P-34

FUJIFILM

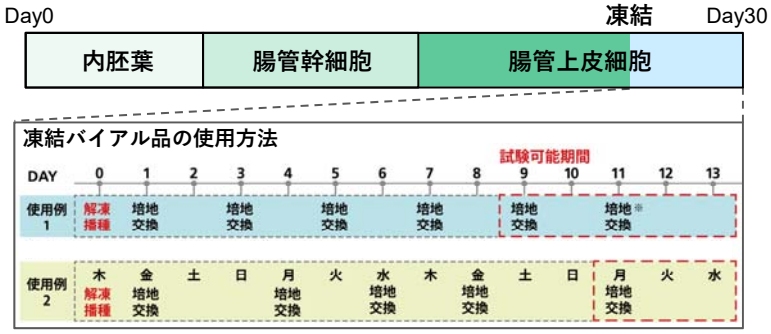
ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の特性解明と食品免疫評価ツールとしての活用

○今倉 悠貴、美馬 伸治、小椋 泉、後藤 俊、柿沼 千早、山田 忠範、畠 賢一郎 （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）
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）

要旨

【目的】食品や腸内細菌が生体の免疫機能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、ヒト結腸がん由来細胞であるCaco-2細胞やマウスを用いた代替モデルが使用されているが、ヒトへの外挿性は十分でない。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、ヒト腸管における免疫応答を評価できる*in vitro*評価モデルの開発を目指した。
【方法】既報(Iwao, T. *et al. Drug Metab. Dispos.* **43**, 603-610 (2015))を基に新規の低分子化合物を加え、ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞へと分化誘導し、種々の性能を評価した。
【結果】1)本細胞は、腸管上皮細胞の主要な代謝酵素、トランスポーターおよび各種腸管上皮細胞マーカーのmRNA発現がヒト初代腸管上皮細胞とほぼ同等であった。2)セルカルチャーインサートの多孔膜上で培養するとバリア機能を示し、トランスポーターによる輸送を評価することが可能であった。3)ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞には吸収上皮細胞だけではなく、杯細胞、内分泌細胞、パネート細胞あるいはM細胞等の腸管免疫に関わる細胞も含まれていることが明らかとなった。4)小腸上皮の主要なToll-like receptor(TLR)を発現しており、TLRを介した免疫応答を評価できることが示された。
【結論】本細胞を用いた*in vitro*評価モデルは、免疫機能に影響を及ぼす食品成分の評価や作用機序の解明に寄与するものと期待される。

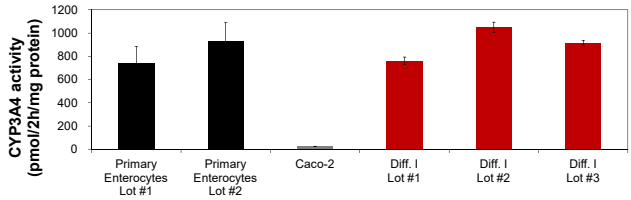
方法



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。

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の特性

代謝酵素活性(CYP3A4)

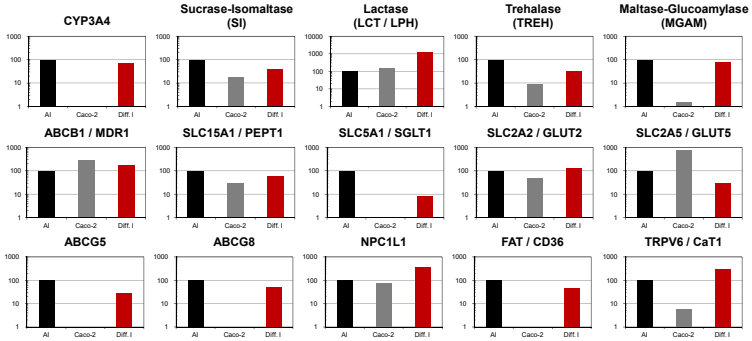


Midazolam was used as a substrate of CYP3A4/5.
Human Enterocytes (purchased from In Vitro ADMET Laboratories, Inc.) were used as primary small intestinal cells.

ヒト初代培養腸管上皮細胞と同等のCYP3A4活性を示した。

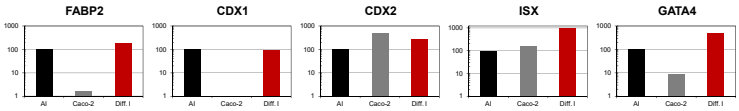
代謝酵素・トランスポーターの遺伝子発現

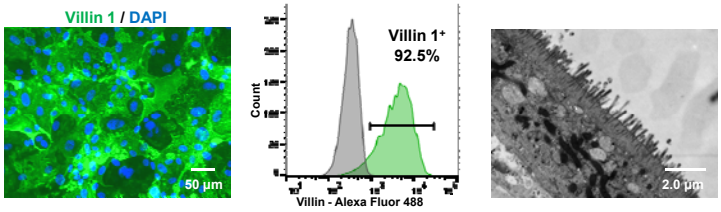
Various gene expression of Diff. I cells were measured by RT-PCR and compared with Adult Intestine (AI) and Caco-2.
(Y-axis: relative mRNA expression)



- 薬物代謝酵素(CYP3A4)、二糖加水分解酵素(Sucrase-Isomaltase, Lactase, Trehalase, Maltase-Glucoamylase)について、生体小腸同等の遺伝子発現を示した。
- 薬物排出トランスポーター(MDR1)、ペプチドトランスポーター(PEPT1)、グルコーストランスポーター(SGLT1, GLUT2, GLUT5)、コレステロールトランスポーター(ABCG5, ABCG8, NPC1L1)、脂肪酸トランスロカーゼ(FAT/CD36)、カルシウムトランスポーター(CaT1)について、生体小腸同等の遺伝子発現を示した。

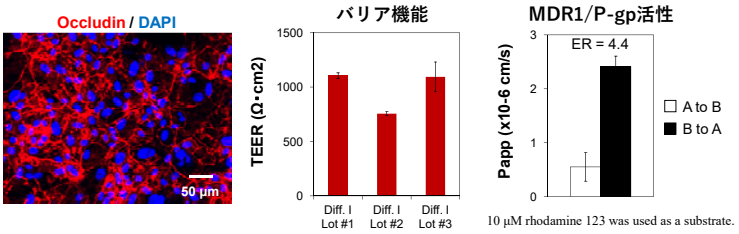
腸管上皮細胞マーカーの遺伝子発現・蛋白質発現





- 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。

バリア機能とトランスポーター活性(MDR1/P-gp)

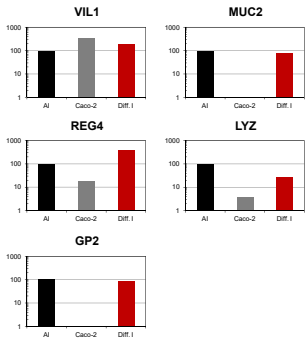


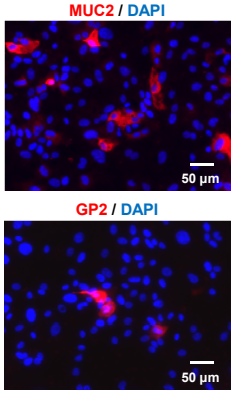
10 μM rhodamine 123 was used as a substrate.

- タイトジャンクション関連蛋白質であるOccludinの発現が見られ、セルカルチャーインサート上で培養するとバリア機能を示した。
- トランスポーター(MDR1/P-gp)による輸送活性、及び輸送方向性が示された。

腸管免疫評価への応用

各種腸管上皮細胞の存在

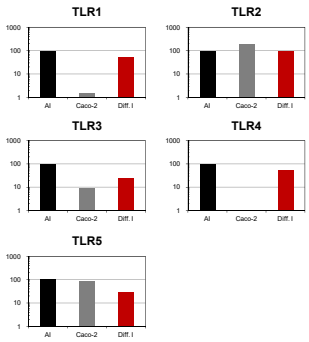


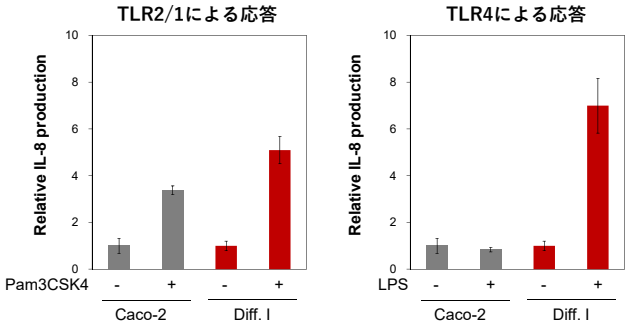


吸収上皮細胞(VIL1)、杯細胞(MUC2)、内分泌細胞(REG4)、パネート細胞(LYZ)、M細胞(GP2)の存在が示された。

Toll-like receptor(TLR)の発現と応答

Caco-2 or Diff. I cells 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.





- ヒト小腸上皮の主要なToll-like receptor(TLR)について、生体小腸同等の遺伝子発現を示した。
- TLR2/1, TLR4を介した免疫応答を評価できることが示された。

結論

本細胞はヒト腸管上皮細胞に近い特性を有しており、免疫機能に影響を及ぼす食品成分の評価や作用機序の解明に寄与するものと期待される。