

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02126

研究課題名(和文)新しい共培養モデルを用いたヒト腸内細菌の共生の分子基盤解明と応用展開

研究課題名(英文) Development of an in vitro co-culture system for elucidation of host-gut microbiota symbiosis

研究代表者

片山 高嶺 (Katayama, Takane)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：70346104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：単層化Caco-2細胞のアピカル側を嫌気環境としつつ、基底膜側を好気環境に維持することが可能なアピカル嫌気培養デバイスを開発した。本デバイスを用いCaco-2細胞を5日間培養したところ、アピカル側および基底膜側の溶解酸素濃度は0.3%以下および60%以上に保たれており、経上皮電気抵抗値は通常のCO₂インキュベーターで培養した場合と同等であった。また、蛍光免疫染色によってもタイトジャンクション形成の維持が確認された。アピカル側培地に嫌気性腸内細菌を添加したところ、その増殖が著しく促進された。本装置を用いることでヒト腸上皮細胞と偏性嫌気性腸内細菌の共培養が可能であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本助成においてアピカル嫌気培養デバイスの有効性を示すことが出来た。本デバイスの特許出願に基づいた共同研究を国内企業2社と進めており、2022年もしくは2023年には実用化が見込まれている。本装置が汎用化されることで、よりin vivoに近い状態で共生・疾患メカニズムを解析することが可能となると考えられる。

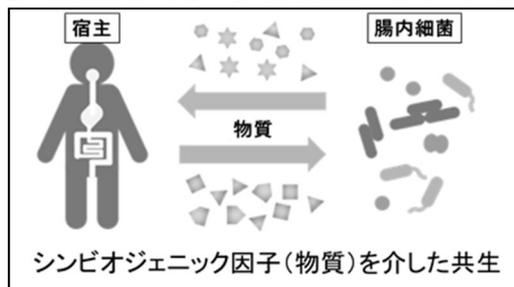
研究成果の概要(英文)：We have developed an apical anaerobic device in this study. The device was able to keep dissolved oxygen concentrations of apical side and basal side of Caco-2 monolayer at < 0.3% and < 60%, respectively, at least for 5 days. Transepithelial electrical resistance values were comparable to that of the cells maintained in CO₂ incubator. Fluorescence immunostaining of claudin-2 revealed clear tight-junction formation of the cells. When obligate anaerobes belonging to Bacteroides and Bifidobacterium genera were added to the apical medium, the growth of these bacteria was stimulated by 10- to 1,000,000-folds. Transepithelial electrical resistance was comparable between before and after co-cultivation. These results indicate that the device is useful to examine cross-talk between intestinal epithelial cells and anaerobic microbes at the molecular levels.

研究分野：応用微生物学

キーワード：共培養 アピカル嫌気 嫌気性細菌 腸上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌と宿主の共生が注目を集めて久しいが、殆どの研究は両者の「相関」を調べたものであり、その相関を担う「物質や遺伝子・酵素」を同定した例は多くない。申請者はこれまでの研究において、ヒト自身が産生する物質（母乳オリゴ糖やムチン型糖鎖）が特定の腸内細菌を増殖させるメカニズムを解明した。このことは、ヒトが積極的に物質を介して腸内細菌叢を制御していることを示唆している。申請者はそのような化合物を「シンビオジェニック因子」として捉え、共生を物質制御の連携として理解したいと考えた。この概念(右図)に基づき、ヒトの腸上皮細胞とヒトの腸内細菌を共培養可能な装置の開発に取り組んだ。



2. 研究の目的

本研究は、ヒト腸上皮細胞とヒト腸内細菌の共培養を可能とする培養装置の開発と利用を目的とした。

3. 研究方法

・アピカル嫌気培養装置の開発

Caco-2 細胞は 10 % FBS を含む DMEM にて培養した。CO₂ インキュベーター内で単層化させた後に、アピカル嫌気培養装置にセットし、嫌気チャンバーに導入した。なお、Caco-2 細胞のみの単独培養時には抗生物質を添加し、共培養の際には非添加とした。酸素濃度は Micro Fiber Optic Oxygen Transmitter (PreSens 社製) を使用して測定した。核染色には DAPI を、免疫染色は抗クローデイン-2 抗体を用いた。

装置の改良は、2016 年に特許出願した培養装置の設計図をもとにして、国内企業 2 社と行った。1 社はディスプレイ使用を可能とするためにプラスチック化を導入し、もう 1 社ではアピカル培地の流動化を導入した。なお、両装置とも経上皮電気抵抗値の揭示測定を可能とするための電極を導入し、付属タブレットに接続して記録可能とした。

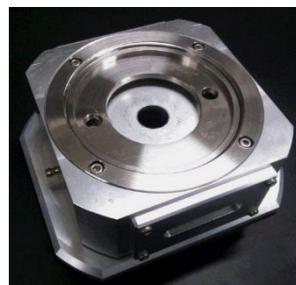
・共培養

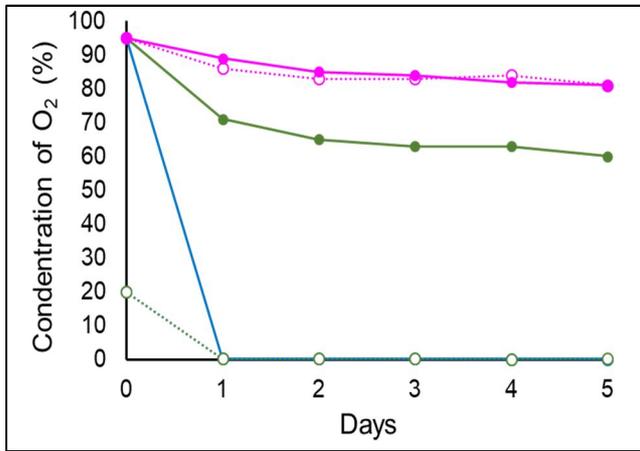
Bacteroides thetaiotaomicron, *Bacteroides dorei*, *Bacteroides caccae*, *Parabacteroides merdae*, *Dorea longicatena*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, および *Bifidobacterium longum* を GAM 培地 (ニッスイ) で一晩培養し、DMEM 培地で洗浄後、培養装置のアピカル培地に 10³ CFU/mL 程度で添加した。共培養を 24 時間行った後、一部をサンプリングして希釈し GAM 寒天培地に塗布して CFU を測定した。また、16S rRNA 遺伝子のシーケンシングをおこなって培養中のコンタミネーションが無いことを確認した。

4. 研究成果

・アピカル嫌気培養装置の開発

ヒトの腸管では、管腔内外で酸素分圧に大きな違いがある。管腔外には血管から酸素が供給されているために好気条件が保たれているものの、管腔内は嫌気的環境が形成されており、事実、腸内細菌叢を形成する殆どのバクテリアは偏性嫌気性である。ヒト上皮細胞と腸内細菌の共培養を可能とするためには、まず、この 2 つの酸素濃度環境を再現する必要があると考えた。そこで、右図に示すようなステンレス製の培養装置 (9 cm x 9 cm x 4 cm) を作製した。本装置の下層には 15 mL 程度の通常の細胞用培地 (非働化したウシ胎児血清を加えた DMEM 培地) を加え、中心のウェルにカルチャーインサートを挿入する。このカルチャーインサートにはあらかじめ通常の CO₂ インキュベーターで Caco-2 細胞を播種し単層化させておく。その後、カルチャーインサートと装置のウェルをコーキング剤で塞ぐことで密閉する。カルチャーインサートの上層にも通常の細胞用培地 (非働化したウシ胎児血清を加えた DMEM 培地) を添加し、その後、装置ごと嫌気チャンバーに導入することで、単層化した Caco-2 細胞の頂端膜側 (アピカル側) のみを嫌気的にすることが可能となる (アピカル嫌気)。

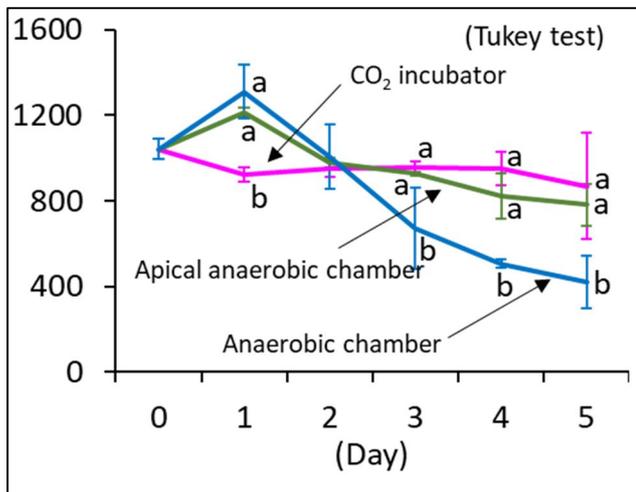




本装置を用いて Caco-2 細胞を培養し、上層培地および下層培地の溶存酸素濃度を測定した。なお、コントロール群は同装置を CO₂ インキュベーターで培養したもの(好気環境)および同装置のウェルのコーキング処理を行わずに培養したもの(嫌気環境)とした。その結果、左図に示す通り、嫌気環境下で培養を続けた場合には、培養 1 日目において上層培地および下層培地とも溶存酸素濃度が 0-0.5% 程度となり、反対に好気環境においては上層培地および下層培地とも溶存酸素濃度 85% 以上が 5 日間にわたって維持された。一方、アピカル嫌気環境においては上層培地の溶存酸素は 1

日目に 0-0.5% 程度になったが、下層培地においては 5 日間にわたって 70% 以上が維持された。以上のことから、本装置は単層化した Caco-2 細胞を、実際の腸管内での酸素分圧条件に近い状態で培養可能であることが明らかとなった。

次に、単層化した Caco-2 細胞のバリア機能を評価するために、経上皮電気抵抗値を測定した。なお、この場合は、経時的に装置からトランスウェルを外して PBS で洗浄した後に、通常の装置(ミリセル抵抗値測定システム)で測定した。結果を次ページ上段左にしめす。

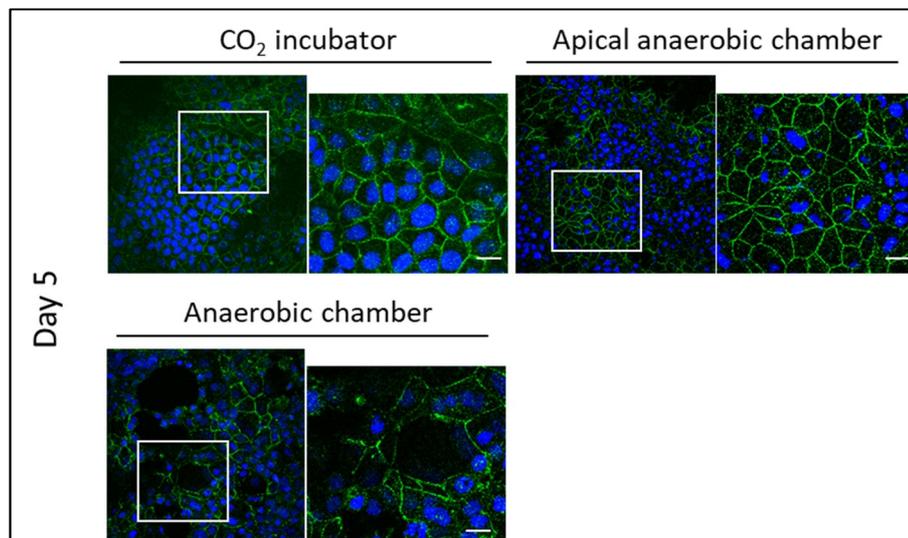


嫌気環境で培養した際には、抵抗値の減少が観察されたが、好気環境およびアピカル嫌気環境においては抵抗値が 5 日間にわたって安定していた。以上の結果から、アピカル嫌気環境においても単層化した Caco-2 細胞のバリア機能は保持されていること、また嫌気環境ではバリア機能が低下することが示唆された。

単層化した Caco-2 細胞のバリア機能の更に検証するために、タイトジャンクションを形成するタンパク質の一つであるクローニン-2 に対する蛍光免疫染色を行った。単層化した Caco-2 細胞を各環境下で 5 日間培養して免疫染色に供した結果を下図に示す。なお核

は DAPI 染色した。嫌気環境下においては、タイトジャンクションの崩壊(緑色)が観察されたが、CO₂ インキュベーター内で培養した好気環境の場合および開発した培養装置で培養したアピカル嫌気環境の場合では、明瞭なタイトジャンクションが観察された。この結果は、経上皮電気抵抗値の結果に良く対応していた。

また、細胞内および細胞外の乳酸デヒドロゲナーゼ活性を測定したところ、嫌気環境で培養した Caco-2 細胞の場合、細胞外の活性が著しく上昇し、また細胞内の活性は減少した。一方で、CO₂ インキュベーター内で培養した好気環境の場合および開発した培養装置で培養したアピカル嫌気環境の場合、細胞外の活性は 5 日間にわたって低く維持され、細胞内では高く保持された(同程度の値)。以上のことから、開発したアピカル嫌気培養デバイスの有効性が示された。



・共培養

次に、アピカル側培地に偏性嫌気性の腸内細菌を添加し、共培養が可能かどうかを確かめることとした。単層化した Caco-2 細胞をアピカル嫌気培養デバイスに設置して培養後、2 日目に *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides dorei*, *Bacteroides caccae*, *Parabacteroides merdae*, *Dorea longicatena*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, および *Bifidobacterium longum* をそれぞれアピカル側培地に 1×10^3 cfu/mL 程度添加して共培養を行った。なおコントロール群は、Caco-2 細胞を播種せずにコーキング剤を添加してカルチャーインサートの底面をふさいだものを使用した。その結果、*Dorea longicatena* を除くすべての細菌において共培養時に著しい細菌増殖が観察され、最少でも 10^2 程度、最大で 10^6 程度の増加が観察された。この増殖促進効果のメカニズムを解明することで共生の基盤を理解することが可能かもしれない。なお、培養後の経上皮電気抵抗値を測定したところ、培養前と比較して 85–106 % 程度の値を示しており、共培養による Caco-2 細胞のバリア機能には大きな影響は与えていないことが示唆された。

Bifidobacterium longum との共培養を行った Caco-2 細胞について DNA アレイ解析を行った。なお、コントロールは共培養しなかった Caco-2 細胞を使用した。その結果、炎症系遺伝子の発現上昇が観察された。本培養装置においては、上皮細胞と腸内細菌が直接的に接触しているが、実際の腸管においてはムチン層を介して直接的な接触は生じないようになっている。おそらく、本培養装置においてもムチン層の導入などが必要と考えられる。

以上の成果を基に国内・国際特許出願を行っている。また学会等での発表は以下の通りである。現在、国内企業 2 社と共同研究を進めており、1 社は前ページで紹介した培養装置をもとに、培養装置とトランスウェルの隙間のコーキングを不要とし、かつ、経時的な経上皮電気抵抗値の測定機能を付加、また下層培地からのサンプリングを可能とした改良型、もう 1 社はペリスタルティックポンプを設置することで上層培地を流動化させることを可能とした改良型である。後者の場合は、腸内細菌との培養を 3 日間まで継続させることが可能であり、かつペリスタルティックポンプの廃液を HPLC 等に接続して分析することが可能である。今後、本装置の実用化が期待されている。

[学会発表]

後藤愛那・神戸大朋・片山高嶺

iGOEMON チャンバーの開発

2018 年日本乳酸菌学会泊まり込みセミナー 2018/07/21

後藤愛那・永田千夏・加藤紀彦・神戸大朋・片山高嶺

嫌気性腸内細菌と培養細胞の共培養システムの開発

第 22 回腸内細菌学会 2019/06/06

Aina GOTOH, Toyoyuki HASHIMOTO, Yasuko YONEDA, Yoichi FUJIYAMA, Eiichi OZEKI, Toshihiko KATOH, Yoh-ichi TAGAWA, Yun-Gi KIM, Koji HASE, Takane KATAYAMA

嫌気性腸内細菌と腸上皮細胞の共培養を可能とする フロー型アピカル嫌気培養器の開発

日本農芸化学会 2021 年度仙台大会 2021/03/20

[特許出願] (出願は本研究助成期間以前であるが、現在、審査官への反論等を行っている)

片山高嶺・神戸大朋

嫌気性細菌などの細菌と上皮細胞との共培養装置及び共培養法

PCT/JP2017/ 39206

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Katoh T, Ojima MN, Sakanaka M, Ashida H, Gotoh A, and Katayama T	4. 巻 8
2. 論文標題 Enzymatic adaptation of Bifidobacterium bifidum to host glycans, viewed from glycoside hydrolyases and carbohydrate-binding modules	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 481
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms8040481	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sakanaka Mikiyasu, Hansen Morten Ejby, Gotoh Aina, Katoh Toshihiko, Yoshida Keisuke, Odamaki Toshitaka, Yachi Hiroyuki, Sugiyama Yuta, Kurihara Shin, Hirose Junko, Urashima Tadasu, Xiao Jin-zhong, Kitaoka Motomitsu, Fukiya Satoru, Yokota Atsushi, Lo Leggio Leila, Abou Hachem Maher, Katayama Takane	4. 巻 5
2. 論文標題 Evolutionary adaptation in fucosyllactose uptake systems supports bifidobacteria-infant symbiosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaaw7696
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aaw7696	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Sakanaka Mikiyasu, Gotoh Aina, Yoshida Keisuke, Odamaki Toshitaka, Koguchi Hiroka, Xiao Jin-zhong, Kitaoka Motomitsu, Katayama Takane	4. 巻 12
2. 論文標題 Varied Pathways of Infant Gut-Associated Bifidobacterium to Assimilate Human Milk Oligosaccharides: Prevalence of the Gene Set and Its Correlation with Bifidobacteria-Rich Microbiota Formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 71～71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu12010071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takada Hiromi, Katoh Toshihiko, Katayama Takane	4. 巻 67
2. 論文標題 Sialylated O-glycans from hen egg white ovomucin are decomposed by mucin-degrading gut microbes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Applied Glycoscience	6. 最初と最後の頁 31～39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5458/jag.jag.JAG-2019_0020	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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takane Katayama
2. 発表標題 Symbiosis and co-evolution between bifidobacteria and humans, driven by human milk oligosaccharides
3. 学会等名 The 7th International conference on food factors (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤愛那・永田千夏・加藤紀彦・神戸大朋・片山高嶺
2. 発表標題 嫌気性腸内細菌と培養細胞の共培養システムの開発
3. 学会等名 第22回腸内細菌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 後藤愛那・神戸大朋・片山高嶺
2. 発表標題 iGOEMONチャンバーの開発
3. 学会等名 2018年日本乳酸菌学会泊まり込みセミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Aina GOTOH, Toyoyuki HASHIMOTO, Yasuko YONEDA, Yoichi FUJIYAMA, Eiichi OZEKI, Toshihiko KATOH, Yoh-ichi TAGAWA, Yun-Gi KIM, Koji HASE, Takane KATAYAMA
2. 発表標題 嫌気性腸内細菌と腸上皮細胞の共培養を可能とする フロー型アピカル嫌気培養器の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度仙台大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://www.bunshioutou.lif.kyoto-u.ac.jp/katayama/Home.html>

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	加藤 紀彦 (Katoh Toshihiko) (40724612)	京都大学・生命科学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	神戸 大朋 (Kambe Taiho) (90303875)	京都大学・生命科学研究科・准教授 (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
---------	---------