

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を作製可能な条件を開発し、ポリフェノール類の小腸における動態特性の解明を試みた。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、検討を進めた。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。また、腸管上皮細胞の機能評価には、定量的RT-PCR法や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。

C. 研究結果

令和6年度では、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。

さらに、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

(研究結果の続き)

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ポーター活性の増加は認められなかった。

#### D. 考察

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。ALI培養を導入することで、より整体に近い構造を構築することに成功した。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

Tatsuya Inui, Yusei Uraya, Yukiko Ueyama-Toba, Hiroyuki Mizuguchi, 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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし