

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14855

研究課題名(和文)腸上皮細胞と筋線維芽細胞の2層培養系を用いた新規薬物透過吸収試験モデルの開発

研究課題名(英文)Development of the new drug transmission absorption examination model by two phase culture system of intestinal epithelium cell and myofibroblast

研究代表者

佐藤 晃一 (Sato, Koichi)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：90205914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：経口摂取された医薬品や機能性食品の効果や安全性は消化管からの吸収に依存するため、培養細胞を用いた消化管透過吸収試験の結果が評価において重要な材料となっている。しかし、現在の吸収透過試験系は単一種の上皮細胞による単層培養系が用いられており、生体の消化管上皮層が多様な上皮細胞から構成されていることや、筋線維芽細胞が上皮細胞直下に足場として配列し上皮細胞の機能を制御していることが考慮されていない。本プロジェクトでは、生体環境に近い物質透過吸収試験系を確立することで、薬や機能性食品の有効性や安全性がより反映されたあらたな評価方法を提供することを最終目的として研究を行った。

研究成果の概要(英文)：As for the medical supplies and the effect and the safety of functional foods done ingestion of, the result of the digestive organs transmission absorption examination that I used a cultured cell will become important materials in evaluation to depend on the absorption from digestive organs. However, single-layered culture system by single epithelium cell is used for the current absorption transmission examination system. That a cortex consisting of various epithelium cells in the digestive organs of the living body and myofibroblast cell arrange it right under an epithelium cell are not considered. In this project, I establish the material transmission absorption examination system that is almost living body environment. And I offer the new evaluation method how medicine and the effectiveness and the safety of functional foods were reflected more.

研究分野：獣医薬理学

キーワード：消化管上皮細胞 筋線維芽細胞 3次元培養 薬物透過吸収

### 1. 研究開始当初の背景

経口摂取された医薬品や機能性食品の効果や安全性は消化管からの吸収に依存するため、培養細胞を用いた消化管透過吸収試験の結果が評価において重要な材料となっている。

しかし、現在の吸収透過試験系は単一種の上皮細胞による単層培養系が用いられており、生体の消化管上皮層が多様な上皮細胞から構成されていることや、筋線維芽細胞が上皮細胞直下に足場として配列し上皮細胞の機能を制御していることが考慮されていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究は、消化管の上皮細胞層と筋線維芽細胞層からなる腸上皮2層モデルの作出による新たな薬物透過吸収試験系の確立することを目的としている。

本プロジェクトにより、生体内の環境に近い物質透過吸収試験系を確立することができれば、様々な薬や機能性食品の有効性や安全性がより反映されたあらたな評価方法を提供することが可能となる。

また、本プロジェクトにより、3次元培養オルガノイドを用いた研究体制の確立もされることにより、上皮細胞と筋線維芽細胞などの相互関係も明らかにすることで、生理的のみならず、ガンなどの病態における消化管微小環境の解明も行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) IESC の効率的分化誘導法の確立

マウス結腸から単離した上皮幹細胞 (IESC) を用いて、3次元培養で報告されている培地、血清、各種発生シグナルを担う因子等により刺激を行い、効率的に分化・増殖させる培養条件を検討する。具体的検討条件は以下のとおりである。

適正培地組成 (DEME, DMEM/F12 など)

血清成分と濃度 (FBS, マウス血清など)

各種発生シグナルの刺激薬・阻害薬の必要性 (Wnt シグナルや Notch シグナル活性化, BMP シグナル阻害など)

足場の必要性 (collagen, laminin など)

#### (2) IESC 由来上皮細胞単層モデルの作成

IESC より分化誘導した上皮細胞を用いて IESC 由来上皮細胞 (IESCepi) 単層モデルを作成し、現在の物質吸収透過性試験に汎用されるヒト結腸上皮由来 Caco-2 細胞およびイヌ腎上皮由来 MDCK 細胞を用いた既存モデルとの比較を行う。

ルシファーイエロー透過性試験により物質透過性を検討

グルコース吸収試験により物質の吸収性を検討

経上皮電気抵抗試験により細胞間密着結合について検討

免疫蛍光染色により細胞間接着を確認

様々な細胞膜トランスポーターの免疫染色およびウェスタンブロットによるその発現・局在を確認。

#### (3) IESC 由来上皮細胞-IMF2 層モデルの作成

IMF 株化細胞と前年度作成の IESCepi 単層モデルを用いて、IESCepi -IMF 2 層モデルを確立する。具体的には、培養 IMF 上に IESCepi を重層培養し、IESCepi-IMF の2層構造を構築して、生体の上皮細胞-IMF 微小環境との比較を行う。

電子顕微鏡により細胞および細胞間の微細構造を解析する。

中和抗体を用いて細胞間接着における 1 および 4 integrin 等の関与を検討する。

#### (4) IESC 由来上皮細胞-IMF 2 層モデルによる透過吸収試験系の作成

IESCepi-IMF 2 層モデルを用いて、IESCepi や Caco-2 細胞を用いた単層培養細胞モデルと、ルシファーイエロー試験により物質透過性を、グルコース吸収試験により物質の吸収への影響を、経上皮電気抵抗の測定により細胞間接着の変化について比較。

#### (5) 3次元オルガノイド(3次元組織構造体)の利用

マウス小腸上皮細胞を用いて、オルガノイドの作成。さらに、IMF とマウス結腸株化上皮細胞による2層培養モデルを作成し、上皮細胞と筋線維芽細胞を用いた物質透過吸収試験系の作成

### 4. 研究成果

平成 27 年度は IESC を用いた上皮細胞単層モデルの作成をめざして、IESC の効率的分化誘導法の確立と IESC 由来上皮細胞単層モデルの作成のために、腸筋線維芽細胞 (IMF) と腸上皮細胞の混合型 3 次元組織構造体 (オルガノイド) 作成の検討を行った。その結果、消化管上皮オルガノイドに IMF を加え、特殊調整した培地、血清、各種因子等により刺激を行い、効率的に分化・増殖させる培養条件を見つけ出し、マウスのみならずヒト消化管からも各種細胞が混在する 3 次元培養モデルを確立することができた。

平成 28 年度は、マウス小腸および大腸のオルガノイド作成に成功したことから、ヒト大腸組織のオルガノイド作成を行い、特殊調整した培地、血清、各種因子等により刺激を行い、効率的に分化・増殖させる培養条件を見つけ出した。また、ヒト結腸癌組織を用いたオルガノイドの作成にも成功し、汎用性の高い実験主義であることを確認した。現在はこれらの知見を元に、上皮幹細胞の効率的分化誘導法の確立と、上皮幹細胞由来単層モデルの作成を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3件) 全て査読有り

1. Satoru Kake, Tatsuya Usui, Takashi Ohama, Koichi Sato.

Death-associated protein kinase 3 controls tumor progression of A549 cells through ERK MAPK/c-Myc signaling. *Oncology Reports*. 2017 Feb;37(2):1100-1106. doi: 10.3892/or.2017.5359. Epub 2017 Jan 9.

2. Hideyoshi Kawasaki, Tauya Saotome, Tatuya Usui, Takashi Ohama and Koichi Sato.

Regulation of intestinal myofibroblasts by KRas-mutated colorectal cancer cells through heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor. *Oncology Report*, 3128 7: 3128-3136, 2017.

3. Tatsuya Usui, Masashi Sakurai, Shuhei Enjoji, Hideyoshi Kawasaki, Koji Umata, Takashi Ohama, Nobuyuki Fujiwara, Ryotaro Yabe, Shunya Tsuji, Hideyuki Yamawaki, Shoichi Hazama, Hiroko Takenouchi, Masao Nakajima, RYOUICHI Tsunedomi, Nobuaki Suzuki, Hiroaki Nagano and Koichi Sato.

Establishment of a novel model for anticancer drug resistance in three-dimensional primary culture of tumor microenvironment. *Stem Cells International*, 7053872, 2016.

〔学会発表〕(計 6件)

1. The Joint Symposium of the 7th Veterinary Research among Universities of Veterinary Medicine in East Asia (2016.2.22), ハノイ(ベトナム) Hideyoshi Kawasaki, Tatsuya Usui, Takashi Ohama, Koichi Sato. Interaction of epithelial cells with intestinal myofibroblasts through S1P in colorectal cancer.

2. 第39回日本分子生物学会年会(2016.12.2), パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 川崎秀吉, 馬田康司, 碓彰一, 鈴木伸明, 永野浩昭, 臼井達哉, 大浜剛, 佐藤晃一 Sphingosine-1-Phosphate は結腸癌微小環境において筋線維芽細胞の遊走を制御する.

3. 第68回日本薬理学会西南部会(2015.11.21), 産業医科大学(福岡県, 北九州市) PP2AとDAPK3はBeclin 1-ATG14L複合体とオートファジーを調節する

藤原信行, 臼井達也, 大浜剛, 佐藤 晃一

4. 第158日本獣医学会学術集会(2015.9.7), 北里大学(秋田, 十和田市) 結腸癌における Sphingosine-1-Phosphate を介した上皮細胞と筋線維芽細胞の相互作用. 川崎秀吉, 臼井達哉, 大浜剛, 佐藤晃一

5. 第158日本獣医学会学術集会(2015.9.7), 北里大学(秋田, 十和田市) イヌの悪性リンパ腫細胞に対する抗精神薬 Perphenazine の抗がん効果 辻竣也, 矢部滝太郎, 臼井達哉, 大浜剛, 佐藤晃一

6. Europhosphatase (2015.6.25), Turuk (Finland)

Regulation of Beclin 1 association with Atg14L and autophagy by PP2A and DAPK3.

Nobuyuki Fujiwara, Tatsuya Usui, Koichi Sato, Takashi Ohama.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
なし

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
・なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 晃一 (SATO Koichi)  
山口大学・共同獣医学部・教授  
研究者番号: 90205914

6. 研究組織

(2)研究分担者：なし  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者：なし  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者：なし  
( )