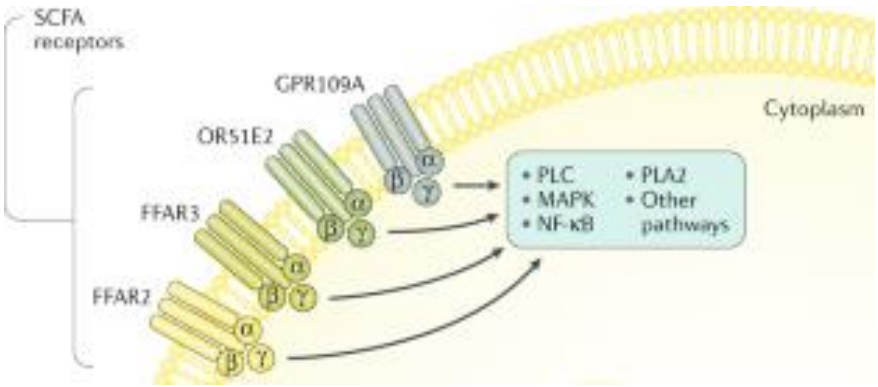
②腸内細菌が直接上皮細胞に接触する。

③腸内細菌が産生する代謝物（短鎖脂肪酸）が上皮細胞に作用する。

F-hiSIECにおける短鎖脂肪酸の受容体の発現

FUJIFILM
Value from Innovation

短鎖脂肪酸の受容体

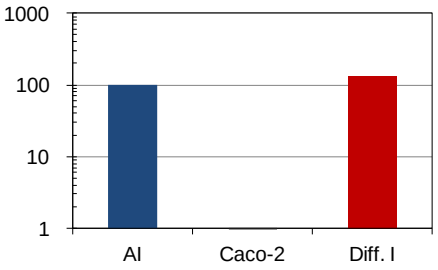


https://www.nature.com/articles/s41575-019-0157-3

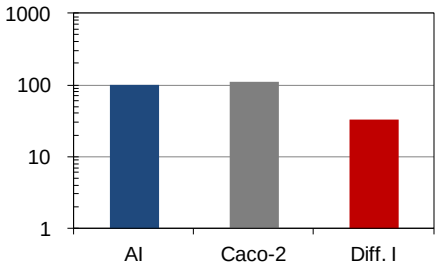
Receptor		SCFA substrate
FFAR2	GPR43	Ac, Pro
FFAR3	GPR41	Ac, Pro, Bu
HCAR2	GPR109A	Bu
OR51E1	GPR164	Bu
OR51E2	Olfr78	Ac, Pro
GPR42		Pro

短鎖脂肪酸受容体

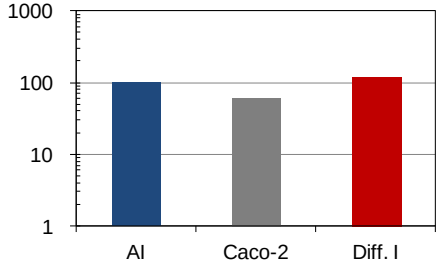
FFAR2 / GPR43



FFAR3 / GPR41

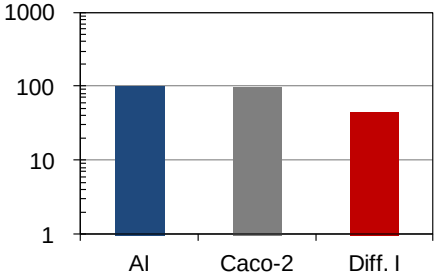


GPR109a

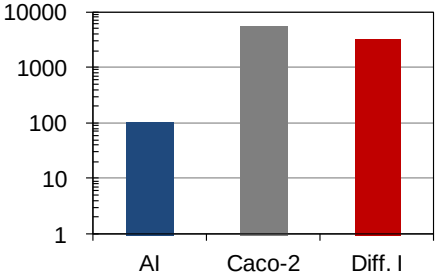


脂肪酸受容体

FFAR1 / GPR40



FFAR4 / GPR120



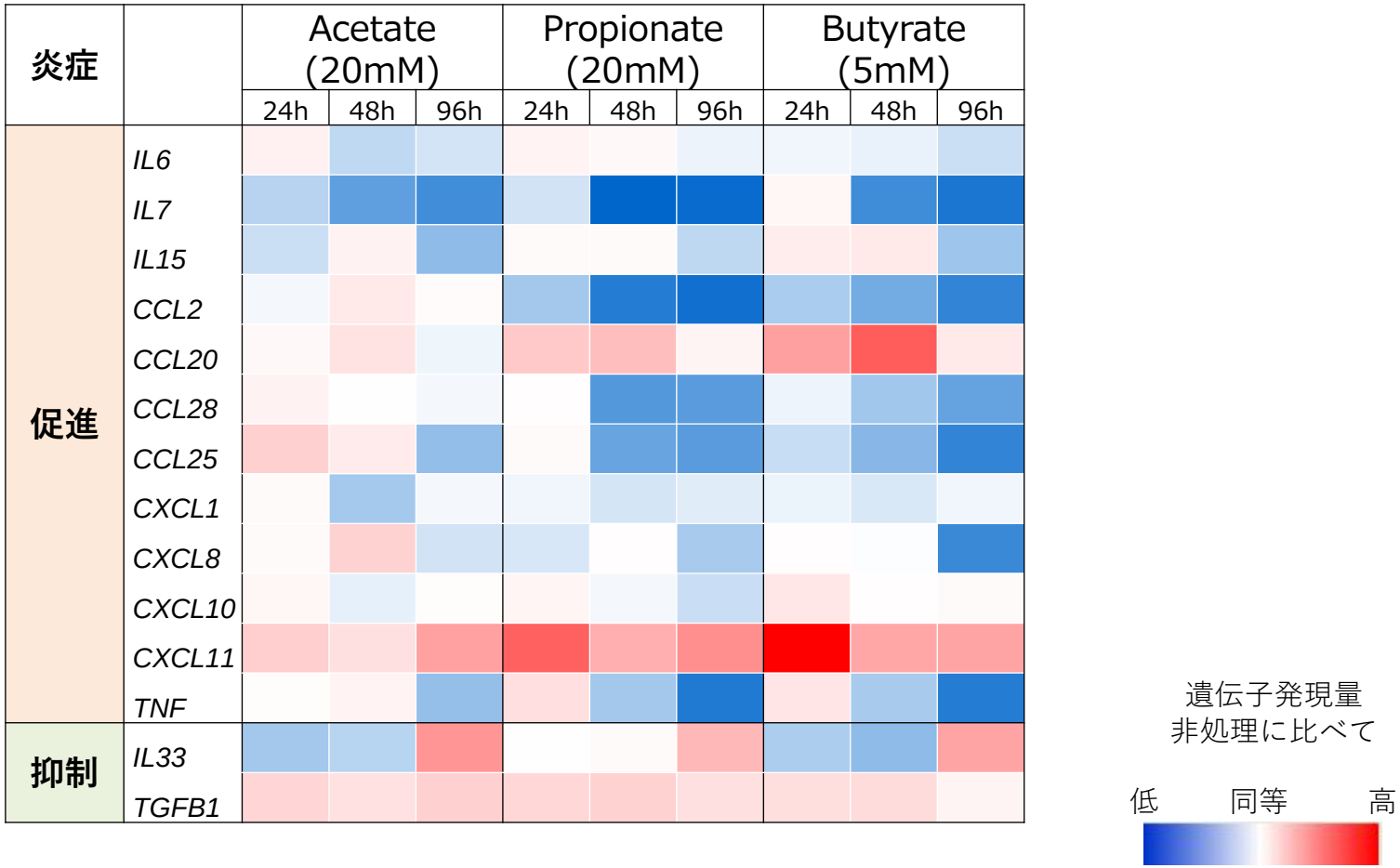
腸管上皮の主要な脂肪酸受容体は、生体小腸と同程度の発現量を示した

NEVER STOP

短鎖脂肪酸添加後の14遺伝子の発現変動

FUJIFILM
Value from Innovation

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経時的に炎症促進系の遺伝子発現が低下し、抑制系の発現が上昇した

NEVER TOP

腸管免疫評価モデルとしての検討　–まとめ–

FUJIFILM
Value from Innovation

✔F-hiSIECは腸内細菌由来因子を認識するTLR 1~5を発現していた。また、リガンドに応答して炎症性サイトカインの発現が亢進した。

✔F-hiSIECは腸内細菌代謝物（短鎖脂肪酸）のレセプターを発現していた。また、短鎖脂肪酸添加によって炎症性サイトカインの発現は低下し、抗炎症サイトカインの発現が亢進した。

F-hiSIECは細菌・代謝物への免疫応答モデルとして応用が期待できる

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞
F-hiSIEC™
FUJIFILM human iPS-derived Small Intestine Epithelial like Cell

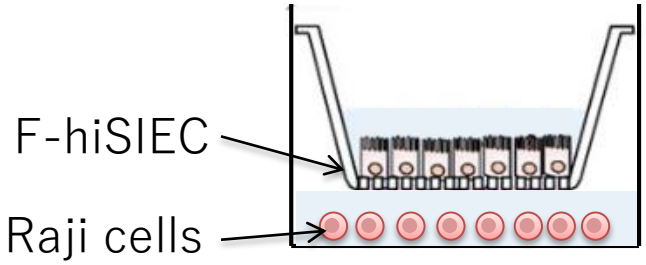
NEVER STOP

Appendix

M細胞の機能評価　実験方法

試験可能期間

DAY	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
使用例1	解凍 播種	培地 交換		培地 交換		培地 交換		培地 交換		培地 交換	培地 交換			



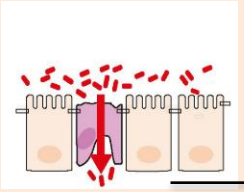
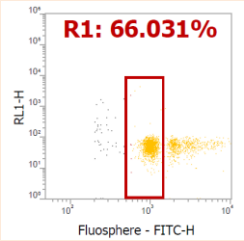
セルカルチャーインサート：Millipore(MCSP24H48)
Pore size : 3.0um

Raji cell 共培養

4~5日間

- Raji除去
- TEER
- 透過試験
- 遺伝子発現評価
- 免疫染色

抗原取り込み能の評価方法

Raji細胞を除去する
↓
HBSS (pH7.4)+ HEPES 25mMで洗浄
↓
上記HBSSに置換して4/37°Cで静置 1h
↓
TEERを測定後、抗原を含むHBSSでApical側を置換
↓
4°Cまたは37°Cで2h 透過
↓
Basal側の溶液を回収して透過数を測定

蛍光粒子(FluoSphere 0.2um) をApical側に添加し、
Basal側に透過した粒子数をフローサイトメトリーにて測定