

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07185

研究課題名(和文) エンテロイドを用いた物質輸送の3D定量解析

研究課題名(英文) 3D quantitative analysis of substrate transport using enteroids

研究代表者

菅原 満 (sugawara, mitsuru)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：60332467

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)：本研究ではエンテロイド(小腸組織培養系)を用いる物質輸送実験系を確立してトランスポーターの機能評価へ応用することを目的とした。蛍光物質をエンテロイド内腔に取り込ませた後、画像解析ツールを用いて自動輪郭決定する方法を改良した。蛍光顕微鏡のフルフォーカス明視野画像の濃淡を二値化、自動選択により輪郭を決定した後、この輪郭を蛍光画像に当てはめて蛍光強度を算出することにより、輪郭全体を捉えることができた。この際、膜不透過性の蛍光試薬をエンテロイド内腔に注入するマイクロインジェクション法の技術を考案した。これにより、内腔と細胞層との境界を客観的に区別しながら解析することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管吸収機構を明らかにするための既存の方法には、消化管内の生理的状态を保ったままin vitro系で評価する手法や、排出トランスポーターを簡便に評価する実験系が少ないことが問題点であった。小腸から作製されるエンテロイドは、消化管内の生理的状态を維持するため、有用な物質輸送解析のツールになる可能性がある。本研究の成果は、薬物吸収のメカニズムの解明や、薬物の吸収に及ぼす他の薬物あるいは食品成分の影響(相互作用)の解析に有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish a substrate transport experimental system using enteroid (small intestine tissue culture system) and apply it to the functional evaluation of transporters. After incorporating the fluorescent substrate into the lumen of the enteroid, the method of automatic contour determination using an image analysis tool was improved. The entire contour could be captured by binarizing the shade of the full-focus bright-field image of the fluorescence microscope, determining the contour by automatic selection, and then applying this contour to the fluorescence image to calculate the fluorescence intensity. At this time, we devised a technique for the microinjection method in which a membrane-impermeable fluorescent reagent is injected into the lumen of the enteroid. This made it possible to analyze the boundary between the lumen and the cell layer while objectively distinguishing it.

研究分野：薬物動態学

キーワード：エンテロイド 画像解析 トランスポーター 蛍光観察

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬物の消化管吸収(小腸上皮の透過)は、古くから薬物の脂溶性と酸・塩基の解離状態(イオン化の割合)によって説明付けられてきた(pH-分配仮説)。これらは多くの薬物の吸収性の良し悪しを規定する大きなファクターであるが、近年、生体膜に発現する輸送担体タンパク質(トランスポーター)による輸送がその吸収性に大きく寄与する薬物が多数存在することが明らかにされてきた。

これまで、薬物の消化管吸収機構を明らかにするためにいくつかの手法が考案されており、申請者らも、経口投与や小腸組織を用いた方法(灌流法、ループ法、反転腸管法、チャンバー法など)、培養細胞(Caco-2細胞など)や上皮細胞から単離精製した膜小胞を用いる方法、外来遺伝子発現系などを用いて、種々薬物の吸収性および吸収機構を評価し、また、通常は吸収されにくい薬物の吸収改善策の検討を行ってきた。しかし、株化された培養細胞ではトランスポーターや酵素の発現量が少ないなどのいくつかの問題があり、外来遺伝子発現系による解析は有用なもの、正常な生理的条件下での排出トランスポーターの影響を簡便に評価することは困難である。

このように上述の手法においては、吸収性の大小の比較や発現系によるトランスポーターの機能解析等には有用であるが、吸収上皮細胞以外の細胞や組織が混在する生理的状态を保ったまま、*in vitro*で評価できる手法が不足しており、また、薬物の吸収を抑制する方向に働く排出トランスポーターの機能を簡便に評価する実験系が少ない、というのが現状である。そこで、これまで使用されてきた“組織を使用する実験”と“細胞を使用する実験”の間をとりもつ実験系があると、薬物の吸収動態の全貌をさらに詳細に明らかにできると考えた。このような条件を満たす実験材料の候補として、生理的形態をよく維持しながら小腸上皮から調製することができるエンテロイドに焦点をあてた。エンテロイドは消化管上皮細胞からの物質の分泌機構や生理機能の解析に用いられているが、これを物質輸送解析のツールとして用いる方法は確立されていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、エンテロイドを物質輸送解析ツールとして用いて物質輸送の定量的解析する方法の確立することである。

われわれのこれまでの検討によって、エンテロイド調製法は確立しており、薬物輸送能を保持していることを確認しているため、本研究では、エンテロイド内に取り込まれた蛍光物質の分布を2Dおよび3D画像解析の手法で解析することにより、輸送メカニズムを明らかにする。すなわち、蛍光顕微鏡を用いて撮像した2D(エンテロイド水平断面)の薬物分布パターンから薬物蓄積領域の境界線の決定や定量化の方法を確立し、さらに3D解析モジュールを追加することにより3D撮像による蛍光物質分布の定量化へと展開する。

3. 研究の方法

6~8週齢の雄性マウスの空腸部から単離した陰窩を、成長因子等を含んだコラーゲンであるマトリゲルで包埋後、4~7日間培養した。継代後培養5,7日目のエンテロイドを用いて、1個のエンテロイドに対して基質をマイクロインジェクションした。マイクロインジェクションには実体顕微鏡を使用し、マイクロインジェクション後に蛍光顕微鏡へ移して観察した。

4. 研究成果

(1) 蛍光画像の処理方法

エンテロイド内腔と細胞層とを区別する境界線の決定方法を検討した。市販の生細胞染色試薬を用いて境界線を明確にしようと試みたが、良好な結果が得られなかった。そこで、蛍光物質をエンテロイド内腔に取り込ませた後、画像解析ツールを用いて自動輪郭決定する方法の改良を検討した。自動輪郭決定の方法として、フォーカスを絞った明視野画像を用いるものとフルフォーカス画像を用いるものを比較し

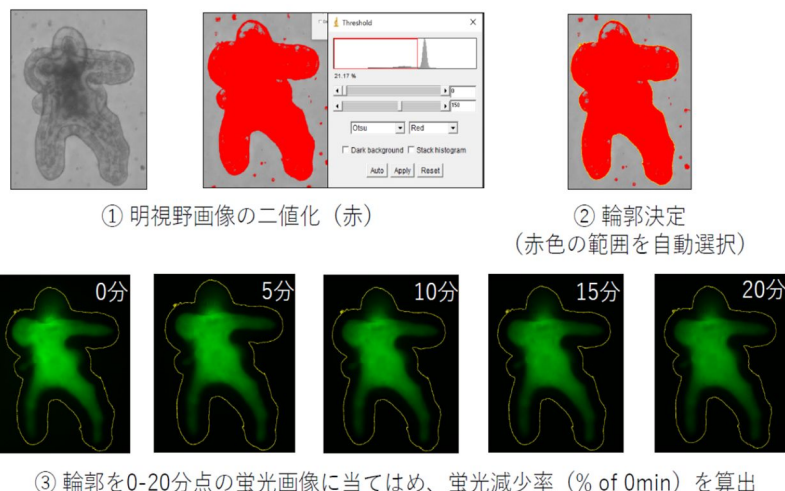


図1 蛍光画像の処理方法

た。その結果、フルフォーカス画像を使用した場合のほうが、輪郭全体を捉えやすいことが明らかになった。蛍光顕微鏡のフルフォーカス明視野画像の濃淡を二値化、自動選択により輪郭を決定した後、この輪郭を蛍光画像に当てはめて蛍光強度を算出することにより、輪郭全体を捉えることができた(図1)。ただし、エンテロイドの形状によっては輪郭全体を捉えることが難しいサンプルも存在した。また、自動化された機能であるため、複数のエンテロイドが近接している場合にはそれらを区別することが困難なため、サンプル調製時あるいは視野選択時に注意が必要である。

次に、後に検討するトランスポーターの輸送活性に影響を与えない色素の使用を想定し、観察用の蛍光色素をエンテロイド内腔に注入する方法を検討した。本実験では、エンテロイド内腔に薬液が注入されたことを確認するために実体顕微鏡観察下、明視野での観察が可能な色素と、内腔の蛍光を比較的長時間観察するための膜不透過性の蛍光色素を混合して用いた。その結果、薬液が内腔に注入される様子を観察することが可能となり、蛍光色素の漏出も少なく、輪郭決定に有用な手法と考えられた。

(2) 基質輸送の解析
マイクロインジェクション法の確立により、吸収方向の物質の輸送(消化管管腔から血液側への輸送)を解析することが可能となった。トランスポーターの基質を注入する際は、試薬が内腔に到達したことが判断できるように、明視野で観察可能な色素とともに注入した。モデル基質としてグルコース誘導体(2-NBDG)を用いた。2-NBDGの輸送に及ぼすグルコーストランスポーター(GLUT2)阻害剤であるフロレチン(PT)の効果を解析したところ、基底膜側よりも刷子縁膜側(内腔側)に添加したときのほうが蛍光強度の変化度が小さく、阻害の程度が大きいことが示された(図2, 図3)。

以上の結果より、本実験系は蛍光可視化により基質輸送を評価する手法として有用であると考えられる。

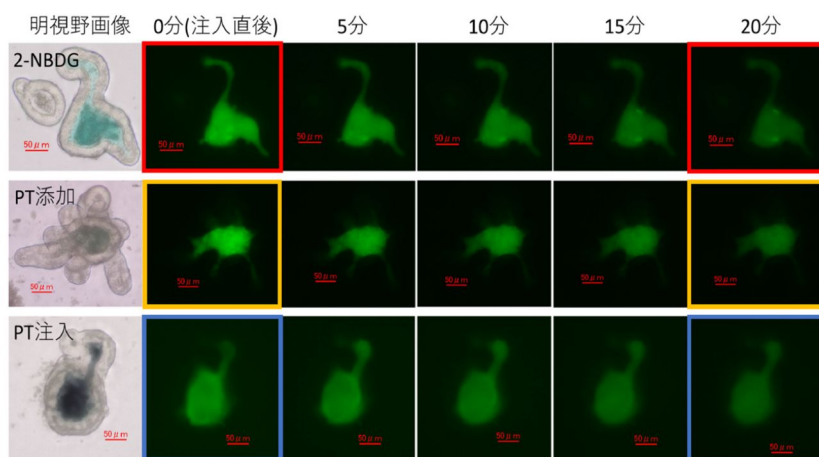


図2 2-NBDGのエンテロイド内腔量(蛍光)の変化に及ぼすフロレチン曝露の影響

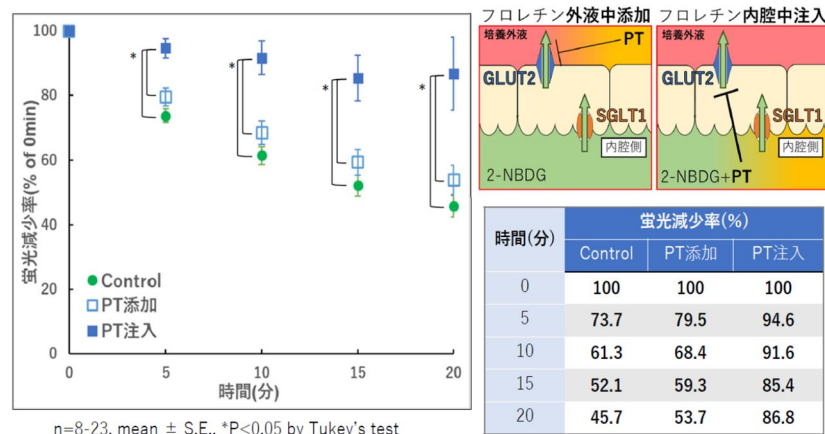


図3 2-NBDGのエンテロイド内腔量(蛍光)の変化に及ぼすフロレチン曝露の影響(図2から算出したデータをグラフ化)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 島田美紀子、佐藤夕紀、柏木 仁、今井俊吾、武隈 洋、菅原 満
2. 発表標題 吸収トランスポーターの機能解析へのエンテロイドの応用
3. 学会等名 日本薬学会第141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
---------------------------	-----------------------	----

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