

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

高機能なヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を用いた
ポリフェノール類吸収評価系の構築

令和5年度 総括研究報告書

研究代表者 植山（鳥羽）由希子

令和6年 5月

目 次	
I. 総括研究報告	
高機能なヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を用いた ポリフェノール類吸収評価系の構築 植山（鳥羽）由希子	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 3

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
総括研究報告書

高機能なヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を用いた
ポリフェノール類吸収評価系の構築

研究代表者 植山（鳥羽）由希子 国立大学法人大阪大学
研究協力者 水口裕之 国立大学法人大阪大学

【要旨】

ポリフェノール類は、生体内で抗酸化作用を有することが示されている一方でその体内動態は明らかにされていない。そこで、より生体の小腸を模したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドを作製し、ポリフェノール類の小腸における動態特性の解明を行なった。本課題で開発した細胞を用いて、今後は食品由来成分の吸収評価系や毒性評価系への応用を目指す。

A. 研究目的

ポリフェノール類は生体内で抗酸化作用を発現し、老化やがんを予防することが示唆されている。しかし、ポリフェノール類を含む製品の摂取による健康被害も報告されている。そこで、ポリフェノール類を含む食品の摂取基準をより正確に制定する必要がある。食品やサプリメントなどの経口摂取成分は、消化管から生体内に取り込まれて生理機能を発揮する。したがって、ポリフェノール類の消化管における吸収機序を明らかにすることは、それらを含む健康食品等の安全性を担保するために必須である。

そこで、本研究ではポリフェノール類の正確な吸収評価を可能とする技術の開発を試みる。具体的には、ヒト人工多能性幹（induced pluripotent stem; iPS）細胞から分化誘導した小腸上皮細胞を用いて、ポリフェノール類の吸収評価系を構築する。高機能なヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を作製可能な分化誘導法を開発し、より生体を模した *in vitro* 評価系の構築とその社会実装を目指す。

B. 研究方法

令和4年度に改良を行なった分化誘導条件下で、ヒトiPS細胞から小腸上皮細胞を作製した。さらに、小腸上皮細胞マーカー遺伝子（*VIL1*など）や薬物代謝酵素（*Cytochrome P450 (CYP) 3A4*）、トランスポーター（*Multi drug resistance 1 (MDR1)*など）の遺伝子発現量を定量的RT-PCR法により解析した。また、薬物代謝酵素の基質を作用させ、未変化体およびその代謝物の量をUPLC-MS/MSを用いて測定することで、薬物代謝酵素活性の測定を行なった。トランスポーターの活性は、RI標識された基質を用いて評価した。

C. 研究結果

R5年度（2年目）では、まず改良後のヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞の詳細な評価を行った。遺伝子発現解析の結果、小腸上皮細胞に発現する代表的な遺伝子の多く（*VIL1*、*MDR1*、*CYP3A4*、*EpCAM*など）は、改良前と比較して、改良後の細胞において高い値を示した。同様に、小腸上皮細胞にて高発現する薬物代謝酵素CYP3A4の活性を測定した結果、改良前と比較して、改良後の細胞において高い値を示した。吸収や排泄を担うトランスポーターの活性を測定した結果、改良前よりも機能は改善していたものの、一部では活性を示さないトランスポーターがあることが示された。本研究課題では、生体を模した食品由来成分の吸収と安全性に及ぼす影響を評価したいため、改良したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞では、十分でないことが示唆された。

そこで、我々はオルガノイド培養技術に着目した。オルガノイドとは、臓器を意味するorganと類似を意味するoidから成る科学造語である。腸管を筆頭に、膵臓や脳、肝臓など様々な臓器由来のオルガノイドが樹立されてきた。オルガノイドの特徴は、三次元培養体であり自己増殖する点と由来臓器の機能を保持している点が挙げられる。ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞の機能が不十分であることに加えて、未分化ヒトiPS細胞から小腸上皮細胞への分化誘導期間（30日間）は、効率的な実用化を妨げると考えられてきた。そこで、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞からオルガノイドが樹立できれば、不十分であった腸管機能の改善と分化誘導期間の省略が可能になるのではないかと考えた。ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を

(研究結果の続き)

生検組織由来の腸管オルガノイド培地 (Fujii *et al.*, *Cell Stem Cell*, 2018)を用いてオルガノイド培養を試みた。その結果、スフェロイドの形成が認められ、増殖している様子も観察された。このヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドは、50回以上の継代が可能であり、その表現型も長期にわたって維持された。さらに、小腸上皮細胞は生体内において単層を形成し種々の成分の吸収・代謝を担っているため、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドの単層膜の作製を試みた。酵素処理により単細胞化したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドを、セルカルチャーインサート上に播種し、独自に開発した培養液を用いて単層膜の形成を試みた。その結果、上皮細胞のバリア機能を示す経上皮電気抵抗 (TEER) 値は培養5日目あたりには $400\Omega \cdot \text{cm}^2$ を示し、単層膜の形成が示唆された。このヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜における小腸上皮細胞マーカー遺伝子の発現量は、オルガノイド化前のヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞と同程度もしくは高い値を示した。また、薬物代謝酵素 (CYP3A4、CYP2D6、CYP2C9、CYP2C19) の活性は、市販のヒト小腸組織と同程度か高い値を示した。吸収や排泄に重要なトランスポーター (P-gp、BCRP、PEPT1) の活性を有していることも確認した。以上より、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞をオルガノイドとして培養し、さらに単層膜を形成させることによって、従来系よりも高い機能と汎用性を兼ね備えた細胞系の確立に成功した (Inui T. *et al.*, *Stem Cell Research & Therapy*, 2024)。

最後に、このヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜を用いて、ポリフェノール類を含む食品の安全性評価系に应用可能であるか予備検討を進めた。茶に含まれるカテキンに代表されるエピガロカテキンガレートは、炎症が惹起されたマウス由来腸管オルガノイドの細胞死を誘発することが報告された (Guo *et al.*, *Food & Function*, 2023)。そこで、我々は、独自に開発したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜を用いて、これの再現性が認められるか評価を試みた。ヒトiPS細胞由来上皮細胞オルガノイド単層膜にエピガロカテキンガレートを作用させた場合においても、細胞死は認められなかった。

D. 考察

これまで腸上皮組織由来の細胞は*in vitro*にて培養が困難であり、生体を模した腸管上皮細胞の培養とその評価は実施されてこなかった。しかし、オルガノイド培養技術の開発とその進歩により、その課題が解決されつつある。本研究では、ヒトiPS細胞由

来小腸上皮細胞の一部の機能を補うために、オルガノイド培養技術を導入した。より*in vivo*に近い条件で継代培養することで、細胞の選択と成熟化が進んだと考えられる。なお、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドの機能や性質は、樹立の資材となるヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞の機能や性質に影響を受けることも明らかにした。すなわち、R4年度に高い機能を有した小腸上皮細胞の分化誘導法の開発に成功していたからこそ得られた成果であると考えている。

また、茶に含まれる代表的なポリフェノール類のエピガロカテキンガレートを作用させた場合において、特徴的な表現系の変化を見出すことができなかった。Guoらの報告は、増殖期のオルガノイドにカテキンを作用させた検討であり、本研究で用いたヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜は増殖期でなく成熟した細胞集団であることから、毒性発現に差が出た可能性がある。今後は、オルガノイド状態のヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドを用いた検討を行い、単層膜を用いた場合との違いを評価したい。

E. 結論

ポリフェノール類の吸収や毒性評価に応用可能な小腸上皮細胞の作製技術の開発を行なった。ヒト iPS 細胞から分化誘導された小腸上皮細胞では、機能の一部が不十分だったため、オルガノイド培養技術を取り入れこれを解決した。今後は、食品由来成分の安全性評価に資する技術であるか示すことを目的とした評価を進めたい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

Inui T., Uraya Y., Yokota J., Yamashita T., Kawai K., Okada K., Uevama-Toba Y., Mizuguchi H., Functional intestinal monolayers from organoids derived from human iPS cells for drug discovery research, *Stem Cell Research & Therapy*, 15, 57, 2024

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Inui T. <i>et al.</i>	Functional intestinal monolayers from organoids derived from human iPS cells for drug discovery research	Stem Cell Research & Therapy	15	Article number: 57	2024

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について

令和6年5月27日

厚生労働大臣
~~（国立医薬品食品衛生研究所長）~~殿
~~（国立保健医療科学院長）~~

機関名 国立大学法人大阪大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 西尾 章治郎

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 高機能なヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を用いたポリフェノール類吸収評価系の構築
3. 研究者名 （所属部署・職名）大学院薬学研究科・助教
（氏名・フリガナ）植山（鳥羽）由希子・ウエヤマ（トバ）ユキコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
		審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称： ）	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

該当なし

（※2）未審査の場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ （無の場合はその理由：
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ （無の場合は委託先機関：
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ （無の場合はその理由：
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ （有の場合はその内容：

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

高機能なヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を用いた
ポリフェノール類吸収評価系の構築

令和5年度 総括研究報告書

研究代表者 植山（鳥羽）由希子

令和6年 5月

目 次	
I. 総括研究報告	
高機能なヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を用いた ポリフェノール類吸収評価系の構築 植山（鳥羽）由希子	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 3

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
総括研究報告書

高機能なヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を用いた
ポリフェノール類吸収評価系の構築

研究代表者 植山（鳥羽）由希子 国立大学法人大阪大学
研究協力者 水口裕之 国立大学法人大阪大学

【要旨】

ポリフェノール類は、生体内で抗酸化作用を有することが示されている一方でその体内動態は明らかにされていない。そこで、より生体の小腸を模したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドを作製し、ポリフェノール類の小腸における動態特性の解明を行なった。本課題で開発した細胞を用いて、今後は食品由来成分の吸収評価系や毒性評価系への応用を目指す。

A. 研究目的

ポリフェノール類は生体内で抗酸化作用を発現し、老化やがんを予防することが示唆されている。しかし、ポリフェノール類を含む製品の摂取による健康被害も報告されている。そこで、ポリフェノール類を含む食品の摂取基準をより正確に制定する必要がある。食品やサプリメントなどの経口摂取成分は、消化管から生体内に取り込まれて生理機能を発揮する。したがって、ポリフェノール類の消化管における吸収機序を明らかにすることは、それらを含む健康食品等の安全性を担保するために必須である。

そこで、本研究ではポリフェノール類の正確な吸収評価を可能とする技術の開発を試みる。具体的には、ヒト人工多能性幹（induced pluripotent stem; iPS）細胞から分化誘導した小腸上皮細胞を用いて、ポリフェノール類の吸収評価系を構築する。高機能なヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を作製可能な分化誘導法を開発し、より生体を模した *in vitro* 評価系の構築とその社会実装を目指す。

B. 研究方法

令和4年度に改良を行なった分化誘導条件下で、ヒトiPS細胞から小腸上皮細胞を作製した。さらに、小腸上皮細胞マーカー遺伝子（*VIL1*など）や薬物代謝酵素（*Cytochrome P450 (CYP) 3A4*）、トランスポーター（*Multi drug resistance 1 (MDR1)*など）の遺伝子発現量を定量的RT-PCR法により解析した。また、薬物代謝酵素の基質を作用させ、未変化体およびその代謝物の量をUPLC-MS/MSを用いて測定することで、薬物代謝酵素活性の測定を行なった。トランスポーターの活性は、RI標識された基質を用いて評価した。

C. 研究結果

R5年度（2年目）では、まず改良後のヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞の詳細な評価を行った。遺伝子発現解析の結果、小腸上皮細胞に発現する代表的な遺伝子の多く（*VIL1*、*MDR1*、*CYP3A4*、*EpCAM*など）は、改良前と比較して、改良後の細胞において高い値を示した。同様に、小腸上皮細胞にて高発現する薬物代謝酵素CYP3A4の活性を測定した結果、改良前と比較して、改良後の細胞において高い値を示した。吸収や排泄を担うトランスポーターの活性を測定した結果、改良前よりも機能は改善していたものの、一部では活性を示さないトランスポーターがあることが示された。本研究課題では、生体を模した食品由来成分の吸収と安全性に及ぼす影響を評価したいため、改良したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞では、十分でないことが示唆された。

そこで、我々はオルガノイド培養技術に着目した。オルガノイドとは、臓器を意味するorganと類似を意味するoidから成る科学造語である。腸管を筆頭に、膵臓や脳、肝臓など様々な臓器由来のオルガノイドが樹立されてきた。オルガノイドの特徴は、三次元培養体であり自己増殖する点と由来臓器の機能を保持している点が挙げられる。ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞の機能が不十分であることに加えて、未分化ヒトiPS細胞から小腸上皮細胞への分化誘導期間（30日間）は、効率的な実用化を妨げると考えられてきた。そこで、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞からオルガノイドが樹立できれば、不十分であった腸管機能の改善と分化誘導期間の省略が可能になるのではないかと考えた。ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を

(研究結果の続き)

生検組織由来の腸管オルガノイド培地 (Fujii *et al.*, *Cell Stem Cell*, 2018)を用いてオルガノイド培養を試みた。その結果、スフェロイドの形成が認められ、増殖している様子も観察された。このヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドは、50回以上の継代が可能であり、その表現型も長期にわたって維持された。さらに、小腸上皮細胞は生体内において単層を形成し種々の成分の吸収・代謝を担っているため、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドの単層膜の作製を試みた。酵素処理により単細胞化したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドを、セルカルチャーインサート上に播種し、独自に開発した培養液を用いて単層膜の形成を試みた。その結果、上皮細胞のバリア機能を示す経上皮電気抵抗 (TEER) 値は培養5日目あたりには $400\Omega \cdot \text{cm}^2$ を示し、単層膜の形成が示唆された。このヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜における小腸上皮細胞マーカー遺伝子の発現量は、オルガノイド化前のヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞と同程度もしくは高い値を示した。また、薬物代謝酵素 (CYP3A4、CYP2D6、CYP2C9、CYP2C19) の活性は、市販のヒト小腸組織と同程度か高い値を示した。吸収や排泄に重要なトランスポーター (P-gp、BCRP、PEPT1) の活性を有していることも確認した。以上より、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞をオルガノイドとして培養し、さらに単層膜を形成させることによって、従来系よりも高い機能と汎用性を兼ね備えた細胞系の確立に成功した (Inui T. *et al.*, *Stem Cell Research & Therapy*, 2024)。

最後に、このヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜を用いて、ポリフェノール類を含む食品の安全性評価系に应用可能であるか予備検討を進めた。茶に含まれるカテキンに代表されるエピガロカテキンガレートは、炎症が惹起されたマウス由来腸管オルガノイドの細胞死を誘発することが報告された (Guo *et al.*, *Food & Function*, 2023)。そこで、我々は、独自に開発したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜を用いて、これの再現性が認められるか評価を試みた。ヒトiPS細胞由来上皮細胞オルガノイド単層膜にエピガロカテキンガレートを作用させた場合においても、細胞死は認められなかった。

D. 考察

これまで腸上皮組織由来の細胞は*in vitro*にて培養が困難であり、生体を模した腸管上皮細胞の培養とその評価は実施されてこなかった。しかし、オルガノイド培養技術の開発とその進歩により、その課題が解決されつつある。本研究では、ヒトiPS細胞由

来小腸上皮細胞の一部の機能を補うために、オルガノイド培養技術を導入した。より*in vivo*に近い条件で継代培養することで、細胞の選択と成熟化が進んだと考えられる。なお、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドの機能や性質は、樹立の資材となるヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞の機能や性質に影響を受けることも明らかにした。すなわち、R4年度に高い機能を有した小腸上皮細胞の分化誘導法の開発に成功していたからこそ得られた成果であると考えている。

また、茶に含まれる代表的なポリフェノール類のエピガロカテキンガレートを作用させた場合において、特徴的な表現系の変化を見出すことができなかった。Guoらの報告は、増殖期のオルガノイドにカテキンを作用させた検討であり、本研究で用いたヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜は増殖期でなく成熟した細胞集団であることから、毒性発現に差が出た可能性がある。今後は、オルガノイド状態のヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドを用いた検討を行い、単層膜を用いた場合との違いを評価したい。

E. 結論

ポリフェノール類の吸収や毒性評価に応用可能な小腸上皮細胞の作製技術の開発を行なった。ヒト iPS 細胞から分化誘導された小腸上皮細胞では、機能の一部が不十分だったため、オルガノイド培養技術を取り入れこれを解決した。今後は、食品由来成分の安全性評価に資する技術であるか示すことを目的とした評価を進めたい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

Inui T., Uraya Y., Yokota J., Yamashita T., Kawai K., Okada K., Uevama-Toba Y., Mizuguchi H., Functional intestinal monolayers from organoids derived from human iPS cells for drug discovery research, *Stem Cell Research & Therapy*, 15, 57, 2024

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Inui T. <i>et al.</i>	Functional intestinal monolayers from organoids derived from human iPS cells for drug discovery research	Stem Cell Research & Therapy	15	Article number: 57	2024

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について

令和6年5月27日

厚生労働大臣
~~（国立医薬品食品衛生研究所長）殿~~
~~（国立保健医療科学院長）~~

機関名 国立大学法人大阪大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 西尾 章治郎

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 高機能なヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を用いたポリフェノール類吸収評価系の構築
3. 研究者名 （所属部署・職名）大学院薬学研究科・助教
（氏名・フリガナ）植山（鳥羽）由希子・ウエヤマ（トバ）ユキコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
		審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称：）	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

該当なし

（※2）未審査の場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ （無の場合はその理由：
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ （無の場合は委託先機関：
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ （無の場合はその理由：
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ （有の場合はその内容：

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

高機能なヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を用いた
ポリフェノール類吸収評価系の構築

令和5年度 総括研究報告書

研究代表者 植山（鳥羽）由希子

令和6年 5月

目 次	
I. 総括研究報告	
高機能なヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を用いた ポリフェノール類吸収評価系の構築 植山（鳥羽）由希子	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 3

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
総括研究報告書

高機能なヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を用いた
ポリフェノール類吸収評価系の構築

研究代表者 植山（鳥羽）由希子 国立大学法人大阪大学
研究協力者 水口裕之 国立大学法人大阪大学

【要旨】

ポリフェノール類は、生体内で抗酸化作用を有することが示されている一方でその体内動態は明らかにされていない。そこで、より生体の小腸を模したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドを作製し、ポリフェノール類の小腸における動態特性の解明を行なった。本課題で開発した細胞を用いて、今後は食品由来成分の吸収評価系や毒性評価系への応用を目指す。

A. 研究目的

ポリフェノール類は生体内で抗酸化作用を発現し、老化やがんを予防することが示唆されている。しかし、ポリフェノール類を含む製品の摂取による健康被害も報告されている。そこで、ポリフェノール類を含む食品の摂取基準をより正確に制定する必要がある。食品やサプリメントなどの経口摂取成分は、消化管から生体内に取り込まれて生理機能を発揮する。したがって、ポリフェノール類の消化管における吸収機序を明らかにすることは、それらを含む健康食品等の安全性を担保するために必須である。

そこで、本研究ではポリフェノール類の正確な吸収評価を可能とする技術の開発を試みる。具体的には、ヒト人工多能性幹（induced pluripotent stem; iPS）細胞から分化誘導した小腸上皮細胞を用いて、ポリフェノール類の吸収評価系を構築する。高機能なヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を作製可能な分化誘導法を開発し、より生体を模した *in vitro* 評価系の構築とその社会実装を目指す。

B. 研究方法

令和4年度に改良を行なった分化誘導条件下で、ヒトiPS細胞から小腸上皮細胞を作製した。さらに、小腸上皮細胞マーカー遺伝子（*VIL1*など）や薬物代謝酵素（*Cytochrome P450 (CYP) 3A4*）、トランスポーター（*Multi drug resistance 1 (MDR1)*など）の遺伝子発現量を定量的RT-PCR法により解析した。また、薬物代謝酵素の基質を作用させ、未変化体およびその代謝物の量をUPLC-MS/MSを用いて測定することで、薬物代謝酵素活性の測定を行なった。トランスポーターの活性は、RI標識された基質を用いて評価した。

C. 研究結果

R5年度（2年目）では、まず改良後のヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞の詳細な評価を行った。遺伝子発現解析の結果、小腸上皮細胞に発現する代表的な遺伝子の多く（*VIL1*、*MDR1*、*CYP3A4*、*EpCAM*など）は、改良前と比較して、改良後の細胞において高い値を示した。同様に、小腸上皮細胞にて高発現する薬物代謝酵素CYP3A4の活性を測定した結果、改良前と比較して、改良後の細胞において高い値を示した。吸収や排泄を担うトランスポーターの活性を測定した結果、改良前よりも機能は改善していたものの、一部では活性を示さないトランスポーターがあることが示された。本研究課題では、生体を模した食品由来成分の吸収と安全性に及ぼす影響を評価したいため、改良したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞では、十分でないことが示唆された。

そこで、我々はオルガノイド培養技術に着目した。オルガノイドとは、臓器を意味するorganと類似を意味するoidから成る科学造語である。腸管を筆頭に、膵臓や脳、肝臓など様々な臓器由来のオルガノイドが樹立されてきた。オルガノイドの特徴は、三次元培養体であり自己増殖する点と由来臓器の機能を保持している点が挙げられる。ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞の機能が不十分であることに加えて、未分化ヒトiPS細胞から小腸上皮細胞への分化誘導期間（30日間）は、効率的な実用化を妨げると考えられてきた。そこで、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞からオルガノイドが樹立できれば、不十分であった腸管機能の改善と分化誘導期間の省略が可能になるのではないかと考えた。ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を

(研究結果の続き)

生検組織由来の腸管オルガノイド培地 (Fujii *et al.*, *Cell Stem Cell*, 2018)を用いてオルガノイド培養を試みた。その結果、スフェロイドの形成が認められ、増殖している様子も観察された。このヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドは、50回以上の継代が可能であり、その表現型も長期にわたって維持された。さらに、小腸上皮細胞は生体内において単層を形成し種々の成分の吸収・代謝を担っているため、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドの単層膜の作製を試みた。酵素処理により単細胞化したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドを、セルカルチャーインサート上に播種し、独自に開発した培養液を用いて単層膜の形成を試みた。その結果、上皮細胞のバリア機能を示す経上皮電気抵抗 (TEER) 値は培養5日目あたりには $400\Omega \cdot \text{cm}^2$ を示し、単層膜の形成が示唆された。このヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜における小腸上皮細胞マーカー遺伝子の発現量は、オルガノイド化前のヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞と同程度もしくは高い値を示した。また、薬物代謝酵素 (CYP3A4、CYP2D6、CYP2C9、CYP2C19) の活性は、市販のヒト小腸組織と同程度か高い値を示した。吸収や排泄に重要なトランスポーター (P-gp、BCRP、PEPT1) の活性を有していることも確認した。以上より、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞をオルガノイドとして培養し、さらに単層膜を形成させることによって、従来系よりも高い機能と汎用性を兼ね備えた細胞系の確立に成功した (Inui T. *et al.*, *Stem Cell Research & Therapy*, 2024)。

最後に、このヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜を用いて、ポリフェノール類を含む食品の安全性評価系に应用可能であるか予備検討を進めた。茶に含まれるカテキンに代表されるエピガロカテキンガレートは、炎症が惹起されたマウス由来腸管オルガノイドの細胞死を誘発することが報告された (Guo *et al.*, *Food & Function*, 2023)。そこで、我々は、独自に開発したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜を用いて、これの再現性が認められるか評価を試みた。ヒトiPS細胞由来上皮細胞オルガノイド単層膜にエピガロカテキンガレートを作用させた場合においても、細胞死は認められなかった。

D. 考察

これまで腸上皮組織由来の細胞は*in vitro*にて培養が困難であり、生体を模した腸管上皮細胞の培養とその評価は実施されてこなかった。しかし、オルガノイド培養技術の開発とその進歩により、その課題が解決されつつある。本研究では、ヒトiPS細胞由

来小腸上皮細胞の一部の機能を補うために、オルガノイド培養技術を導入した。より*in vivo*に近い条件で継代培養することで、細胞の選択と成熟化が進んだと考えられる。なお、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドの機能や性質は、樹立の資材となるヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞の機能や性質に影響を受けることも明らかにした。すなわち、R4年度に高い機能を有した小腸上皮細胞の分化誘導法の開発に成功していたからこそ得られた成果であると考えている。

また、茶に含まれる代表的なポリフェノール類のエピガロカテキンガレートを作用させた場合において、特徴的な表現系の変化を見出すことができなかった。Guoらの報告は、増殖期のオルガノイドにカテキンを作用させた検討であり、本研究で用いたヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜は増殖期でなく成熟した細胞集団であることから、毒性発現に差が出た可能性がある。今後は、オルガノイド状態のヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドを用いた検討を行い、単層膜を用いた場合との違いを評価したい。

E. 結論

ポリフェノール類の吸収や毒性評価に応用可能な小腸上皮細胞の作製技術の開発を行なった。ヒト iPS 細胞から分化誘導された小腸上皮細胞では、機能の一部が不十分だったため、オルガノイド培養技術を取り入れこれを解決した。今後は、食品由来成分の安全性評価に資する技術であるか示すことを目的とした評価を進めたい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

Inui T., Uraya Y., Yokota J., Yamashita T., Kawai K., Okada K., Uevama-Toba Y., Mizuguchi H., Functional intestinal monolayers from organoids derived from human iPS cells for drug discovery research, *Stem Cell Research & Therapy*, 15, 57, 2024

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Inui T. <i>et al.</i>	Functional intestinal monolayers from organoids derived from human iPS cells for drug discovery research	Stem Cell Research & Therapy	15	Article number: 57	2024

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について

令和6年5月27日

厚生労働大臣
~~（国立医薬品食品衛生研究所長）殿~~
~~（国立保健医療科学院長）~~

機関名 国立大学法人大阪大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 西尾 章治郎

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 高機能なヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を用いたポリフェノール類吸収評価系の構築
3. 研究者名 （所属部署・職名）大学院薬学研究科・助教
（氏名・フリガナ）植山（鳥羽）由希子・ウエヤマ（トバ）ユキコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
		審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称： ）	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

該当なし

（※2）未審査の場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ （無の場合はその理由：
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ （無の場合は委託先機関：
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ （無の場合はその理由：
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ （有の場合はその内容：

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

高機能なヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を用いた
ポリフェノール類吸収評価系の構築

令和5年度 総括研究報告書

研究代表者 植山（鳥羽）由希子

令和6年 5月

目 次	
I. 総括研究報告	
高機能なヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を用いた ポリフェノール類吸収評価系の構築 植山（鳥羽）由希子	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 3

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
総括研究報告書

高機能なヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を用いた
ポリフェノール類吸収評価系の構築

研究代表者 植山（鳥羽）由希子 国立大学法人大阪大学
研究協力者 水口裕之 国立大学法人大阪大学

【要旨】

ポリフェノール類は、生体内で抗酸化作用を有することが示されている一方でその体内動態は明らかにされていない。そこで、より生体の小腸を模したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドを作製し、ポリフェノール類の小腸における動態特性の解明を行なった。本課題で開発した細胞を用いて、今後は食品由来成分の吸収評価系や毒性評価系への応用を目指す。

A. 研究目的

ポリフェノール類は生体内で抗酸化作用を発現し、老化やがんを予防することが示唆されている。しかし、ポリフェノール類を含む製品の摂取による健康被害も報告されている。そこで、ポリフェノール類を含む食品の摂取基準をより正確に制定する必要がある。食品やサプリメントなどの経口摂取成分は、消化管から生体内に取り込まれて生理機能を発揮する。したがって、ポリフェノール類の消化管における吸収機序を明らかにすることは、それらを含む健康食品等の安全性を担保するために必須である。

そこで、本研究ではポリフェノール類の正確な吸収評価を可能とする技術の開発を試みる。具体的には、ヒト人工多能性幹（induced pluripotent stem; iPS）細胞から分化誘導した小腸上皮細胞を用いて、ポリフェノール類の吸収評価系を構築する。高機能なヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を作製可能な分化誘導法を開発し、より生体を模した *in vitro* 評価系の構築とその社会実装を目指す。

B. 研究方法

令和4年度に改良を行なった分化誘導条件下で、ヒトiPS細胞から小腸上皮細胞を作製した。さらに、小腸上皮細胞マーカー遺伝子（*VIL1*など）や薬物代謝酵素（*Cytochrome P450 (CYP) 3A4*）、トランスポーター（*Multi drug resistance 1 (MDR1)*など）の遺伝子発現量を定量的RT-PCR法により解析した。また、薬物代謝酵素の基質を作用させ、未変化体およびその代謝物の量をUPLC-MS/MSを用いて測定することで、薬物代謝酵素活性の測定を行なった。トランスポーターの活性は、RI標識された基質を用いて評価した。

C. 研究結果

R5年度（2年目）では、まず改良後のヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞の詳細な評価を行った。遺伝子発現解析の結果、小腸上皮細胞に発現する代表的な遺伝子の多く（*VIL1*、*MDR1*、*CYP3A4*、*EpCAM*など）は、改良前と比較して、改良後の細胞において高い値を示した。同様に、小腸上皮細胞にて高発現する薬物代謝酵素CYP3A4の活性を測定した結果、改良前と比較して、改良後の細胞において高い値を示した。吸収や排泄を担うトランスポーターの活性を測定した結果、改良前よりも機能は改善していたものの、一部では活性を示さないトランスポーターがあることが示された。本研究課題では、生体を模した食品由来成分の吸収と安全性に及ぼす影響を評価したいため、改良したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞では、十分でないことが示唆された。

そこで、我々はオルガノイド培養技術に着目した。オルガノイドとは、臓器を意味するorganと類似を意味するoidから成る科学造語である。腸管を筆頭に、膵臓や脳、肝臓など様々な臓器由来のオルガノイドが樹立されてきた。オルガノイドの特徴は、三次元培養体であり自己増殖する点と由来臓器の機能を保持している点が挙げられる。ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞の機能が不十分であることに加えて、未分化ヒトiPS細胞から小腸上皮細胞への分化誘導期間（30日間）は、効率的な実用化を妨げると考えられてきた。そこで、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞からオルガノイドが樹立できれば、不十分であった腸管機能の改善と分化誘導期間の省略が可能になるのではないかと考えた。ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を

(研究結果の続き)

生検組織由来の腸管オルガノイド培地 (Fujii *et al.*, *Cell Stem Cell*, 2018)を用いてオルガノイド培養を試みた。その結果、スフェロイドの形成が認められ、増殖している様子も観察された。このヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドは、50回以上の継代が可能であり、その表現型も長期にわたって維持された。さらに、小腸上皮細胞は生体内において単層を形成し種々の成分の吸収・代謝を担っているため、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドの単層膜の作製を試みた。酵素処理により単細胞化したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドを、セルカルチャーインサート上に播種し、独自に開発した培養液を用いて単層膜の形成を試みた。その結果、上皮細胞のバリア機能を示す経上皮電気抵抗 (TEER) 値は培養5日目あたりには $400\Omega \cdot \text{cm}^2$ を示し、単層膜の形成が示唆された。このヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜における小腸上皮細胞マーカー遺伝子の発現量は、オルガノイド化前のヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞と同程度もしくは高い値を示した。また、薬物代謝酵素 (CYP3A4、CYP2D6、CYP2C9、CYP2C19) の活性は、市販のヒト小腸組織と同程度か高い値を示した。吸収や排泄に重要なトランスポーター (P-gp、BCRP、PEPT1) の活性を有していることも確認した。以上より、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞をオルガノイドとして培養し、さらに単層膜を形成させることによって、従来系よりも高い機能と汎用性を兼ね備えた細胞系の確立に成功した (Inui T. *et al.*, *Stem Cell Research & Therapy*, 2024)。

最後に、このヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜を用いて、ポリフェノール類を含む食品の安全性評価系に应用可能であるか予備検討を進めた。茶に含まれるカテキンに代表されるエピガロカテキンガレートは、炎症が惹起されたマウス由来腸管オルガノイドの細胞死を誘発することが報告された (Guo *et al.*, *Food & Function*, 2023)。そこで、我々は、独自に開発したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜を用いて、これの再現性が認められるか評価を試みた。ヒトiPS細胞由来上皮細胞オルガノイド単層膜にエピガロカテキンガレートを作用させた場合においても、細胞死は認められなかった。

D. 考察

これまで腸上皮組織由来の細胞は*in vitro*にて培養が困難であり、生体を模した腸管上皮細胞の培養とその評価は実施されてこなかった。しかし、オルガノイド培養技術の開発とその進歩により、その課題が解決されつつある。本研究では、ヒトiPS細胞由

来小腸上皮細胞の一部の機能を補うために、オルガノイド培養技術を導入した。より*in vivo*に近い条件で継代培養することで、細胞の選択と成熟化が進んだと考えられる。なお、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドの機能や性質は、樹立の資材となるヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞の機能や性質に影響を受けることも明らかにした。すなわち、R4年度に高い機能を有した小腸上皮細胞の分化誘導法の開発に成功していたからこそ得られた成果であると考えている。

また、茶に含まれる代表的なポリフェノール類のエピガロカテキンガレートを作用させた場合において、特徴的な表現系の変化を見出すことができなかった。Guoらの報告は、増殖期のオルガノイドにカテキンを作用させた検討であり、本研究で用いたヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜は増殖期でなく成熟した細胞集団であることから、毒性発現に差が出た可能性がある。今後は、オルガノイド状態のヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドを用いた検討を行い、単層膜を用いた場合との違いを評価したい。

E. 結論

ポリフェノール類の吸収や毒性評価に応用可能な小腸上皮細胞の作製技術の開発を行なった。ヒト iPS 細胞から分化誘導された小腸上皮細胞では、機能の一部が不十分だったため、オルガノイド培養技術を取り入れこれを解決した。今後は、食品由来成分の安全性評価に資する技術であるか示すことを目的とした評価を進めたい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

Inui T., Uraya Y., Yokota J., Yamashita T., Kawai K., Okada K., Uevama-Toba Y., Mizuguchi H., Functional intestinal monolayers from organoids derived from human iPS cells for drug discovery research, *Stem Cell Research & Therapy*, 15, 57, 2024

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Inui T. <i>et al.</i>	Functional intestinal monolayers from organoids derived from human iPS cells for drug discovery research	Stem Cell Research & Therapy	15	Article number: 57	2024

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について

令和6年5月27日

厚生労働大臣
~~（国立医薬品食品衛生研究所長）殿~~
~~（国立保健医療科学院長）~~

機関名 国立大学法人大阪大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 西尾 章治郎

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 高機能なヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を用いたポリフェノール類吸収評価系の構築
3. 研究者名 （所属部署・職名）大学院薬学研究科・助教
（氏名・フリガナ）植山（鳥羽）由希子・ウエヤマ（トバ）ユキコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
		審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称： ）	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

該当なし

（※2）未審査の場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ （無の場合はその理由：
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ （無の場合は委託先機関：
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ （無の場合はその理由：
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ （有の場合はその内容：

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

高機能なヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を用いた
ポリフェノール類吸収評価系の構築

令和5年度 総括研究報告書

研究代表者 植山（鳥羽）由希子

令和6年 5月

目 次	
I. 総括研究報告	
高機能なヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を用いた ポリフェノール類吸収評価系の構築 植山（鳥羽）由希子	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 3

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
総括研究報告書

高機能なヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を用いた
ポリフェノール類吸収評価系の構築

研究代表者 植山（鳥羽）由希子 国立大学法人大阪大学
研究協力者 水口裕之 国立大学法人大阪大学

【要旨】

ポリフェノール類は、生体内で抗酸化作用を有することが示されている一方でその体内動態は明らかにされていない。そこで、より生体の小腸を模したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドを作製し、ポリフェノール類の小腸における動態特性の解明を行なった。本課題で開発した細胞を用いて、今後は食品由来成分の吸収評価系や毒性評価系への応用を目指す。

A. 研究目的

ポリフェノール類は生体内で抗酸化作用を発現し、老化やがんを予防することが示唆されている。しかし、ポリフェノール類を含む製品の摂取による健康被害も報告されている。そこで、ポリフェノール類を含む食品の摂取基準をより正確に制定する必要がある。食品やサプリメントなどの経口摂取成分は、消化管から生体内に取り込まれて生理機能を発揮する。したがって、ポリフェノール類の消化管における吸収機序を明らかにすることは、それらを含む健康食品等の安全性を担保するために必須である。

そこで、本研究ではポリフェノール類の正確な吸収評価を可能とする技術の開発を試みる。具体的には、ヒト人工多能性幹（induced pluripotent stem; iPS）細胞から分化誘導した小腸上皮細胞を用いて、ポリフェノール類の吸収評価系を構築する。高機能なヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を作製可能な分化誘導法を開発し、より生体を模した *in vitro* 評価系の構築とその社会実装を目指す。

B. 研究方法

令和4年度に改良を行なった分化誘導条件下で、ヒトiPS細胞から小腸上皮細胞を作製した。さらに、小腸上皮細胞マーカー遺伝子（*VIL1*など）や薬物代謝酵素（*Cytochrome P450 (CYP) 3A4*）、トランスポーター（*Multi drug resistance 1 (MDR1)*など）の遺伝子発現量を定量的RT-PCR法により解析した。また、薬物代謝酵素の基質を作用させ、未変化体およびその代謝物の量をUPLC-MS/MSを用いて測定することで、薬物代謝酵素活性の測定を行なった。トランスポーターの活性は、RI標識された基質を用いて評価した。

C. 研究結果

R5年度（2年目）では、まず改良後のヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞の詳細な評価を行った。遺伝子発現解析の結果、小腸上皮細胞に発現する代表的な遺伝子の多く（*VIL1*、*MDR1*、*CYP3A4*、*EpCAM*など）は、改良前と比較して、改良後の細胞において高い値を示した。同様に、小腸上皮細胞にて高発現する薬物代謝酵素CYP3A4の活性を測定した結果、改良前と比較して、改良後の細胞において高い値を示した。吸収や排泄を担うトランスポーターの活性を測定した結果、改良前よりも機能は改善していたものの、一部では活性を示さないトランスポーターがあることが示された。本研究課題では、生体を模した食品由来成分の吸収と安全性に及ぼす影響を評価したいため、改良したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞では、十分でないことが示唆された。

そこで、我々はオルガノイド培養技術に着目した。オルガノイドとは、臓器を意味するorganと類似を意味するoidから成る科学造語である。腸管を筆頭に、膵臓や脳、肝臓など様々な臓器由来のオルガノイドが樹立されてきた。オルガノイドの特徴は、三次元培養体であり自己増殖する点と由来臓器の機能を保持している点が挙げられる。ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞の機能が不十分であることに加えて、未分化ヒトiPS細胞から小腸上皮細胞への分化誘導期間（30日間）は、効率的な実用化を妨げると考えられてきた。そこで、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞からオルガノイドが樹立できれば、不十分であった腸管機能の改善と分化誘導期間の省略が可能になるのではないかと考えた。ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を

(研究結果の続き)

生検組織由来の腸管オルガノイド培地 (Fujii *et al.*, *Cell Stem Cell*, 2018)を用いてオルガノイド培養を試みた。その結果、スフェロイドの形成が認められ、増殖している様子も観察された。このヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドは、50回以上の継代が可能であり、その表現型も長期にわたって維持された。さらに、小腸上皮細胞は生体内において単層を形成し種々の成分の吸収・代謝を担っているため、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドの単層膜の作製を試みた。酵素処理により単細胞化したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドを、セルカルチャーインサート上に播種し、独自に開発した培養液を用いて単層膜の形成を試みた。その結果、上皮細胞のバリア機能を示す経上皮電気抵抗 (TEER) 値は培養5日目あたりには $400\Omega \cdot \text{cm}^2$ を示し、単層膜の形成が示唆された。このヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜における小腸上皮細胞マーカー遺伝子の発現量は、オルガノイド化前のヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞と同程度もしくは高い値を示した。また、薬物代謝酵素 (CYP3A4、CYP2D6、CYP2C9、CYP2C19) の活性は、市販のヒト小腸組織と同程度か高い値を示した。吸収や排泄に重要なトランスポーター (P-gp、BCRP、PEPT1) の活性を有していることも確認した。以上より、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞をオルガノイドとして培養し、さらに単層膜を形成させることによって、従来系よりも高い機能と汎用性を兼ね備えた細胞系の確立に成功した (Inui T. *et al.*, *Stem Cell Research & Therapy*, 2024)。

最後に、このヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜を用いて、ポリフェノール類を含む食品の安全性評価系に应用可能であるか予備検討を進めた。茶に含まれるカテキンに代表されるエピガロカテキンガレートは、炎症が惹起されたマウス由来腸管オルガノイドの細胞死を誘発することが報告された (Guo *et al.*, *Food & Function*, 2023)。そこで、我々は、独自に開発したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜を用いて、これの再現性が認められるか評価を試みた。ヒトiPS細胞由来上皮細胞オルガノイド単層膜にエピガロカテキンガレートを作用させた場合においても、細胞死は認められなかった。

D. 考察

これまで腸上皮組織由来の細胞は*in vitro*にて培養が困難であり、生体を模した腸管上皮細胞の培養とその評価は実施されてこなかった。しかし、オルガノイド培養技術の開発とその進歩により、その課題が解決されつつある。本研究では、ヒトiPS細胞由

来小腸上皮細胞の一部の機能を補うために、オルガノイド培養技術を導入した。より*in vivo*に近い条件で継代培養することで、細胞の選択と成熟化が進んだと考えられる。なお、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドの機能や性質は、樹立の資材となるヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞の機能や性質に影響を受けることも明らかにした。すなわち、R4年度に高い機能を有した小腸上皮細胞の分化誘導法の開発に成功していたからこそ得られた成果であると考えている。

また、茶に含まれる代表的なポリフェノール類のエピガロカテキンガレートを作用させた場合において、特徴的な表現系の変化を見出すことができなかった。Guoらの報告は、増殖期のオルガノイドにカテキンを作用させた検討であり、本研究で用いたヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜は増殖期でなく成熟した細胞集団であることから、毒性発現に差が出た可能性がある。今後は、オルガノイド状態のヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドを用いた検討を行い、単層膜を用いた場合との違いを評価したい。

E. 結論

ポリフェノール類の吸収や毒性評価に応用可能な小腸上皮細胞の作製技術の開発を行なった。ヒト iPS 細胞から分化誘導された小腸上皮細胞では、機能の一部が不十分だったため、オルガノイド培養技術を取り入れこれを解決した。今後は、食品由来成分の安全性評価に資する技術であるか示すことを目的とした評価を進めたい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

Inui T., Uraya Y., Yokota J., Yamashita T., Kawai K., Okada K., Uevama-Toba Y., Mizuguchi H., Functional intestinal monolayers from organoids derived from human iPS cells for drug discovery research, *Stem Cell Research & Therapy*, 15, 57, 2024

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Inui T. <i>et al.</i>	Functional intestinal monolayers from organoids derived from human iPS cells for drug discovery research	Stem Cell Research & Therapy	15	Article number: 57	2024

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について

令和6年5月27日

厚生労働大臣
~~（国立医薬品食品衛生研究所長）殿~~
~~（国立保健医療科学院長）~~

機関名 国立大学法人大阪大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 西尾 章治郎

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 高機能なヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を用いたポリフェノール類吸収評価系の構築
3. 研究者名 （所属部署・職名）大学院薬学研究科・助教
（氏名・フリガナ）植山（鳥羽）由希子・ウエヤマ（トバ）ユキコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
		審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称： ）	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

該当なし

（※2）未審査の場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ （無の場合はその理由：
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ （無の場合は委託先機関：
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ （無の場合はその理由：
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ （有の場合はその内容：

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。