

アピカル嫌気チャンバーを利用した腸内細菌と宿主の相互作用解析と応用展開

片山 高嶺
京都大学大学院 生命科学研究科

研究成果: 単層化した Caco-2 細胞をアピカル嫌気チャンバー内で 5 日間培養したところ、頂端膜側および基底膜側の溶存酸素濃度はそれぞれ 0.3 %以下および 60 %以上に保たれていた。その際の Caco-2 細胞の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 Caco-2 細胞と同等であった。クローデイン-2 の免疫染色によっても、CO₂ インキュベーターで培養した Caco-2 細胞と同等のタイトジャンクション形成が確認された。アピカル嫌気チャンバーに設置した Caco-2 細胞の頂端膜側培地に偏性嫌気性腸内細菌である *Bacteroides* 属細菌や *Bifidobacterium* 属細菌を添加したところ、これら細菌の増殖が 100 倍~10000 倍に促進され、また培養前後において経上皮電気抵抗値は保たれていた。これらのことから、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。

研究の目的

腸内細菌は宿主の健康や疾病に大きく関与することが近年の研究によって明らかになってきている。このクロストークを解明するために動物実験が多大な貢献をしてきたが、最近、動物実験に代替する研究手法の開発が強く求められるようになってきている。また、実験動物とヒトでは腸内細菌叢が異なることも指摘されている。私は、腸内細菌と宿主のクロストークを *in vitro* で解析する装置が必要であると考え、単層化したヒト腸管上皮細胞の頂端膜側を嫌気条件に、かつ、基底膜側を好気条件とすることが可能なデバイス(アピカル嫌気チャンバー)の開発を行っている。本研究は、本装置の有効性を実証することを目的とした。

方法

アピカル嫌気チャンバー(図 1)の作製は、ワケンビーテック社に依頼した。Caco-2 細胞の培養は DMEM (10 % FBS) にて行った。CO₂ インキュベーター内で単層化させた後に、アピカル嫌気チャンバーにセットし、嫌気培養装置の中に導入した。酸素濃度の測定には Micro Fiber Optic Oxygen Transmitter (PreSens 社製)を用いた。核染色は DAPI を、免疫染色は抗クローデイン-2 抗体を用いて行った。細菌株は理研バイオリソースセンターから取得し、通常の培養には GAM 培地(ニッスイ)を、共培養の際には DMEM (10 % FBS) を用いた。

結果

アピカル嫌気チャンバーを用いて Caco-2 細胞を培養したところ、頂端膜側の溶存酸素濃度は 1 日以内に 0.3 % 以下となり、基底膜側は 70 % 程度であった。溶存酸素濃度は 5 日間の培養中でほとんど変化せず、最終日での基底膜側濃度は 65 % であった。アピカル嫌気チャンバーを使用せずに、嫌気培養装置に静置した場合には、頂端膜側および基底膜側の両方が 1 日以内に溶存酸素濃度 0 % となった。経上皮電気抵抗値の経日変化を図 2 に示す。アピカル嫌気チャンバーで培養した Caco-2 細胞は、通常の CO₂ インキュベーター内で培養した細胞と同程度の値を示した一方で、嫌気培養装置に静置した細胞では値が著しく低下した。嫌気培養装置に静置した Caco-2 細胞の培養上清の乳酸デヒドロゲナーゼ活性は 3 日目から著しく上昇したことから、細胞が損傷していることが強く示唆された。次に、それぞれの条件で 5 日間培養した細胞を用いてクローディン 2 の免疫染色を行ったところ、アピカル嫌気チャンバーで培養した Caco-2 細胞では、通常の CO₂ インキュベーター内で培養した細胞と同等以上の明確なタイトジャンクションが確認された。一方で、嫌気培養装置に静置した Caco-2 細胞ではタイトジャンクションの崩壊が認められた。

溶存酸素濃度が 0.3 % 以下となった頂端膜側の培地に *Bacteroides thetaiotaomicron*、*Bacteroides uniformis*、*Bacteroides caccae*、*Parabacteroides merdae*、*Dorea longicatena*、*Lactococcus lactis*、*Bifidobacterium longum* および *Bifidobacterium bifidum* を添加して 24 時間培養したところ、Caco-2 細胞非存在下で培養した場合と比べて 100 倍から 10000 倍のコロニー形成能の上昇が認められた。培養前後の経上皮電気抵抗値に変化はなかったことから Caco-2 細胞は健全に保たれていると推察される。Caco-2 細胞との物理的な接触による上昇であるのか、代謝産物等の授受による上昇であるのか興味を持たれた。

結論

本装置の共培養システムとしての有効性が示された。Caco-2 などの腸上皮細胞株のみならず、iPS 細胞などから分化させたオルガノイドを 2 次元化して利用することも可能であり、これにより、より生体に近い環境で腸内細菌と宿主であるヒトのクロストークを理解することが可能となる。また、薬物や食品成分の動態解析にも展開可能であると考えられ、国内企業との実用化を計画している。

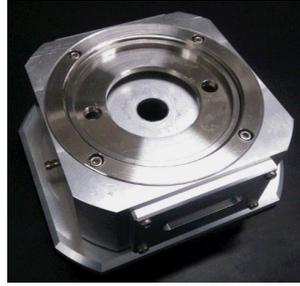


図 1. アピカル嫌気チャンバー (11 cm x 11 cm x 5 cm)
中央の穴にトランスウェルをセットし、嫌気培養装置内に導入する。

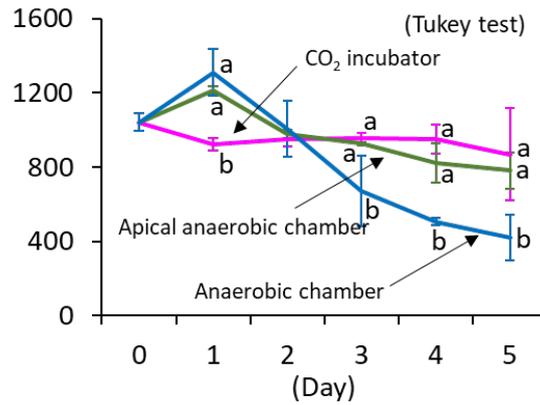


図 2. 経上皮電気抵抗値
単層化した Caco-2 細胞をそれぞれの条件で培養し経時的に抵抗値を測定した。

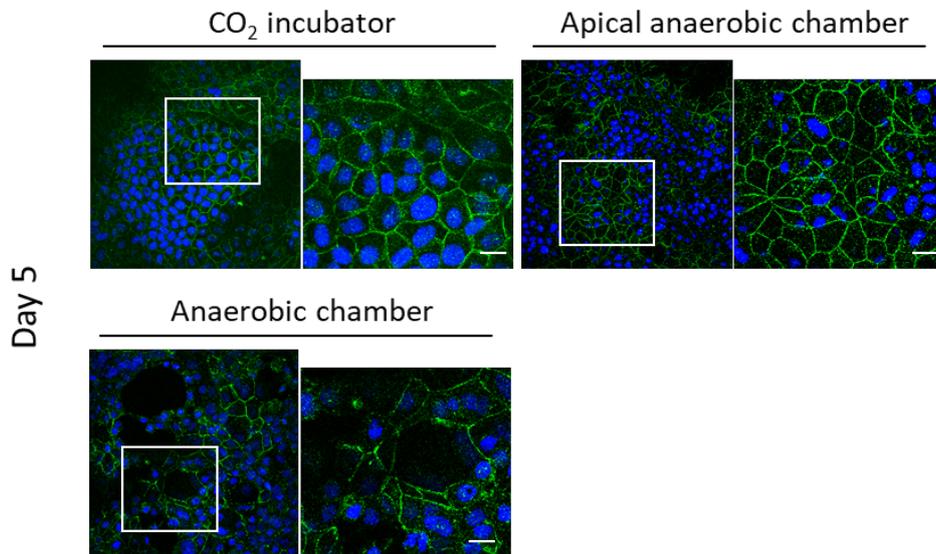


図 3. 免疫染色によるタイトジャンクション形成評価
それぞれの条件で 5 日間培養した細胞を使用した。核(青)、クローデイン-2(緑)。
スケールバーは 20 μm .