

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 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 (-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 -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、 $300 \cdot \text{cm}^2$ 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 $400 \cdot \text{cm}^2$ 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ー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）