

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4年度～令和6年度 総合研究報告書

研究代表者 植山（鳥羽）由希子

令和7年 5月

目 次

I. 総合研究報告	
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	----- 1
植山（鳥羽）由希子	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 4

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

ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化誘導法の改良には発生学的に有効であることが示唆されているシグナル伝達系を作用点とする化合物やリコンビナントタンパク質を対象に、スクリーニングを実施した。

腸管上皮細胞の機能評価には、小腸上皮細胞マーカー（*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*））の遺伝子発現量を定量的 RT-PCR 法あるいは免疫染色法などの生化学的手法を用いた。また、電子顕微鏡を用いた微細構造の観察や、経上皮膜電位抵抗値の測定も行なった。

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。

令和 5 年度までに開発したヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜を用いて、エピガロカテキンガレート（*Epigallocatechin Gallate*; EGCG）を作用させた後に、遺伝子発現量を定量的 RT-PCR 法により解析した。EGCG の腸管毒性を検討するため、EGCG を作用させた細胞の細胞生存率を WST-8 assay により評価した。

C. 研究結果

ヒト iPS 細胞は、内胚葉細胞、腸管前駆細胞を経て小腸上皮細胞へと分化する。したがって、各ステップの細胞を高効率かつ高品質に分化誘導することが重要である。そこで、段階的なスクリーニングを行い、新たに高機能なヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を作製可能な分化誘導条件を決定し、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

(研究結果の続き)

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するために、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が高い値を示した。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)。

確立したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドの単層膜を用いて、ポリフェノール類の吸収評価系の確立を試みた。緑茶に豊富に含まれるEGCGを作用させ、その表現系を評価した。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(*VIL1*、*MDR1*、*CYP3A4*、*EpCAM*など)の多くは、EGCGの作用に影響を受けなかった。一方で、*LDLR*や*PCSK9*などのコレステロールの取り込みに関連する遺伝子群の一部は、EGCG作用により発現量が増加した。また、*ASBT*は回腸で発現する胆汁酸の再吸収に関わるトランスポーターであり、ポリフェノール作用により阻害されることが報告されている(Takashima et al., *J Agric Food Chem.*, 2021)。実際に、EGCGを作用させた場合においては、*ASBT*の発現低下が認められた。その他の脂質動態に関連する遺伝子群や胆汁酸動態に関連する遺伝子群は、有意な発現変動が認められなかった。これらの結果から、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドの単層膜は、これまでにCaco-2細胞等の腸管モデルを用いた報告を一部再現しているものの、十分でないことが示唆された。また、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応用可能であるか検討を行なった。EGCG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、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EGCGを作用させ、細胞生存率を測定した。その結果、予想に反して1 mMのEGCG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。

上記の結果を踏まえ、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜の機能が十分でなかった可能性も考慮し、培養法の改良を行った。腸管は生体において頂端側が空気にさらされているため、作製した単層膜もそのような環境を再現することでより高度な吸収評価が可能になるのではないかと考えた。近年では、気相液相界面(air-liquid interface: ALI)培養と呼ばれる方法で培養することで、効率的に腸管幹細胞から腸管上皮細胞に分化することが報告されている。ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜にALI培養を導入した。ALI培養を行った細胞では、TEERの値が通

(研究結果の続き)

常培養群と比較して有意に上昇した。また、電子顕微鏡を用いた観察では、通常培養より密な微絨毛構造が認められた。主要な薬物代謝酵素であるCYP3A4は、ALI培養をすることで遺伝子発現量が有意に増加した一方で、その活性は低下した。また、MDR1の発現量は増加したが、その活性の増加は認められなかった。その他にUGT1A1やCES1、CES2、VIL1などの遺伝子発現量が増加した。興味深いことに、免疫蛍光染色を行った結果、ALI培養を行った細胞では、ムチン (MUC2) 陽性の細胞数が増加し、またその1個あたりの細胞の面積も増加した。以上の結果から、ALI培養を導入することで、一部の腸管機能を担う遺伝子の発現量は増加したが、酵素活性やトランスporter活性の増加は認められないことが明らかとなった (Inui T. et al., *European Journal of Cell Biology*, 2025)。

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、我々が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、EGCGを作用させた場合、一部既報とは異なる結果が得られた。ほとんどの報告はCaco-2細胞や実験動物などを用いた検討であり、今回使用したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイド単層膜とは性質が大きく異なる腸管モデルである。ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞オルガノイドはヒト生体に近い表現型を有することを示してきたが (Inui T et al., *Stem Cell Research & Therapy*, 2024)、*in vitro*で培養している細胞モデルであるため正確に生体内の構造を反映できていない点があった。そこで、生体と同様に頂端側が空気にさらされるような環境を再現するため、ALI培養を導入した。ムチンは、腸管の頂端側を覆う粘液層の成分であり、ALI培養した群ではこれの分泌が増加していた。この結果から、生体に近い構造を有した

モデルの確立に成功したと考えられた。

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や ALI 培養を導入し、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. 研究発表

1. 論文発表

Inui T., Uraya Y., Yokota J., Yamashita T., Kawai K., Okada K., Ueyama-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

Inui T., Uraya Y., Ueyama-Toba Y., Mizuguchi H., Air-liquid interface culture alters the characteristics and functions of monolayers generated from human iPS cell-derived enterocyte-like cell organoids, *European Journal of Cell Biology*, 104, 2, 151479, 2025

2. 学会発表

該当なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

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
Inui T. <i>et al.</i>	Air-liquid interface culture alters the characteristics and functions of monolayers generated from human iPS cell-derived enterocyte-like cell organoids	European Journal of Cell Biology	102	Article number: 151479	2025