

表 2. C社 使用培地

Thawing Medium		
Component	Amount (ml)	Final Concentration
InVitroGRO HT	250	99.5%
Penicillin-Streptomycin	1.25	0.5%

2~8°Cで保存（1ヶ月間）

その日に必要な量の培地を分注し、使用前に Y27632（室温）を終濃度 5 μ M, で添加する。

Plating Medium		
Component	Amount (ml)	Final Concentration
InVitroGRO CP	250	99.5%
Penicillin-Streptomycin	1.25	0.5%

2~8°Cで保存（1ヶ月間）

その日に必要な量の培地を分注し、使用前に Y27632（室温）を終濃度 5 μ M, で添加する。

Base Maintenance medium		
Component	Amount (ml)	Final Concentration
William's medium E	500	99.9%
Penicillin-Streptomycin	0.5	0.1%

2~8°Cで保存（1ヶ月間）

Enhanced hiPS-HEP Maintenance medium		
Component	Amount (ml)	Final Concentration
Base Maintenance medium	49	%
HEP Supplement	1	2%
DMSO	0.25	0.5%

-15°C以下で保存（1ヶ月）凍結融解を繰り返してはいけない

Assay medium		
Component	Amount (ml)	Final Concentration
William's medium E (Phenol Red 不含有)	50	96%
Dexamethasone (10mM)	0.007	1.4 μ M
Hepatocyte Maintenance Supplement Pack Cocktail B	2	4%

4°Cで保存

厚生労働科学研究委託費（医薬品等規制調和・評価研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

担当研究課題 ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導性の評価・品質基準の
作成

担当責任者 松永民秀 名古屋市立大学 大学院薬学研究科 教授

研究要旨

ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化促進もしくは薬物動態学的機能の獲得に有用な低分子化合物を見出した。これを用いて分化させた腸管上皮細胞様細胞は薬物代謝酵素活性を有していた。さらに、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D_3 により CYP3A4 の mRNA 発現および活性の誘導も認められた。

研究協力者

岩尾岳洋 名古屋市立大学 大学院薬学研究科
講師

A. 研究目的

小腸には多くの薬物トランスポーターや薬物代謝酵素が発現しており、これらは医薬品の薬物動態に大きく影響する。したがって、医薬品開発時には医薬品候補化合物の小腸における動態を評価することが極めて重要である。現在、その評価のためには結腸がん由来の Caco-2 細胞が汎用されている。その理由として、Caco-2 細胞は形態学的に小腸に類似しており、薬物の膜透過の評価に適していることが挙げられる。一方で、薬物トランスポーターの発現パターンはヒト正常小腸とは異なることや、薬物代謝酵素の発現量が極めて低いこと、CYP3A4 の発現に関わる核内受容体である PXR の発現が認められないことが報告されている。したがって、Caco-2 細胞では小腸における薬物の膜透過と代謝をあわせて評価することや、P-gp や

CYP3A4 の誘導の評価には適さないことが問題となっている。

ヒト iPS 細胞が樹立されて以来、再生医療だけでなく創薬への応用に向けた研究も多く行われている。ヒト iPS 細胞から組織細胞への分化誘導に関する報告のうち、薬物動態を制御する主要な臓器である肝臓へ（肝細胞）への分化誘導の報告は多く存在するものの、腸管への分化誘導に関する報告は極めて少ない。

そこで本研究では、ヒト iPS 細胞から成熟腸管上皮細胞を作製し、誘導性の評価が可能なモデル系を構築することを目的とした。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞は国立成育医療研究センター研究所において樹立されたヒト iPS 細胞株 (Windy) を用いた。ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化は、ヒト iPS 細胞が培養ディッシュに対し、未分化細胞の割合が約 70% になった状態で開始した。

まず、アクチビン A 含む培地で内胚葉へ分化

させ、さらに線維芽細胞増殖因子2を含む培地で腸管幹細胞へ分化させた。その後、Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho 結合キナーゼ阻害剤である Y-27632 を 10 μ M となるよう添加し、5% CO₂/95% air 条件下 CO₂ インキュベーター中 37°C で 60 分間処理した後、細胞をアクターゼで剥離し、あらかじめ希釈した GFR マトリゲルでコーティングした細胞培養用 24 ウェルプレートに播種した (Y-27632 は播種後 24 時間培地に添加した)。細胞播種後、上皮成長因子を含む培地で腸管上皮細胞へ分化させた。低分子化合物は上記のある期間に添加した。

薬物代謝酵素誘導実験では、1 α -25-ジヒドロキシビタミン D₃ を細胞回収前に 48 時間処理した。

ペプチドの取り込み実験では、 β -Ala-Lys-AMCA (蛍光ラベルされたジペプチド) を 5% CO₂/95% air 条件下 CO₂ インキュベーター中 37°C でインキュベートした後、細胞内取り込みを顕微鏡下で観察した。

<倫理面への配慮>

本研究では国立成育医療研究センター研究所において樹立されたヒト iPS 細胞を用いており、倫理面の配慮は特に必要ないと判断される。

C. 研究結果

我々が以前報告したヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化誘導法 (Iwao *et al.*, *Drug Metab Pharmacokinet*, **29**, 44, 2014) に基づき、分化誘導時にさまざまな液性因子および低分子化合物を用いて成熟化に効果的な因子のスクリーニングを行った。その結果、ある低分子化合物を用いることで腸管上皮細胞マーカーであるスクラーゼ-イソマルターゼや主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 の発現の上昇が認められた

(Fig. 1)。また、この腸管上皮細胞様細胞は重要な排出トランスポーターである P-gp や BCRP の発現や、各種薬物代謝酵素活性 (CYP1A1/2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4/5, UGT, SULT)、ペプチドトランスポーターを介したペプチドの取り込み能も認められた。さらに、1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃ を処理することで、CYP3A4 の mRNA 発現および活性の誘導も認められた (Fig. 2)。

D. 考察

今回我々が見出した低分子化合物を用いて分化誘導させた細胞は、スクラーゼ-イソマルターゼをはじめとした腸管上皮細胞マーカーや P-gp, BCRP などの薬物トランスポーター、主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 を発現していた。また、形態学的にも数石状で腸管上皮細胞に類似した形態を示していたことから、この分化させた細胞は腸管上皮細胞様細胞であることが示唆された。さらに、薬物代謝酵素活性やペプチドの取り込み能に加え、1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃ による誘導能も認められたことから、腸管上皮細胞に特異的な薬物動態学的機能を有する細胞であることも明らかとなった。以上のことから、我々がヒト iPS 細胞から作製した腸管上皮細胞様細胞は薬物の吸収や代謝だけでなく、誘導性評価のためのモデル細胞としての有用性が示された。

E. 結論

今回我々は、ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化促進もしくは薬物動態学的機能の獲得に有用な低分子化合物を見出した。この化合物を用いて分化させた腸管上皮細胞様細胞は薬物代謝能やペプチドの取り込み能だけでなく、CYP3A4 の誘導能も有していたことから、

腸管における誘導性評価のモデル細胞としての利用の可能性が示された。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表等

論文発表等

- 1) Takenaka T, Harada N, Kuze J, Chiba M, Iwao T, **Matsunaga T**: Human small intestinal epithelial cells differentiated from adult intestinal stem cells as a novel system for predicting oral drug absorption in humans. *Drug Metab Dispos*, 2014; **42**: 1947–1954.
- 2) Kondo Y, Iwao T, Yoshihashi S, Mimori K, Ogihara R, Nagata K, Kurose K, Saito M, Niwa T, Suzuki T, Miyata N, Ohmori S, Nakamura K, **Matsunaga T**: Histone deacetylase inhibitors promote hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. *PLoS One*, 2014; **9**: e104010.
- 3) Kondo Y, Yoshihashi S, Mimori K, Ogihara R, Kanehama Y, Maki Y, Enosawa S, Kurose K, Iwao T, Nakamura K, **Matsunaga T**: Selective culture method for hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2014; **29**: 407–413.
- 4) Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, Sasaki T, Takahashi S, Kamada N, Matsubara T, Gonzalez FJ, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Umezawa A, Nagata K, **Matsunaga T**, Ohmori S: An efficient method for differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells

retaining drug metabolizing activity. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2014; **29**: 237–243.

- 5) Iwao T, Toyota M, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nagata K, **Matsunaga T**: Differentiation of human induced pluripotent stem cells into functional enterocyte-like cells using a simple method. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2014; **29**: 44–51.
- 6) **松永民秀**, 岩尾岳洋: 多能性幹細胞 (ES細胞, iPS細胞) の利用. 薬剤学実験法 必携マニュアル—Pharmaceutical Scientistのために— II 生物薬剤学, 日本薬剤学会出版委員会編, 南江堂, 東京, 2014年; p. 299–311.

学会発表等

- 1) **Matsunaga T**, Utility of iPS cells for drug metabolizing enzyme expression. 29th JSSX Meeting - 19th North American ISSX joint meeting (2014. 10, San Francisco, CA, USA).
- 2) 壁谷知樹, 岩尾岳洋, 小玉菜央, 中村克徳, **松永民秀**: ヒト iPS細胞由来小腸幹細胞の至適培養法の開発. 第66回日本生物工学会大会 (2014. 9, 札幌).

報道発表等

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) **松永民秀**, 岩尾岳洋「人工多能性幹細胞を腸管上皮細胞へ分化誘導する方法」国際出願番号: PCT/JP2014/054379, 国際出願日: 2014年2月24日.

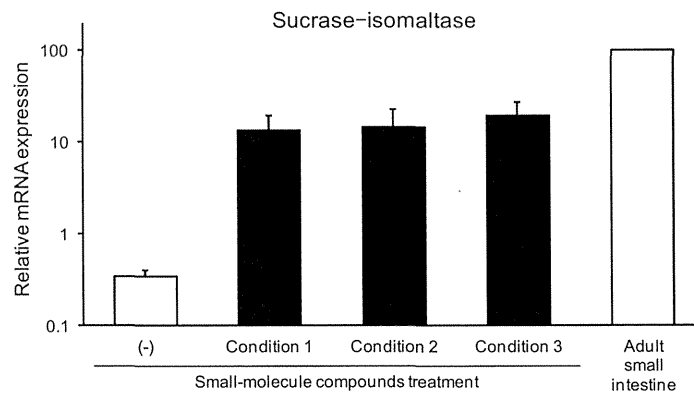


Fig. 1. 腸管上皮細胞様細胞におけるスクラーゼ-イソマルターゼの mRNA 発現

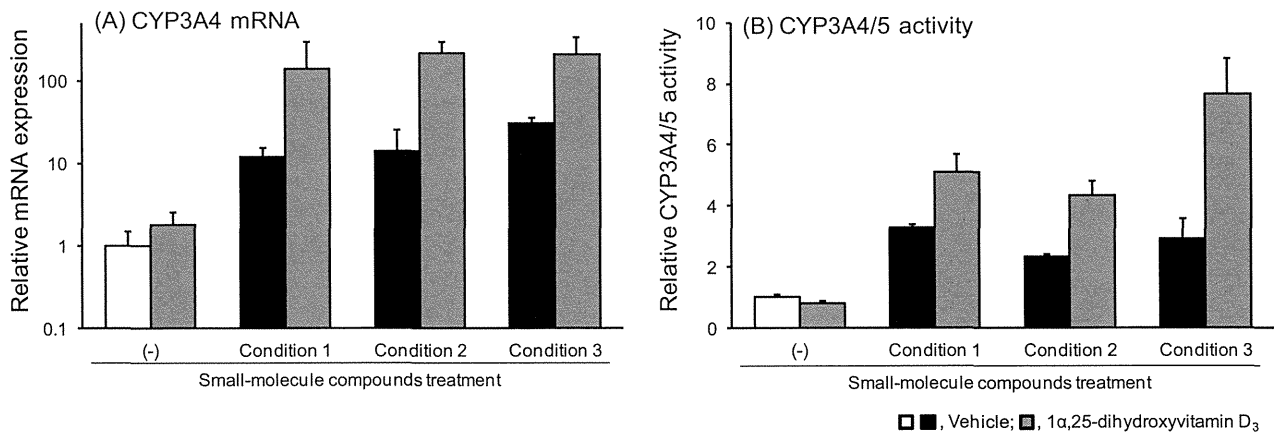


Fig. 2. 1α,25-ジヒドロキシビタミン D₃による CYP3A4 mRNA 発現と CYP3A4/5 活性の誘導

厚生労働科学研究委託費（医薬品等規制調和・評価研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

担当研究課題 ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導性の評価・
品質基準の作成

担当責任者 糸 昭苑 東京工業大学 生命理工学研究科 教授

研究要旨

今回はヒト-iPS 細胞からヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化誘導条件の培養日数や分化培地に加える化合物等について至適化を行ない、分化促進化合物、よい培養条件が得られた。分化途中細胞の表面抗原の解析結果から、途中段階の分化細胞を効率よく濃縮・純化できる方法を新規に見出した。代謝酵素などの成熟マーカーの発現も確認された。今後、今回見出した化合物を利用する分化誘導方法と純化方法を組み合わせて、さらに後の成熟化の培養条件をより適した方法の検討を加えることにより、より高効率、高成熟度の小腸上皮細胞が得られると期待される。

研究協力者

白木伸明 熊本大学 発生医学研究所 准教授
坂野大介 熊本大学 発生医学研究所 助教
山添大士 熊本大学 発生医学研究所 研究員
大垣総一郎 熊本大学医学教育部博士課程1年

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導性の評価・品質基準の作成

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化誘導条件の培養日数や分化培地に加える化合物等について至適化を行なった。分化誘導を促進する化合物、培養条件について検討を行なった。さらに、その条件下でヒト iPS 細胞から得られた途中段階の分化細胞について解析を行い、分化の経路を検証した。さらに、表面抗原の解析

結果から、途中段階の分化細胞を効率よく濃縮・純化できる方法を開発することより、今後の分化効率化へ向けての展開を図った。

<倫理面への配慮>

今回の研究は細胞株由来のヒト iPS 細胞を使用し、患者由来のものではないため、倫理面への配慮が特に問題にはならない。

C. 研究結果

C1. ヒト iPS 細胞からの腸への分化誘導方法の最適化を検討したところ、ある化合物を加えることにより、分化誘導の日数の短縮が認められ、腸への分化誘導効率が有意に上昇した。さらに、この化合物を用いて分化誘導した小腸上皮細胞は薬物代謝酵素 Cyp3A4 を発現する細胞に分化することを確認した。

一方、分化の途中段階の細胞について解析を行ったところ、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞マ

一カーとしては CDX2 が指標とされるが、CDX2+細胞には SOX17+と SOX17-細胞が存在し、その中でも CDX2+SOX17+細胞が CYP3A4 や MDR1 などを発現する小腸上皮細胞へ分化することを見出した。また CDX2+SOX17-に関しては胎盤の細胞へ分化することを見出した。したがって、これらの結果から、CDX2 というマーカー単独だけでは、真の小腸上皮とは言えないことが明らかになった。CDX2 と同時に SOX17 を評価に使用し、CDX2+SOX17+細胞を指標として評価すれば、真の小腸上皮細胞であるといえる。

さらに、簡易的濃縮方法の検討を行った。様々な細胞外マトリクスの上に継代し、分化細胞の接着効率、濃縮度について検討を行なった。

その結果、ある細胞外マトリクスを用いることにより CDX2+SOX17+細胞を特異的に濃縮することが可能であることを新規に見出した。なお、この細胞外マトリクスの受容体がマウス胚で特異的に小腸上皮に発現していることを見出し、生理的に意味がある現象であることが裏付けられた。また、今回の方法により分化誘導して得られた小腸上皮細胞から、Cyp3A4 陽性の細胞が得られ、このことから、分化誘導方法が適切であることを裏付けられた。

なお、今年度はトランスウエルでの培養方法も試したが、引き続き、次年度さらに検討する予定である。

D. 考察

これまでの分化の指標では胎盤細胞への分化も同時に観察しており、新たなマーカーを指標にすることでより特異的に小腸上皮細胞への分化誘導を行える。また CDX2+SOX17+細胞の濃縮を簡便に行えることから今後の分化誘導をより効率的に行える。またあるインテグリンが小腸上皮細胞特異的に発現しており、分化メカ

ニズムの解析も今後大きく進展すると期待される。

E. 結論

今回の研究の結果により、真の小腸上皮細胞のマーカーを同定し、それを利用して、分化誘導して得られた小腸上皮細胞の簡易的濃縮方法の確立を行った。また、分化を促進する化合物を得て、これを利用して分化の加速化、高効率化に成功した。今後はこれらの成果をさらに応用して、分化成熟度の高い小腸上皮細胞の作成へ向けて展開出来ると期待される。

F. 健康危機情報

該当なし。

G. 研究発表等

論文発表等

- 1) Tsuyama T, Shiraki N, Kume S. “Definitive endoderm differentiation of human embryonic stem cells combined with selective elimination of undifferentiated cells by methionine deprivation”, Human Embryonic Stem Cells, 3rd Edition (Springer's Protocols On Line series) (Edited by Kursad Turksen), *in press*
- 2) Umeda K, Shiraki N, Kume S, Hepatic differentiation from human iPS cells using M15 cells, in “iPS Cells: Generation Characterization and Differentiation –Methods and Protocols” Methods Mol Biol. 2014 [Epub ahead of print]
- 3) Yamazoe T, Shiraki N, Kume S, Hepatic differentiation from murine and human iPS cells using nanofiber scaffolds, Methods Mol Biol. 2014 Nov 20. Epub. in “ES Cells: Methods and Protocols- 2nd Edition” [Epub ahead of print]
- 4) Shiraki N, Ogaki S, Kume S*. Profiling of embryonic stem cell differentiation. Rev Diabet Stud. 11(1):102-14, 2014.

- 5) Shahjalal HM, Shiraki N, Sakano D, Kikawa H, Ogaki S, Baba H, Kume K., Kume S. Generation of insulin-producing beta-like cells from human iPS cells in a defined and completely Xeno-free culture system. *J. Mol. Cell Biol.* 6, 394-408, 2014.
- 6) Shiraki N., Shiraki Y., Tsuyama T., Obata F, Miura M, Nagae G, Aburatani H., Kume K, Endo F, Kume S*. Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Metab.* 19, 780-794, 2014.
- 7) 白木伸明 糸昭苑 「ES/iP 細胞を用いた内胚葉細胞（膵、肝、小腸）への分化誘導」『iPS 細胞研究最前線—疾患モデルから臓器再生まで』医学のあゆみ」251, 1153-1159, 2014. (長船健二 編集)
- 8) 坂野大介 糸昭苑 「ES 細胞を用いた発生分化の研究と再生医学への応用」『特集 器官の発生と再生の基礎』公益財団法人金原一郎医学医療振興財団(医学書院) 生体の科学 65. 197-202, 2014. 6月
- 9) 白木伸明 糸昭苑 「メチオニンの代謝はヒトの ES 細胞および iPS 細胞の未分化維持および分化を制御している」First Author's <http://first.lifesciencedb.jp/archives/8655>
- 学会発表等
- 1) 白木伸明 「ヒト iPS 細胞から効率的かつ安定に肝臓を分化誘導する方法の開発」第 11 回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム『ヒト iPS 細胞を利用した安全性薬理試験法の実現に向けて』日本薬学会レギュラトリーサイエンス部会 (H26. 12. 9. 東京)
- 2) 白木伸明『幹細胞から様々な機能細胞を分化誘導する試み』ワークショップ(原孝彦・糸昭苑オーガナイザー) 第 37 回日本分子生物学会 (H.26. 11. 26 横浜)
- 3) 津山 友徳、白木 伸明、白木 恭子、小幡 史明、三浦 正幸、糸 和彦、遠藤 文夫、糸 昭苑、「ヒト多能性幹細胞における S-アデノシルメチオニンの重要性」“S-adenosyl methionine is crucial for maintaining human pluripotent stem cells” 第 37 回日本分子生物学会 (H.26. 11. 26 横浜)
- 4) Ogaki S., Morooka M, Otera K and Kume S. “A cost effective intestinal epithelial differentiation system from human iPS cells”. Key Forum, Kumamoto 2014, 9,5.
- 5) Tsuyama T, Shiraki N, Kume S. “S-adenosyl methionine is crucial for maintaining human ES/iPS cells” Key Forum, Kumamoto 2014, 9,5.
- 6) Otera K, Ogaki S, Kume S. “Easy purification of human iPSC-derived immature intestinal epithelial cells.” Key Forum, Kumamoto 2014, 9, 5.
- 7) 糸昭苑 「多能性幹細胞から消化器官を創る」New Insights of Molecular Genetics on Growth Disorders 平成 26 年 7 月 12 日 (東京)
- 8) Shoen Kume Chemical genetic identification of signals that control late-stage pancreatic beta cell differentiation. “Diabetes” session. ISSCR, 2014, June 20. Oral presentation (Vancouver)
- 9) Kume S “Signals that control differentiation of pluripotent stem cells into pancreatic beta cells” (Organizer, Erdal Karaoz) Tissue Engineering Regenerative Medicine International Society (TERMIS-EU 2014; Genova, June 10-13,2014)
- 10) Shiraki N, Shiraki Y, Tsuyama T, Obata F, Miura M, Nagae G, Aburatani H, Kume K, Endo F, Kume S. Methionine Metabolism Regulates Maintenance and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. 第 12 回幹細胞シンポ

ジウム 福岡 (12th SCRS-Fukuoka) May 30-31,
2014.

報道発表等

- 1) TOP STORY として論文の紹介 ESC & iPSC
News 9.25 July 2, 2014 Web ニュース
<http://s1832.t.en25.com/e/es.aspx?s=1832&e=123108&clq=ceb3aa38f4034b5d8ab46b1081cf4f3f>
- 2) 科学新聞「ヒト iPSC/ES 細胞 メチオニン除去培養液で効率的に分化」2014. 4.25
- 3) 熊本日日新聞「ヒト iPSC、ES 細胞効率分化 熊本大研究所グループ メチオニン除去培養液を使用」2014. 4.23.
- 4) 朝日新聞 (熊本版)(生活面)『熊本大・白木助教と糸教授 アミノ酸組成着目「簡便な方法」発見』2014. 4.19.
- 5) 朝日新聞全国版「万能細胞培養の効率アップ 熊本大などのチームが発見」2014. 4.18.
- 6) 日経産業新聞「iPSC・ES 細胞分化防ぐ ヒトのアミノ酸発見 熊本大・東大」2014. 4.18.
- 7) 読売新聞熊本版「iPSC 分化、効率的に 熊本大研究者ら成功 アミノ酸の働きで」2014. 4.18.
- 8) NHK ニュース 2014. 4.18. 6時 55分
- 9) KKT テレビタミン 2014. 4.18.18時 20分
- 10) RKK 夕方いちばん 2014. 4.18. 18時 19分

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 糸 昭苑、遠藤文夫、白木伸明、白木恭子、糸 和彦、馬渡一徳「アミノ酸組成変更培地を用いた幹細胞の分化促進方法、及び該方法を用いて処理された幹細胞、並びに培地」特願 2014-32068 出願日：2014年9月10日

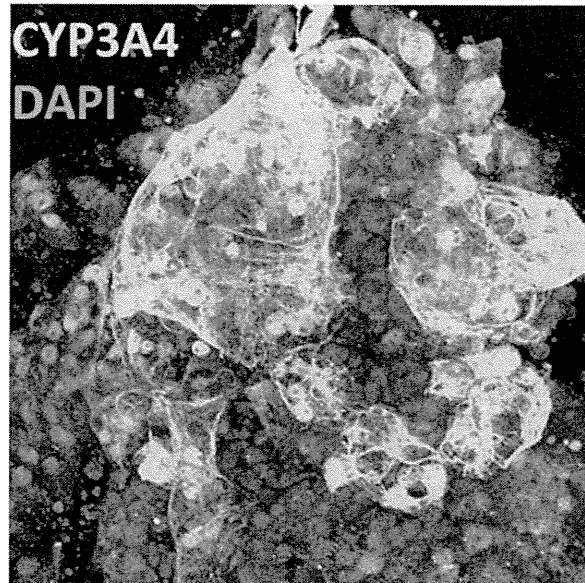


図 分化小腸上皮細胞から、薬物代謝酵素 CYP3A4 の発現を確認した。
今後は機能についても確認予定である。

担当研究課題

ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導性の評価・品質基準の作成

担当責任者 水口裕之 大阪大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨

小腸上皮細胞は、様々な薬物トランスポーターや薬物代謝酵素を発現しており、薬物の吸収・代謝において重要な役割を担う。薬物の吸収過程を評価するためにヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞が汎用されているが、Caco-2 細胞はいくつかの問題点を抱えている。まず、Caco-2 細胞はヒト小腸上皮細胞と比べ、薬物代謝酵素シトクロム P450 (CYP)3A4 の発現量が著しく低いため、小腸上皮細胞における薬物の吸収・代謝を同時に評価することが困難である。そこで我々は、ほぼ無限の増殖能と小腸上皮細胞を含むあらゆる体細胞への分化能を有するヒト ES/iPS 細胞からヒト小腸上皮細胞に類似した薬物吸収・代謝機能を有する細胞を作製する技術の開発を試みた。ヒト ES/iPS 細胞から小腸前駆細胞を分化誘導したのち、化合物 A、B、C を作用させるとともに、分化誘導期間を延長することによって、小腸上皮細胞への分化誘導効率が約 20%から約 40%に上昇した。このようにして作製したヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の CYP3A4 遺伝子発現量は Caco-2 細胞よりも高かった。また、CYP3A4 誘導能を有していることも確認した。以上の結果より、我々の分化誘導法を用いることによって、Caco-2 細胞よりもヒト小腸に近い薬物代謝酵素発現を有する小腸上皮細胞をヒト ES/iPS 細胞から効率良く作製できることが示された。したがって、本研究により得られたヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を *in vitro* 薬物吸収・代謝評価系へ応用することで、既存の評価系の抱える問題点を克服できる可能性が示唆された。

研究協力者

高山和雄 大阪大学大学院薬学研究科 学生
小澤辰哉 大阪大学大学院薬学研究科 学生

A. 研究目的

小腸は吸収上皮細胞、分泌系細胞、幹細胞などの細胞から構成されており、この中でも吸収上皮細胞は、様々な薬物代謝酵素や薬物トランスポーターを発現しているため、経口投与され

た薬物の吸収や代謝において重要な役割を担う。創薬研究において、医薬品候補化合物の小腸での吸収を評価するための *in vitro* 評価系としては、ヒト小腸吸収上皮細胞の入手は困難であるため、ラット等の小動物由来小腸組織を用いた反転腸管法やヒト大腸癌細胞株 Caco-2 細胞を用いた系が汎用されている。しかしながら、前者は動物由来組織を用いているため種差の問題があり、後者は Caco-2 細胞がヒト小腸

吸収上皮細胞に比べ、薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの発現量が著しく低いという問題点を有している。小腸吸収上皮細胞は、シトクロム P450 3A4 (CPY450) 等の薬物代謝酵素を発現し、薬物の吸収だけでなく代謝も行うが、Caco-2 細胞は薬物代謝酵素の活性が極めて低く (ほとんど発現しておらず)、“代謝と吸収”を同時に評価できないという決定的な欠点を有する。

以上のような背景のもと、我々は、増殖能力に優れ、多分化能を有するヒト iPS 細胞から小腸吸収上皮細胞を分化誘導することで、この問題点を解決できると考え、この分化誘導法の開発を試みている。ヒト ES/iPS 細胞から小腸組織への分化誘導研究は極めて遅れており、Spence らが 2011 年に Nature 誌に発表した報告が最初である (Nature. 470. 105-9. 2011)。しかしながら、本報告では、再生医療を目的とした研究であるためヒト小腸吸収上皮細胞の作製ではなく、小腸組織の作製に主眼が置かれているため、吸収上皮細胞への選択的な分化誘導については未検討である。我々は、これら既存プロトコールを参考に、改良を加えながら、ヒト iPS 細胞から薬物吸収・薬物代謝・薬物誘導試験などに応用可能な小腸吸収上皮細胞への分化誘導法の開発を試みた。本研究では、これらの基本プロトコールをさらに改良して小腸吸収上皮細胞への高効率分化誘導法を開発するとともに、Caco-2 細胞に取って代わる、薬物誘導能および薬物の“代謝能と吸収能”を同時に評価可能な *in vitro* 評価系の開発を目指す。

B. 研究方法

B. 1. ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞株 Tic は、10 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF、片山化学

工業) を含む ReproStem (ReproCELL) 培地でマイトマイシン C 処理した MEF (Millipore) 上で培養した。ヒト iPS 細胞株は 3-5 日ごとに 0.1 mg/ml の Dispase (Roche) を用いて、コロニーのまま継代を行った。

B. 2. ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞株 Tic を Dispase で剥離し、回収した細胞を Matrigel (BD Biosciences) をコーティングした細胞培養用マルチプレート (住友ベークライト) の各ウェルにコロニーのまま播種した。その後、100 ng/ml Activin A (R&D systems) および 0.2-0.5 % FBS を含む differentiation RPMI1640 培地で培養し、4 日間培地交換を毎日行うことによって、ヒト ES/iPS 細胞を内胚葉細胞へ分化誘導した。ヒト ES/iPS 細胞由来内胚葉細胞から小腸様細胞に分化させる際には、内胚葉細胞を 5 μ mol/l 6-Bromoindirubin-3'-oxime (BIO、GSK3 Inhibitor IX、Calbiochem)、10 μ mol/l DAPT (γ -secretase inhibitor、Peptide Institution)、10% Knock Serum Replacement (Invitrogen)、1 % Non Essential Amino Acid Solution (Invitrogen)、Penicillin/Streptomycin、2 mM L-Glutamine、100 μ mol/l β -mercaptoethanol を含む differentiation DMEM-high Glucose 培地 (Invitrogen) にて培養を行い、培養 24 日目まで分化誘導させた。この間、培地交換は 2-3 日おきに行った。

B. 3. 定量的リアルタイム PCR

ISOGEN (Nippon Gene) を用いて、ヒト iPS 細胞株 Tic から分化誘導した細胞から Total RNA を回収した。各 Total RNA を RNase-free

DNaseI (NEB) で処理した後、Superscript VILO cDNA Synthesis kit (Invitrogen) を用いて、逆転写反応を行い、Complementary DNA (cDNA) を合成した。SYBR Green gene expression assays (Applied Biosystems) を用いた定量的リアルタイム RT-PCR 法を行い、StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) により定量した。GAPDH 遺伝子を内部標準遺伝子として用いた。

B. 4. FACS

ヒト iPS 細胞株 Tic を分化誘導したのち、作製された小腸上皮細胞を 1×Permeabilization Buffer (e-Bioscience) で 30 分透過処理を行った後、細胞を回収し、一次抗体ならびに二次抗体で標識した。解析は FACS LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) を用いた。

B. 5. 電気膜抵抗値 (TEER) 測定実験

24well のチャンバー (BD Falcon) 上で培養したヒト iPS 細胞株 Tic 由来小腸上皮細胞および Caco-2 細胞における TEER 値を、Millicell (Merk millipore) を用いて測定した。

<倫理面への配慮>

研究の実施に際しては、必要に応じ、各研究機関の研究倫理審査委員会に計画を申請し、審査を受けた上で研究を進めた。また、遺伝子実験に関しては、「遺伝子組換え生物等の使用の規制による生物の多様性確保に関する法律」及び、これに基づく各研究施設の組換え DNA 実験安全管理規則に則って行い、必要に応じて関連委員会に計画を申請、審査を受けた上で研究を進めた。

C. 研究結果

C. 1. ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞を用いた薬物誘導性評価試験の開発

本研究では、ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化誘導法の改良を行った。使用する液性因子、化合物を検討し、培養期間を最適化することで、腸管上皮細胞の成熟化を試みた。化合物 A、B、C を用いることにより、ANPEP、I-FABP 等の腸管上皮マーカーの遺伝子発現量が有意に上昇した。また、化合物 A、B、C 作用させ、培養期間を 24 日から 34 日に延長することによって、腸管上皮細胞への分化誘導効率は約 20% から約 40% に上昇した。したがって、化合物 A、B、C を作用させ、培養期間を延長することで、腸管上皮細胞への分化が促進できることが示された。

C. 2. 分化成熟の指標解析 (誘導性解析)

誘導性を薬物代謝酵素 CYP3A4、トランスポーターとして P-gp (MDR1/ ABCB1) の発現を指標として評価した。ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞における CYP 誘導能を評価するため、ビタミン D3 を作用させ、CYP3A4、P-gp の mRNA 量を定量した。ビタミン D3 を作用させることにより、CYP3A4 mRNA 量は約 100 倍上昇した。一方、P-gp の mRNA 量についてはほぼ変動しなかった。したがって、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞を用いて、CYP3A4 の誘導能を評価できる可能性が示唆された。

C. 3. 分化成熟の指標解析 (腸管上皮細胞機能解析)

ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞に関して、既存の Caco-2 細胞との比較により、酵素、薬物トランスポーターの発現、トランスウエル上でタイトジャンクションの形成について評価し

た。ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞における薬物代謝酵素 CYP3A4、薬物トランスポーター PEPT1、P-gp の遺伝子発現量を調べたところ、Caco-2 細胞よりも有意に高かった。また、トランスウエル上でタイトジャンクションを形成できるかどうか調べるために、細胞膜抵抗値を測定したところ、 $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 程度の値を示した。なお、コントロールとして用いた Caco-2 細胞では約 $400 \Omega \cdot \text{cm}^2$ であった。以上のことからヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞は Caco-2 細胞と同様あるいはそれ以上の機能を有している可能性が示唆された。

D. 考察

本年度作製したプロトコルを用いることによって、約 40%の効率で腸管上皮細胞をヒト iPS 細胞から作製可能になった。今後は、腸管上皮細胞への分化誘導効率をより一層高めるために、培養条件の最適化を継続して実施する。また、本研究において CYP3A4 がビタミン D3 により誘導できることを明らかにしたが、他種の CYP 誘導剤（リファンピシン等）を用いた試験も実施する。なお、分化誘導条件を変更した際には、その都度 CYP 誘導試験を実施しなおす予定である。薬物代謝酵素 CYP3A4、薬物トランスポーター PEPT1、P-gp の発現量解析を通して、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞が Caco-2 細胞よりも優れている可能性を示したが、今後は上述の薬物代謝酵素・トランスポーター以外のマーカー遺伝子を用いて Caco-2 細胞との比較を実施する。

E. 結論

分化誘導に使用する液性因子・化合物の最適化、分化誘導期間の延長により、ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化誘導効率の向上に

成功した。今後も継続して、分化誘導法の改良を実施することで、より高機能な腸管上皮細胞を作製したい。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表等

論文発表等

該当なし

学会発表等

- 1) 小澤 辰哉、高山 和雄、櫻井 文教、立花 雅史、川端 健二、水口 裕之、薬物動態評価系への応用を目指したヒト ES/iPS 細胞由来小腸上皮細胞の作製、第 37 回日本分子生物学会、横浜、2014 年 11 月

報道発表等

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし（出願予定あり）

厚生労働科学研究委託費（医薬品等規制調和・評価研究事業）
委託業務成果究報告書（業務項目）

担当研究課題 ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導性の評価・品質基準の作成

担当責任者 梅澤明弘 国立成育医療研究センター研究所 再生医療センター長

研究要旨

医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」において経口投与では腸管上皮での薬物による酵素誘導の影響を考慮することが求められている。本研究では、薬物代謝酵素・トランスポーター等の薬物誘導性評価試験に対応する腸管上皮細胞作製系の開発研究を行った。ヒト iPS 細胞を用いた分化誘導系において腸管細胞マーカーである CDX-2 陽性を認めた。今後は、ヒト小腸上皮における薬物代謝酵素等の誘導が担保できる in vitro 試験系構築を目指し、腸管組織機能を有する分化誘導体作製系の開発と細胞性質の評価を進めていく。

研究協力者

阿久津英憲 国立成育医療研究センター研究所
生殖医療研究部部长

A. 研究目的

腸管組織はヒト臓器の中でも複雑な構造、機能を有する臓器であり、ヒト多能性幹細胞からの分化誘導は容易ではない。しかし、多能性幹細胞の応用は腸管組織細胞の供給を無尽蔵に、しかも体性組織検体を用いるよりも均一性質として品質管理に優れることが想定される。本研究では、薬物代謝酵素・トランスポーター等の薬物誘導性評価試験を行うことが可能となるヒト腸管上皮細胞分化誘導系の開発を行って行く。

B. 研究方法

ヒト胎児肺線維芽細胞（MRC5）由来ヒト iPS 細胞^{1), 2)}を用いて腸管組織への分化誘導研究を行

った。良好に未分化維持された MRC5-iPS 細胞を用いて無血清下で分化誘導を行った。分科誘導体の評価として、組織学的評価としてヘマトキシリン・エオジン染色を行った。加えて、腸管細胞マーカーである CDX-2 および E-CADHERIN 抗体を用いて免疫組織染色を行いタンパク質レベルでの発現動態を評価した。

参考文献

- 1) Nishino K, et al. Plos one 2010.
- 2) Toyoda M, et al. Genes Cells 2011.

<倫理面への配慮>

本研究についてヒト試料を用いてゲノム解析を行う研究の実施に際しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に、および当機関で定められた倫理規定を遵守して研究を遂行する。

C. 研究結果

MRC5-iPS 細胞は外胚葉・内胚葉・中胚葉の3胚葉組織へ分化することが確認されている。良好に未分化維持された MRC5-iPS 細胞を平面培養系において無血清培地により分化誘導を行った。その分化誘導体に対してヘマトキシリン・エオジン染色を行ったところ腸管上皮様構造を確認した。その固定標本に対して腸管細胞マーカーである CDX-2 抗体を用いて免疫組織染色を行った結果腸管上皮様構造に CDX-2 陽性細胞が認められた (図 1)。同様に E-CADHERIN も陽性となり腸管上皮様組織構造をとることが示唆された。

D. 考察

生体内腸管組織は粘膜層、粘膜下層、筋層、漿膜下組織、漿膜に分かれており、吸収、免疫、蠕動といった複雑な機能を有する臓器である。腸管組織は、発生・分化・機能において複雑な器官であるが、経口薬物代謝評価系構築のためにはその分化誘導系の構築は重要である。今年度は、ヒト iPS 細胞からの腸管様構造体の作製に成功したが、次年度以降で引き続き分化誘導系開発と分化誘導体の評価をさらに行う必要がある。

E. 結論

発生的および組織構造学的にも複雑な臓器であるヒト腸管様構造体をヒト iPS 細胞から作製することに成功した。今後は、経口薬物代謝評価系に資する観点から分化誘導系およびその作製体についてさらに知見を得る必要がある。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表等

論文発表等

- 1) Lu S, Kanekura K, Hara T, Mahadevan J, Spears LD, Osowski CM, Martinez R, Yamazaki-Inoue M, Toyoda M, Neilson A, Blanner P, Brown CM, Semenkovich CF, Marshall BA, Hershey T, Umezawa A, Greer PA, Urano F.: A calcium-dependent protease as a potential therapeutic target for Wolfram syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2014; 111: E5292-5301.
- 2) Higuchi A, Ling QD, Kumar SS, Munusamy MA, Alarfaj AA, Chang Y, Kao SH, Lin KC, Wang HC, Umezawa A.: Generation of pluripotent stem cells without the use of genetic material. *Lab Invest.*, 2015; 95: 26-42.
- 3) Tano K, Yasuda S, Kuroda T, Saito H, Umezawa A, Sato Y.: A novel in vitro method for detecting undifferentiated human pluripotent stem cells as impurities in cell therapy products using a highly efficient culture system. *PLoS One.*, 2014; 9: e110496.
- 4) Santostefano KE, Hamazaki T, Biel NM, Jin S, Umezawa A, Terada N.: A practical guide to induced pluripotent stem cell research using patient samples. *Lab Invest.*, 2015; 95: 4-13.
- 5) Fukawatase Y, Toyoda M, Okamura K, Nakamura K, Nakabayashi K, Takada S, Yamazaki-Inoue M, Masuda A, Nasu M, Hata K, Hanaoka K, Higuchi A, Takubo K, Umezawa A.: Ataxia telangiectasia derived iPS cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability. *Sci Rep.*, 2014; 4: 5421.
- 6) Inoue T, Umezawa A, Takenaka T, Suzuki H, Okada H.: The contribution of epithelial-mesenchymal transition to

renal fibrosis differs among kidney disease models. *Kidney Int.*, 2015; 87: 233-238.

- 7) Ichida JK, TCW J, Williams LA, Carter AC, Shi Y, Moura MT, Ziller M, Singh S, Amabile G, Bock C, Umezawa A, Rubin LL, Bradner JE, Akutsu H, Meissner A, Eggen K. : Notch inhibition allows oncogene-independent generation of iPS cells. *Nat Chem Biol.*, 2014; 10: 632-639.
- 8) Toyoda M, Umezawa A. : Stem cells bond our organs/tissues and engineering products. *Circ J.*, 2014; 78: 1582-1583.

学会発表等

- 1) 三木卓也, 脇谷晶一, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 西野 光一郎. : ヒト iPS 細胞の状態遷移における DNA メチル化可変領域の解析 (DNA methylation kinetics in the state transition of human iPS cells) . 第 8 回日本エピジェネティクス研究会 (2014.5, 東京).
- 2) Miura T, Sugawara T, Fukuda A, Tamoto R, Umezawa A, Akutsu H. : Generation of committed neural progenitors from human fibroblasts by defined factors. 12th Annual Meeting of ISSCR (2014.6, Vancouver, Canada).

報道発表等

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

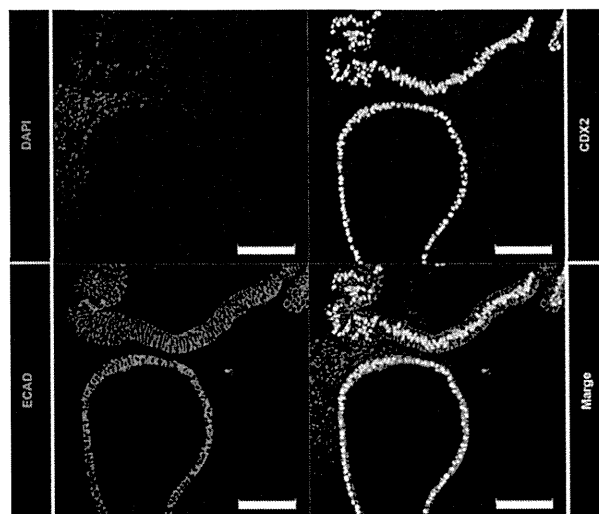


図1 ヒト iPS 細胞由来分化誘導体免疫組織染色
CDX-2 (緑) と E-CADHERIN (赤) が腸管上皮様
組織構造体に陽性である。細胞核 (DAPI ; 青)。
スケールバーは 100 μ m

厚生労働科学研究委託費（医薬品等規制調和・評価研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

担当研究課題 ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と
誘導能予測モデルの開発

担当責任者 樋坂章博 千葉大学大学院薬学研究院 教授

研究要旨

CYP3A の 28 基質薬と 13 阻害薬の薬物相互作用の臨床試験の報告について、新規に開発された CR-Fg-IR 法を適用することにより、小腸と肝臓の代謝とその阻害の程度を分離評価することに成功した。その結果、グレープフルーツジュースでは阻害が小腸選択的におきていること、そのほかの阻害薬では一般に小腸における阻害は肝臓よりもやや弱いことが明らかとなった。今後、この評価法を CYP3A の誘導薬についても適用する予定であり、そこで小腸の CYP3A の誘導の程度が明らかになれば、in vitro の情報からそれを予測する方法論の構築が可能となる。

研究協力者

中村 己貴子 中外製薬株式会社 臨床企画推進
部臨床薬理動態評価グループ

報告している (Hisaka A et al. Assessment of intestinal availability (FG) of substrate drugs of cytochrome p450s by analyzing changes in pharmacokinetic properties caused by drug-drug interactions. Drug Metab Dispos. 2014;42(10):1640-5). この方法を拡張し、多数の臨床試験の文献報告の成績にギブスサンプリング法を適用することで、CYP3A の 28 基質薬と 13 阻害薬について、小腸の代謝の程度に加えて、代謝の阻害の程度を一斉解析した。

<倫理面への配慮>

本解析は論文に報告された臨床試験の成績を解析対象としているので、倫理面での配慮は不要である。

A. 研究目的

薬物代謝酵素誘導能を in vitro の実験結果から小腸と肝臓の寄与を分離して予測することが本研究の最終的な目的であるが、そのためには臨床試験の薬物相互作用の情報を小腸と肝臓の寄与を分離して評価する必要がある。今年度は情報が豊富な臨床試験の阻害の相互作用について、この分離を行う方法を確立することを研究の目的とした。

B. 研究方法

我々はすでに臨床試験における相互作用による AUC と消失半減期の変化から、小腸における代謝の程度を評価する新しい方法 (DDI 法) を

C. 研究結果と考察

薬物代謝酵素 CYP の誘導能の評価については、

初代培養肝細胞などを用いて mRNA の変化から判別し、必要に応じて臨床試験を実施する方法が、最近の日本のガイドライン案、あるいは米国 FDA のガイダンス案で提案されている。

また、*in vitro* の情報から *in vivo* の誘導の程度を推定する方法として、小腸と肝臓の寄与を分離して予測する方法についても同様に発表されている。しかし、実際には誘導能を肝臓と小腸で分離して評価あるいは予測した試みは *in vitro*、*in vivo* の両方についてほとんどなく、ほとんどの研究が肝臓の寄与のみを考慮している。これは小腸の寄与が *in vivo* でどの程度であるのか十分に評価されていないことに原因がある。本研究では iPS 細胞による評価を適用することで、これらの革新を図る計画であるが、特にこれまでほとんど注目されてこなかった小腸における相互作用の評価の意義を確認することが、研究の前提として重要である。

これまで、小腸の薬物代謝は肝移植患者を用いた臨床研究、あるいはグレープフルーツジュースに代表される小腸選択的な代謝阻害剤を用いて、一部の薬剤では肝臓に十分匹敵するほど重要であることが明らかにされている。しかし、小腸と肝臓の代謝は経口吸収後に連続的におきることから、これを分離評価することは難しかった。

今回新規に確立された方法に従い、CYP3A の多数の基質薬と阻害薬について、小腸と肝臓の阻害の程度を分離評価することに成功した。その結果、グレープフルーツジュースでは阻害が小腸選択的におきていること、そのほかの阻害薬では一般に小腸における阻害は肝臓よりもやや弱いことが明らかとなった。

今後、この評価法を CYP3A の誘導薬についても適用する予定であり、そこで小腸の誘導の寄与が明らかになれば、*in vitro* の情報からそ

れを予測する方法論の構築が始めて可能となる。

D. 結論

CYP3A の 28 基質薬と 13 阻害薬の薬物相互作用の臨床試験の報告について、新規に開発された CR-Fg-IR 法を適用することにより、小腸と肝臓の代謝とその阻害の程度を分離評価することに成功した。

E. 健康危機情報

該当なし

F. 研究発表等

学会発表

- 1) 樋坂章博. 薬物吸収時の小腸の代謝および輸送の定量的解析. 第 5 回杉山研究室 (理研) 公開シンポジウム (2015. 2, 横浜).
- 2) Nakamura M, Koh S, Hisaka A, Suzuki H. Systematic Assessment of Intestinal Metabolism and Degree of Inhibition in Drug-drug interactions caused by Inhibition of CYP3A. American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics (ASCPT) 2015 Annual Meeting (2015. 3, New Orleans, USA).