

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、形態学的にも敷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.

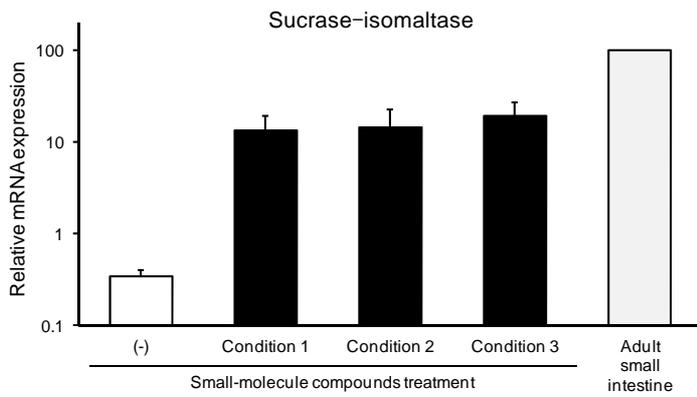


Fig. 1. 腸管上皮細胞様細胞におけるスクラーゼ-イソマルターゼの mRNA 発現

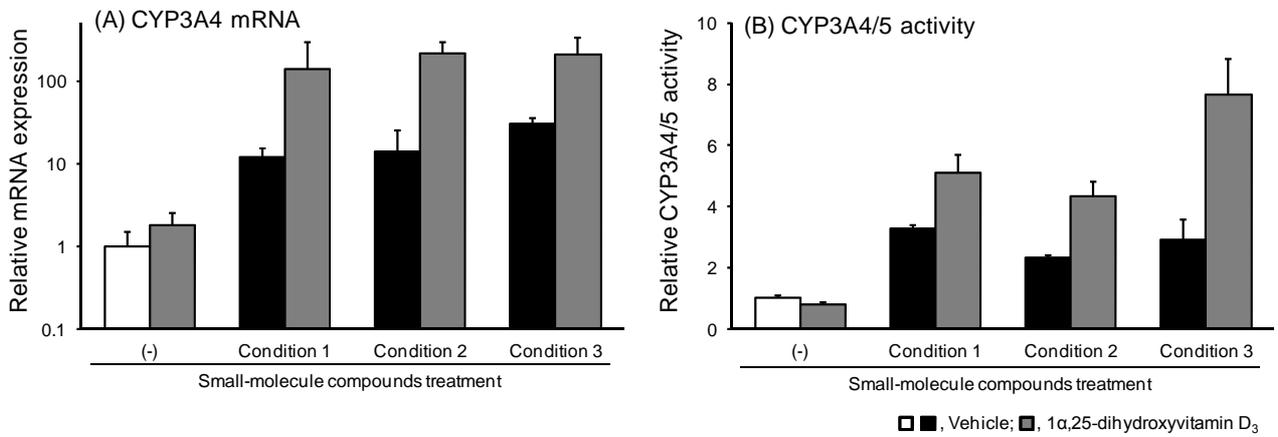


Fig. 2. 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ による CYP3A4 mRNA 発現と CYP3A4/5 活性の誘導