

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06642

研究課題名(和文) 腸内細菌叢破綻による炎症性腸疾患を模倣するマイクロ流体チップの開発と薬物治療解析

研究課題名(英文) Development of a microfluidic device that mimics inflammatory bowel disease caused by disruption of the intestinal flora

研究代表者

津田 真弘 (Tsuda, Masahiro)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：10726813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腸内細菌叢の破綻による炎症性腸疾患を模倣するマイクロ流体チップを作製し、治療候補薬の簡便なスクリーニング系としての有用性を評価した。本チップでは、炎症性腸疾患の発症メカニズムの1つと考えられている腸バリア機能崩壊からの異物の侵入と、それによって引き起こされる炎症反応を表現できた。さらに、腸バリア機能を保持する亜鉛の添加により炎症の惹起を抑制することをチップ上で表現できた。よって、本チップは腸バリア機能に影響を与える物質の炎症性腸疾患に対する有効性を評価できる系となりうると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、炎症性腸疾患の研究には主にげっ歯類を用いた動物モデルが利用されてきたが、ヒトとげっ歯類では種差があることから、その応用には限界があった。本研究で得られた成果は、ヒトの細胞を用いたin vitroの系を構築することで種差を考慮せずに評価が可能となり、炎症性腸疾患治療薬の開発に貢献するものである。また、動物実験の代替としての役割を果たすことができれば、動物実験の削減にも貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we fabricated a microfluidic chip that mimics inflammatory bowel disease caused by disruption of the intestinal microflora and evaluated its usefulness as a simple screening system for candidate drugs. The chip was able to represent the invasion of foreign substances through the disruption of the intestinal barrier function, which is considered to be one of the pathogenic mechanisms of inflammatory bowel disease, and the inflammatory response triggered by the invasion of foreign substances. Furthermore, the addition of zinc, which maintains the intestinal barrier function, suppressed the induction of inflammation on the chip. Therefore, this chip can be used to evaluate the efficacy of substances that affect the intestinal barrier function against inflammatory bowel disease.

研究分野：医療薬学

キーワード：腸内細菌 マイクロ流体デバイス Organ-on-a-chip 炎症性腸疾患 腸管免疫 Disease-on-a-chip Gut-on-a-chip 共培養

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患は再燃寛解を繰り返す難治性の自己免疫疾患である。遺伝的素因、環境的素因、腸管免疫が複合的に関与して発症する多因子疾患と考えられているが、未だ発症原因は不明である。近年、炎症性腸疾患患者の腸管では、腸管粘膜バリア機能の低下と腸内細菌叢の乱れが生じていることが明らかとなり、粘膜層や腸内細菌叢と炎症性腸疾患の発症機序との関わりに注目が集まっている。炎症性腸疾患の病態研究にはデキストラン硫酸ナトリウム誘導性腸炎マウスなどが用いられているが、マウスとヒトでは腸内細菌叢に種差が存在するため、げっ歯類モデルの使用には限界がある。この観点から、*in vitro* におけるヒト炎症性腸疾患モデルの確立が望まれるが、ヒト腸管を完全に模倣する細胞が無いことや腸内細菌の持つ毒性により腸管細胞との長期間の共培養が難しいことなどにより、ゴールドスタンダードとなるような *in vitro* 実験系は確立されていない。

これら問題点を克服するためにマイクロ流体チップを用いた細胞培養が注目されている。マイクロ流体チップでは、培養液を還流することで生まれるシアストレスを細胞にかけたり、空気圧により腸蠕動運動を模倣した伸展刺激を加えたりすることができるため、これまでより生理学的な状況に近い環境での細胞培養が可能となった。我々の研究室においてもヒト小腸モデル細胞として汎用される Caco-2 細胞を播種した Gut-on-a-chip を作成し、薬物の透過実験や代謝実験において静置培養系と遜色ない結果を得ると共に、培地 flow をかけることで細胞層が厚くなり、トランスポーターなどの発現が上昇するといった結果を得ている。そこで、マイクロ流体チップを用いて、ヒト炎症性腸疾患モデルの確立を試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腸内細菌叢の破綻による炎症性腸疾患を模倣するマイクロ流体チップを製作し、治療候補薬の簡便なスクリーニング系としての有用性を検証することである。そのために、以下のことを明らかにしていく。

- ・マイクロ流体チップ上でヒト腸管環境を模した粘膜層と腸内細菌叢を有する共培養系を確立することができるか。
- ・腸内細菌により炎症が惹起される *in vitro* 炎症性腸疾患モデルを確立できるか。
- ・確立したモデルにおいて、炎症抑制を惹起するような物質の評価が可能であるか。

3. 研究の方法

(1) マイクロ流体チップの作製

Polydimethylsiloxane (PDMS) を硬化用触媒と 10:1 の割合で混ぜて鋳型に流し込み、硬化させた。上側になるブロックにのみ、流路の両端に当たる部分の 4 か所に培地リザーバーとしての穴を開けた。上下のブロックの接着面に PDMS を付着させ、孔径 3 μm の polyester メンブレンを流路の間に挟んでデバイスを完成させた(図 1)。

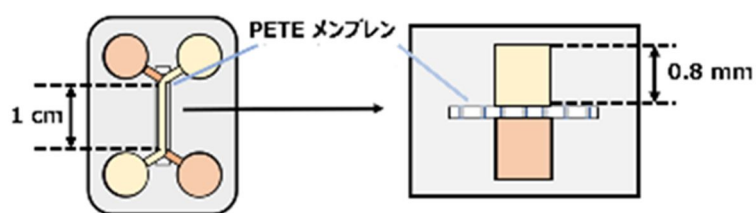


図 1. マイクロ流体チップの構造

(2) マイクロ流体チップでの細胞培養

マイクロ流体チップにヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 細胞懸濁液とヒト大腸杯細胞株 HT29-MTX 細胞懸濁液の 9:1 混合細胞懸濁液を流路内に注入し、14 日間培養した。培地交換は 2 日ごとに行った。播種して 7 日後からシーソー式振盪器を用いて、振盪角度 7 度、周期 30 分/往復の条件で振盪培養した。粘液の産生についてはアルシアンブルー染色により確認した。また、粘液の主な構成成分の一つである MUC2 の発現について、RT-PCR および免疫染色により確認した。粘液除去には粘液タンパク質のジスルフィド結合を開裂させ、粘液を除去する薬剤である Dithiothreitol (DTT) を用いた。亜鉛添加の影響を調べる際は、亜鉛濃度が 100 μM となるように DMEM 培地に添加し、細胞培養に用いた。

(3) 腸チップへの細菌播種

細菌を播種する 1 日前に、腸チップ中の培地を抗生物質を含まない DMEM 培地に置換した。腸チップへ細菌を播種する前に、Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) はトリプティックソイブロスを用いて、Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) は MRS 培地を用いて 37°C で培養した。細菌を

抗生物質を含まない DMEM 培地で再懸濁し、腸チップの上側流路に注入した。

(4) 細菌による細胞障害の評価

腸チップにおける細胞障害の評価には、生細胞を染色する Calcein-AM (4 μM) と死細胞を染色する Propidium Iodide (8 μM) の混合液を使用し、それぞれの蛍光を蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(5) Fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran を用いた腸透過実験

細胞間隙を透過する FITC-dextran (4,000 Da) を用いて、腸管透過性を評価した。0 分で FITC-dextran を上側流路に投与し、120 分後に下側の溶液を採取して FITC-dextran の蛍光強度を測定した。見かけの透過係数(P_{app})を以下の式で求め、細胞バリア機能の指標とした。

$$P_{app} = \frac{\text{透過量}}{120} \frac{1}{A C_0}$$

P_{app} : 見かけの透過係数, A: 細胞層面積, C_0 : 初濃度
マイクロ流体チップにおける細胞層面積は 0.1 cm² とした。

(6) 細菌の侵入と炎症反応評価

ヒト単球系白血病細胞株 THP-1 細胞を Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を含む培地で 48 時間培養し、マクロファージへの分化誘導を行った後に腸チップの下側流路に播種した。TNF- α の定量は ELISA を用いて行った。

(7) 統計学的解析

2 群の比較には対応のない t 検定を用いた。3 群以上の比較には One-way ANOVA、Two-way ANOVA として Bonferroni 法を用い、 $P < 0.05$ を統計学的に有意とした。

4. 研究成果

(1) Caco-2 細胞と HT-29 細胞の共培養系の作成

Caco-2 細胞および HT29-MTX 細胞の 2 種細胞の共培養を行い、粘液の生成について確認した。粘液を構成するムチンタンパク質を青く染めるアルシアンブルー染色の結果から、Caco-2/HT29-MTX 共培養系では、薄く染められた Caco-2 細胞と濃く染められた HT29-MTX 細胞が共存している様子が確認された(図 2A)。Caco-2/HT29-MTX 共培養系において、粘液を構成するコアタンパク質である MUC2 の発現を RT-PCR により遺伝子レベルで確認し(図 2B)、さらに免疫染色によって MUC2 のタンパク質レベルでの発現を確認した(図 2C)。以上より、腸チップにおいて粘液の産生が確認された。

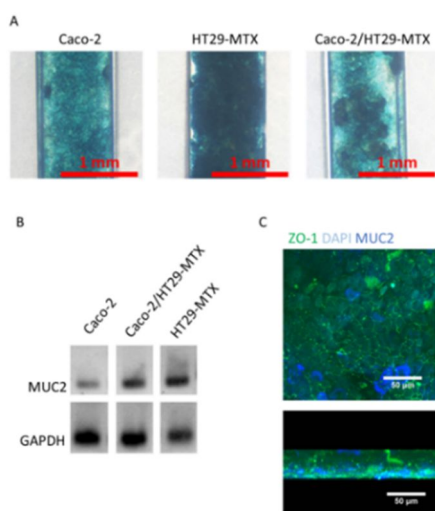


図 2. 腸チップにおける粘液産生および MUC2 発現確認

- A. 各細胞培養系におけるアルシアンブルー染色。倍率: 4 × 10 倍
- B. 各細胞培養系における MUC2 の RT-PCR。
- C. Caco-2/HT29-MTX 共培養系における ZO-1 (緑), 核 (DAPI, シアン), MUC2 (青) の免疫染色。倍率: 60 × 1 倍

(2) 細菌の導入とバリア機能に与える影響

常在性細菌である LGG および細胞障害性を持つ細菌である EIEC を腸チップに播種した際の細胞障害について評価した。LGG 播種群では 72 時間後において細胞への障害が確認されなかった。一方で、EIEC 播種群では播種 12 時間後に死細胞が観察され、細胞への障害が確認された(図 3)。

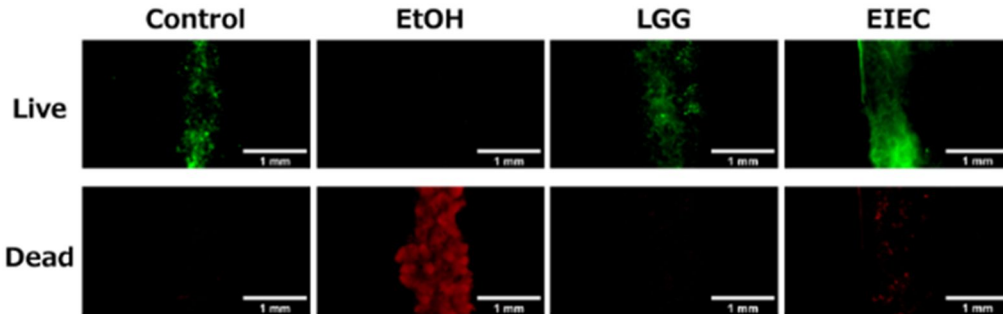


図 3 細菌による細胞障害の評価

LGG は播種 72 h 後に、EIEC は播種 12 h 後に測定した。生細胞は Calcein-AM (緑)で、死細胞は Propidium Iodide (赤)を用いて染色した。倍率:4 × 10 倍

ヒト腸内では、常在細菌の定着により障害活性を持つ菌の影響が抑制されていることが知られている。そのため、ヒト腸内を模倣するために常在性の細菌と障害活性を持つ細菌の 2 種細菌の共培養が必要であり、2 種細菌共培養による細胞バリア機能への影響を FITC-dextran の透過実験により評価した。細菌を播種していないコントロール群と比較して、LGG 播種群の P_{app} は播種後 24 および 96 時間では有意に低値を示し、播種後 48 および 72 時間後においては有意な差は見られなかった(図 4A)。EIEC 播種群では、コントロール群と比較して 6 時間後から P_{app} が有意に高値を示した(図 4B)。一方、LGG 播種後に EIEC を播種した群では播種 6 および 12 時間後においてコントロール群と比較して P_{app} に有意な差は見られず、播種 24 時間後にコントロール群と比較して P_{app} の上昇が確認された(図 4B)

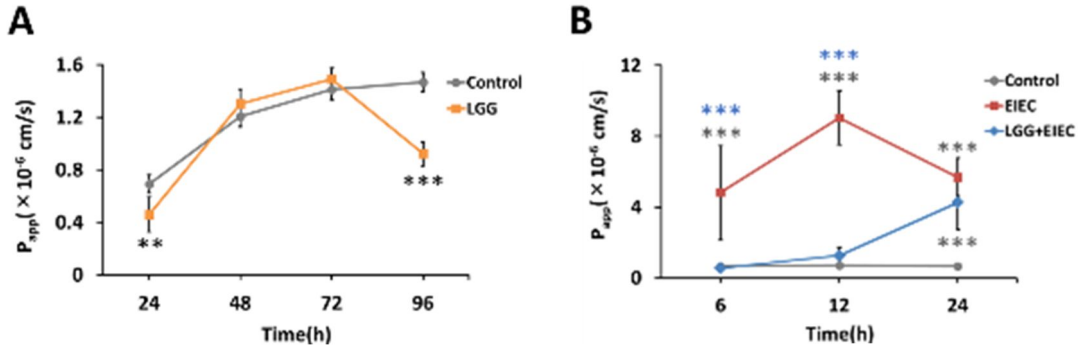


図 4 腸チップにおける細菌共培養時 FITC-dextran の透過

A. LGG 播種による影響。LGG は 0 h に播種。

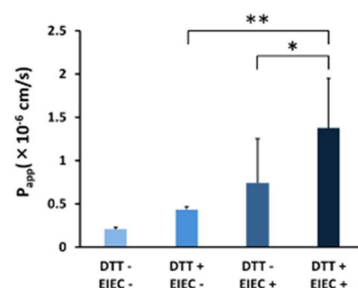
B. EIEC 播種による影響と LGG による保護効果。EIEC は 0 h に、LGG は-48 h に播種。

データは mean ± SEM. n = 4-6. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (***: vs Control, ***: vs LGG+EIEC)

DTT による粘液除去条件下における EIEC のバリア機能への影響を FITC-dextran の透過を測定することで評価した。EIEC を播種していない群において、DTT 添加により P_{app} の上昇傾向が確認された。また、DTT 添加 EIEC 播種群において、DTT 非添加 EIEC 播種群よりも有意に高い P_{app} が確認された(図 5)。以上より、粘液層が EIEC からの細胞障害に対して保護的に機能していることが示唆された。

図 5 粘液除去時 FITC-dextran の透過

データは mean ± SEM. n = 5-6, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$



(3) 細菌の侵入と炎症反応評価

次にバリア機能が崩壊した際に下側流路に細菌が侵入するか評価した。EIEC 播種群では 12 時間時点で下の流路に細菌が到達していることが確認された。そこで、下側流路に侵入した細菌によって炎症が生じるかを確かめるために、下側流路における TNF- α の放出を ELISA で評価した。EIEC 播種後 12 時間において、EIEC 播種群では Bacteria Free 群と比較して TNF- α 濃度の有意な上昇が見られた (図 6)。LGG 播種後に EIEC を播種した群では、播種後 12 時間において EIEC 群と比較して有意に低値を示した。よって、細胞障害性細菌 EIEC による炎症の誘発、また EIEC 播種後 12 時間まではプロバイオティクス LGG の保護的な作用が見られた。以上より、今回の腸チップにおいてバリア機能が崩壊して異物が侵入し、炎症を生じるような系が表現できた。

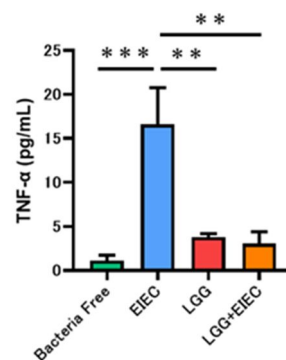


図 6 細菌播種時の下側流路における TNF- α の濃度 EIEC を播種してから 12 時間後に測定。データは mean \pm SEM。n = 3-5。** p < 0.01, *** p < 0.001

(4) 亜鉛添加時のバリア機能・炎症評価

亜鉛はタイトジャンクションを構成するタンパク質の発現を上昇させ、細胞バリア機能の強化に関するとの報告がある。そこで、今回の腸チップを評価するために亜鉛による細胞バリア機能への影響を FITC-dextran の透過実験により評価した。EIEC 播種後 12 時間では、亜鉛添加 EIEC 播種群において、亜鉛非添加 EIEC 播種群と比較して有意に低い透過性を示し、EIEC を播種していない群とほぼ同様の値を示した (図 7A)。TNF- α の放出についても亜鉛添加 EIEC 播種群において、亜鉛非添加 EIEC 播種群と比較して有意に低値を示し、EIEC を播種していない群とほぼ同様の値を示した (図 7B)。以上から、EIEC 播種後 12 時間までは亜鉛によってバリア機能が強化されて TNF- α の放出が少なくなったことが示唆された。

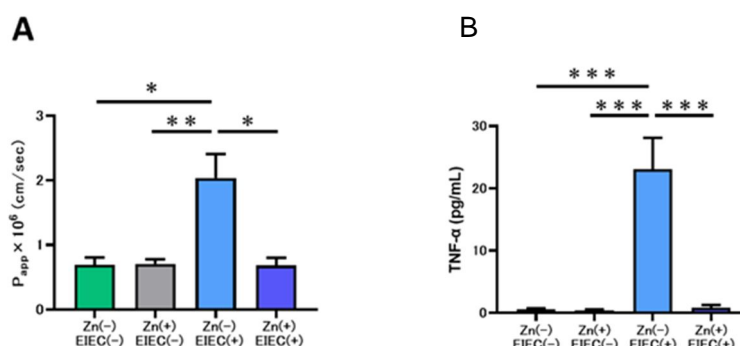


図 7 亜鉛添加時の FITC-dextran の透過 (A)と 下側流路における TNF- α の濃度 (B) データは mean \pm SEM。n = 3-6。
* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

以上、本研究では、腸管細胞、粘液産生細胞、腸内細菌、マクロファージを搭載したマイクロ流体チップを開発した。本チップでは、炎症性腸疾患の発症メカニズムの 1 つと考えられている腸バリア機能崩壊からの異物の侵入と、それによって引き起こされる炎症反応を表現できた。さらに、腸バリア機能を保持する亜鉛の添加により炎症の惹起を抑制することをチップ上で表現できた。よって、本チップは、腸バリア機能に影響を与える物質の炎症性腸疾患に対する有効性を評価できる系となりうると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Matsuda Yuya, Nakagawa Shunsaku, Yano Ikuko, Masuda Satohiro, Imai Satoshi, Yonezawa Atsushi, Yamamoto Takashi, Sugimoto Mitsuhiro, Tsuda Masahiro, Tsuzuki Tetsunori, Omura Tomohiro, Nakagawa Takayuki, Chen-Yoshikawa Toyofumi Fengshi, Nagao Miki, Date Hiroshi, Matsubara Kazuo	4. 巻 45
2. 論文標題 Effect of Itraconazole and Its Metabolite Hydroxyitraconazole on the Blood Concentrations of Cyclosporine and Tacrolimus in Lung Transplant Recipients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 397 ~ 402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00738	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 Sasaki Yuko, Tatsuoka Hirota, Tsuda Masahiro, Sumi Takumi, Eguchi Yuka, So Kanako, Higuchi Yuriko, Takayama Kazuo, Torisawa Yusuke, Yamashita Fumiyoshi	4. 巻 45
2. 論文標題 Intestinal Permeability of Drugs in Caco-2 Cells Cultured in Microfluidic Devices	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1246 ~ 1253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00092	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 Wang Mengyang, Tsuda Masahiro, Deguchi Sayaka, Higuchi Yuriko, So Kanako, Torisawa Yu-suke, Takayama Kazuo, Yamashita Fumiyoshi	4. 巻 627
2. 論文標題 Application of perfluoropolyether elastomers in microfluidic drug metabolism assays	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 122253 ~ 122253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijpharm.2022.122253	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 Zhang Qiyue, Taniguchi Shiori, So Kanako, Tsuda Masahiro, Higuchi Yuriko, Hashida Mitsuru, Yamashita Fumiyoshi	4. 巻 47
2. 論文標題 CREB is a potential marker associated with drug-induced liver injury: Identification and validation through transcriptome database analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 337 ~ 348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.47.337	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 Deguchi S, Tsuda M, Kosugi K, Sakamoto A, Mimura N, Negoro R, Sano E, Nobe T, Maeda K, Kusuhabara H, Mizuguchi H, Yamashita F, Torisawa Y, Takayama K	4. 巻 7
2. 論文標題 Usability of Polydimethylsiloxane-Based Microfluidic Devices in Pharmaceutical Research Using Human Hepatocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 3648 ~ 3657
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbmaterials.1c00642	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 Sano E, Deguchi S, Matsuoka N, Tsuda M, Wang M, Kosugi K, Mori C, Yagi K, Wada A, Yamasaki S, Kawai T, Yodogawa M, Mizuguchi H, Nakazawa N, Yamashita F, Torisawa Y, Takayama K	4. 巻 6
2. 論文標題 Generation of Tetrafluoroethylene-Propylene Elastomer-Based Microfluidic Devices for Drug Toxicity and Metabolism Studies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 24859 ~ 24865
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.1c03719	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 津田真弘
2. 発表標題 粘液と腸内細菌を導入したgut-on-a-chipの開発
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 竹内美優、津田真弘、坂元瑞理、宗可奈子、樋口ゆり子、山下富義
2. 発表標題 炎症性腸疾患モデルマウスにおける低亜鉛血症の腸透過性への影響
3. 学会等名 第73回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂元瑞理、津田真弘、竹内美優、宗可奈子、樋口ゆり子、山下富義
2. 発表標題 リアルワールドデータを用いた炎症性腸疾患における分子標的薬の使用実態調査
3. 学会等名 第73回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 角 拓己、津田真弘、江口由佳、宗可奈子、樋口ゆり子、山下富義
2. 発表標題 粘液および腸内細菌を導入したgut-on-a-chipの開発
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 江口由佳、佐々木優子、津田真弘、角 拓己、宗可奈子、樋口ゆり子、山下富義
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスにおけるCaco-2細胞層を介した薬物輸送に対する流れ刺激の影響
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mengyang Wang, Masahiro Tsuda, Kanako So, Yuriko Higuchi, Fumiyoshi Yamashita
2. 発表標題 Erfluoropolyether elastomers as a material for microfluidic devices intended for drug metabolism studies (低吸収フッ素エラストマーデバイスの開発と薬物動態評価)
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第37回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mengyang Wang, Hiroataka Tatsuoka, Masahiro Tsuda, Kanako So, Yuriko Higuchi, Fumiyoshi Yamashita
2. 発表標題 Development and evaluation of perfluoropolyether elastomer-based microfluidic devices for drug metabolism studies.
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 出口清香、津田真弘、小杉香織、水口裕之、山下富義、鳥澤勇介、高山和雄
2. 発表標題 Polydimethylsiloxane製 liver-on-a-chipを用いた薬物代謝・毒性試験
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021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 分 担 者	山下 富義 (Yamashita Fumiyoshi) (30243041)	京都大学・薬学研究科・教授 (14301)	

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
---------	---------