

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：38005

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K20655

研究課題名（和文）T細胞に着目した免疫応答モデルの構築：自己免疫性疾患への展開

研究課題名（英文）Modeling the immune responses: For autoimmune diseases

研究代表者

玉井 美保 (Tamai, Miho)

沖縄科学技術大学院大学・免疫シグナルユニット・スタッフサイエンティスト

研究者番号：20619704

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：免疫システムの作用機序を理解し、制御する手法の開発は医学・医療において極めて重要な課題であり、培養モデル構築は非常に有用なツールとなる。生体の免疫システムには複数の要因が関与しているため、培養モデルの構築は容易ではない。本研究では、生体の免疫応答を再現した培養モデルシステムの構築を目指し研究に着手した。まず最大の免疫器官である腸管に着目し、多孔質膜を中心にして上下に流路を有するマイクロ流体デバイスを用いることで、腸内細菌モデルである大腸菌DH5⁺との共培養を実現した。腸の生理機能に重要な役割を果たすマクロファージの導入により、大腸との相互作用が確認され、生体の腸内環境に近いモデルが構築できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫応答は個体全体の現象であるために、作用機序の解明や疾患予防・治療方開発のためのツールを得る事において、動物実験による解析が一般的であったが、培養レベルで免疫応答モデルの構築できれば、細胞レベルでの評価が可能となり、従来の動物個体を用いた実験に代わる、安定的かつコスト的にも比較的安価な新しい評価モデルとしての応用が期待される。本研究は、医療産業へのニーズは勿論、貢献度や期待度が非常に高く、このようなモデルは十分に社会に貢献しうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Developing methods to understand and control the mechanisms of the immune system is a crucial issue in medicine and medical care, and the construction of culture models is a helpful tool. Since multiple factors are involved in a living body's immune system, it is hard to construct a culture model. In this study, we tried to build a culture model system that reproduces the immune response of the living body. First, we focused on the intestinal tract, the largest immune organ. We succeeded in co-culture with E. coli DH5⁺, a model of intestinal bacteria, using a microfluidic device with upper and lower channels centered on a porous membrane. By introducing macrophages, which play an essential role in the physiological functions of the intestine, interaction with the bacteria was confirmed, and a model similar to the intestinal environment of living organisms could be constructed.

研究分野：細胞組織工学

キーワード：組織培養モデル 流体デバイス

1. 研究開始当初の背景

我々のからだには、ウイルスや病原菌の侵入などからまもる『免疫反応』という防御システムが備わっている。免疫応答は基本的な生体防御反応であるが、このシステムに異常をきたすと免疫性疾患を誘発する。このような自己免疫疾患の作用機序を解明し、免疫応答を制御する手法の開発は重要な課題である。免疫応答は、さまざまな異なる細胞集団の密接な連携のもとに構築されており、きわめて複雑である。そのため現状では動物(個体)実験に頼らざるを得ないが、ヒト T 細胞を用いた解析結果が必ずしもマウスの結果と一致しないという課題もある。また、動物実験代替法が開発が望まれる今日、生体の免疫応答を培養レベルで再現可能なモデルを構築することができれば、作用機序の解明や制御手法開発のための有力なツールとなり、このような手法の開発は医学・医療において非常に重要な課題であり、培養モデルの開発は有用なアプローチとなると考えられる。しかし生体の免疫システムには複数の要因が関与しているため、その培養モデルの構築は容易ではない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、免疫応答・疾患の予測に役立つ、生体に近い生理的応答能を再現した、これまでに報告の無い包括的な免疫応答が可能となる培養モデルの構築であり、自己免疫性疾患の作用機序解明や制御手法開発のためのツールを確立することである。生体の免疫応答が再現可能な培養モデルシステムの構築をするために、まず最大の免疫器官である腸管に着目した。腸管は、腸内細菌を含む多種多様な抗原に常にさらされている特殊な器官であることから、腸管上皮細胞のみではなく腸内細菌などとの共培養モデルへ展開し腸内細菌と免疫細胞との相互作用をも考慮した培養モデル構築を目指した。

3. 研究の方法

腸内細菌と免疫細胞との相互作用をも考慮した培養モデルを構築するため、多孔質膜を中心にして上下に流路を有するマイクロ流体デバイスを用いて培養モデルの構築をおこなった。ヒト結腸がん由来細胞株である C2BBe1 細胞を用いて多孔質膜上で培養した。上皮細胞の密着結合の形成は、TEER 値を測定することで評価した。腸内細菌モデルとして大腸菌 DH5 を用い、蛍光顕微鏡で観察可能とするため蛍光タンパク質発現 DH5 を調製した。免疫細胞のモデルとして、マクロファージ様細胞株である RAW264 細胞をマイクロ流体デバイスへ導入した。免疫細胞が大腸菌に反応する様子は、遺伝子発現解析によりおこなった。また、免疫応答を実現するため、シンジェニックモデルを目指し、マウス初代培養細胞を用いた腸管培養モデルの構築も試みた。

4. 研究成果

腸管組織培養モデルの構築には、多孔質膜を中心にして上下に流路を有するマイクロ流体デバイスを用いた。このマイクロ流体デバイスには膜抵抗値を測定することのできる電極が組み込まれているため、多孔質膜上で上皮細胞の密着結合形成を評価することが可能である。ヒト結腸がん由来細胞株である C2BBe1 細胞をマイクロ流体デバイスに播種し接着培養すると、培養日数を経るとともに膜抵抗値の上昇が確認され、C2BBe1 細胞がマイクロ流体デバイス内で密着結合を形成し、腸管上皮様の組織を形成していることが示唆された。

そこで腸内環境を考慮し、この腸管組織培養モデルに腸内細菌を導入することを試みた。腸内細菌モデルとして、大腸菌 DH5 α を用いることにした。顕微鏡下での観察を容易にするため、大腸菌にシアン蛍光タンパク質を発現させた。この蛍光タンパク質発現 DH5 を用いて、腸管組織培養モデルとの共培養をおこなった。通常の静置培養では大腸菌の増殖が優位となり培養系を維持することは不可能であるが、マイクロ流体デバイスを用いて流速をコントロールすることで、大腸菌の過剰な増殖を回避し、腸管上皮細胞との共培養が可能となった。また、このように菌数を制御した培養条件下では、腸管組織培養モデルの細胞のバリア機能が保持されていることが膜抵抗値の測定から確認された。基盤となる培養モデルが構築できたため、腸の生理機能に重要な役割を果たしている消化管に常在するマクロファージに着目し、このモデルシステムにマクロファージ様細胞株である RAW264 細胞の導入をおこなった。構築した腸管組織培養モデルに RAW264 細胞を播種、接着後に蛍光タンパク質発現大腸菌を導入すると、腸管組織培養モデルの膜抵抗値の減少が観られた。これは、大腸菌を導入していない非共培養条件では観られなかったことから、大腸菌と RAW264 細胞との共培養の作用によるものと考えられる。そこで、炎症性サイトカインに着目し解析を進めたところ、RAW264 細胞が大腸菌に反応し TNF を産生し、そのサイトカイン刺激を C2BBe1 細胞が受けることで、炎症性サイトカインである

IL-8 が放出されていることが遺伝子発現レベルで確認された。また、3種共培養系における上皮細胞の密着結合レベルを測定すると、膜抵抗値の減少が観られ、上皮細胞のバリア機能の低下が起きていることが確認された。これは、大腸菌に RAW264 細胞が応答し産生されたサイトカインによって、C2BBel 細胞が刺激され、炎症性サイトカインを放出したことで上皮障害が惹起され、上皮細胞のバリア機能低下つまり膜抵抗値が減少したことが考えられる。

また、より生体に近い免疫応答を実現するためのシンジェニックモデル構築として、マウス初代培養細胞を用いた腸管培養モデルの構築を試みた。マウス腸陰窩の分離をおこない腸管オルガノイドを形成させた。作製した腸管オルガノイドを用いて、腸内細菌由来代謝物を作用させると、Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2) 遺伝子の発現が上昇することが確認された。Ptgs2 は、炎症応答の代表的なメディエーターとしてよく知られる分子である Cox-2 を誘導し炎症を促進することが知られており、腸内細菌との共培養により腸内環境を再現できる可能性が示唆された。今後実際に共培養を進めることでより生体内に近い環境を実現した培養モデルになると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Miho Tamai, Yoichi Fujiyama, Yoh-Ichi Tagawa | 4. 巻 27 |
| 2. 論文標題 Hepatocytes and Endothelial Networks in a Fluid-Based In Vitro Model of Liver Drug Metabolism | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Tissue Eng Part A | 6. 最初と最後の頁 17-18 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.TEA.2020.0226. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Tamai M, Uchisawa H, Saito Y, Matsue H, Kawase M, Naraoka T, Tagawa Y | 4. 巻 522(3) |
| 2. 論文標題 Acorbine, a Corbicula japonica-derived tripeptide containing non-proteinogenic amino acids, suppresses ethanol-induced liver injury. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun. | 6. 最初と最後の頁 580-584 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.11.131. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Moriya K, Tamai M, Koga T, Tanaka T, Tagawa Y | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Acetaminophen-induced hepatotoxicity of cultured hepatocytes depends on timing of isolation from light-cycle controlled mice | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Genes Cells | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12755. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Qi Z, Kamoshida M, Tamai M, Hirose M, Tagawa Y | 4. 巻 2(1) |
| 2. 論文標題 Study of time-dependent pharmacokinetics of mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for drug screening | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Translat Regulat Sci. | 6. 最初と最後の頁 7-13 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Hirota Masato, Tamai Miho, Yukawa Sachie, Taira Naoyuki, et al. | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Human immune and gut microbial parameters associated with inter-individual variations in COVID-19 mRNA vaccine-induced immunity | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Communications Biology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-04755-9 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 津田南美、進藤寛将、玉井美保、藤山陽一、長岡紀幸、田川陽一 |
| 2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いた大腸炎モデルの開発と解析 |
| 3. 学会等名 第85回インターフェロン・サイトカイン学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 木佐貴 真由、津田 南美、粕谷 菜月、進藤 寛将、藤山 陽一、玉井 美保、長岡 紀幸、田川 陽一 |
| 2. 発表標題 細菌共培養腸管マイクロ流体デバイスを用いた物質の吸収・輸送 |
| 3. 学会等名 第34回日本動物実験代替法学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 JINHO HONG, Taiki Satoh, Miho Tamai, Tamura Shiori, Tetsuro Suzuki, Yoichi Fujiyama, and Yoh-ichi Tagawa |
| 2. 発表標題 Culturing of human iPSCs-derived liver tissue culture model on fluidic devices and biochemical analysis of its function as a hepatitis B virus research model |
| 3. 学会等名 第7回デザイン生命工学研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小島菜、中澤杜浩、進藤寛将、玉井美保、藤山陽一、小関英一、米田恭子、長岡紀幸、田川陽一 |
| 2. 発表標題 腸内細菌と腸管上皮細胞の共培養マイクロ流体デバイスの開発 |
| 3. 学会等名 第24回 腸内細菌学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 1.津田南美、進藤寛将、中澤杜浩、小島菜、藤山陽一、小関英一、玉井美保、長岡紀幸、田川陽一 |
| 2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いた細胞-細菌共培養系の構築 |
| 3. 学会等名 第6回デザイン生命工学研究会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 薬物スクリーニングのための “ 時計 ” をもつ肝組織モデルの構築 |
| 2. 発表標題 QI ZHEN, 玉井美保、今西未来、田川陽一 |
| 3. 学会等名 第6回デザイン生命工学研究会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 小畑美貴、大田拓穂、玉井美穂、田川陽一 |
| 2. 発表標題 マウスES細胞・TS細胞を用いた胚盤胞モデルの構築 |
| 3. 学会等名 第6回デザイン生命工学研究会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Miho Tamai and Yoh-ichi Tagawa |
| 2. 発表標題 Immune-cell response culture model derived from murine embryonic stem cells for drug induced liver injury |
| 3. 学会等名 The 5th Annual Meeting of Living Systems Design Research (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yoh-ichi Tagawa, Morihiro Nakazawa, Shiori Kojima, Minami Tsuda, Hiromasa Shindo, Miho Tamai, Yasuko Yoneda, Yoichi Fujiyama, Eiichi Ozeki |
| 2. 発表標題 Intestinal Epithelium and Bacteria on a Chip |
| 3. 学会等名 The 5th Annual Meeting of Living Systems Design Research (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Zhen Qi, Miho Tamai, Miki Imanishi, and Yoh-ichi Tagawa |
| 2. 発表標題 Novel artificial transcription system-synchronized circadian rhythm in mouse ES cell-derived cardiomyocyte culture model |
| 3. 学会等名 The 5th Annual Meeting of Living Systems Design Research (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Minami Tsuda, Hiromasa Shindo, Morihiro Nakazawa, Yoichi Fujiyama, Eiichi Ozeki, Yoh-ichi TagawaMiho Tamai, |
| 2. 発表標題 Multidimensional co-culture of intestinal epithelial cell, macrophage and bacteria for IBD model on microfluidic device |
| 3. 学会等名 The 5th Annual Meeting of Living Systems Design Research (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Aika Okazaki, Morihiro Nakazawa, Yoichi Fujiyama, Miho Tamai, and Yoh-ichi Tagawa |
| 2. 発表標題 Development of a microfluidic device measuring drug absorption and permeability of intestinal epithelial cells |
| 3. 学会等名 The 5th Annual Meeting of Living Systems Design Research (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Miho Tamai and Yoh-ichi TAGAWA |
| 2. 発表標題 Inflammatory Liver Disease Culture Model Derived from Murine ES Cells in Consideration of an Immune-cell Response |
| 3. 学会等名 Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society AP Chapter and the 7th Asian Biomaterials Congress (TERMIS-AP + ABMC7 2019) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐藤 敦紀、Ahn Sungho、玉井 美保、藤山 陽一、中島 謙治、酒井 聡、鈴木 哲朗、田川 陽一 |
| 2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来肝細胞系譜細胞と非実質細胞の共培養系の構築とその流体デバイスモデル・HBV感染モデルへの試み |
| 3. 学会等名 第26回肝細胞研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Taiki Satoh, Miho Tamai, Yoichi Fujiyama, Yoh-ichi Tagawa |
| 2. 発表標題 Human iPS Cell-derived Liver-on-a-Chip for Virus Infection |
| 3. 学会等名 Organ-on-a-Chip & Tissue-on-a-Chip Europe 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 Qi Zhen、今西 未来、玉井 美保、田川 陽一 |
| 2. 発表標題 人工転写因子により概日リズムの発生の解明 |
| 3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 田川 陽一 (Tagawa Yoh-ichi) | 東京工業大学 | |
| 研究協力者 | 石川 裕規 (Ishikawa Hiroki) | 沖縄科学技術大学院大学 | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|