

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	医薬品のヒト経口吸収性評価への活用を目指したヒトiPS細胞由来小腸細胞作製に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	吉田晋平
Author(English)	Shinpei Yoshida
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12107号, 授与年月日:2021年9月24日, 学位の種別:課程博士, 審査員:糸 昭苑,白木 伸明,山口 雄輝,田川 陽一,加藤 明
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12107号, Conferred date:2021/9/24, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

2021 年 博士論文

医薬品のヒト経口吸収性評価への活用を目指した
ヒト iPS 細胞由来小腸細胞作製に関する研究

東京工業大学 生命理工学院
生命理工学系 生命理工学コース

吉田 晋平

指導教員 桑 昭苑 教授

目次

略語表.....	3
要約	4
第 1 章 研究背景.....	6
第 2 章 3 次元培養法を用いたヒト iPS 細胞由来小腸細胞の作製.....	11
2.1 ヒト iPS 細胞から小腸オルガノイドへの分化誘導検討.....	20
2.1.1 ヒト iPS 細胞から内胚葉への分化誘導検討	20
2.1.2 内胚葉から中腸/後腸 (小腸前駆細胞) への分化誘導検討	22
2.1.3 小腸前駆細胞から小腸オルガノイドへの成熟化検討.....	24
2.1.4 小腸オルガノイドから小腸細胞の純化法の検討.....	27
2.2 ヒト iPS 細胞由来小腸細胞の機能的解析.....	31
2.2.1 ヒト iPS 細胞由来小腸細胞の薬物代謝酵素活性評価	31
2.2.2 ヒト iPS 細胞由来小腸細胞のバリア機能評価	33
2.2.3 ヒト iPS 細胞由来小腸細胞の長期培養の検討	37
2.3 小括	40
第 3 章 2 次元培養法を用いたヒト iPS 細胞由来小腸細胞の作製.....	43
3.1 コラーゲンビトリゲル膜を用いた小腸細胞への成熟化検討	52
3.2 ヒト iPS 細胞由来小腸細胞の機能的解析.....	57
3.3 生理的条件に類似した成熟化小腸細胞への分化誘導法の検討	60
3.3.1 成熟化培地の検討.....	60
3.3.2 成熟化に寄与する因子の解析.....	64
3.4 ヒト小腸吸収性とヒト iPS 細胞由来単層膜透過性の相関性解析	68
3.5 小括	70
第 4 章 総括.....	74
発表学会目録.....	77
論文目録.....	78
参考文献.....	79
謝辞	85

略語表

ABC	ATP-binding cassette
ABCB1	ATP-binding cassette family B member 1
ABCG2	ATP-binding cassette family G member 2
P_{app}	apparent permeability coefficient
BCRP	breast cancer resistance protein
BMP	bone morphogenetic protein
CDX2	caudal-related homeobox transcription factor 2
CVM	collagen vitrigel membrane
CYP	cytochrome P450
Dex	dexamethasone
DMSO	dimethyl sulfoxide
EGF	epidermal growth factor
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
Fa	fraction absorbed
FGF4	fibroblast growth factor 4
GSK-3 β	glycogen synthase kinase-3 β
hESCs	human embryonic stem cells
HGF	hepatocyte growth factor
hiPSCs	human induced pluripotent stem cells
LGR5	leucine-rich orphan G-protein-coupled receptor
MACS	magnetic-activated cell sorting system
MEFs	mouse embryonic fibroblasts
PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeation Assay
P-gp	P-glycoprotein
PEPT1	peptide transporter 1
SLC	solute carrier
SLC15A1	solute carrier family 15 member 1
TEER	trans-epithelial electrical resistance
TGF- β	transforming growth factor β
VD3	1 α ,25- dihydroxy vitamin D3, calcitriol

要約

医薬品のヒト経口吸収性評価への活用を目指したヒト iPS 細胞由来小腸細胞作製に関する研究

吉田 晋平 指導教員 桑 昭苑

【第1章：研究背景】

経口医薬品が薬効を発揮するためには、吸収された後に循環血液を介して、標的部位に送達される必要があるが、医薬品の吸収は主に小腸によって行われている。従って、小腸において効率良く吸収される医薬品を探索することが有用である。創薬で広く使用される *in vitro* 吸収評価モデルとして、人工リン脂質膜 (PAMPA) やヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞株が挙げられる。しかし、これら *in vitro* 評価モデルは、医薬品の吸収を制御すると考えられる薬物代謝酵素や薬物トランスポーターが発現していない、あるいはそれらの発現量がヒト小腸と異なることから、よりヒトの生理的条件に類似した *in vitro* モデルの開発が望まれている。

多能性幹細胞であるヒト iPS 細胞は、3 胚葉由来の全ての細胞に分化できるポテンシャルを有しており、近年の研究から、小腸細胞へと分化可能であることが明らかとなった。ヒト iPS 細胞からヒト成人小腸に類似した細胞が作製できれば、既存の評価系に代わる、新しい *in vitro* 吸収評価モデルが構築できると考えられる。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞から小腸細胞への分化誘導法、並びにヒト iPS 細胞由来小腸細胞を用いた *in vitro* 吸収評価モデルの作製法の確立を目指し、検討を行った。

【検討内容】

In vitro 条件下、ヒト iPS 細胞から目的とする組織細胞へと分化誘導するには、必要な分化誘導因子を与える必要がある。これまでに、ヒト iPS 細胞から小腸細胞へと分化誘導する方法として、マトリゲルを用いた 3 次元培養による方法¹と 2 次元培養下で分化誘導する方法²が報告されており、当研究室では 2 次元培養下での小腸細胞への分化誘導に成功している。3 次元培養法においては、3 次元構造体のオルガノイドが形成されるため、このままの状態では機能的な解析や単層膜を用いた *in vitro* 吸収評価が困難である。また、オルガノイドには小腸細胞以外の細胞が含まれていることから、小腸細胞の純化法、並びに医薬品の吸収性評価に対する有用性を見極めるための機能的な解析を行った。

2 次元培養法においては、小腸前駆細胞から小腸細胞へと成熟化させる方法の検討を行い、よりヒト成人小腸に類似した細胞への分化誘導を試みた。また、作製したヒト iPS 細胞由来小腸細胞の機能的な解析も行った。

【結果及び考察】

第2章：3次元培養法を用いたヒト iPS 細胞由来小腸細胞の作製

まず、内胚葉への分化を促す *activin A* を添加した培地によりヒト iPS 細胞から内胚葉へと分化させた後、内胚葉の後方化を促すと報告されている *Wnt3a* 及び *FGF4* を添加した培地を用いて小腸前駆細胞へと分化させた。その後、小腸前駆細胞から小腸細胞への成熟化を促すと報告されている *R-spondin1*, *noggin*, *EGF* を加えた培地及びマトリゲルを用いた3次元培養により、小腸オルガノイドを作製した。小腸オルガノイドは間質細胞を多く含んでいたことから、小腸細胞を純化する方法を検討し、上皮細胞特異的な表面抗原である *CD326 (EpCAM)* を指標とすることで、小腸細胞を高効率に純化できることを明らかにした。また、純化したヒト iPS 細胞由来小腸細胞について、薬物の吸収性を制御する機能の解析を行った結果、小腸に発現する主な薬物代謝酵素であるチトクロム *P450 3A (CYP3A)* 及び *2J2 (CYP2J2)* の活性、並びに単層膜のタイトジャンクションの形成を確認した。

第3章：2次元培養法を用いたヒト iPS 細胞由来小腸細胞の作製

高密度のコラーゲンで形成され、生体内の結合組織に近い構造を有する *collagen vitrigel membrane (CVM)* 上に、内胚葉あるいは小腸前駆細胞を播種し、*CVM* の成熟化に対する効果を評価した。その結果、小腸マーカーの *villin*、薬物代謝酵素の *CYP3A4*, *CYP2C9*, *CYP2C19*、薬物トランスポーターの *P-gp*, *BCRP*, *PEPT1* の遺伝子発現量がヒト成人小腸に類似していたことから、*CVM* は機能的な小腸細胞への成熟化に有用と考えられた。また、成熟化を促す添加因子を検討した結果、*BIO*, *dimethyl sulfoxide*, *dexamethasone*, 活性型 *vitamin D3* を加えた培地が有用であることを見出した。さらに、モデル薬物のヒト小腸吸収率と本細胞の単層膜透過性には高い相関性が認められた。

以上の結果から、3次元培養法によって作製したヒト iPS 細胞由来小腸オルガノイド、2次元培養法によって作製したヒト iPS 細胞由来小腸細胞、それぞれがヒト経口吸収性を評価可能な *in vitro* 吸収評価モデルとなることが期待される。

【参考文献】

1. Spence, J. R. et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*. 470, 105-109 (2011).
2. Ogaki, S., Shiraki, N., Kume, K., and Kume, S. (2013). Wnt and Notch signals guide embryonic stem cell differentiation into the intestinal lineages. *Stem Cell* 31, 1086–1096.

【研究発表】

Shinpei Yoshida, Hiroto Miwa, Tomoyuki Kawachi, Shoen Kume, Koji Takahashi
Generation of intestinal organoids derived from human pluripotent stem cells for drug testing
Scientific Reports. 2020 Apr 6;10(1):5989.

Shinpei Yoshida, Takayuki Honjo, Keita Iino, Ryunosuke Ishibe, Sylvia Leo, Nobuaki Shiraki, Shoen Kume. et al. Generation of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Functional Enterocyte-Like Cells for Pharmacokinetic Studies. *Stem Cell Reports*. 2021 Feb 9;16(2):295-308

第 1 章

研究背景

口から摂取した食品は、胃で消化された後に、脂質、ペプチド、イオン、水分として小腸から吸収され、生命活動に必要な栄養として利用されているが、小腸では、これら必要な栄養だけでなく経口で服用する医薬品の吸収も担っている (Figure 1-1)。医薬品の経口吸収性 (生物学的利用率又はバイオアベイラビリティ) は、水への溶解性、小腸細胞における膜透過性 (薬物トランスポーターによる膜輸送を含む) 及び代謝、肝細胞における代謝によって影響を受けると考えられる。そのため、創薬においては、小腸細胞膜透過性が高く、また代謝されにくい医薬品候補化合物 (以下、化合物) をスクリーニングすることが有用である。ラット、イヌ、サルなどの非臨床安全性評価動物を用いた *in vivo* 評価により経口吸収性を評価する方法も用いられるが、必要な化合物量が多いこと、イヌやサルの *in vivo* 評価は高度な動物実験技術が必要であること、スループット性が低いことから、化合物のスクリーニングには適していない。 *In vivo* 評価のスループットを高める方法として、複数化合物を同時に投与し、1度の投与で複数化合物を評価するカセットドージング法も挙げられるが、薬物間相互作用の影響が懸念される [1]。また、非臨床安全性動物とヒトでは生理的条件が大きく異なることから、種差の懸念も大きい。

そこで、スループット性に優れ、種差の懸念が低い *in vitro* 吸収評価系として、人工膜透過システムの Parallel Artificial Membrane Permeation Assay (PAMPA) [2][3] やヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 細胞 [4][5][6] を用いた膜透過性評価が創薬において広く行われている。PAMPA はヒトの細胞膜を構成するリン脂質でコーティングされた膜であり、化合物の物理化学的性質である親油性に依存したヒトの膜透過性は理論上評価できると考えられるが、小腸細胞間の細胞間隙からの透過性、薬物トランスポーターによる薬物輸送、及び薬物代謝酵素による代謝を含めた評価はできない。Caco-2 細胞は小腸に代表的な細胞間密着結合 (タイトジャンクション) によるバリア機能や微絨毛を有し、基質を能動的に輸送する排泄型 ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターの P 糖タンパク質 (P-glycoprotein, P-gp)、乳癌耐性蛋白

(breast cancer resistance protein, BCRP) や取り込み型の solute carrier (SLC) トランスポーターであるペプチドトランスポーター1 (peptide transporter 1, PEPT1) が発現している。しかし一方で、その発現量は小腸組織と異なること、特に薬物代謝酵素の発現量が低いことが報告されている [7]。ヒト小腸において最も多く発現し、大部分の医薬品の代謝に関与する CYP (cytochrome P450) 3A (内、CYP3A4 が代表的な分子種) は、経口吸収性の評価において重要だが [8][9][10]、Caco-2 細胞における CYP3A4 の発現量はヒト小腸よりも低く [7]、CYP3A4 代謝を含めた評価はできないと考えられる。また、Caco-2 細胞の機能的特性は研究室間差があることも報告されている [11]。以上のことから、よりヒト小腸の生理的条件に類似した *in vitro* 小腸モデルの開発が望まれている。ヒトプライマリー小腸細胞 [12] の活用を考えた場合、大量かつ安定的に入手することが困難であり、ヒトプライマリー小腸細胞を用いた事例も少ないために機能的なプロファイルの情報が少ないといった課題が考えられる。

多能性幹細胞であるヒト ES 細胞 (human embryonic stem cell, hESCs)、人工誘発性多能性幹細胞であるヒト iPS 細胞 (human induced pluripotent stem cells, hiPSCs) [13] は未分化の状態で増殖培養が可能で、3 胚葉由来のすべての細胞に分化できるポテンシャルを有しており、それぞれの胚葉への分化に対応する誘導因子を曝露させることで特定の細胞へ分化させることが可能であると考えられる。よって創薬においては、多能性幹細胞は、入手が困難なヒト細胞の大量調製を可能とする創薬プラットフォームとして期待されている。当研究室を含む最近の研究において、ヒト ES 細胞あるいはヒト iPS 細胞は内胚葉、また内胚葉由来の組織細胞である膵臓細胞、肝細胞、小腸細胞へと分化可能であることが明らかになった [14][15][16][17]。

小腸細胞は自己再生能を有する組織であり、これは小腸幹細胞によってもたらされていると考えられる。小腸幹細胞は陰窩に局在し、吸収細胞や杯細胞、小腸分泌細胞、パネート細胞などの分泌細胞へと分化する (Figure 1-2) [18][19][20]。小腸幹細胞の増殖や分化は、Notch シグナル [21] や Wnt シグナルレセプター leucine-rich orphan G-protein-coupled receptor (LGR5) とそのリガンドである R-spondin1 との結合による Wnt/ β -カテニンシグナルによって制御されていると考えられる [22]。また、小腸幹細胞の培養法の研究も進められており、マウス Lgr5

陽性幹細胞は、epidermal growth factor (EGF)、noggin [bone morphogenetic protein (BMP) 阻害剤]、R-spondin1 を添加した培地で、ラミニン及びコラーゲンが豊富に含まれるマトリゲルによる 3 次元培養下、オルガノイドを形成し長期間培養可能であることが見出されている [19]。また、ヒト小腸や結腸のオルガノイド培養には、Wnt3a、EGF、noggin、R-spondin1、nicotinamide、A-83-01 [transforming growth factor β (TGF- β) type I 受容体様キナーゼ阻害剤] の添加が有用であることが報告されている [23]。

小腸幹細胞の 3 次元オルガノイド培養法は、ヒト iPS 細胞から小腸細胞への分化誘導にも応用されている。TGF- β ファミリーである activin A を用い、転写因子群である SOX ファミリーに属する SOX17 や転写因子群である FOX サブファミリーに属する FOXA2 を発現する内胚葉への分化誘導 [24]、内胚葉の後方化をサポートすると報告されている fibroblast growth factor-4 (FGF4) [25] と Wnt3a を用いた内胚葉から caudal-related homeobox transcription factor 2 (CDX2) を発現する中/後腸 (小腸前駆細胞) へと分化誘導させた後に、小腸幹細胞のオルガノイド培養システムにより小腸オルガノイドへと成熟化することが報告されている (Figure 1-3) [26]。しかし、3 次元構造体である小腸オルガノイドを用いた化合物の吸収評価はできないことから、創薬に活用するためには、2 次元培養下に落とし込む必要がある。

ヒト iPS 細胞から小腸細胞への分化誘導検討では、上述した 3 次元オルガノイド培養に加えて、2 次元培養下でも検討されている (Figure 1-3)。当研究室ではこれまでに、2 次元培養下において、マウス ES 細胞、ヒト ES 細胞あるいはヒト iPS 細胞から小腸細胞への分化誘導に成功している [16][17]。Glycogen synthase kinase (GSK)-3 β 阻害剤 (Wnt/ β -カテニンシグナルを活性化) の 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO), γ -secretase 阻害剤 (notch シグナルを抑制) の (3,5-difluorophenylacetyl)-L-alanyl-L-2-phenylglycine tert-butyl ester (DAPT) は、内胚葉から CDX2 陽性の小腸前駆細胞へと分化誘導し、さらには、吸収細胞、杯細胞、分泌細胞、パネート細胞といった小腸細胞へと成熟化することを見出している [16]。他の研究グループからは、アデノウイルスベクターを用いた FOXA2, CDX2 の遺伝子導入 [27][28]、DNA メチル化阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine によるエピジェネティクスの調節により吸収細胞へと分化誘導する

方法 [29][30] が報告されている (Figure 1-3)。しかし、作製した小腸細胞の機能的解析が不十分であること、吸収性を評価できる方法まで確立されていないこと、分化効率が不明瞭であること、2度の遺伝子導入が必要のため細胞の作製が煩雑であることなど、創薬に活用する上で課題がある。

本研究では、創薬で活用する上での課題を払拭した、ヒト iPS 細胞から小腸細胞への分化誘導法の確立を目指し、検討を行った。

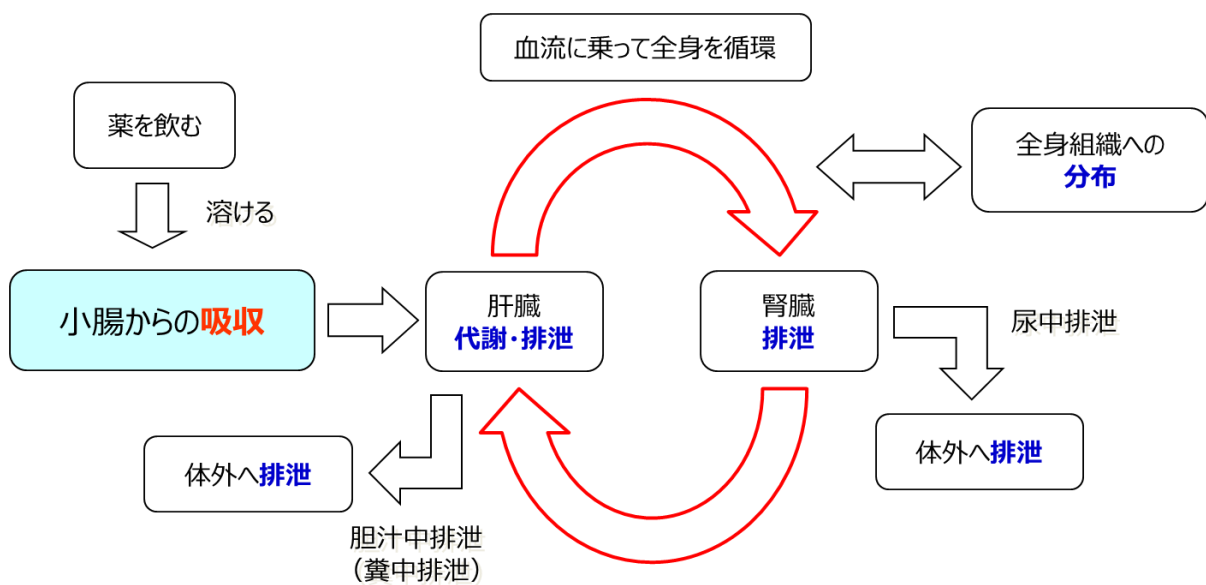


Figure 1-1: 経口医薬品の体内動態 (模式図)

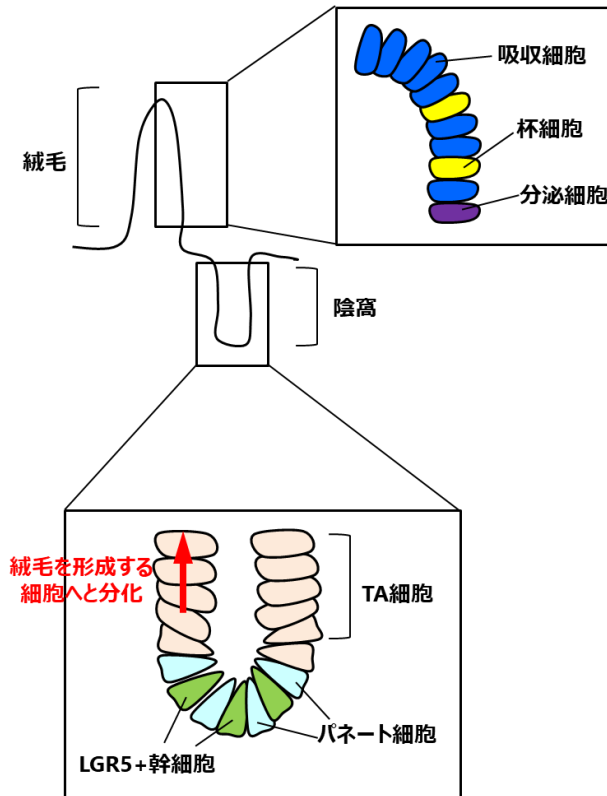


Figure 1-2: 小腸の絨毛及び陰窩の構造と幹細胞の局在とその維持 (模式図)

3次元培養による分化誘導



2次元培養による分化誘導

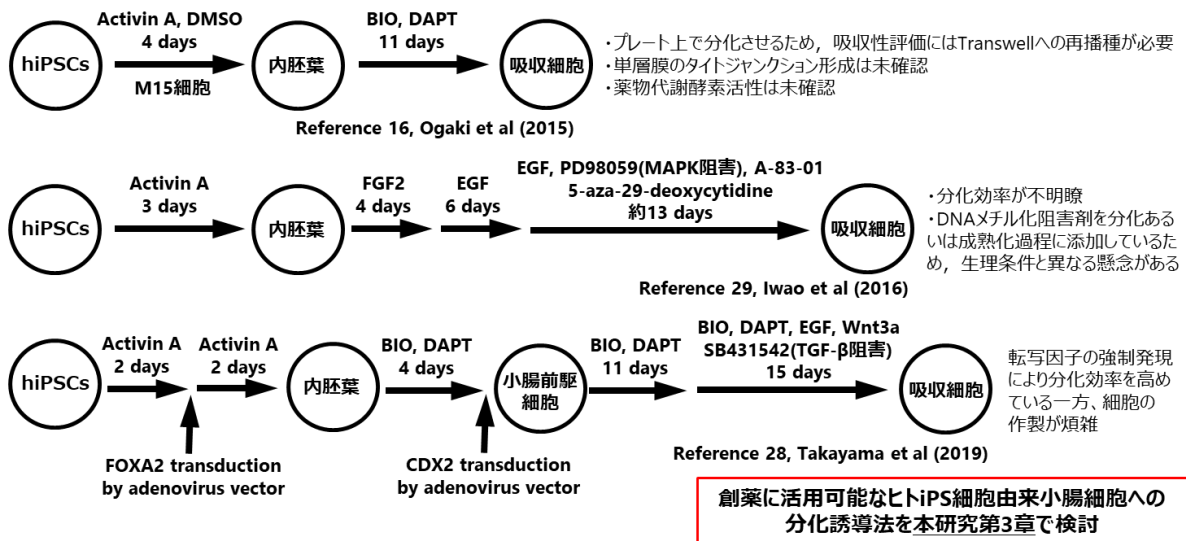


Figure 1-3: 他の研究チームによるヒト iPS 細胞から小腸細胞への分化誘導法 (概要図)

第 2 章

3 次元培養法を用いたヒト iPS 細胞由来小腸細胞の作製

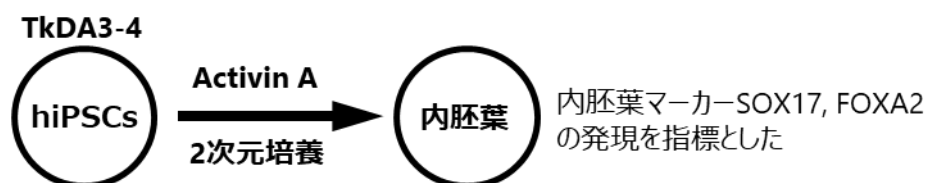
ヒト iPS 細胞から目的とする組織細胞へと分化誘導するには、2 次元培養下あるいは 3 次元培養下で、必要な分化誘導シグナルを加える方法が有用と考えられる。本章では、まず小腸幹細胞の 3 次元オルガノイド培養法を用いた、ヒト iPS 細胞から小腸オルガノイドへの分化誘導法 [26] を参考に、ヒト iPS 細胞 (TkDA3-4) から小腸オルガノイドの作製を検討した。具体的には、Nodal シグナルの活性化による内胚葉への分化誘導、Wnt シグナル及び FGF シグナルの付加による中腸/後腸 (小腸前駆細胞) への分化誘導、マトリゲルを用いた 3 次元培養下で Wnt シグナルの活性、BMP シグナルの抑制、EGF の添加による小腸細胞への成熟化をそれぞれ段階的に検討した (Figure 2-1)。

2 次元培養と異なり、3 次元培養下では、オルガノイドとして目的の細胞が得られるため、そのままの状態では詳細な解析が困難である [26]。加えて、*in vitro* 経口吸収性評価は、2 次元培養で作製した単層膜を用いて行うため [3][4][5]、オルガノイドとして評価に用いることは困難である。そこで、酵素的及び機械的な処理によって、オルガノイドを単分散する方法を検討した。また、ヒト iPS 細胞由来小腸オルガノイドは小腸細胞以外の細胞が含まれていることから [26]、単分散後の細胞を用いて、小腸細胞を純化する方法を検討した。

医薬品の経口吸収性は、小腸に発現している薬物代謝酵素による代謝、並びにタイトジャンクションによるバリア機能によって影響を受けると考えられる。3 次元培養下で作製したヒト iPS 細胞由来小腸細胞について、これらの機能は明らかになっていないことから、それぞれの機能的解析を実施した。薬物代謝酵素については、ヒト小腸に主に発現が認められる CYP3A 及び CYP2J2 酵素 [8][31] について、典型的な基質に対する代謝反応により評価した。また、タイトジャンクションによるバリア機能については、その指標として広く用いられている、trans-epithelial electrical resistance (TEER)、細胞間隙透過マーカーの inulin 及び lucifer yellow の膜透過性、並びにタイトジャンクション構成タンパクの Occludin 及び ZO-1 の発現

を解析することで評価した。

1.1 ヒトiPS細胞から内胚葉への分化誘導検討



1.2 内胚葉から中腸/後腸 (小腸前駆細胞) への分化誘導検討



1.3 小腸前駆細胞から小腸オルガノイドへの成熟化検討



Figure 2-1: ヒト iPS 細胞から小腸細胞への分化誘導検討 (模式図)

実験材料及び方法：

ヒト iPS 細胞の維持培養法

ヒト iPS 細胞株は東京大学医科学研究所の大津先生から提供いただいた TkDA3-4 株 [32] を使用した。ヒト iPS 細胞は、マイトマイシン C で増殖化を抑制させたマウス胎児繊維芽細胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEFs) をフィーダー細胞として培養を行った。DMEM/F12 培地 (Sigma-Aldrich, Saint Louis) に 100 U/mL penicillin (Thermo Fisher Scientific, Waltham), 100 µg/mL streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham), 2 mM L-glutamine (Thermo Fisher Scientific, Waltham), 0.55 mM 2-mercaptoethanol (Thermo Fisher Scientific, Waltham), 20% (v/v) Knockout Serum Replacement (Thermo Fisher Scientific, Waltham), 5 ng/mL recombinant human basic fibroblast

growth factor (ReproCELL, Yokohama) をサプリメントとして添加した培地を維持培地として使用した。MEFs は妊娠後 13.5 日齢のマウス胎児から調製した。ヒト iPS 細胞の継代は、まず MEFs を CTK dissociation solution (ReproCELL, Yokohama) を用いて酵素的に除去し、残ったヒト iPS 細胞コロニーをセルスクレイパーで剥がし、機械的に小さなクランプにした後、約 1/3 量を予め MEFs を播種した 100 mm ディッシュ上に播種する方法で行った。

ヒト iPS 細胞から内胚葉への分化誘導法

CTK dissociation solution を用いて MEFs のみを酵素的に除去した後、accutase (Innovative Cell Technologies, San Diego) を用いてヒト iPS 細胞コロニーを単分散させた。単分散したヒト iPS 細胞を hES-qualified Matrigel (Corning, Corning) でコーティングした 24 well plate に 3×10^5 cells/cm² の細胞数で播種した。なお播種には、上記ヒト iPS 細胞維持培地に 10 μ M Y27632 (Wako, Tokyo) を添加した培地を用いた。播種翌日に約 9 割コンフルエントになった段階で、内胚葉への分化誘導を開始した。培地を吸引除去後、D-PBS で 2 回洗浄した後に、RPMI 1640 media (Thermo Fisher Scientific, Waltham) に 100 ng/mL recombinant human/mouse/rat Activin A (R&D Systems, Minneapolis), 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, fetal bovine serum (Equitech-bio, Kerrville, 誘導開始から 1 日目: 0%, 1 日目から 2 日目: 0.2%, 2 日目から 3 日目: 2%) をサプリメントとして添加した培地を用いて 3 日間毎日培養交換しながら培養し、ヒト iPS 細胞から内胚葉へと分化誘導した。

内胚葉から中腸/後腸 (小腸前駆細胞) への分化誘導法

内胚葉への分化誘導後 (day 3, D3)、培地を吸引除去し、D-PBS で 2 回洗浄した。RPMI 1640 media に 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin, 500 ng/mL recombinant human FGF4 (R&D Systems, Minneapolis), and 500 ng/mL recombinant human Wnt3A (R&D Systems, Minneapolis) をサプリメントとして添加した培地を用いて 4 日間毎日培地交換しながら培養し、内胚葉から小腸前駆細胞へと分化誘導した。

小腸前駆細胞から小腸オルガノイドへの分化誘導法

小腸前駆細胞へと分化誘導後 (day 7, D7)、培地を吸引除去し、D-PBS で2回洗浄した。接着細胞及びスフェロイドをセルスクレイパーで剥がし、500 ng/mL recombinant human R-Spondin1 (R&D Systems, Minneapolis), 100 ng/mL recombinant human Noggin (R&D Systems, Minneapolis), 100 ng/mL recombinant human EGF (R&D Systems, Minneapolis) をサプリメントとして加えた matrigel に包埋後、24 well plate あるいは 100 mm ディッシュ上に播種した。37°C インキュベーター内に静置し、matrigel が固まった後に advanced DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, Waltham) に 2 mM L-glutamine, 15 mM HEPES (Thermo Fisher Scientific, Waltham), 2% (v/v) B27 supplement (Thermo Fisher Scientific, Waltham), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, or 2.5 µg/mL amphotericin B (infrequent) (Sigma-Aldrich, Saint Louis), 10 µM Y27632 (Wako, Tokyo, 播種後 3 日間のみ) をサプリメントとして添加した培地を用いて 28 日以上培養し、小腸前駆細胞から小腸オルガノイドへと分化誘導した。なお、培地交換は 3-4 日間隔で行った。

小腸オルガノイドから小腸細胞の純化法

セルスクレイパーで小腸オルガノイドをディッシュから剥がした後、2 mM EDTA (Thermo Fisher Scientific, Waltham), 1 mM dithiothreitol (Sigma-Aldrich, Saint Louis) を加えた D-PBS で回収し、氷冷下で 30 分間静置した。小腸オルガノイドを 18G の針に通し、機械的に細かく分散させた。上清を吸引除去後、3U Dispase (Roche Applied Science, Penzberg), 1% fetal bovine serum, 10 µM Y-27632 を加えた DMEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham) を添加し、37°C で 20 分間静置した後、23 G の針に通し、さらに機械的に分散させた。その後、70 µm cell-strainer に通し、単分散させた細胞を調製した。細胞に human Fc receptors blocking reagent (BioLegend, San Diego or Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) を加えた MACS 用バッファー (0.5% bovine serum albumin + 0.1 mM EDTA in D-PBS) を添加し、氷冷下で 15 分間反応させた。上清を吸引除去後、human EpCAM antibody-coated microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) を加えた

MACS 用バッファーを添加し、氷冷下で 15 分間反応させた。上清を吸引除去後、magnetic-activated cell sorting system (MACS) を行い、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞を純化した。

ヒト iPS 細胞由来小腸細胞の培養法

ヒト iPS 細胞由来小腸細胞は、iMatrix (laminin511-E8, Nippi, Tokyo) でコーティングしたプレートあるいは Transwell inserts (Corning, Corning) に $1-3 \times 10^5$ cells/cm² の細胞数で播種した。Advanced DMEM/F12 に 2 mM L-glutamine, 15 mM HEPES, 2% B27 supplement, 1% (v/v) N2 supplement (Thermo Fisher Scientific, Waltham), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 1 mM N-acetylcysteine (Sigma-Aldrich, Saint Louis), or 2.5 µg/mL amphotericin B (infrequent) (Sigma-Aldrich, Saint Louis), 10 nM human gastrin I (Peptide Institute, Osaka), 500 nM A-83-01 (Tocris Bioscience, Minneapolis), 10 µM Y27632 (播種日のみ), 500 ng/mL recombinant human R-Spondin1, 100 ng/mL recombinant human Noggin, 100 ng/mL recombinant human EGF をサプリメントとして加えた培地を用いた (長期培養時も同様の培地を使用)。長期培養時は、5,000-10,000 cells のヒト iPS 細胞由来小腸細胞を Matrigel に包埋し、24 well プレートあるいは 100 mm ディッシュに播種した。Matrigel が固まった後、培地を添加し、3-4 日間隔で培地を交換した。

RT-PCR 法

トータル RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden) あるいは PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham) により採取した。ヒト成人小腸 cDNA は human adult small intestines pooled from five donors Clontech (Mountain View) を使用した。逆転写反応は SuperScript III First-strand Synthesis SuperMix (Thermo Fisher Scientific, Waltham) を用いて行った。Real-time polymerase chain reaction (PCR) は、Power SYBR Green PCR Mater Mix, Taqman Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham) あるいは One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (TAKARA BIO, Shiga) を用い、Applied Biosystems StepOne Plus real-time PCR systems, the Applied Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR System あるいは Applied Biosystems 7500 Real

Time PCR System により行った。mRNA 遺伝子発現量はハウスキーピング遺伝子 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) により補正した。プライマーは以下の遺伝子配列のものを使用した (Table 2)。

Gene Name	Forward sequence (5'→3')	Reverse sequence (5'→3')
SOX17	CTGCAGGCCAGAAGCAGTGTTA	CCCAAAGTGTCAAGTGGCAGA
FOXA2	GGTGTACTCCGGCCCATTA	CAGAGTTAGCCGGGCCTGAA
CDX2	TTCACCTACAGTCGCTACATCACCA	CTGCGGTTCTGAAACCAGATT
VILLIN (VIL1)	GCTTGGCAACTCTAGGGACTGG	TGAGGTTGCTGTTAGCATTGAACAC
MUC2	CAACCAGCACGTCATCCTGAA	GATGCAAATGCTGGCATCAAAG
LYSOZYME (LYZ)	CCGTGATCCACAAGGCATTA	GAGTTACTCCACAACCTTGAACA
LGR5	ATGCTGGAATGTTTCAGGCTCA	CAGCCATCAAGCAGGTGTTC
EPHB2	CTGCAGGGCCAGGAATTTG	CACCCTGTGGTTGTCCAGTGTTA
OCCULUDIN (OCLN)	GACCTGAATGGGTACATGTGTGTAA	GGAATTCTCACAACCAACTGAAG
ZO-1	CGGGACTGTTGGTATTGGCTAGA	GCTAGGCCAGGGCCATAGTAAAG
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGA

Table 2: プライマーの遺伝子配列

免疫染色法

細胞固定は、Mildform 10 N (Wako, Tokyo) を室温で 30 分間あるいは methanol を氷冷下で 15 分間インキュベートすることで行った。固定完了後、D-PBS で 2-3 回洗浄した。固定した細胞は免疫染色を行うまで 4°C で保存した。染色前には、10% normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch, West Grove), 0.1% Triton X-100 を添加した D-PBS を添加し室温で 45 分間静置することで、透過処理及びブロッキング処理を行った。1 次抗体反応は一晩 4°C で行い、2 次抗体反応は 1 時間室温で行った。また小腸オルガイドの固定は、Mildform 10N を 4°C で一晩インキュベートすることで行った。その後、10–30% sucrose solution で 4°C で一晩インキュベートした後、OCT compound (Sakura Finetek, Tokyo) に包埋し液体窒素にて凍結ブロックを作製した。凍結したブロックは凍結切片作製まで -80 °C で保管した。凍結切片はクライオスタットを用いて 10 μm の厚さで作製し、スライドグラスに張り付けた。切片を張り付けたスライドグラスは免疫染色に用いるまで -20°C 以下で保管した。凍結切片の免疫染色反応は上述した方法と同様に行ったが、染色箱内で行った。1 次抗体は、goat anti-SOX17, 1:50 (R&D Systems, Minneapolis); goat anti-FOXA2, 1:50 (R&D Systems, Minneapolis); mouse anti-CDX2, ready

to use (BioGenex, San Ramon); goat anti-VILLIN, 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas); rabbit anti-MUC2, 1:100 (Santa Cruz, Dallas); rabbit anti-Lysozyme, ready to use (Diagnostic BioSystems, Pleasanton); goat anti-EpCAM, 1:20 (R&D Systems, Minneapolis); mouse anti-vimentin, 1:50 (Santa Cruz, Dallas); mouse anti-occludin, 1:250 (Thermo Fisher Scientific, Waltham); mouse anti-ZO-1, 1:100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham); mouse anti-OCCLUDIN, 1:250 (Thermo Fisher Scientific, Waltham); goat anti-EphB2, 1:40 (R&D Systems, Minneapolis) を使用し、2次抗体は、donkey anti-goat-Alexa Fluor 488, 1:500 (Thermo Fisher Scientific, Waltham); donkey anti-rabbit-Alexa Fluor 488, 1:500 (Thermo Fisher Scientific, Waltham); donkey anti-mouse-Alexa Fluor 488, 1:500 (Thermo Fisher Scientific, Waltham); donkey anti-mouse-Alexa Fluor 555, 1:500 (Thermo Fisher Scientific, Waltham) を用いた。細胞核の染色は Hoechst33342 (Thermo Fisher Scientific, Waltham) を用いた。染色後の画像解析は蛍光顕微鏡 BZ-9000 microscope (Keyence, Osaka) を用いた。

代謝反応評価

シトクロム P450 (CYP) の活性評価のため、CYP3A 及び CYP2J2 の典型的基質である terfenadine (Sigma-Aldrich, Saint Louis) あるいは CYP3A の典型的基質である midazolam (Wako, Tokyo) を用いた。基質濃度は、terfenadine, midazolam 共に 1 μ M, 反応バッファーは Krebs-Henseleit buffer (pH 7.4) を用い、代謝反応は 37°C、90 分間で行った。長期培養における CYP 活性評価においては、基質濃度は terfenadine が 1 μ M, midazolam が 20 μ M、反応バッファーは Krebs-Henseleit buffer (pH 7.4) あるいは 2 mM L-glutamine を添加した Williams medium E (Thermo Fisher Scientific, Waltham) を用い、代謝反応は 37°C、90 分間あるいは 120 分間で行った。また midazolam を用いた評価では、典型的な CYP3A 阻害剤である 10 μ M ketoconazole (Sigma-Aldrich, Saint Louis) を添加しての検討も行った。細胞数は $1-2 \times 10^6$ cells/mL、アセトニトリルを添加し反応をストップさせた。

Terfenadine の代謝物として、hydroxyl-terfenadine (Sigma-Aldrich, Saint Louis), midazolam の代謝物として hydroxyl-midazolam (1'-OH midazolam, Sigma-Aldrich, Saint Louis) を LC/MS/MS

system, Waters ACQUITY UPLC (Waters Corporation, Milford), Waters Quattro Ultima mass spectrometer (Waters Corporation, Milford), Nexera UHPLC (Shimadzu, Kyoto), Triple Quad 6500 Plus system (AB SCIEX, Tokyo), Triple Quad 6500 system (AB SCIEX, Tokyo) により定量した。フラグメントイオンは multiple reaction monitoring mode によりモニターした。Hydroxyl-terfenadine の precursor ion は 40 V の cone voltage、product ion は 30eV の collision energy により生成した (m/z 488.30 \rightarrow 452.20)。Hydroxyl-midazolam の precursor ion は 40V あるいは 130V の cone voltage、product ion は 20 eV の collision energy (m/z 342.00 \rightarrow 324.10) あるいは 37 eV の collision energy により生成した (m/z 341.55 \rightarrow 202.79)。分析カラムは 1.7 μ m ACQUITY UPLC BEH C18, 2.1 \times 100 mm (Waters Corporation, Milford) と CAPCELL PAK ADME, 2.1 \times 50 mm (OSAKA SODA, Osaka) を使用した。移動相は 0.1% ギ酸水溶液 (mobile phase A) と アセトニトリル (mobile phase B) を使用し、流速は 0.5 あるいは 0.75 mL/min にした。グラジエント比率は 10-95-95-10-10 (% of B) / 0-1-1.2-1.21- 1.5 (min) あるいは 30-40-40-95-95-30 (% of B) / 0-0.4-0.9-0.91-1.1-1.11 あるいは 0-0.4-0.7-0.71-0.9-0.91 (min) とした。なお、検量線は細胞を用いて調製した。

膜電気抵抗値 (trans-epithelial electrical resistance, TEER) の測定法

ヒト iPS 細胞由来小腸細胞の単層膜のタイトジャンクションによるバリア機能の指標として、TEER を評価した。TEER は Millicell-ERS (Merck Millipore, Darmstadt) を用いて測定した。

Lucifer yellow 及び inulin の膜透過性評価

ヒト iPS 細胞由来小腸細胞の単層膜のタイトジャンクションによるバリア機能の指標として、低膜透過性かつ細胞間隙透過マーカーである水溶性蛍光化合物 lucifer yellow (Wako, Tokyo) あるいは高分子量の [14 C]-inulin (American Radiolabeled Chemicals Inc., Saint Louis) の apical 側 to basal 側への膜透過性を評価した。 [14 C]-inulin (2 μ Ci/mL) or lucifer yellow (100 μ g/mL) の濃度で 37°C、120 分間インキュベートした。培養液を除去後、細胞を transport medium

(Hank's balanced salt solution, pH 7.4) で 2 回 wash した後に、250 μL の ^{14}C -Inulin or lucifer yellow 溶液を apical 側に 900 or 700 μL の transport medium を basal 側に添加することで評価を開始した。120 分間インキュベート後、basal 側からサンプリングし、サンプル中放射能は Tri-Carb 3100 (PerkinElmer, Waltham)、サンプル中の蛍光強度 (励起波長: 428 nm, 蛍光波長: 536 nm) は multi-plate reader EnSpire (PerkinElmer, Waltham) を用いて測定した。

Apparent permeability coefficient (P_{app})の算出

P_{app} は以下の式により算出した。

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0}$$

dQ/dt = the amount of the compound permeated per unit of time、 A = the surface area of insert membrane (0.33 cm^2)、 C_0 = the initial compound concentration in the donor chamber

統計解析

データは例数 3 以上、平均値 \pm 標準誤差で示した。統計的有意性は、対応のない Student's T 検定 (両側検定) あるいは Two-way ANOVA Tukey's 多重比較検定で行い、 p 値 <0.05 の時に有意差があるとした。

2.1 ヒト iPS 細胞から小腸オルガノイドへの分化誘導検討

2.1.1 ヒト iPS 細胞から内胚葉への分化誘導検討

以下に示した分化誘導手順 (Figure 2-2-A) により、ヒト iPS 細胞 (TkDA3-4) から内胚葉への分化誘導を検討した。まず、CTK dissociation solution を用いて MEFs を除去し、accutase により iPS 細胞コロニーを単分散させた後、マトリゲルでコーティングしたプレートに播種した。播種翌日に約 90%コンフルエントとなった状態で、内胚葉への分化誘導を促す Nodal シグナルの活性化作用が報告されている activin A [24] を加えた培地を用いて 3 日間分化させた。その結果、細胞が大きく TkDA3-4 とは明らかに異なる細胞形態を示した (Figure 2-2-B)。Day 3 (D3) の細胞の遺伝子発現解析の結果、内胚葉マーカーである *SOX17*, *FOXA2* の遺伝子発現量がヒト iPS 細胞に比べて有意に高かった (Figure 2-2-C)。また免疫細胞染色の結果、ほぼ全ての細胞が *SOX17* 及び *FOXA2* 陽性であった (Figure 2-2-D)。以上の結果から、TkDA3-4 は activin A によって、高効率に内胚葉へ分化したと考えられた。

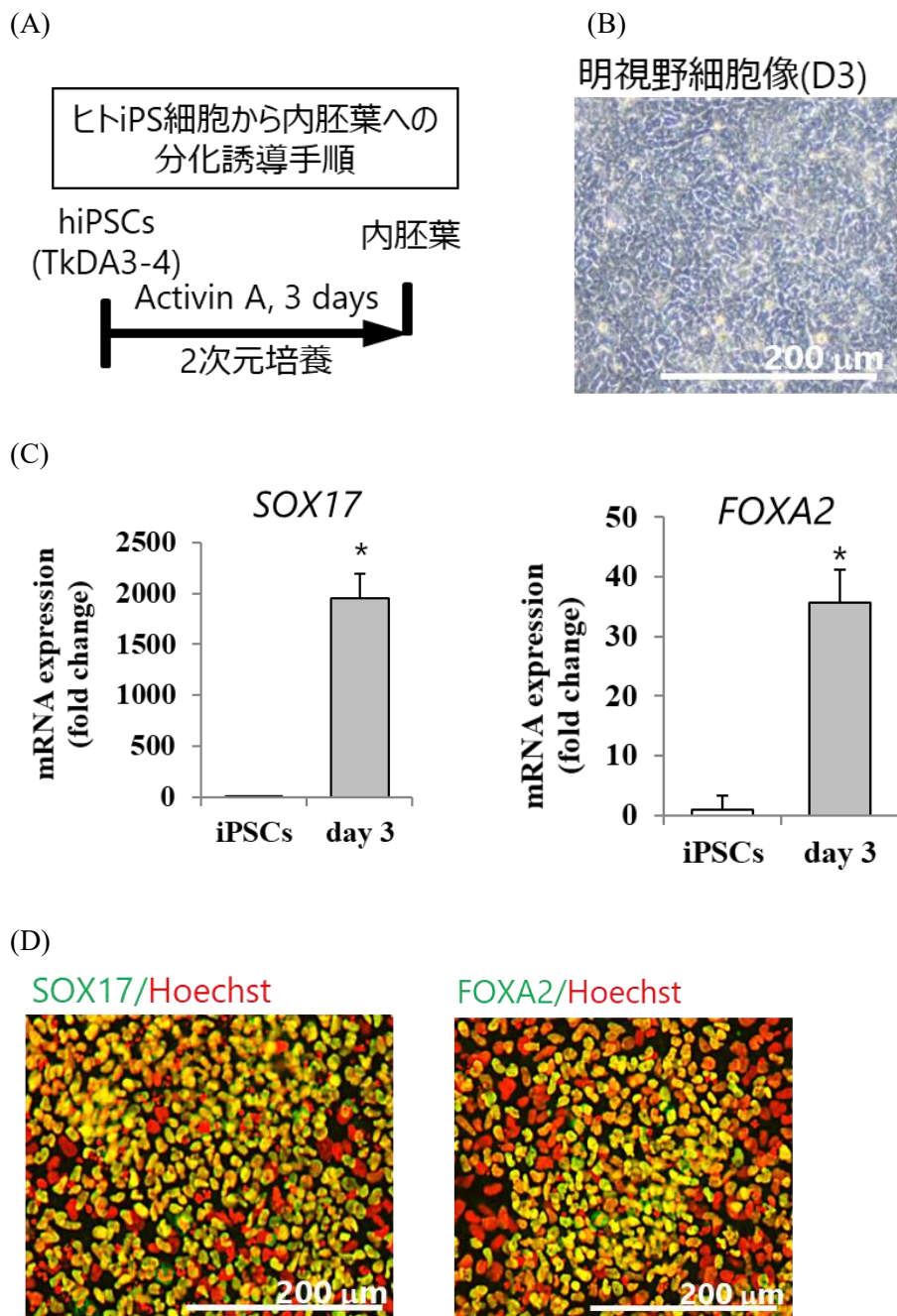
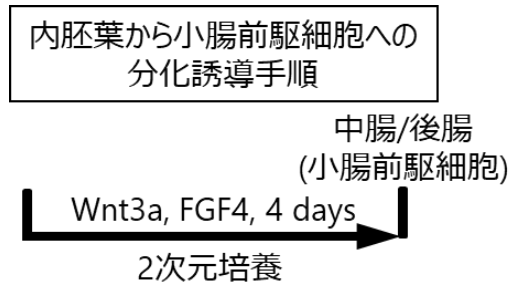


Figure 2-2: Derivation of hiPSCs into definitive endoderm. (A) the procedure for differentiating hiPSCs into definitive endoderm (DE). (B) Bright field image in differentiated cells at day 3. (C) Definitive endoderm marker (*SOX17* and *FOXA2*) gene expressions in differentiated cells at day 3. Data are presented as means \pm S.D. Fold changes versus that of hiPSCs are shown (hiPSCs: n = 8, differentiated cells: n = 7). *p < 0.01. (D) Immuno-staining images of SOX17 and FOXA2 in differentiated cells at day 3.

2.1.2 内胚葉から中腸/後腸 (小腸前駆細胞) への分化誘導検討

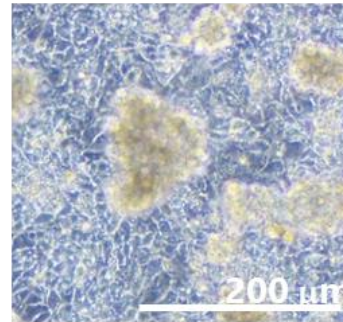
次に、以下に示した分化誘導手順 (Figure 2-3-A) により、内胚葉 (D3) から中腸/後腸 (小腸前駆細胞) への分化誘導を検討した。小腸前駆細胞への分化誘導因子として報告されている Wnt3a 及び FGF4 [25][26] を添加した培地で 4 日間分化させた結果、細胞凝集塊を伴う細胞形態を示した (Figure 2-3-B)。D7 の細胞の遺伝子発現解析の結果、小腸前駆細胞マーカーである *CDX2* の遺伝子発現量が D3 の内胚葉に比べて有意に増加した (Figure 2-3-C)。また免疫細胞染色の結果、大部分の細胞が *CDX2* 陽性の細胞であった (Figure 2-3-D)。以上の結果から、内胚葉は Wnt3a 及び FGF4 によって高効率で小腸前駆細胞 (D7) へ分化したと考えられた。なお、分化後の細胞の形態から、Wnt3a は GSK-3 β 阻害剤 (Wnt/ β -カテニンシグナルを活性化) の CHIR99021 (3 μ M) [33] に代替が可能であること、また FGF4 の添加は必須ではないことを示唆する結果を得ている。Wnt シグナル単独でも内胚葉は *CDX2* 陽性の細胞へと分化すること [26]、線維芽細胞のコンディションドメディウムと Wnt3a によって内胚葉の後方が促進されることが報告されている [34] ことから、わずかに含まれると推察される中胚葉由来の間質細胞 (Figure 2-5-A) が小腸前駆細胞への分化をサポートしている可能性が考えられる。

(A)

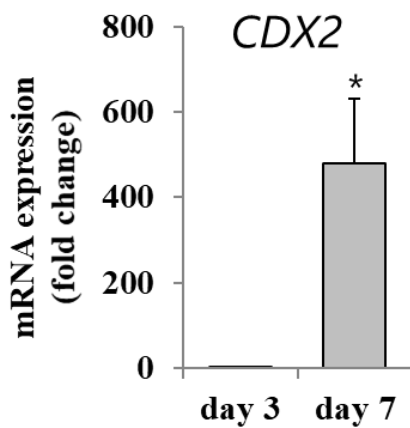


(B)

明視野細胞像(D7)



(C)



(D)

CDX2/Hoechst

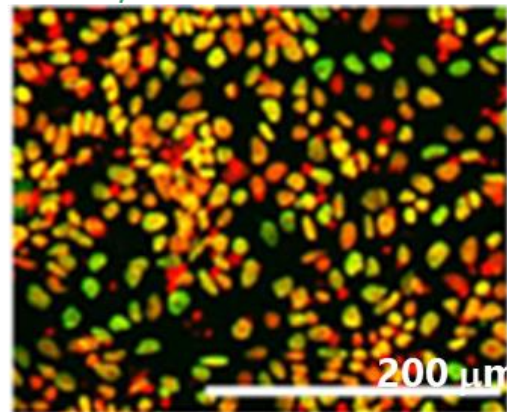
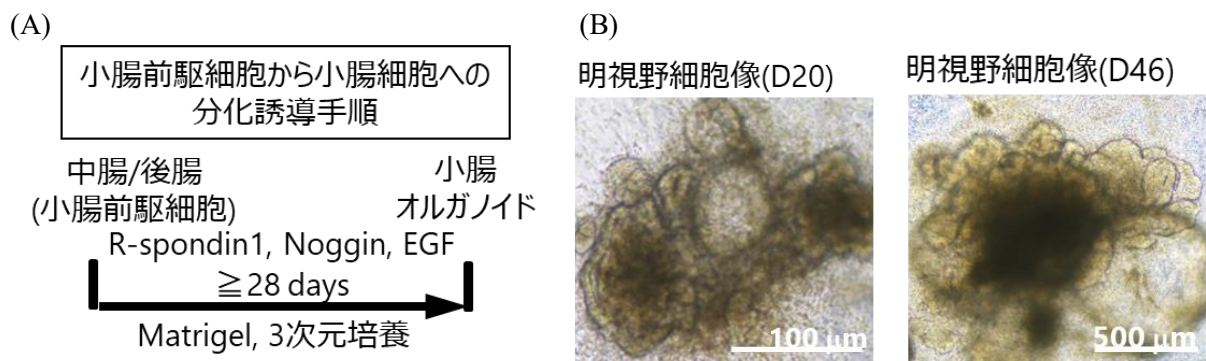


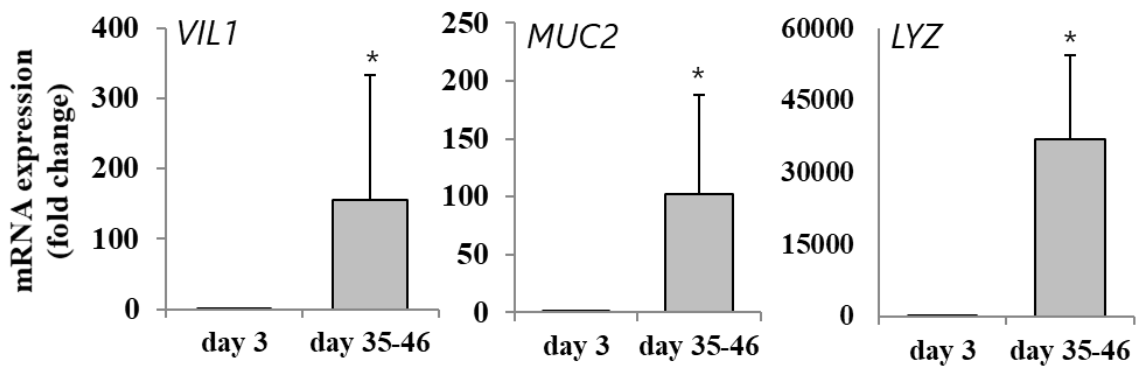
Figure 2-3: Derivation of definitive endoderm into mid/hindgut (intestinal progenitor cell). (A) The procedure for differentiating definitive endoderm into intestinal progenitor cell. (B) Bright field image in the differentiated cells at day 7. (C) Intestinal progenitor cell marker *CDX2* gene expression in differentiated cells at day 7. Data are presented as means \pm S.D. Fold changes versus that of day 3 definitive endoderm are shown (definitive endoderm at day 3: n = 7, differentiated cells: n = 7). *p < 0.01. (D) Immuno-staining image of *CDX2* in the differentiated cells at day 7.

2.1.3 小腸前駆細胞から小腸オルガノイドへの成熟化検討

続いて、以下に示した分化誘導手順 (Figure 2-4-A) により、小腸前駆細胞 (D7) から小腸オルガノイドへの成熟化を検討した。小腸細胞の維持培養に有用な因子 [23]、また小腸前駆細胞から小腸オルガノイドへの成熟化に有用な因子として報告されている [26]、R-spondin1, noggin, EGF を培地に添加し 28 日以上培養した結果、オルガノイド及びスフェア (以下オルガノイド) の細胞形態を示した (Figure 2-4-B)。D35-D46 の細胞の遺伝子発現解析の結果、吸収細胞マーカーである *Villin*, 杯細胞マーカーである *MUC2 (MUCIN)*, パネート細胞マーカーである *LYZ (Lysozyme)* の遺伝子発現量が D3 の内胚葉に比べて有意に増加した (Figure 2-4-C)。また、オルガノイドの凍結切片を用いた免疫細胞染色の結果、オルガノイドを形成している細胞において *Villin* 及び *Lysozyme* 陽性の細胞が認められたことから、小腸オルガノイドへと成熟化したと考えられた (Figure 2-4-D)。なお、培養後の細胞の形態から、R-spondin1 は R-spondin1 強制発現細胞のコンディションドメディウム [33], noggin は BMP シグナル阻害剤の LDN193189 (100 nM) によって代替可能であることを示唆する結果を得ている。



(C)



(D)

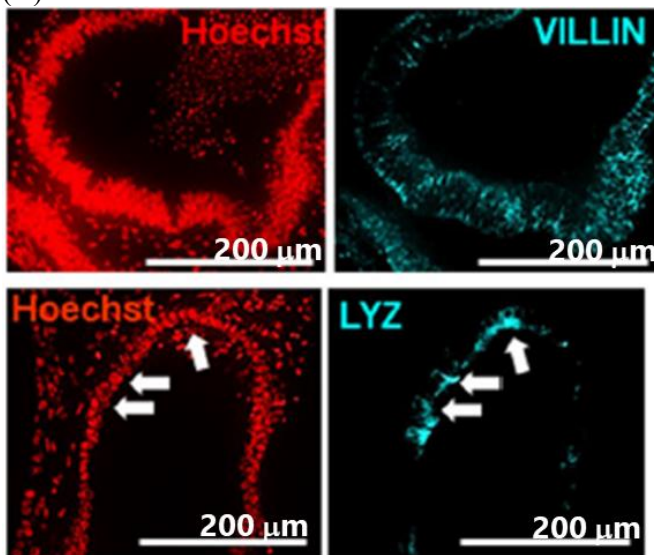


Figure 2-4: Derivation of intestinal progenitor cell into intestinal organoids. (A) The procedure for differentiating intestinal progenitor cell into intestinal organoids. (B) Representative bright field image in the differentiated into intestinal organoids at day 20 and 46 are presented. (C) Enterocyte marker *VILLIN* (*VIL1*) gene, goblet cell marker *MUCIN* (*MUC2*) gene, Paneth cell marker *lysozyme* (*LYZ*) gene expressions in differentiated cells at day 35–46. Data are presented as means \pm S.D. Fold changes versus that of day 3 definitive endoderm are shown (definitive endoderm at day 3: $n = 7$, differentiated cells: $n = 19$). (D) Immuno-staining images of *VILLIN* and *LYZ* in the differentiated into intestinal organoids are presented. Arrows depict the corresponding regions positively stained with anti-*LYZ* antibody in both regions. Statistical significance was determined by two-tailed unpaired Student's t-test.

また、明視野細胞像から小腸オルガノイドには小腸細胞以外の細胞が含まれると考えられた (Figure 3-B)。ヒト iPS 細胞から小腸オルガノイドへの分化誘導を報告した論文 [26] において、間質細胞が含まれることが示されている。免疫細胞染色の結果、作製した小腸オルガノイドには Vimentin 陽性の間質細胞が含まれていることが示された (Figure 2-5-A)。この結果から、小腸オルガノイドを単分散した細胞には小腸細胞以外に間質細胞が含まれていることから、この細胞を用いて作製した単層膜では、タイトジャンクションによるバリア機能が確認できず、細胞膜透過性による医薬品のヒト経口吸収性を評価できない可能性が考えられた。

そこで、小腸細胞が上皮細胞であることを利用して、上皮細胞特異的に発現している表面抗原 CD326 (EpCAM) [35][36] を指標に、小腸細胞を純化できないかと考えた。免疫細胞染色の結果、小腸オルガノイドのみ EpCAM を発現していることが確認できたことから (Figure 2-5-B)、次に小腸細胞の純化法の検討を行った。

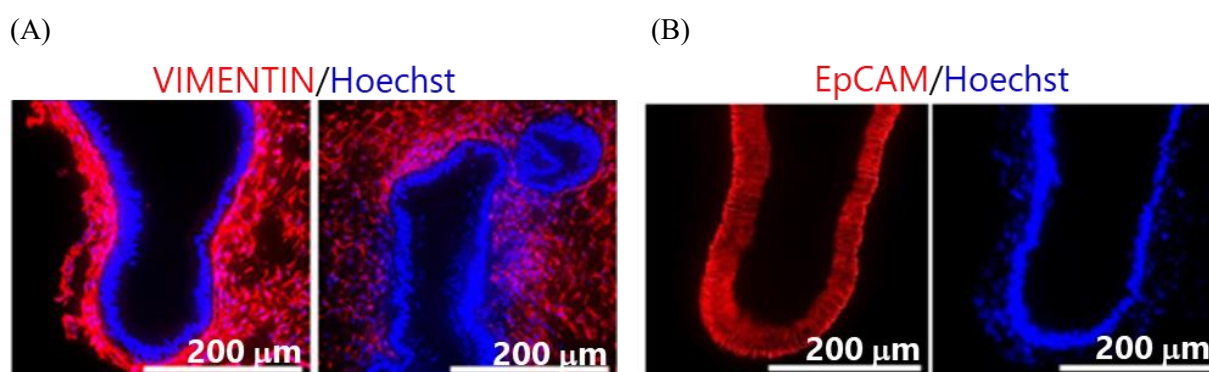


Figure 2-5: (A) Immuno-staining images of a mesenchymal cell marker VIMENTIN in intestinal organoids at day 42. (B) The immuno-staining images of EpCAM in intestinal organoids at day 42 are shown.

2.1.4 小腸オルガノイドから小腸細胞の純化法の検討

小腸オルガノイドから小腸細胞を純化するため、小腸オルガノイドを単分散させた後に上皮細胞マーカーである EpCAM を指標とした磁気細胞分離 (MACS) を行った (Figure 2-6, 2-7-A)。MACS による EpCAM 陽性上皮細胞の純化を確認するため、MACS 実施前のヘテロな細胞、MACS 実施後カラムにトラップされた細胞 (EpCAM 抗体に磁気ビーズが付いているため、抗体に認識された細胞は磁石部分のカラムにトラップされる)、MACS 実施後カラムにトラップされなかった細胞について、それぞれフローサイトメトリーを行った。その結果、EpCAM 陽性細胞の割合はそれぞれ 59.6%, 94.8%, 3.6% であり (Figure 2-7-B)、MACS によって EpCAM 陽性の上皮細胞を高純度でソーティングできることが示された。

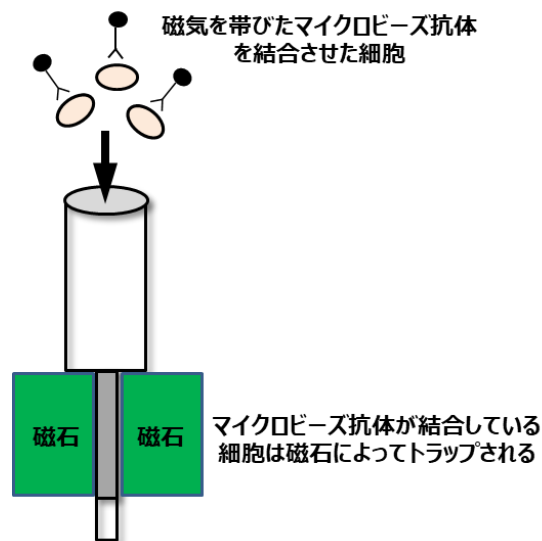


Figure 2-6: MACS によるセルソーティング(模式図)

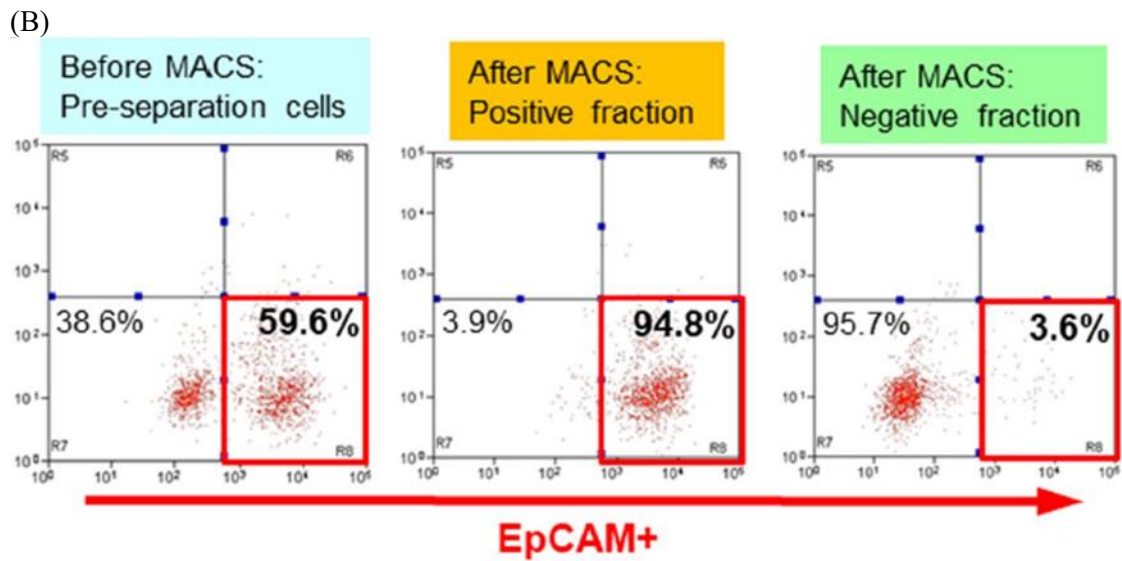
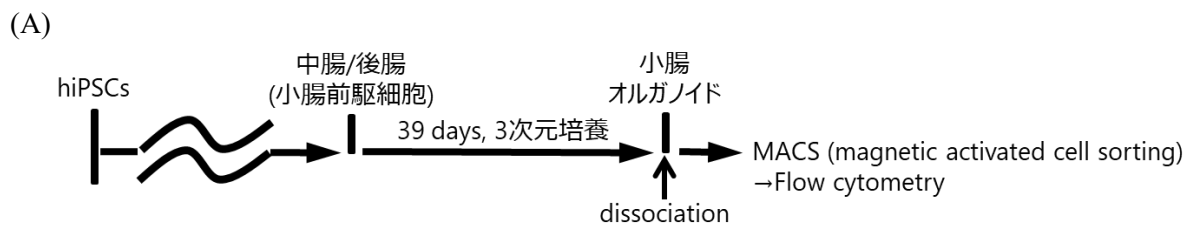


Figure 2-7: Purification of hiPSC-derived intestinal epithelial cells (IECs) from intestinal organoids. (A) A schematic drawing of the assay procedure. (B) The proportion of EpCAM⁺ cells in pre-separation cells before MACS, positive fraction after MACS, and negative fraction after MACS are analyzed by flow cytometry, respectively.

続いて、MACS によってヒト iPS 細胞由来小腸細胞 (hiPSC-IECs) が純化されたことを確認するため、EpCAM 陽性上皮細胞を laminin511-E8 fragment (iMatrix) でコーティングしたプレート上に播種した後に、免疫細胞染色を行った (Figure 2-8-A)。その結果、ほぼ全ての細胞が吸収細胞マーカー Villin 陽性であったことから、小腸オルガノイドからソーティングした上皮細胞は小腸細胞であると考えられた。また、Lysozyme 陽性のパネート細胞、MUC2 陽性の杯細胞、Chromogranin A (CHGA) 陽性の分泌細胞、EphB2 陽性の transient amplifying (TA) 細胞が含まれていることも明らかになった (Figure 2-8-B)。以上の結果から、EpCAM を指標とした MACS により、小腸オルガノイドから小腸細胞を高効率に純化できると考えられた。また、小腸幹細胞マーカー *LGR5* 及び小腸幹細胞から少し分化した TA 細胞マーカー *EPHB2* (*EphB2*) の遺伝子発現量はヒト成人小腸と同等レベルであったことから、小腸幹細胞が含まれている可能性が考えられる (Figure 2-8-B, 2-8-C)。

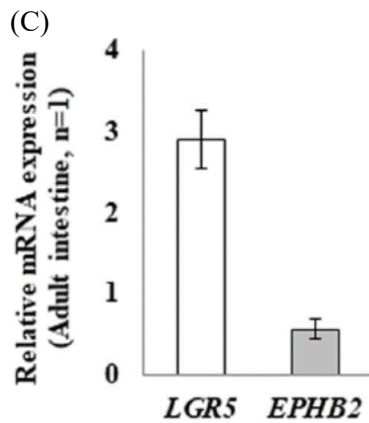
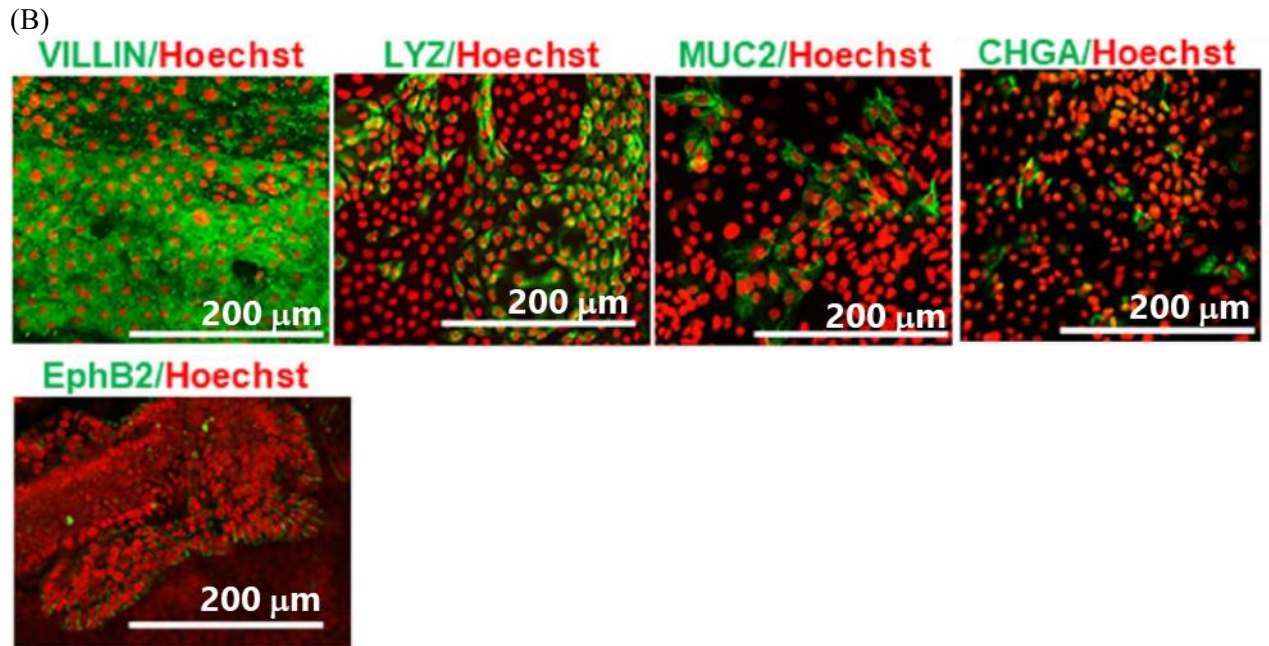
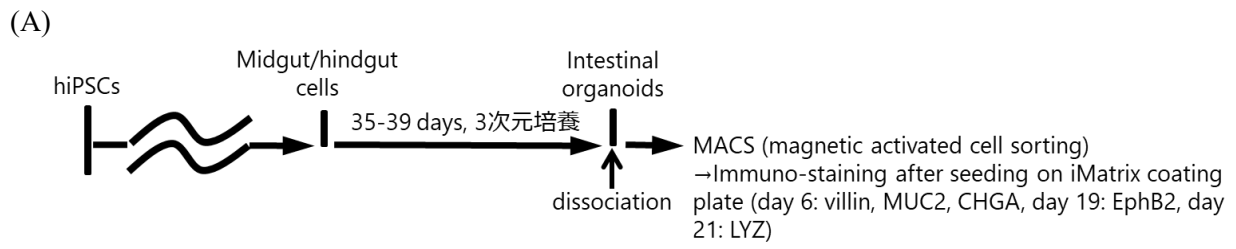


Figure 2-8: (A) A schematic drawing of the assay procedure. (B) Immuno-staining images of VILLIN, LYZ, MUC2, CHGA, and EphB2 in EpCAM⁺ cells seeded on iMatrix coating culture 96 well plates. (C) Intestinal stem cell marker (*LGR5*) and transient amplifying (TA) cell maker (*EPHB2*) gene expressions in EpCAM⁺ cells. Data are presented as means ± S.D. (n = 3).

2.2 ヒト iPS 細胞由来小腸細胞の機能的解析

2.2.1 ヒト iPS 細胞由来小腸細胞の薬物代謝酵素活性評価

小腸オルガノイドから純化したヒト iPS 細胞由来小腸細胞が、医薬品のヒト経口吸収性の評価に有用であること見極めるため、ヒト小腸に主に発現している薬物代謝酵素 CYP3A 及び CYP2J2 [8][31] の活性を評価した (Figure 2-9-A)。

小腸オルガノイドを単分散後、MACS 実施前のヘテロな細胞、MACS で純化したヒト iPS 細胞由来小腸細胞 (hiPSC-IECs)、MACS 実施後に磁気カラムにトラップされなかった細胞、それぞれの細胞に対して CYP3A 及び 2J2 活性を評価した。典型的 CYP3A 及び CYP2J2 基質である telfenadine、典型的 CYP3A 基質である midazolam を用い、代謝反応後のそれぞれの主代謝物 hydroxyl-terfenadine, hydroxyl-midazolam (1'-OH midazolam) の生成から活性を評価した。その結果、両基質共に MACS カラムにトラップされなかった細胞ではほとんど代謝されず、MACS 前のヘテロな細胞に比べて、純化したヒト iPS 細胞由来小腸細胞において有意に多くの代謝物が生成された (Figure 2-9-B)。また、midazolam に比べて terfenadine の方がより多くの代謝物が生成されたが、terfenadine は CYP3A 及び CYP2J2 により代謝されたためと考えられる (Figure 2-9-B)。以上の結果から、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞は CYP3A 及び 2J2 酵素活性を有することが示された。

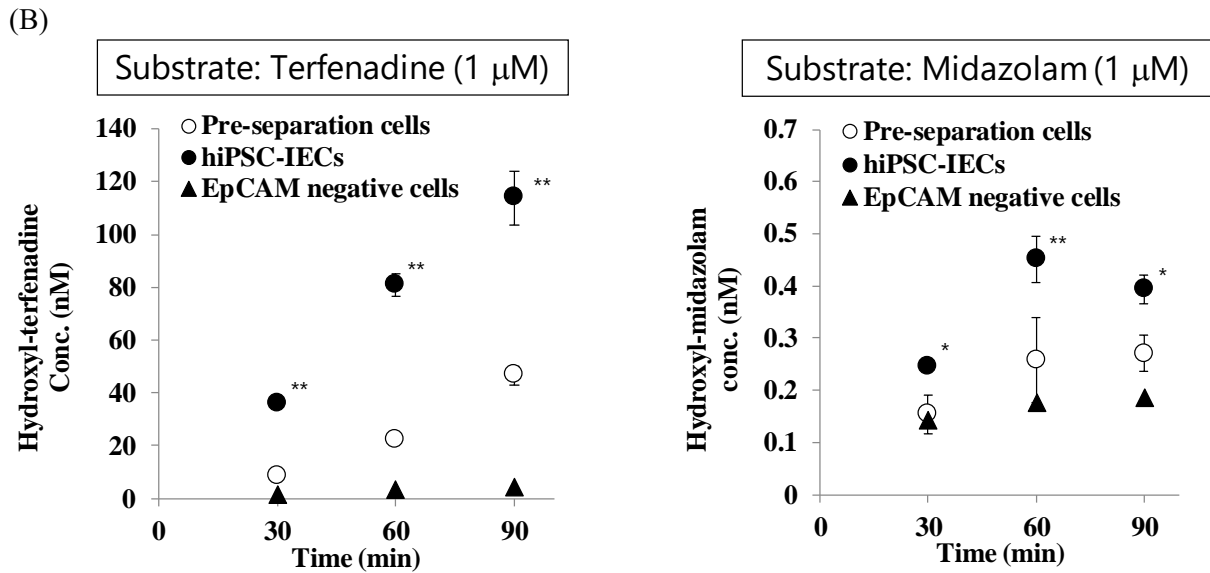
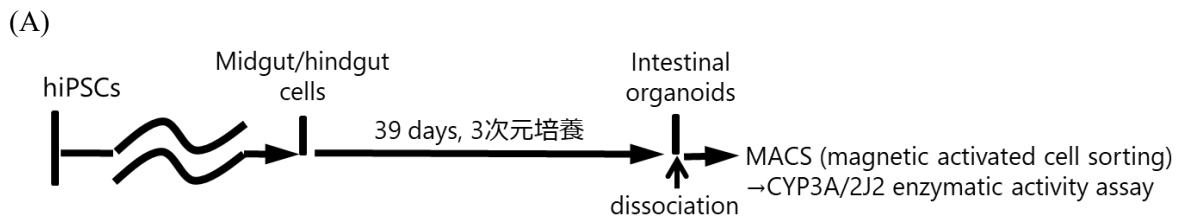


Figure 2-9: Functional characterization of hiPSC-IECs. (A) A schematic drawing of the assay procedure. (B) Drug metabolizing enzyme activity in pre-separation cells before MACS, hiPSCs-IECs and negative fraction after MACS. Data are presented as means \pm S.D. ($n = 3$, respectively). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus pre-separation cells before MACS. Data are presented as means \pm S.D. ($n = 3$). Statistical significance was determined by two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test.

2.2.2 ヒト iPS 細胞由来小腸細胞のバリア機能評価

小腸オルガノイドから純化したヒト iPS 細胞由来小腸細胞が医薬品のヒト経口吸収性の評価に有用であることを見極めるため、薬物代謝酵素の活性評価に続き、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞 (hiPSC-IECs) の単層膜のタイトジャンクションによるバリア機能を評価した (Figure 2-10-A, 2-11-A)。

ヒト iPS 細胞由来小腸細胞を 1 あるいは 3×10^5 cells/cm² の細胞数で Transwell 上に播種後、12 日間あるいは 13 日間培養し作製した単層膜の TEER は、それぞれ $419 \Omega \times \text{cm}^2$ 、 $342 \Omega \times \text{cm}^2$ と高値を示した (Figure 2-10-B, 2-11-B)。一方で、MACS 実施前のヘテロな細胞、MACS 実施後カラムにトラップされなかった細胞を Transwell 上に播種後、13 日間培養し作製した単層膜の TEER は、それぞれ $65.6 \Omega \times \text{cm}^2$ 、 $43.3 \Omega \times \text{cm}^2$ であり、細胞を播種していない時の TEER ($37.5 \Omega \times \text{cm}^2$) とほぼ同様に低値であった (Figure 2-11-B)。

次に、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞を Transwell 上に播種後 D13 における単層膜を用いて、細胞間隙透過マーカー inulin 及び lucifer yellow の apical to basal (吸収方向) の膜透過性を評価した。その結果、inulin の膜透過係数 P_{app} は 0.138×10^{-6} cm/sec、lucifer yellow の P_{app} は 0.624×10^{-6} cm/sec とそれぞれ低い膜透過性 [3][4] を示した (Figure 2-10-C, 2-11-C)。一方で、MACS 実施前のヘテロな細胞、MACS 実施後カラムにトラップされなかった細胞を Transwell 上に播種後 D13 における単層膜における lucifer yellow の P_{app} は、それぞれ 13.8×10^{-6} cm/sec, 23.3×10^{-6} cm/sec であり、細胞を播種していない時 lucifer yellow の P_{app} (40.9×10^{-6} cm/sec) とほぼ同様に高い膜透過性を示した (Figure 2-11-C)。また、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞について免疫細胞染色を行った結果、その細胞膜にはタイトジャンクションを構成するタンパクである Occludin 及び ZO-1 [37] を発現していることが示された (Figure 2-10-D, 2-11-D)。

以上の結果から、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞はタイトジャンクションを形成し、小腸に特徴的なバリア機能を有することが示された。

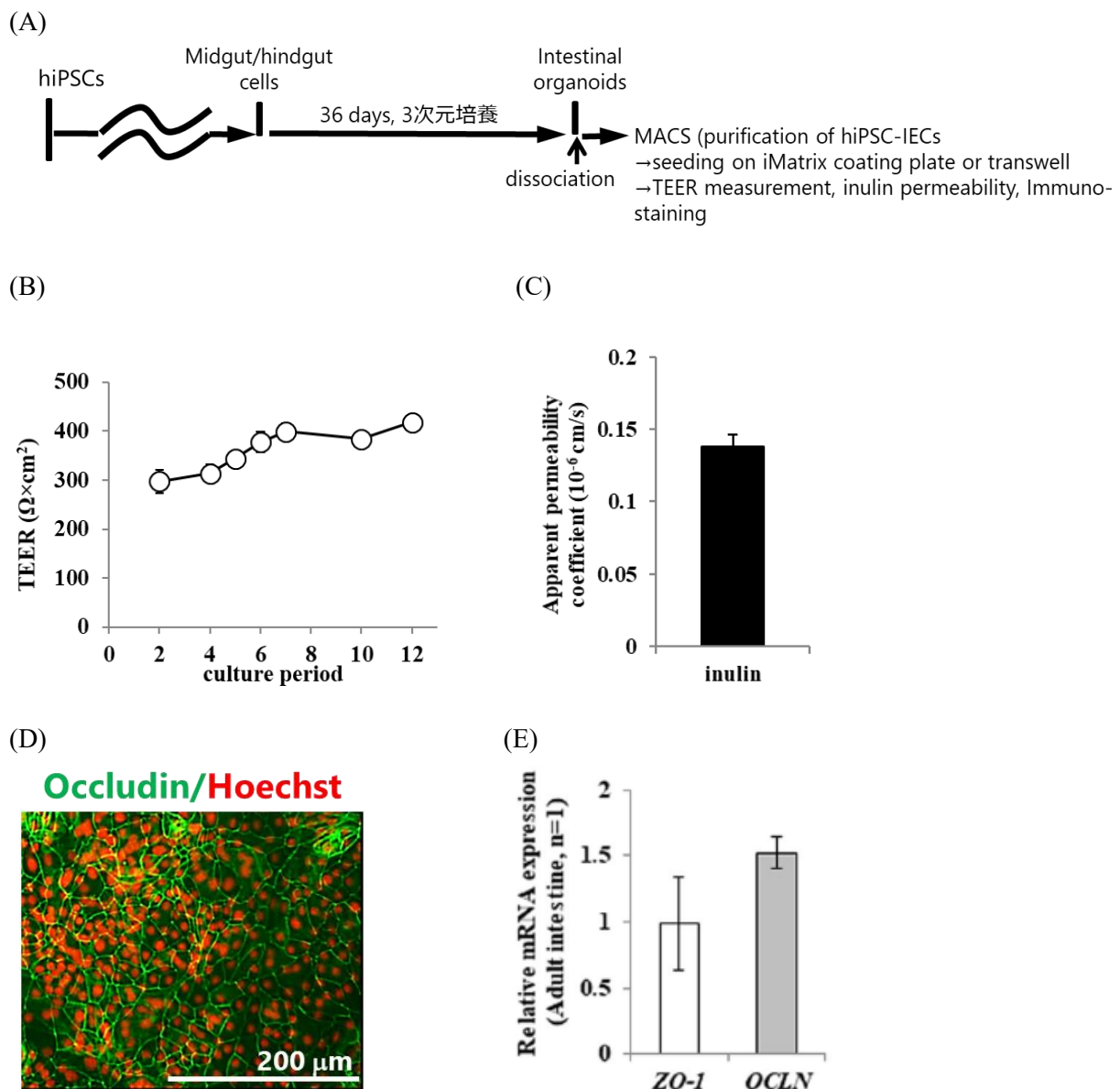
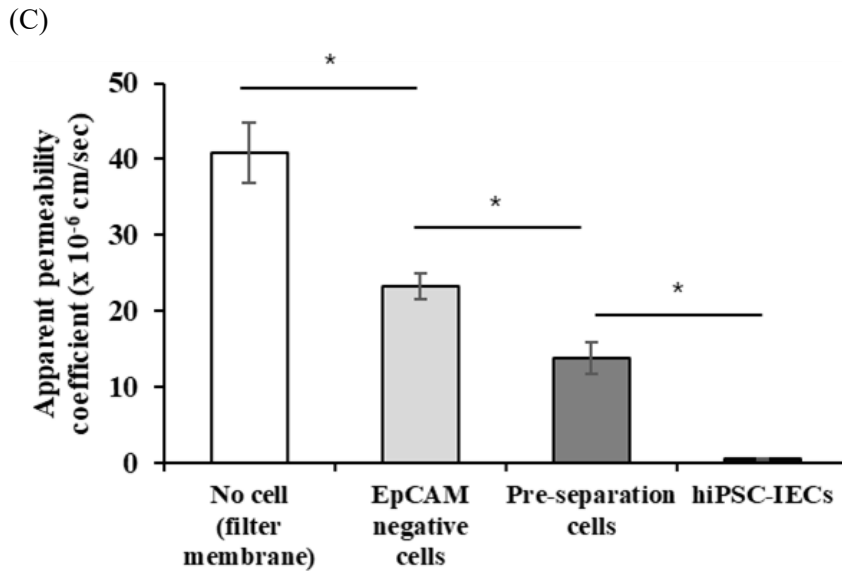
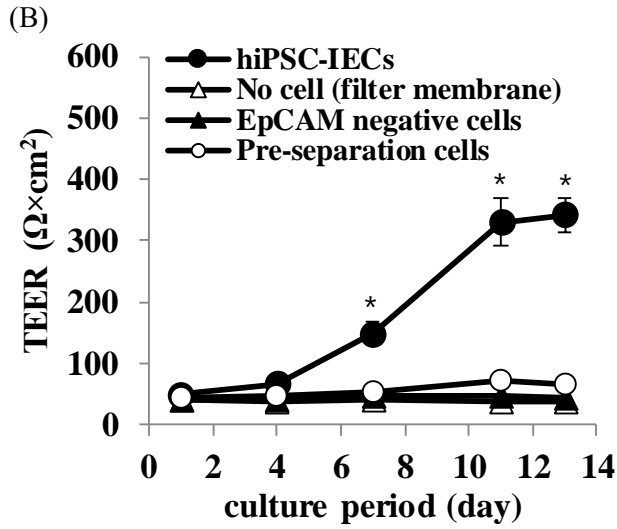
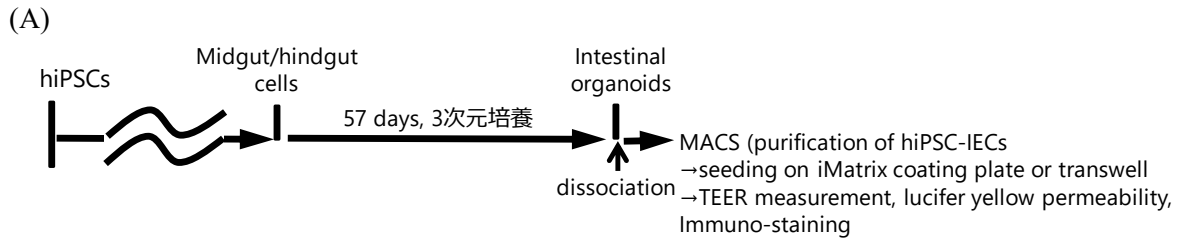


Figure 2-10: Functional characterization of hiPSC-IECs. (A) A schematic drawing of the assay procedure. (B) The TEER values in the hiPSC-IECs at each culture day after seeding on iMatrix-coating Transwell inserts. Data are presented as means \pm S.D. (n = 4). * $p < 0.01$. (C) The apparent permeability coefficient (P_{app}) of paracellular marker inulin in hiPSC-IEC monolayer after seeding on iMatrix-coating Transwell inserts. Data are presented as means \pm S.D. (n = 3). Permeation assay was conducted on day 13 after seeding. (D) Immunostaining image of Occludin in hiPSC-IEC monolayer after seeding on iMatrix-coating culture plates at day 6. (E) Tight-junction maker (*OCLN* and *ZO-1*) gene expressions in hiPSC-IECs (n = 3).



(D)

ZO-1/Hoechst

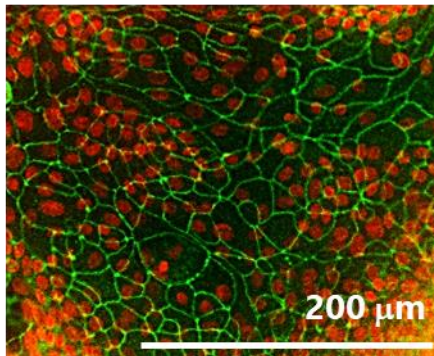


Figure 2-11: Functional characterization of hiPSC-IECs. (A) A schematic drawing of the assay procedure. (B) TEER values in the filter membrane without cells, EpCAM negative cells (negative fraction after MACS), pre-separation cells, and hiPSC-IECs at each culture day after seeding on iMatrix coating Transwell inserts. Data are presented as means \pm S.D. ($n = 4$). * $p < 0.01$ versus the pre-separation cells. (C) The apparent permeability coefficient (P_{app}) of a paracellular marker lucifer yellow in the filter membrane without cells, EpCAM negative cells, the pre-separation cells, and hiPSC-IECs at day 13 post-seeding on iMatrix coating Transwell inserts. Data are presented as means \pm S.D. ($n = 4$). * $p < 0.01$. (D) Immunostaining image of ZO-1 in hiPSC-IEC monolayer after seeding on a culture plate at day 4. Statistical significance was determined by two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test.

Figure 2-11 was using the hiPSC-IECs differentiated under a modified protocol, in which part of recombinant proteins (Wnt3a, noggin) are replaced with small molecular compounds (3 μ M CHIR99021, 100 nM LDN193189) and excluded (FGF4).

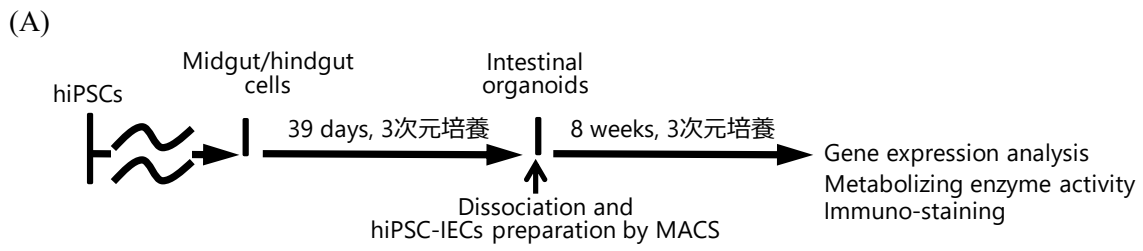
2.2.3 ヒト iPS 細胞由来小腸細胞の長期培養の検討

化合物のヒト経口吸収性評価の時期から逆算して、ヒト iPS 細胞から小腸細胞を準備することは、使い勝手が悪い。そこで、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞の長期培養の検討を行った。

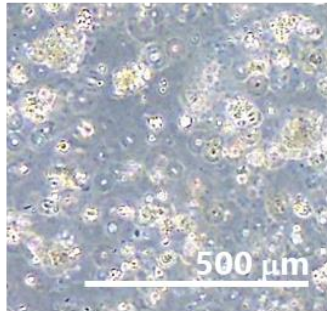
培地には、ヒト小腸細胞や結腸細胞の培養に有用と報告されている因子 (N-acetylcysteine, human gastrin I, A-83-01, R-spondin1, noggin, EGF) [23] をサプリメントとして加えた培地を用いた (Figure 2-12-A)。その結果、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞をマトリゲルに包埋した 3 次元培養により、8 週間のオルガノイド培養が可能であった (Figure 2-12-B)。次に、8 週間の培養後、CYP3A 及び 2J2 酵素の典型的基質である terfenadine、CYP3A 酵素の典型的基質である midazolam に対する代謝反応を評価した結果、それぞれの酸化代謝物 (hydroxyl-terfenadine, hydroxyl-midazolam) の生成が確認された (Figure 2-12-C, D)。Terfenadine は長期培養前とほぼ同程度の代謝物量が確認され、midazolam は評価濃度を 20 倍、また評価細胞数を 2 倍に上げたことで長期培養前よりも代謝物の生成量は上がったものの、評価濃度及び細胞数で補正した場合には約半分の代謝物量であった (Figure 7-B, 10-C, D)。また、CYP3A 選択的な阻害剤である ketoconazole (10 μ M) を加えた時の midazolam の代謝物量は control に比べて有意に低下した (Figure 2-12-D)。

続いて、8 週間培養後のヒト iPS 細胞由来小腸細胞について免疫細胞染色を行った結果、8 週間培養後においてもタイトジャンクション構成タンパク Occludin 及び ZO-1 の発現が確認された (Figure 2-12-E)。

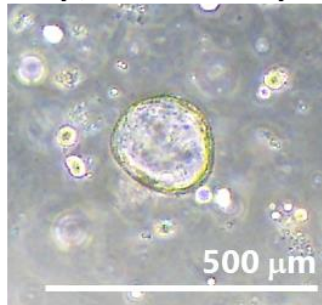
以上の結果から、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞は、小腸に特徴的な機能である薬物代謝活性及びタイトジャンクションによるバリア機能が維持された状態で、8 週間の長期培養が可能であることが示唆された。



(B)
 純化後単分散播種D0
 (明視野細胞像)



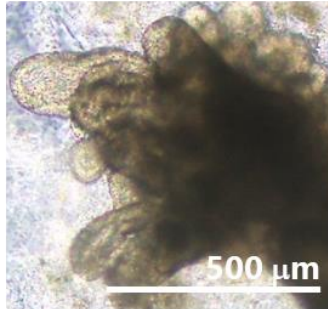
D4(明視野細胞像)



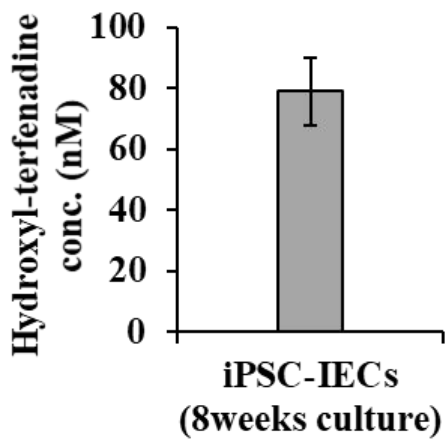
D13(明視野細胞像)



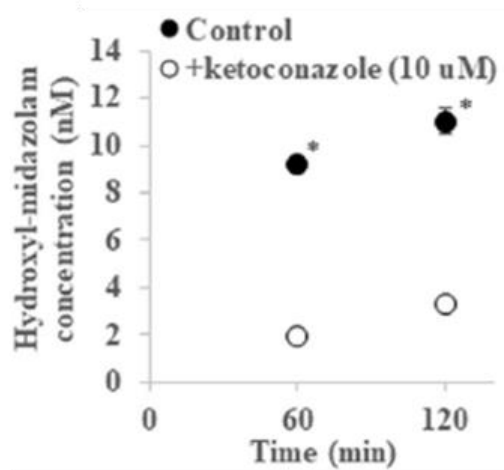
D54(明視野細胞像)



(C)



(D)



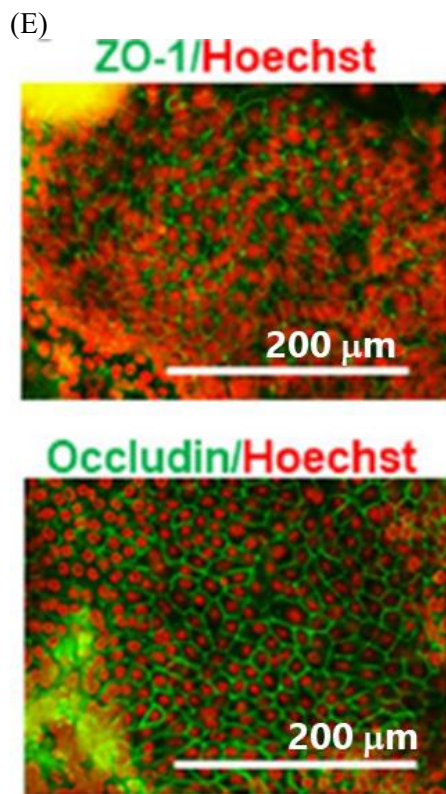


Figure 2-12: Development of long-term culture method of hiPSCs-IECs. (A) A schematic procedure for long-term culture of hiPSCs-IECs. (B) Bright field images of hiPSC-IECs on days 0, 4, 13 and 54 after purification are shown. (C) Drug metabolizing enzyme activity for terfenadine in 8 weeks-cultured iPSC-IECs. Data are presented as means \pm S.D. (n = 3). (D) Drug metabolic activity for midazolam in 8 weeks-cultured iPSC-IECs. Data are presented as means \pm S.D. (n = 3). * p < 0.01 versus the reaction with 10 μ M ketoconazole. (E) Immuno-staining images of Occludin and ZO-1 in 8 weeks-cultured hiPSC-IEC monolayer after seeding on iMatrix coating culture plates. Statistical analysis was determined by two-tailed unpaired Student's t-test.

2.3 小括

本章では、まずヒト iPS 細胞として TkDA3-4 を用い、3 次元培養によるヒト iPS 細胞から小腸オルガノイドへの分化誘導を検討した。多能性幹細胞から目的の組織細胞へと分化させる場合、生体における分化、例えば小腸細胞においては内部細胞塊から 3 胚葉の内の内胚葉への分化、内胚葉の後方化を促し中腸/後腸 (小腸前駆細胞) への分化、小腸前駆細胞から小腸細胞への成熟化といった過程が想定される [26]。TGF- β ファミリーである activin A は Nodal シグナルを活性化し、多能性幹細胞から内胚葉への分化を促す作用が報告されていることから [24]、ヒト iPS 細胞を 100 ng/mL の activin A を添加した培地で 3 日間分化させた。その結果、内胚葉マーカー SOX17 及び FOXA2 を発現する内胚葉への分化を確認した。次に、Wnt3a [26][34]、FGF4 [25][26] は内胚葉の後方化 (小腸前駆細胞への分化) を促す作用が報告されていることから、内胚葉を 500 ng/mL の Wnt3a と 500 ng/mL の FGF4 を添加した培地で 4 日間分化させた。その結果、小腸前駆細胞マーカー CDX2 を発現する小腸前駆細胞への分化を確認した。小腸幹細胞マーカー LGR5 のリガンドで小腸幹細胞の維持に重要な Wnt シグナルを活性化する R-spondin1、小腸陰窩の維持に重要な BMP シグナル阻害作用を示す noggin、小腸幹細胞の増殖に重要な EGF を添加した培地、並びに小腸基底膜に含まれるラミニン及びコラーゲンが豊富なマトリゲルを用いた 3 次元培養法は、マウスやヒトの小腸幹細胞の培養 [19][20][23] や CDX2 陽性の小腸前駆細胞から小腸細胞への成熟化 [26] に有用であることが報告されている。そこで、小腸前駆細胞をマトリゲルに包埋し、500 ng/mL の R-spondin1、100 ng/mL の noggin、100 ng/mL の EGF を添加した培地で 28 日以上培養することで、吸収細胞 (Villin)、杯細胞 (Mucin)、分泌細胞 (Chromogranin A)、パネート細胞 (Lysozyme)、分化が少し進んだ TA 細胞 (EphB2) などの各種小腸細胞で構成される小腸オルガノイドへの成熟化を確認した。

作製したヒト iPS 細胞由来小腸オルガノイドについて、免疫細胞染色を行った結果、小腸オルガノイドには Vimentin 陽性の間質細胞が多く含まれており、これは中胚葉由来の間質細胞と推察された [26]。この間質細胞は、内胚葉の後方化及び小腸幹細胞の維持に重要と考え

られる [26][34]。一方で、医薬品のヒト経口吸収性の評価において必須である、単層膜のタイトジャンクションによるバリア機能に対しては負の影響が考えられるため、次に、小腸オルガノイドから小腸細胞を純化する方法を検討した。小腸細胞は上皮細胞であることから、上皮細胞特異的に発現する表面抗原 EpCAM (CD326) [35][36] を指標に、小腸オルガノイドを単分散した細胞を用いて MACS を行った。その結果、MACS 前は EpCAM 陽性細胞の割合が約 60%であったのに対し、MACS によって回収した細胞では EpCAM 陽性細胞の割合が約 95%と大きく向上した。この結果から、MACS により高効率に EpCAM 陽性の上皮細胞をソーティングできることが分かった。また、純化した EpCAM 陽性の上皮細胞について免疫細胞染色を行った結果、大部分が Villin 陽性の吸収細胞であったことから、ヒト iPS 細胞由来小腸オルガノイドから小腸細胞を高効率に純化できることが分かった。MACS 前の小腸細胞と間質細胞が含まれるヘテロな細胞で作製した単層膜では、細胞が播種されていない時と同様に、TEER が低く、lucifer yellow の透過性が高かったことから、ヒト iPS 細胞由来小腸オルガノイドを用いてヒト経口吸収性の *in vitro* 評価モデルを作製するには、小腸細胞を純化する必要があると考えられた。

医薬品のヒト経口吸収性を評価する上で、小腸からの吸収性を制御している、薬物代謝活性並びにタイトジャンクションによるバリア機能を有していることは重要である。そこで、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞におけるこれらの機能を評価した。ヒト小腸における主な薬物代謝酵素である CYP3A 及び CYP2J2 酵素の基質薬物である terfenadine、CYP3A の基質薬物である midazolam に対する代謝反応を評価した結果、それぞれの酸化代謝物の生成が確認されたことから、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞は CYP3A 及び CYP2J2 酵素活性を有していると考えられた。また、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞を Transwell に播種し作製した単層膜を用いて、タイトジャンクションの指標として広く用いられている TEER、細胞間隙マーカー inulin 及び lucifer yellow の膜透過性、タイトジャンクション構成タンパク質である Occludin 及び ZO-1 の発現を評価した。その結果、Transwell 播種後 D12-D13 における TEER は約 $400 \Omega \times \text{cm}^2$ と高い TEER を示した。また、Transwell 播種後 D13 における Inulin、lucifer yellow の膜透過係数

P_{app} はそれぞれ 0.138×10^{-6} cm/sec、 0.624×10^{-6} cm/sec と低い膜透過性を示した [3][4]。さらに、細胞膜において Occludin 及び ZO-1 の発現が確認されたことから、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞はタイトジャンクションを形成し、小腸に特徴的なバリア機能を有していると考えられた。

以上の結果から、3次元培養によって分化誘導し、作製したヒト iPS 細胞由来小腸細胞は医薬品のヒトにおける経口吸収性を評価するための新規 *in vitro* 小腸モデルとして有用と考えられる。なお、経口吸収性を制御する機能として、薬物の経細胞輸送に関与する薬物トランスポーター (P-gp, BCRP, PEPT1) 活性も挙げられるが [38]、他の研究において、本細胞はこれら薬物トランスポーターによる輸送活性を有していることを確認している [39]。

創薬への活用を想定した場合、ヒト経口吸収性評価の時期から逆算して、ヒト iPS 細胞から小腸細胞を準備することは、使い勝手が悪い。長期間培養が可能であれば、評価時期とずらした細胞の調製が可能となる。また、培養可能であれば得られる細胞数が増え、評価薬物数を増やせる可能性もある。そこで本章の最後に、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞の長期培養の検討を行った。ヒト小腸及び結腸細胞の培養に有用と報告されているサプリメント (N-acetylcysteine, human gastrin I, A-83-01, R-spondin1, noggin, EGF) 並びにマトリゲルによる3次元培養 [20][23] を用いて長期培養を検討した結果、8週間のオルガノイド培養が可能であることを確認した。また、terfenadine 及び midazolam に対する代謝反応を評価した結果、8週間培養後においても長期培養前と同程度の CYP3A 及び CYP2J2 活性があると考えられた。さらに、8週間培養後の小腸細胞の細胞膜においてもタイトジャンクション構成タンパクの Occludin 及び ZO-1 の発現を確認した。以上の結果から、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞は長期間の培養が可能であることが示唆された。

第 3 章

2 次元培養法を用いたヒト iPS 細胞由来小腸細胞の作製

第 2 章において、3 次元培養法を用いた分化誘導により、ヒト iPS 細胞 (TkDA3-4) から小腸オルガノイドへの分化を確認できた。また、小腸オルガノイドから純化したヒト iPS 細胞由来小腸細胞の機能解析を行った結果、小腸に主な薬物代謝酵素である CYP3A 及び CYP2J2 酵素の活性を有し、本小腸細胞の単層膜はタイトジャンクションによるバリア機能を有することが確認できたことから、医薬品のヒト経口吸収性を評価する *in vitro* 小腸モデルとして有用と考えられた。しかし一方で、高価なサプリメントを長期間使用すること、3 次元培養を行うために培養操作が煩雑であること、分化誘導期間が 35 日以上かつ膜透過性評価までおよそ 10 日間要することなど、創薬への活用を考慮した場合に、改善が期待される点も見受けられる。また、他の研究グループから報告されている 2 次元培養での分化誘導法においては、機能的解析が不十分であること、分化効率が不明瞭であること、2 度の遺伝子導入を行うことから分化誘導操作が煩雑なことなど、創薬に活用する上で課題があると考えられる。

当研究グループではこれまでに、ヒト iPS 細胞の維持培地からメチオニンを一過性に除去することで分化誘導効率を向上できること [40]、M15 フィーダー細胞を用いることで内胚葉への分化効率を向上できること [41]、BIO (Wnt シグナルの活性化) と DAPT (notch シグナルの抑制) による内胚葉から小腸前駆細胞への分化誘導並びに小腸細胞への成熟化効果 [16][17]、Collagen Vitrigel Membrane (CVM) による前駆細胞の成熟化をサポートする効果 [15] を見出している。そこで、これら知見を活用し、創薬で活用する上での課題を解決しうる、短い分化誘導期間、並びに簡便な培養操作でのヒト iPS 細胞由来小腸細胞への分化誘導法の確立を目指し、検討を行った。

実験材料及び方法

試薬

Elacridar, verapamil, midazolam は Wako Pure Chemical (Tokyo, Japan)、 ^3H -digoxin, ^3H -prazosin, ^3H -propranolol, ^3H -mannitol は PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA, USA)、Digoxin, testosterone, ketoconazole, 6β -hydroxytestosterone, diclofenac, ranitidine, famotidine, sulpiride, nadolol, and sulfasalazine は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)、antipyrine, metoprolol, hydrochlorothiazide, fexofenadine は Wako Pure Chemical、Atenolol は LKT Laboratories (St. Paul, MN, USA)、acyclovir は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) から購入し、使用した。

Human iPS cell lines

ヒト iPS 細胞株は、ChiPS18 cells [42] (Takara Bio, Kusatsu, Japan), RPChiPS771 cells (ReproCell, Yokohama, Japan) を使用した。維持培地には AK02N StemFit media (Ajinomoto, Tokyo, Japan) を用い、Synthemax II (Corning, Corning, NY, USA) でコーティングしたディッシュ上に播種した。メチオニンを一過性に除去する場合は、Methionine-deprived KA01 培地 (Ajinomoto) を用いた。

ヒト iPS 細胞から小腸細胞への分化誘導法

予め 100 mm ディッシュに mitomycin 処置した M15 フィーダー細胞を 5×10^6 cells/dish の細胞数で播種しておき、その上にヒト iPS 細胞を 5×10^5 cells/dish の細胞数で播種した。その後、M1 培地 [DMEM (ThermoFisher, Waltham, MA, USA, 11995-073), 4,500 mg/L glucose, Non-essential amino acids (NEAA; ThermoFisher, 11140050), L-glutamine (Gln; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan, 16948-04), penicillin-streptomycin (PS; Nacalai Tesque, 26252-94), 0.1 mM β -mercaptoethanol (β -ME, Sigma-Aldrich), serum-free B27 supplement (ThermoFisher, 17504044), 100 ng/mL recombinant human activin A (Cell Guidance Systems, Cambridge, UK, GFH6) with 3 μM CHIR99021 (Wako) for 1 day, without CHIR99021 for another 2 days] を用いて 3 日間培養 (day 3, D3) するこ

とで、内胚葉へと分化誘導を行った。内胚葉を単分散後、プレートに播種して引き続き分化誘導を継続、あるいは 2.0×10^6 cells/ml の細胞濃度で Bambanker hRM (NIPPON Genetics, Tokyo, Japan, CS-07-001) あるいは STEM-CELLBANKER (Takara Bio, Kusatsu, Japan, CB045) を用いて液体窒素下で凍結保存した。

続いて、内胚葉を 24 well CVM inserts (ad-MED Vitrigel^{TM2}, Kanto Chemical Co., Inc.) 上に 8×10^4 cells/well の細胞数で播種し、M2 培地 [DMEM (ThermoFisher, 11885-084, low glucose), supplemented with NEAA, L-Gln, PS, β -ME, 2000 mg/L D-Glucose, 10% KnockOutTM Serum Replacement (KSR; ThermoFisher, 10828028), 5 μ M 6-Bromoindirubin-3'-oxime (BIO; WAKO, 029-16241), 10 μ M 3,5-difluorophenylacetyl)-L-alanyl-L-2-phenylglycine tert-butyl ester (DAPT; WAKO, 049-33583)] で 12 日間培養 (D4-D15) することで小腸前駆細胞へと分化誘導を行った。その後、M3-0 培地 [Cellartis[®] Hepatocyte Maintenance Medium (Takara Bio, Y30051)]、又は M3-1 培地 [William's E medium (ThermoFisher, A1217601) supplemented with L-Glu, HCM SingleQuots (without GA1000 and human Epithelial growth factor (EGF) (Lonza, Basel, Switzerland, CC-4182), PS (Nacalai tesque), 10 ng/ml recombinant human Hepatocyte growth factor (HGF; PeproTech, Rocky hill, NJ, USA, 100-39), 0.1 μ M Dexamethasone (Sigma-Aldrich, D8893), 1.4 μ M BIO and 1 μ M $1\alpha,25$ -dihydroxy vitamin D3 (calcitriol, 活性型 VD3; Wako, 034-24921)]、あるいは M3-2 培地 [M3-1 培地から HGF を除き、0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, D2650) を添加] を用いて培養することで、小腸細胞への成熟化を行った。

また別の方法として、内胚葉を iMatrix-551 silk (Matrixome, Osaka, Japan, 892-021) で $0.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度でコーティングした 100 mm ディッシュ上に 4×10^6 cells/dish の細胞数で播種し、M2 培地を用いて 7 日間培養 (D4-D10) することで小腸前駆細胞への分化誘導を行った。その後、小腸前駆細胞をカルチャープレートに播種して引き続き分化誘導を継続、あるいは Bambanker hRM 又は STEM-CELLBANKER を用いて液体窒素下で凍結保存した。

続いて、小腸前駆細胞を 24 well CVM inserts に 1.6×10^5 cells/well の細胞数で播種し、M2 培地 (播種後 2 日間は 10 μ M Y-27632 を添加) を用いて 5 日間 (D11-D15)、以後は M3-1 培地あ

るいは M3-2 培地を用いて培養することで、小腸細胞への成熟化を行った。なお、insert chamber (apical 側) には 200 μ L、lower chamber (basolateral 側) には 500 μ L の培地を添加し、2 日間間隔で培地を交換した。

Caco-2 細胞の培養法

Caco-2 細胞は DMEM medium (low glucose) に 10% FBS をサプリメントとして加えた培地を用いて培養した。単層膜のタイトジャンクションによるバリア機能を評価する際は、Caco-2 細胞を 24 well CVM inserts に 5.0×10^4 cells/well の細胞数で播種した。およそ播種 7 日目には単層膜を形成した。

免疫細胞染色操作

4% paraformaldehyde (Nacalai Tesque) in PBS で細胞固定後、0.1% Triton X-100 (Nacalai Tesque) で透過処理を行った。抗体は以下のものを使用した：anti-CDX2 (1:100, BioGenex, San Ramon, CA, MU392A-UC), anti-VILLIN (1:100, BD Transduction Laboratories, San Diego, 610359), Alexa 568-conjugated, and Alexa 488-conjugated antibodies (1:1000, ThermoFisher)。

Real-time PCR

RNA は RNeasy micro-kit あるいは QIAzol (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて抽出し、その後 DNase (Qiagen) 処理を行った。逆転写反応は、PrimeScript™ RT Master Mix (Takara Bio) を用いて行った。Real-time PCR は、TaqMan Primers and Probe あるいは SYBR Green を用いて、StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) により行った。 β -ACTIN あるいは GAPDH を内部標準とした。mRNA 遺伝子発現量は、ヒト成人小腸 (ASI; ASI=1) に対する fold-change で表記し、ヒト小腸 RNA は正常ヒト成人小腸 [Takara Bio, 63653, Lot No. 1012049A (Figure 3-1, 3-3-B-i), Lot. No. 1901903A (Figure 3-3-B-ii), 4, pooled from 5 male/female Caucasians ages ranged from 20 to 61]。なお、両ロットで遺伝子発現量に有意な差はないことを確認して

いる。プライマーは以下の遺伝子配列及び ID のものを使用した (Table 3-1)。

Gene Symbol	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence
<i>GAPDH</i>	CGAGATCCCTCCAAAATCAA	CATGAGTCCTTCCACGATACCAA
<i>CDX2</i>	GAGGGGGTGGTTATTGGACT	AGGAAGTCCAGGTTGGCTCT
<i>LGR5</i>	CTCTTCCTCAAACCGTCTGC	GCAACTGCTGGAAAGTGCA
<i>ABCB1</i>	CTTATGCTCTGGCCTTCTGG	GGAGATGCCTGTCCAACACT
<i>ABCG2</i>	TTAAGTGAAACTGCTGCTTTAGAGT	TCGGTCTTAACCAAAGGCTCA
<i>SLC15A1</i>	GCAATATCATTGTGCTCATCGT	CAATCTCTGCTGGGTTGATGT
Gene Symbol	TaqMan Primers and Probe ID*	
<i>GAPDH</i>	Hs02758991_g1	
<i>VILLIN</i>	Hs01031724_m1	
<i>CYP2C9</i>	Hs00426397_m1	
<i>CYP2C19</i>	Hs00426380_m1	
<i>CYP3A4</i>	Hs00430021_m1	

*ABI Expression Assay

B) Primer sequences used in Figure 1, 3, 4 and S3.

Gene Symbol	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence
<i>LGR5</i>	TAAGTGGAACTGCAAACCTGGAGA	CTGATTGCAGACGGTTTGAGGA
<i>CDX2</i>	TCACTGGGCATTTCCGTGAG	GTGGATCGGCCAGATAACAAGA
<i>VILLIN</i>	CGACTGCTACCTGCTGCTCTACAC	CGGCTTGATAAGCTGATGCTGTAA
<i>CYP2B6</i>	CCAGCTTCCGAGGGTACATCA	TTCAAAGTAGTGTGGGTCATGGAGA
<i>CYP2C9</i>	AACACTGCAGTTGACTTGTGGAG	GGTTTCTGCCAATCACACGTTT
<i>CYP2C19</i>	AATCACTGCAGCTGACTTACTTGGAA	CCGGTTTCTGCCAATGACAC
<i>CYP3A4</i>	GAAACACAGATCCCCCTGAA	CTGGTGTTCAGGCACAGA
<i>CYP3A7</i>	AAGGTCGCCTCAAAGAGACA	TGCACTTTCTGCTGGACATC
<i>UGT1A1</i>	TGGCTGTTCCCACTTACTGCAC	AGGGTCCGTGAGCATGACATC
<i>ABCB1</i>	GGAGCCTACTTGGTGGCACATAA	TGGCATAGTCAGGAGCAAATGAAC
<i>ABCG2</i>	CATGGTGTATAGACGCCCTGAC	GTTCCCAAATTGATGTTGTGACAGA
<i>SLC15A1</i>	TCACCTGTGGCGAAGTGCTC	AGCAGCCATCCTGCCTGAA
<i>ALPI</i>	CATTCCAGGTCACCAGATCCA	AGAAATCTATGCCCAGCATCCAG
<i>ACTB</i>	TGGCACCCAGCACAATGAA	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA
<i>GAPDH</i>	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGA

Table 3-1: プライマーの遺伝子配列及び Taqman primers and Probe ID

TEER 測定

TEER は Millicell ERS-2 (Epithelial Volt-Ohm Meter, Millipore) を用いて測定した。

薬物トランスポーターによる輸送評価及び CYP3A 活性評価 (Figure 3-2)

P-gp 及び BCRP による輸送活性の評価については、Basal-to-Apical (B to A, 排泄方向) 及び Apical-to-Basal (A to B, 吸収方向) 方向の膜透過性を評価することで行った。典型的 P-gp 基質の [³H]-digoxin (0.1 μCi/3mL; 比放射能 26.3Ci/mmol) を用い、典型的 P-gp 阻害薬の verapamil (100 μM) の存在下及び非存在下での膜透過性を評価した。BCRP/P-gp 活性の評価では、典型的 BCRP/P-gp 基質の [³H]-prazosin (0.1 μCi/3mL; 比放射能 85.3Ci/mmol) を用い、典型的 BCRP/P-gp 阻害剤の elacridar (20 μM) の存在下及び非存在下での膜透過性を評価した。経細胞透過性は、高膜透過性薬物の [³H]-propranolol (0.1 μCi/3mL; 比放射能 25.0Ci/mmol)、細胞間隙の透過性は、水溶性低膜透過性化合物の [³H]-mannitol (0.1 μCi/3mL; 比放射能 24.7Ci/mmol) をそれぞれ用いて評価した。培地を吸引除去後、transport buffer (TB; 118 mM NaCl, 23.8 mM NaHCO₃, 4.8 mM KCl, 1.0 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 12.5 mM HEPES, 5 mM glucose and 1.5 mM CaCl₂, pH7.4) を添加し、37°C で 10 分間プレインキュベーションを行った。各種評価化合物を加えた TB を添加することで、反応を開始した。Apical 側 (insert) には 200 μL、basal 側には 500 μL 添加した。反応時間は 30-120 分間、基質添加側とは逆側から所定の時間にサンプリングし、その後サンプリングした量と等量の TB を添加した。すなわち、A to B 方向の膜透過性評価では、basal 側から 100 μL、B to A 方向の膜透過性評価では、apical 側から 50 μL サンプリングした。サンプリングした試料には CLEAR-SOL I (Nacalai Tesque) を添加し、液体シンチレーションカウンタ (PerkinElmer) により放射能を測定した。また同様の操作により CYP3A 代謝活性評価を行い、典型的 CYP3A 基質の midazolam (10 μM) と 37°C で 2 時間反応させた後に、主代謝物である 1'-OH midazolam を LC-MS/MS (Shimadzu Prominence Ultra-Fast Liquid Chromatography/ABSciex QTRAP 5500) を用いて定量した。

アルカリフォスファターゼ (Alkaline phosphatase, ALP) 活性評価

細胞を固定後、StemTAG Alkaline phosphatase staining and activity assay kit (Cell Biolabs, Inc, San Diego, CA, USA) を用いて ALP 染色を行った。

薬物の膜透過性評価

Transport buffer は Hanks' Balanced Salt Solutions (HBSS, ThermoFisher, 4025092) に 5% FBS を添加したものをを用いた。各薬物 (2 あるいは 5 μM) を加えた TB を添加することで反応を開始した。膜透過性は 37°C で 2 時間インキュベートすることで評価した。

試料中化合物濃度は LC-MS/MS system: Nexera UHPLC (Shimadzu, Kyoto, LC instrument 1) and a Triple Quad 6500 Plus system (AB SCIEX, Tokyo, MS instrument 1) により測定した。HPLC カラムは CAPCELL PAK ADME (2.1 mm I.D. \times 50 mm, 3 mm, OSAKA SODA, Osaka, column 1) を使用した。各化合物の LC-MS/MS による測定は以下の条件で実施し (Table 3-2)、イオンは multiple reaction monitoring modes によりモニターした。

Compound	Instrument (LC, MS)	Column	LC condition				MS condition			
			Mobile phase		Gradient condition % B/min	Flow rate mL / min	cone voltage V	collision energy eV	Monitoring ion (m / z)	
			A	B					precursor	product
antipyrine	1, 1	1	0.1% HCOOH in water	acetonitrile	20-95-95-20 /0-0.50-0.90-0.91-1.10	1.0	12	51	189.1	56.1
propranolol	1, 1	1	0.1% HCOOH in water	acetonitrile	20-95-95-20 /0-0.50-0.90-0.91-1.10	1.0	100	25	260.2	183.1
metoprolol	1, 1	1	0.1% HCOOH in water	acetonitrile	20-95-95-20 /0-0.50-0.90-0.91-1.10	1.0	40	25	268.1	116.0
diclofenac	1, 1	1	0.1% HCOOH in water	acetonitrile	20-95-95-20 /0-0.50-0.90-0.91-1.10	1.0	34	50	296.0	214.1
digoxin	1, 1	1	0.1% HCOOH in water	acetonitrile	20-95-95-20 /0-0.50-0.90-0.91-1.10	1.0	194	22	781.6	651.4
hydrochlorothiazide	1, 1	1	0.1% HCOOH in water	acetonitrile	5-95-95-5 /0-0.50-0.70-0.71-0.9	1.0	-88	-27	295.9	268.9
atenolol	1, 1	1	0.1% HCOOH in water	acetonitrile	2-50-50-2 /0-0.50-0.70-0.71-0.9	1.0	51	26	267.2	190.1
famotidine	1, 1	1	0.1% HCOOH in water	acetonitrile	2-50-50-2 /0-0.50-0.70-0.71-0.9	1.0	32	27	338.0	189.0
sulpiride	1, 1	1	0.1% HCOOH in water	acetonitrile	2-50-50-2 /0-0.50-0.70-0.71-0.9	1.0	52	34	342.1	112.1
nadolol	1, 1	1	0.1% HCOOH in water	acetonitrile	2-50-50-2 /0-0.50-0.70-0.71-0.9	1.0	79	23	310.1	254.1
acyclovir	1, 1	1	0.1% HCOOH in water	acetonitrile	2-50-50-2 /0-0.50-0.70-0.71-0.9	1.0	27	18	226.0	152.0
ranitidine	1, 1	1	0.1% HCOOH in water	acetonitrile	5-95-95-5 /0-0.90-1.20-1.21-1.50	1.0	1	23	315.1	176.0
sulfasalazine	1, 1	1	0.1% HCOOH in water	acetonitrile	5-95-95-5 /0-0.90-1.20-1.21-1.50	1.0	84	40	399.1	223.1
fexofenadine	1, 1	1	0.1% HCOOH in water	acetonitrile	5-95-95-5 /0-0.90-1.20-1.21-1.50	1.0	112	38	502.3	466.3
testosterone	1, 1	1	0.1% HCOOH in water	acetonitrile	50-60-60-95-95-50 /0-0.40-0.90-0.91-1.1-1.11-1.4	1.0	80	28	289.1	97.0
6beta-hydroxytestosterone	1, 1	1	0.1% HCOOH in water	acetonitrile	30-50-50-95-95-30 /0-0.40-0.60-0.61-0.8-0.81-1.0	1.0	84	72	305.1	91.0
midazolam	1, 1	1	0.1% HCOOH in water	acetonitrile	30-50-50-95-95-30 /0-0.40-0.50-0.51-0.70-0.71-0.90	1.0	7	38	325.6	291.2
1-hydroxy midazolam	1, 1	1	0.1% HCOOH in water	acetonitrile	30-50-50-95-95-30 /0-0.40-0.50-0.51-0.70-0.71-0.90	1.0	130	37	341.6	202.8

Table 3-2: LC-MS/MS 測定条件

Apparent permeability coefficient (P_{app})の算出

膜透過係数 P_{app} は以下の式により算出した。

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0}$$

dQ/dt = the amount of the compound permeated per unit of time、 A = the surface area of insert membrane (0.33 cm²)、 C_0 = the initial compound concentration in the donor chamber

P_{app} とヒト小腸吸収率 F_a との相関性解析

P_{app} とヒト小腸における吸収率 (fraction absorbed, F_a , %) の相関性は以下の式 [43] により解析した。フィッティングは Phoenix WinNonlin (Ver. 8.1, Certara, L.P.) を用いた非線形最小二乗法により行った。

$$F_a = 100 \times (1 - \exp(-\alpha \times P_{app}))$$

α : the scaling factor

CYP3A 代謝活性評価 (Figure 3-4)

培地を吸引除去後、典型的 CYP3A 基質の midazolam (20 μ M) あるいは testosterone (50 μ M) を添加した TB を添加することで反応を開始した。阻害剤を入れる際は、TB 中に典型的 CYP3A 阻害薬の ketoconazole (Sigma-Aldrich) を 0.5 あるいは 5 μ M の濃度となるように添加した。Apical には 200 μ L、basal には 500 μ L 添加した。37°C で 30-120 分間インキュベート後、apical, basal 両側からサンプリングし、LC-MS/MS による分析まで -80°C で保管し、試料中の 1'-OH midazolam あるいは 6 β -OH testosterone を測定した。細胞のタンパク定量は、Pierce BCA protein assay kit (ThermoFisher) を用い、代謝クリアランスはタンパク量当たりで算出した。なお、反応時間 30 分で代謝反応がおおよそ飽和していると考えられたため、代謝クリアランス算出時の代謝速度は反応時間 30 分値を用いて算出した。

蛍光化合物 Rhodamine 123 の膜透過性評価

Rhodamine 123 (10 μ M; Dojindo, Kumamoto, Japan, R233) を P-gp 基質プローブとして使用し、P-gp 輸送活性を評価した。Rhodamine 123 の濃度は Luminometer (GloMax Microplate Luminometer, Promega) により測定した。Flux ratio は以下の式で算出した。

$$\text{Flux ratio} = \frac{P_{app, B \text{ to } A}}{P_{app, A \text{ to } B}}$$

統計解析

結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。有意差検定は Student's t-tests あるいは ANOVA multiple comparisons tests によって行った。解析の結果、P 値が <0.05, <0.01, <0.001 となった場合に有意差ありと判定した。

3.1 コラーゲンビトリゲル膜を用いた小腸細胞への成熟化検討

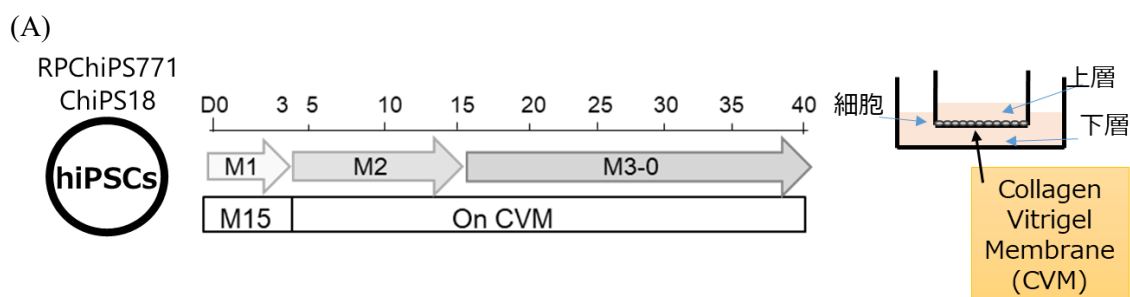
当研究室で積み上げてきた知見を組み合わせることで、ヒト iPS 細胞から小腸細胞へのより簡便な分化誘導法の検討を行った。具体的には、以下①～④の知見を用いた。①マウス中腎細胞である M15 フィーダー細胞は多能性幹細胞から内胚葉への分化をサポートする [41]、②iPS 細胞維持培地から一過性にメチオニンを除去することで内胚葉への分化を促進 [40]、③Wnt シグナルを活性化する BIO と notch シグナルを抑制する DAPT による内胚葉から小腸前駆細胞への分化誘導並びに小腸細胞への成熟化 [16][17]、④高密度のコラーゲンで形成され生体内の結合組織に近い構造を有する培養基材である Collagen vitrigel membrane (CVM) による前駆細胞の成熟化を促進 [15] (Figure 3-1-A)。

M15 フィーダー細胞、メチオニン除去培地及び activinA を用いて分化させた内胚葉 (day 3, D3) を CVM 上に単分散播種後、BIO と DAPT を添加した M2 培地 (D4-D15) を用いて培養した結果、D10 においてほぼすべての細胞が CDX2 を発現し、小腸前駆細胞への分化を確認した (Figure 3-1-B)。D16 より M3-0 培地を用いて培養した結果、D30 において、小腸微絨毛に発現する Villin が apical 側に高発現していることを確認した (Figure 3-1-C)。

次に、培養日数毎に小腸マーカー、薬物トランスポーター、薬物代謝酵素それぞれの遺伝子発現量解析をすることで、小腸前駆細胞から小腸細胞への成熟化の時期を見極める検討を行った。小腸幹細胞マーカー *LGR5* は D5 まで一過性に増加した後に減少した一方で、小腸マーカー *CDX2*, *Villin* はそれぞれ D10, D21 において最大となった後も維持した。薬物トランスポーター ATP-binding cassette family G member 2 (*ABCG2*, *BCRP*)、ATP-binding cassette family B member 1 (*ABCB1*, *MDR1*, *P-gp*)、solute carrier family 15 member 1 (*SLC15A1*, *PEPT1*) は D21 で最大となった後も維持した。薬物代謝酵素 *CYP2C9*, *CYP2C19* は D21 で最大となり、*CYP3A4* は D30 において最大となった後、それぞれ維持した (Figure 3-1-D)。また、小腸マーカー、薬物トランスポーター、薬物代謝酵素それぞれの遺伝子発現量は、ヒト成人小腸に類似していた。以上の結果より、D21 にはヒト小腸に類似した小腸細胞へと成熟化したと考えられ、短い分化期間、また CVM insert 上で誘導していることから再播種なしで小腸吸収性を評価する

ことができる、簡便な分化誘導法を開発できたと結論付けた。

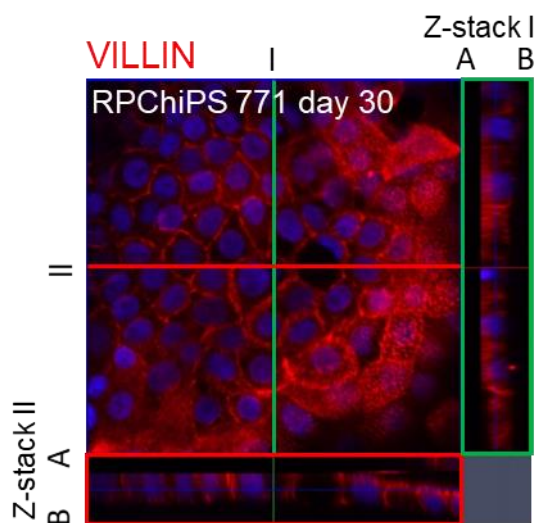
続いて、本誘導法が他のヒト iPS 細胞株 (ChiPS18 株) に応用可能であるかを評価した。具体的には、RPChiPSS771 株及び ChiPS18 株を用いて 21 日間分化誘導して作製した小腸細胞、培養 14 日目の Caco-2 細胞における遺伝子発現量を比較した。RPChiPSS771 株及び ChiPS18 株由来小腸細胞における小腸マーカー、薬物トランスポーター、薬物代謝酵素の遺伝子発現量はヒト成人小腸に類似していたことから、本誘導法は他のヒト iPS 細胞株にも応用可能であると考えられた。一方で、ChiPS18 株由来小腸細胞に比べて、RPChiPS771 株由来小腸細胞の方がヒト成人小腸の遺伝子発現量に類似していたことから、ヒト成人小腸には RPChiPS771 株由来小腸細胞がより類似している可能性が考えられた。また、薬物トランスポーター (*P-gp*, *BCRP*, *PEPT1*) 及び *CYP3A4* の遺伝子発現量が Caco-2 細胞よりもヒト iPS 細胞由来小腸細胞の方が高いことを確認した (Figure 3-1-E)。



(B)

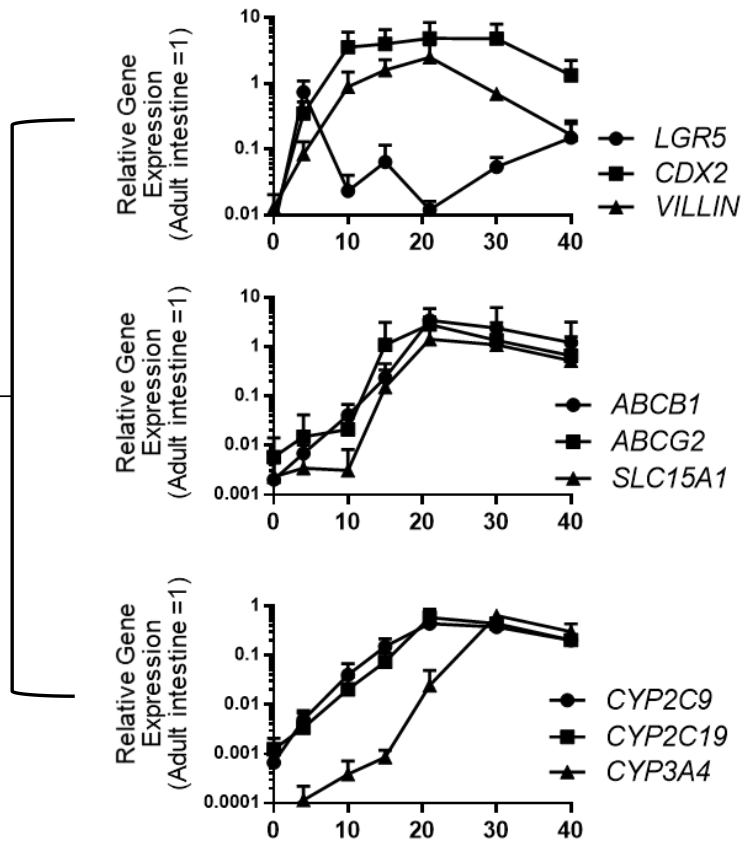


(C)



(D)

RPChIPS771
derived



(E)

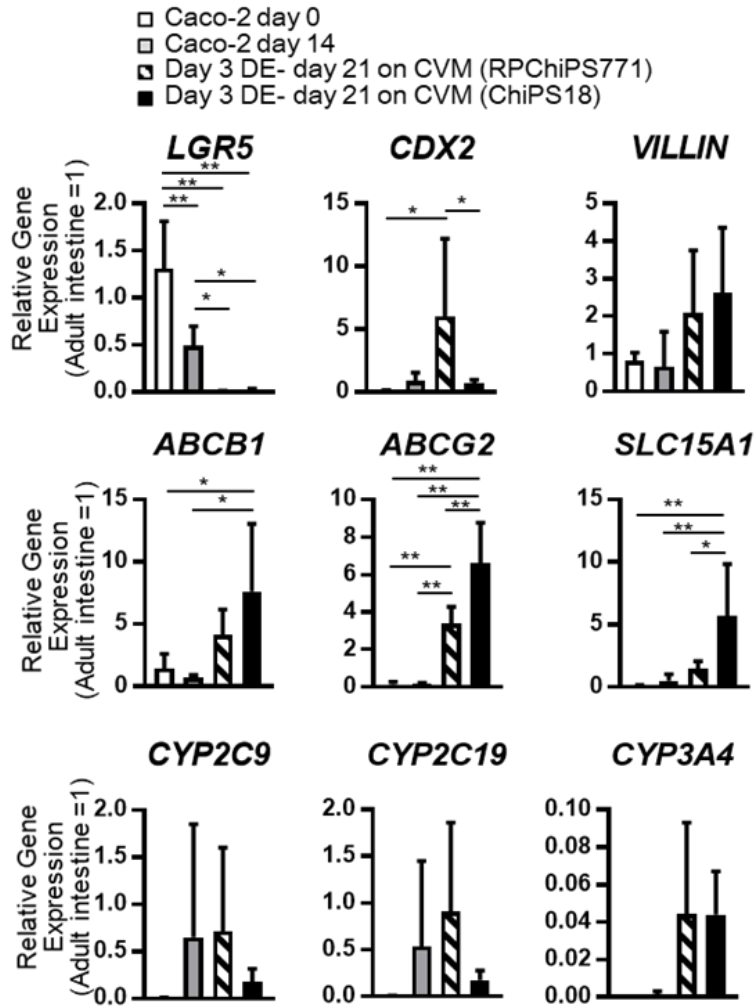


Figure 3-1. Collagen vitrigel membrane supports the differentiation of human iPSCs into intestinal cells expressing transporters and CYP enzymes.

(A) A schematic drawing of the differentiation procedure of hiPSCs to derive intestinal differentiation.

(B, C) Expression of an intestinal marker CDX2 (green) on day 10, an enterocyte marker VILLIN (red) expression is observed to localize in the apical side on day 30. I (green line) and II (red line) depict the cross-section along which the Z-stacks are compiled and showed in the box areas (C). (D)

Time-dependent expressions of *CDX2*, *VILLIN*, *LGR5* (an intestinal stem cell marker), *ABCB1* (transporter), *ABCG2* (transporter), *SLC15A1* (transporter), *CYP2C9* (enzyme), *CYP2C19* (enzyme),

and *CYP3A4* (enzyme). (E) hiPSC-derived enterocyte-like cells expressed higher levels of *CDX2*, *VILLIN*, *ABCB1*, *ABCG2*, *SLC15A1*, *CYP3A4* but lower levels of *LGR5* compared to that of the Caco-2 cells. Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=3; n, number of independent experiments). Relative values versus those of the adult intestine are shown. Differences between enterocyte-like cells derived from RPChiPS771 and ChiPS18 were analyzed by two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test, significances are shown as $*P < 0.05$ or $**P < 0.01$.

3.2 ヒト iPS 細胞由来小腸細胞の機能的解析

第1項において、排泄型薬物トランスポーター*P-gp*, *BCRP* について、ヒト成人小腸に類似の遺伝子発現量を確認したことから (Figure 3-1-E)、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞における *P-gp*, *BCRP* の輸送活性を評価した (Figure 3-2-A)。

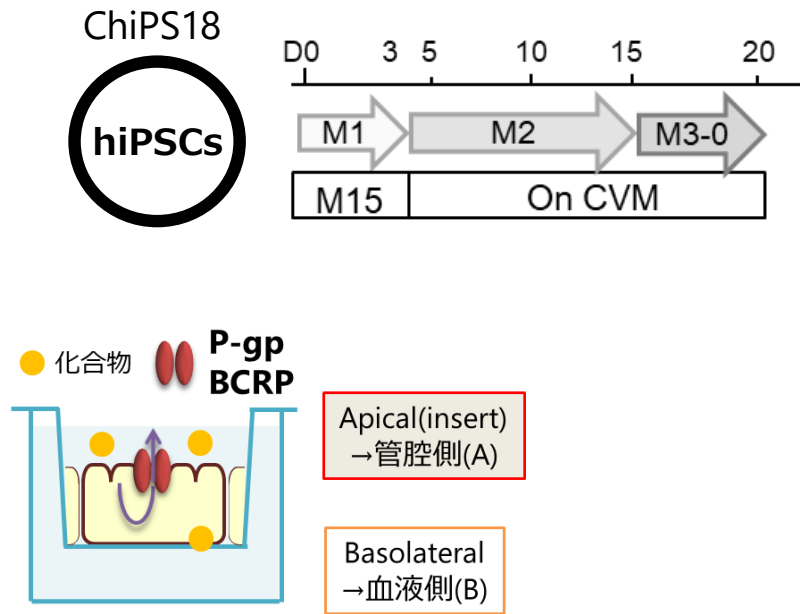
典型的 *P-gp* 基質である [³H]-digoxin において、basal-to-apical (B to A) の排泄方向への膜透過性 P_{app} が apical-to basal (A to B) の吸収方向への P_{app} に比べて高く、digoxin の方向性輸送、すなわち *P-gp* による排泄方向への輸送が確認できた (Figure 3-2-B)。また、*P-gp* の典型的阻害剤である 100 μ M verapamil 存在下において、B to A 方向の P_{app} と A to B 方向の P_{app} が同程度であり、digoxin の方向性輸送の消失、すなわち阻害剤により *P-gp* による輸送の減少が確認できた (Figure 3-2-B)。

典型的 *BCRP/P-gp* 基質である [³H]-prazosin において、B to A 方向への P_{app} が A to B 方向の P_{app} に比べて高く、prazosin の方向性輸送、すなわち *BCRP/P-gp* による排泄方向への輸送が確認された (Figure 3-2-C)。また、*BCRP/P-gp* の典型的阻害剤である 20 μ M elacridar 存在下において、B to A 方向への P_{app} が減少した一方で、A to B 方向への P_{app} は増加したことから、阻害剤により *BCRP/P-gp* による輸送の減少が確認できた。

以上の結果から、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞は *P-gp* 及び *BCRP* による排泄方向への薬物輸送活性を有することが示された (Figure 3-2-B, C)。なお、高膜透過性で経細胞透過マーカーの脂溶性薬物である [³H]-propranolol、また低膜透過性で細胞間隙透過マーカーの水溶性化合物である [³H]-mannitol の A to B 方向及び B to A 方向の P_{app} は共にほぼ同様であり、また propranolol の方が高い膜透過性を示した (Figure 3-2-D, E)。

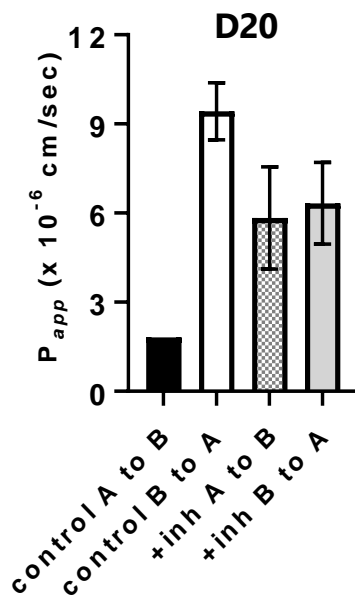
CYP3A4 について、ヒト成人小腸に類似の遺伝子発現が認められたことから (Figure 3-1-E)、典型的 *CYP3A* 基質である midazolam (10 μ M) を用いて、主酸化代謝物である 1'-OH midazolam の生成から *CYP3A* 活性を評価した [44]。その結果、1'-OH midazolam の生成が確認でき、生成量から算出した代謝クリアランスは 463.8 pmol/hr/mg cellular protein であった (Figure 3-2-F)。この結果から、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞は、*CYP3A* 酵素活性を有することが示された。

(A)



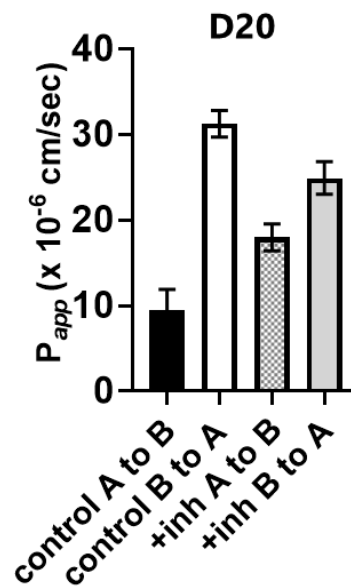
(B)

Substrate: Digoxin (1.3 nM)
inhibitor: Verapamil (100 μ M)



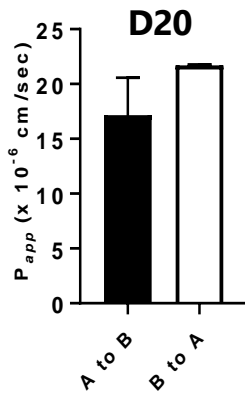
(C)

Substrate: Prazosin (0.4 nM)
inhibitor: Elacridar (20 μ M)



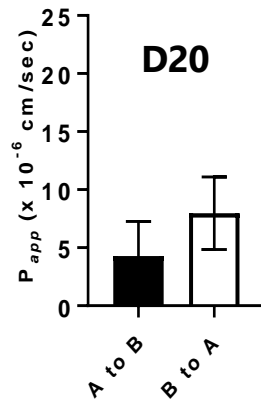
(D)

Propranolol
(transcellular marker)



(E)

Mannitol
(paracellular marker)



(F)

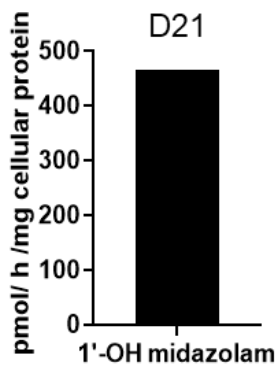


Figure 3-2. hiPSC-derived enterocyte like cells showed the functions of efflux transporters and high permeability for propranolol and low permeability for mannitol. (A) A schematic drawing of the experiment. (B, C) Transport activities of P-gp and BCRP were tested with their representative substrates and inhibitors. (B) Directional transcellular transport of digoxin (1.27 nM) in the absence (control) or presence of verapamil. (C) Directional transcellular transport of prazosin (0.391 nM) in the absence (control) or presence of elacridar. (D) The transport of propranolol (1.33 nM), which is mainly through the transcellular route by passive membrane permeation, was examined. (E) The transport of mannitol (1.35 nM), which is mainly through the paracellular route, was examined. Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=3). (F) CYP3A4 activity was examined to check the formation of 1'-OH midazolam (n=2).

3.3 生理的条件下に類似した成熟化小腸細胞への分化誘導法の検討

3.3.1 成熟化培地の検討

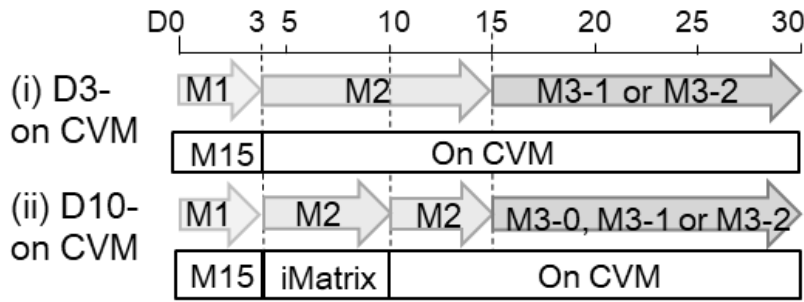
これまでの検討から、BIO, DAPT を添加した M2 培地で CVM 上の DE 細胞 (D3) を D15 まで培養し、市販 M3-0 培地で D16 から培養することにより、D21 にはヒト成人小腸に類似した機能的な小腸細胞へと分化できることを確認している (Figure 3-1-D, 3-1-E, 3-2-B, 3-2-C, 3-2-E)。一方で、市販 M3-0 培地の組成は不明であり、小腸前駆細胞の成熟化に有用な因子の解析が困難である。そこで、成熟化培地作製の検討を行った。成熟化を促す因子として、細胞周期の調節により多能性幹細胞の分化を促進する dimethyl sulfoxide (DMSO) [17][45]、glucocorticoid receptor 及び pregnane X receptor を介した P-gp の誘導作用や肝細胞の成熟化を促す dexamethasone (Dex) [15][46][47]、胎児小腸の成熟化 [48] や CYP3A4 の誘導作用を示す 1 α ,25- dihydroxy vitamin D3 (VD3) [49]、肝細胞の成熟化を促す hepatocyte growth factor (HGF) [15] を用い、Dex/VD3/HGF を添加した M3-1 培地、DMSO/Dex/VD3 を添加した M3-2 培地について、小腸細胞への成熟化を検討した (Figure 3-3-A)。

CVM 上に D3 から播種し M3-1 培地あるいは M3-2 培地で分化させた protocol (i) の細胞 (D21, D23) について遺伝子発現解析を行った結果、小腸マーカー (*CDX2*, *VILLIN*)、薬物代謝酵素及び薬物トランスポーター、それぞれについて、ヒト成人小腸に類似の遺伝子発現が確認された (Figure 3-3-B, 左図)。また、CVM 上に D10 から播種し M3-1 培地あるいは M3-2 培地で分化させた protocol (ii) の細胞 (D25) について遺伝子発現解析を行った結果、protocol (i) と同様に、小腸マーカー、薬物代謝酵素及び薬物トランスポーターそれぞれについて、ヒト成人小腸に類似の遺伝子発現が確認されたことから (Figure 3-3-B, 右図)、M3-1、M3-2 培地は共に、小腸細胞へと成熟化可能な培地と考えられた。一方で、M3-2 培地で培養した細胞は、M3-1 培地で培養した細胞に比べて、protocol (i) では *CYP3A4* 遺伝子、protocol (ii) では *CDX2*, *VILLIN*, *CYP3A4* 遺伝子の発現量が有意に高かったことから、M3-2 培地の方がより成熟化に適した培地であると推察された (Figure 3-3-B)。

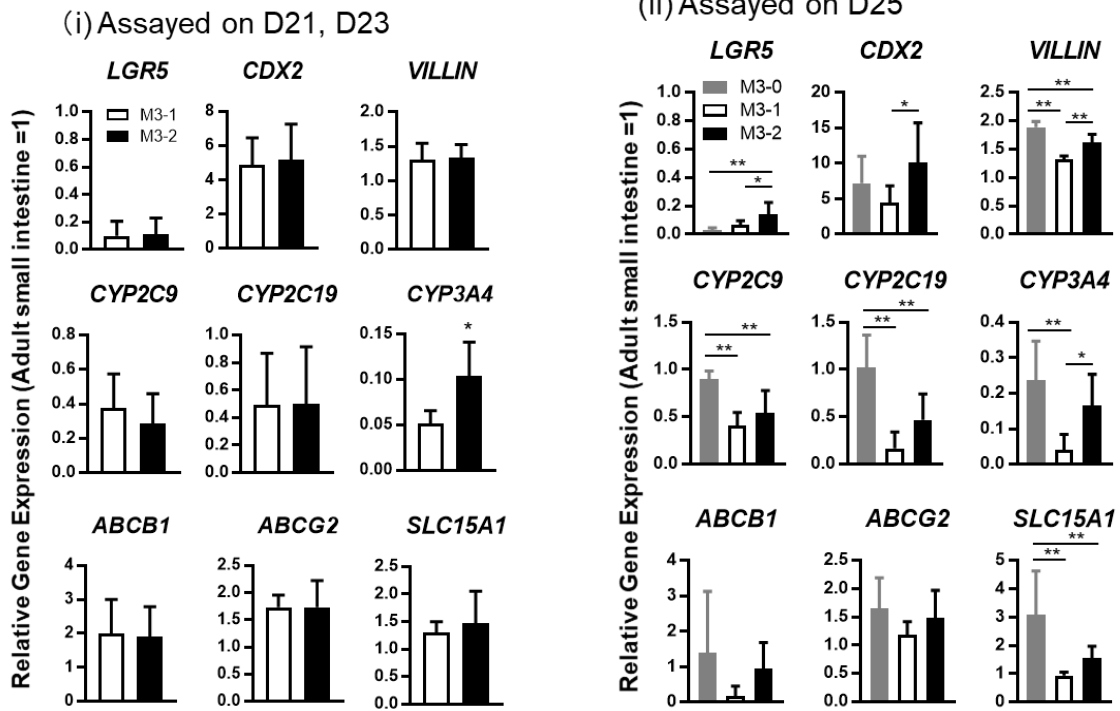
小腸細胞の成熟化の指標として、タイトジャンクションによるバリア機能も重要であることから、バリア機能の指標である TEER を測定した。M3-0, M3-1 あるいは M3-2 培地で分化させた時のヒト iPS 細胞由来小腸細胞 (D30) における TEER は、それぞれ $554 \Omega \times \text{cm}^2$, $292 \Omega \times \text{cm}^2$, $204 \Omega \times \text{cm}^2$ であり、何れも高い TEER を示したことから、タイトジャンクションを形成していると考えられた (Figure 3-3-C)。また、Caco-2 細胞 (D21) の TEER は $885 \Omega \times \text{cm}^2$ と高い値であり、ヒト小腸 (*in vitro*) における TEER (約 $100 \Omega \times \text{cm}^2$) に比べて高いことから、Caco-2 細胞単層膜の細胞間隙は、生理的条件とは異なると推察される [50][51][52]。

さらに小腸細胞への成熟化指標の一つである alkaline phosphatase (ALP) 活性を評価した結果 [23][33]、D30 において 70.3%が陽性であり、一部未成熟な細胞と ALP 活性を有する成熟化細胞の不均一な細胞集団であることが示唆された (Figure 3-3-D)。

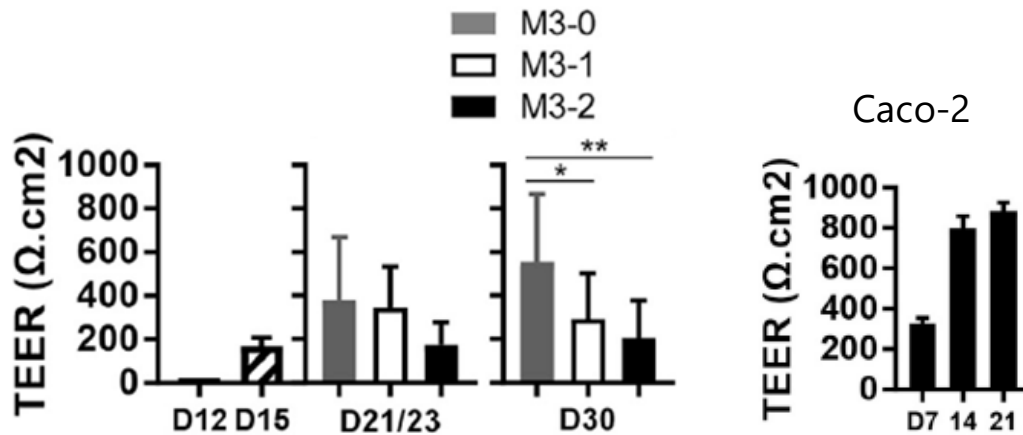
(A)



(B)



(C)



(D)

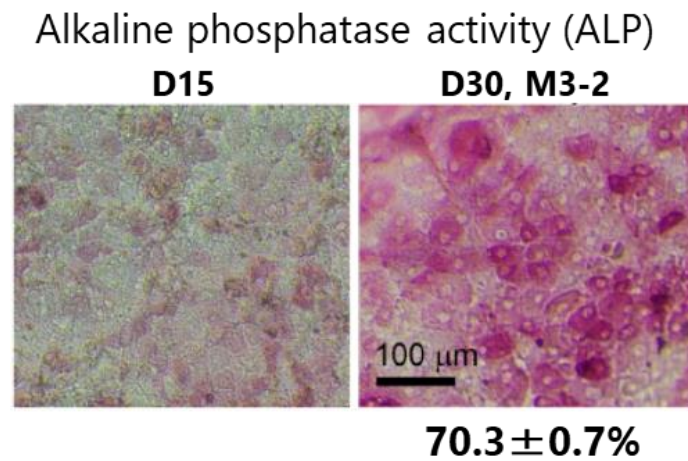


Figure 3-3. Alternative maturation procedure to generate hiPS-derived enterocyte-like cells

(A) A schematic drawing of the experimental design. (B) The expression of differentiation markers, transporters, and metabolizing enzymes in RPChiPS771-derived enterocyte-like cells cultured under protocol (i) assayed on D21 or protocol (ii) assayed on D25 are shown. (C) TEER values of iPS-derived enterocyte-like cells cultured under protocol (ii) (left) or Caco-2 cells (right). (D) The alkaline phosphatase (ALP) staining was performed with RPChiPS771-derived enterocyte-like cells on D15 and D30. Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=3; n, independent experiments). Relative values versus those of the adult intestine are shown (B). Differences between groups were analyzed by Student's t-test (B) or one-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test [B protocol (ii), C]. **p* < 0.05, ***p* < 0.01. Scale bar: 100 μm.

3.3.2 成熟化に寄与する因子の解析

前項で作製した成熟化培地 M3-2 を用いて、成熟化に有用な因子を解析した。M3-2 培地における成熟化因子と考えられる DMSO, Dex, VD3 の内、1 つあるいは 2 つ除いた計 8 条件の培地 (condition #1-8) について評価した (Figure 3-4-A)。

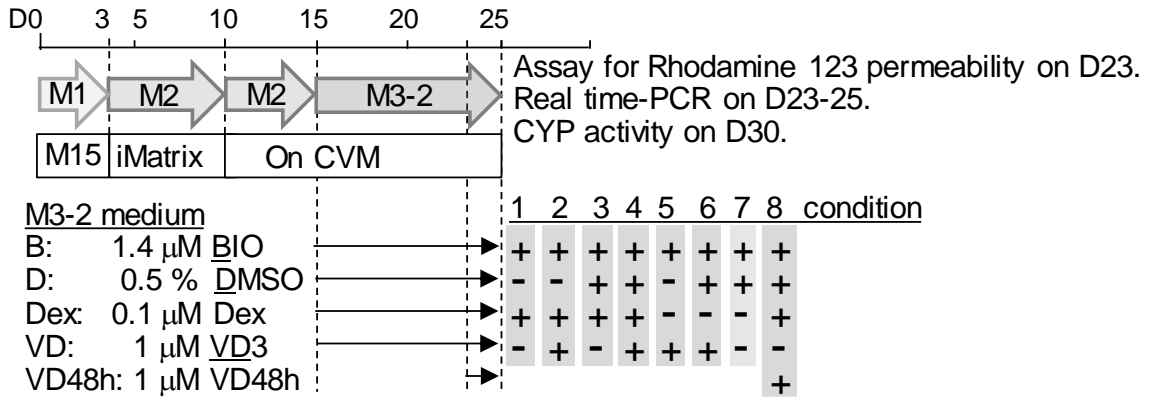
典型的 P-gp 基質 rhodamine123 を用いて、8 条件で培養したそれぞれの細胞 (D23) での A to B 方向の膜透過性、B to A 方向の膜透過性をそれぞれ評価した。その結果、condition #3 (DMSO/Dex) において、condition #1 (Dex), 5 (VD3) に比べて B to A 方向の膜透過性が有意に高かったことから、P-gp の活性向上には DMSO が有用と考えられた。また、condition #6 (DMSO/VD3), 7 (DMSO)、condition #5 (VD3) において、condition #1-4 に比べて低い flux ratio (B to A/A to B) であったことから、P-gp の活性向上には Dex も有用であると考えられた (Figure 3-4-B)。一方で、condition #1 (Dex)、condition #2 (Dex/VD3) では A to B 方向の膜透過性、B to A 方向の膜透過性それぞれに差は認められなかったことから、VD3 による P-gp の活性向上は確認できなかった。

次に、condition #3 (Dex/DMSO), #4 (Dex/DMSO/VD3), #8 (Dex/DMSO/VD3 [D23-25]) の細胞 (D25) の遺伝子発現解析により VD3 の成熟化効果を評価した。VD3 を添加した condition #4, 8 において、VD3 を添加していない condition #3 に比べて、*CYP3A4* の遺伝子発現量が有意に高かったことから、VD3 は *CYP3A4* 遺伝子の発現を誘導すると考えられた (Figure 3-4-C, 左図)。また、condition #4, 8 は、condition #3 に比べて、小腸の成熟化マーカー *ALPI* (intestinal alkaline phosphatase)、二次代謝酵素である *UGT1A1* (UDP glucuronosyltransferase 1-1)、*CYP2B6*、*CYP3A7* 遺伝子の発現量が有意に高かった (Figure 3-4-C, 右図)。

続いて、M3-2 培地を用いて作製したヒト iPS 細胞由来小腸細胞 (D30) について、典型的 CYP3A 基質である testosterone (50 μ M)、midazolam (20 μ M) に対する代謝反応を評価した。その結果、主酸化代謝物である 6 β -OH testosterone、1'-OH midazolam が生成し、その代謝クリアランスはそれぞれ 0.6 nmol/hr/mg cellular protein (6 β -OH testosterone)、3.7 nmol/hr/mg cellular protein (1'-OH midazolam)。また、典型的 CYP3A 阻害剤である ketoconazole (0.5, 5 μ M) 存在下、両 CYP3A 基質の代謝物が減少し、代謝反応の阻害が確認された (Figure 3-4-D)。

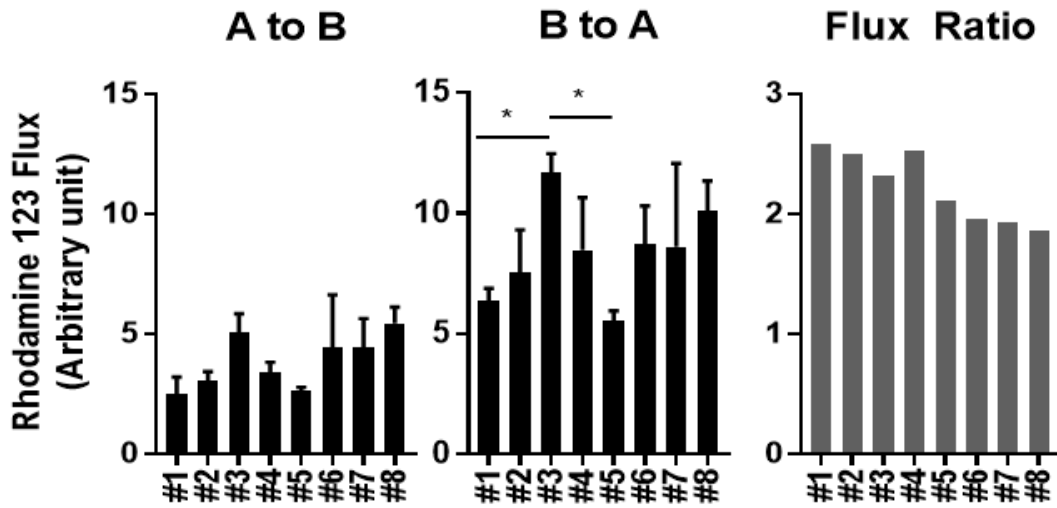
(A)

RPChiPS771

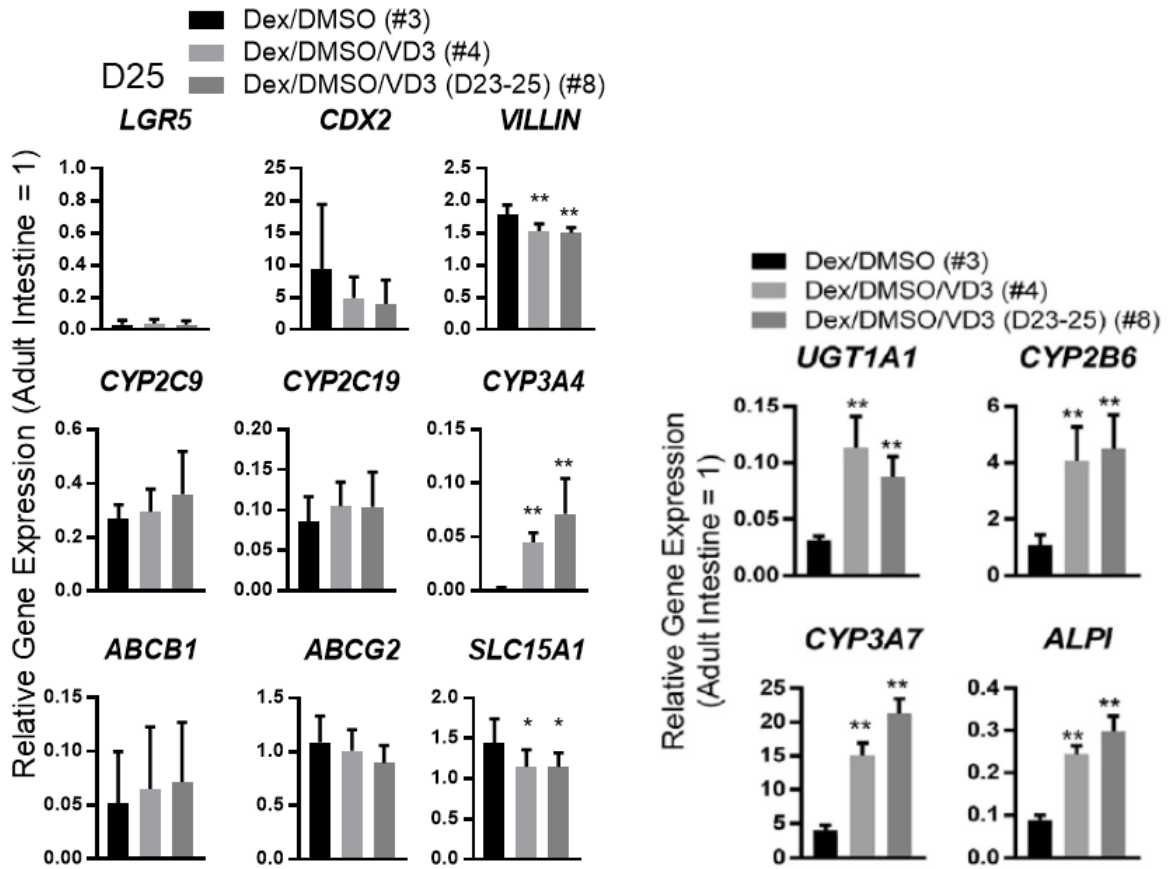


(B)

P-gp substrate Rhodamine 123の輸送評価, D23



(C)



(D)

**CYP3A Substrate: Testosterone (50 μ M), Midazolam (20 μ M)
inhibitor: ketoconazole (0.5, 5 μ M)**

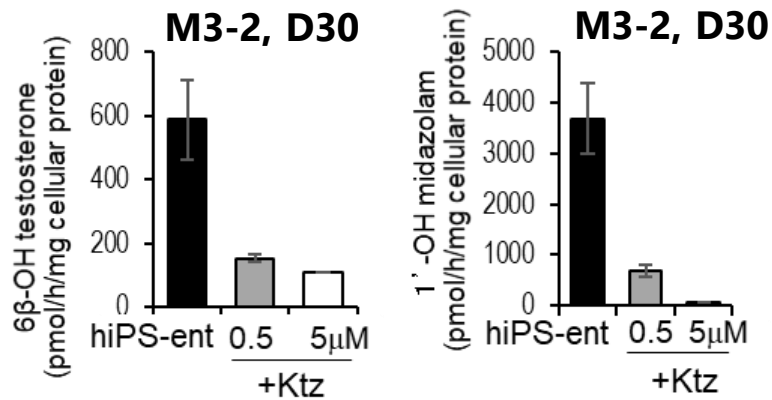


Figure 3-4. Components for maturation into hiPSC-derived enterocyte like cells.

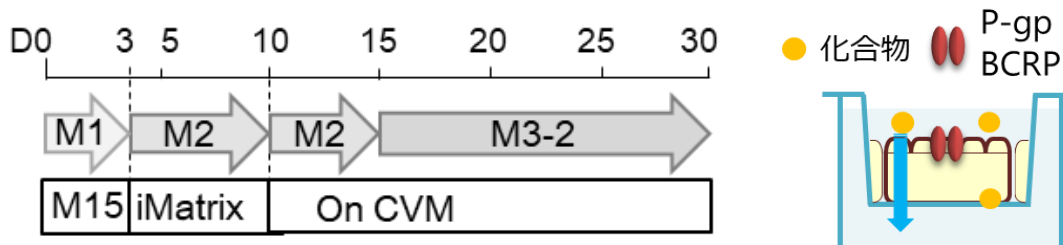
(A) A schematic drawing of the experimental procedure for differentiating RPChiPS771 into enterocytes. Maturation was performed by culturing the cells in M3-2, under 8 conditions, either with a full set of factors or in the absence of 1 or 2 certain factors, as noted. (B) Differentiated cells were assayed for rhodamine 123 permeability. Directional transcellular transport of fluorescence derived from rhodamine 123 (left panel: A to B; middle panel: B to A) or the flux ratio (right panel) are shown. (C) Gene expression levels of the markers upon maturation under three different conditions (condition #3, 4, 8). Time-dependent expressions of intestinal marker genes (LGR5 and CDX2), metabolic enzymes (UGT1A1, CYP2B6, CYP3A4, and CYP3A7), transporters (ABCB1, ABCG2, and SLC15A1), and a mature marker ALPI, during differentiation and with or without VD3. (D) CYP3A4 activity was examined, using testosterone (upper panel) or midazolam (lower panel) as substrates, and quantification of their metabolites was performed by LC-MS/MS. Ktz: ketoconazole (CYP3A inhibitor). Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=3-4; n, independent experiments). Relative values versus those of the adult intestine are shown. Differences versus controls or between groups were analyzed by one-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test (B, C); *p<0.05, **p<0.01.

3.4 ヒト小腸吸収性とヒト iPS 細胞由来単層膜透過性の相関性解析

ヒト小腸吸収率 F_a (fraction absorbed, %) 既知の 15 個のモデル薬物 [5][12][43][50][51] を用いて、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞 (D23, D30) の単層透過性 (P_{app}) を評価した (Figure 3-5-A)。モデル薬物は、ヒト F_a が $\geq 90\%$ である testosterone, antipyrine, propranolol, metoprolol, diclofenac、ヒト F_a が $< 90\%$ かつ $\geq 30\%$ である digoxin (P-gp 基質), hydrochlorothiazide, atenolol, ranitidine (P-gp 基質), famotidine (P-gp 基質), sulpiride, nadolol、ヒト F_a が $< 30\%$ である acyclovir, sulfasalazine (BCRP 基質), fexofenadine (P-gp 基質) を用いた。

その結果、ヒト F_a が $\geq 90\%$ のモデル薬物における P_{app} は、D23 では $8.03\text{--}48.4 \times 10^{-6}$ cm/s、D30 では $12.0\text{--}41.9 \times 10^{-6}$ cm/s、ヒト F_a が $< 90\%$ かつ $\geq 30\%$ のモデル薬物における P_{app} は、D23 では $2.10\text{--}6.15 \times 10^{-6}$ cm/s、D30 では $5.18\text{--}9.50 \times 10^{-6}$ cm/s、ヒト F_a が $< 30\%$ のモデル薬物における P_{app} は、D23 では $1.02\text{--}3.62 \times 10^{-6}$ cm/s、D30 では $2.65\text{--}10.0 \times 10^{-6}$ cm/s であった。よって、ヒト F_a が $\geq 90\%$ で小腸における吸収率が高いモデル薬物の P_{app} は、ヒト F_a が $< 30\%$ で小腸における吸収率が低いモデル薬物の P_{app} に比べて高く、ヒト F_a と関連していると考えられた (Figure 3-5-B)。そこで、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞における膜透過性 P_{app} とヒト F_a の相関性を解析した結果、シグモイド型の相関曲線が示され、決定係数 (R^2) が D23 で 0.749、D30 で 0.553 と高い相関性を示した (Figure 3-5-C)。

(A)



(B)

Compound	RPChiPS771 d23			RPChiPS771 d30			Human Fa (%)	Reference
	P_{app} (x 10 ⁻⁶ cm/sec)			P_{app} (x 10 ⁻⁶ cm/sec)				
	Mean	±	SD	Mean	±	SD		
testosterone	8.03	±	0.26	13.9	±	2.13	100	Sjöberg et al., 2013
antipyrine	48.4	±	1.7	41.9	±	2.2	97	Sugano et al., 2002
propranolol	26	±	2.7	29.3	±	2.5	90	Skolnik et al., 2010
metoprolol	22.6	±	1.3	25.1	±	4.8	95	Sjöberg et al., 2013
diclofenac	17.4	±	0.6	12	±	1.2	99	Sjöberg et al., 2013
digoxin	6.15	±	0.94	5.18	±	0.7	75	Takenaka et al., 2016
hydrochlorothiazide	2.1	±	1.12	9.5	±	4.92	67	Skolnik et al., 2010
atenolol	2.9	±	0.48	5.57	±	3.54	56	Sjöberg et al., 2013
ranitidine	3.94	±	0.7	8.3	±	6.06	50	Skolnik et al., 2010
famotidine	5.05	±	1.76	7.42	±	3.36	38	Sugano et al., 2002
sulpiride	3.15	±	1.18	8.39	±	4.96	36	Amidon et al., 1988
nadolol	2.83	±	1.5	8.96	±	9.29	33	Takenaka et al., 2016
acyclovir	3.62	±	0.73	10	±	6.34	18	Takenaka et al., 2016
sulfasalazine	1.02	±	0.4	2.65	±	1.01	13	Skolnik et al., 2010
fexofenadine	1.28	±	0.3	4.1	±	3.72	13	Sjöberg et al., 2013

(C)

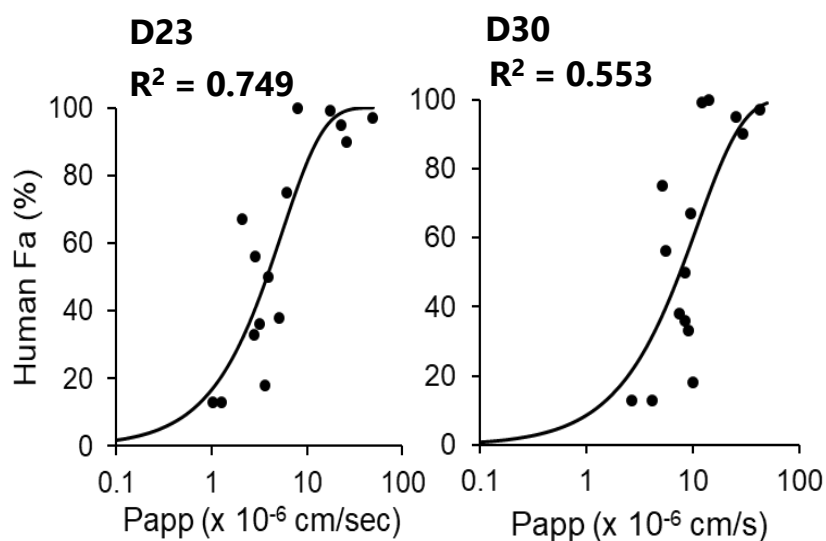


Figure 3-5. A good correlation of *in vitro* P_{app} in hiPSC-derived enterocyte-like cells with human Fa values of test drugs. (A) A schematic drawing of the experimental design. (B) RPChiPS771-derived enterocytes matured using M3-2 medium were used for evaluating the apparent permeability coefficient (P_{app}) of 15 test drugs on D23 or D30. Drugs with known human Fa values and the references used in this study are shown. Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=4; n, number of duplicates). (C) The mean values of P_{app} against human Fa of the drugs are plotted, which showed a good correlation and sigmoidal relationship with the coefficient of determination (R^2) (D23: $R^2 = 0.749$, D30: $R^2 = 0.553$).

3.5 小括

本章では、創薬への活用を見据えて、短い期間かつ培養操作が簡便であるヒト iPS 細胞由来小腸細胞への分化誘導法の検討を行い、これまで当研究室で積み上げてきた研究成果を活用した方法の構築を目指した。具体的には、M15 フィーダー細胞による内胚葉誘導のサポート [41]、メチオニン除去による誘導効率の向上 (分化誘導の促進及び不要な未分化 iPS 細胞の除去) [40]、BIO, DAPT を用いた小腸前駆細胞への分化誘導及び小腸細胞への成熟化 [16][17]、CVM 膜及び市販 M3-0 培地を用いた成熟化 [15] といった知見を活用した。その結果、分化 10 日目 (day 10, D10) において CDX2 陽性の小腸前駆細胞への分化を確認し、D30 において Villin 陽性の吸収細胞を確認した。分化日数毎に遺伝子発現量を解析した結果、D21 において Villin、薬物トランスポーター (*P-gp*, *BCRP*, *PEPT*) 及び薬物代謝酵素 (*CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4*) の遺伝子発現量がヒト小腸に類似したことから、D21 には小腸細胞へと成熟化したと考えられた。

次に、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞について、小腸の主な薬物トランスポーターであり排泄型トランスポーターの *P-gp* 及び *BCRP* の輸送活性と小腸の主な薬物代謝酵素である *CYP3A* 酵素活性を評価した。*P-gp* 輸送活性評価では基質に digoxin, 阻害剤に verapamil を、*BCRP/P-gp* 輸送評価では基質に prazosin, 阻害剤に elacridar を使用し、A to B (吸収方向) 及び B to A (排泄方向) の両方向の膜透過性の比較から活性を評価した。その結果、digoxin, prazosin 共に吸収方向に比べて排泄方向への膜透過性が高く、阻害剤存在下において吸収方向及び排泄方向の膜透過性の差が消失あるいは減少したことから、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞は *P-gp* 及び *BCRP* 輸送活性を有していると考えられた。また、*CYP3A* 活性評価では基質として midazolam (10 μ M) を用いて代謝反応を評価した結果、その酸化代謝物 1'-OH midazolam が生成した (代謝クリアランスは 463.8 pmol/hr/mg cellular protein) ことから、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞は *CYP3A* 活性を有することを確認できた。

これまでの検討から、CDX2 陽性の小腸前駆細胞を市販 M3-0 培地により CVM 上で培養することにより、D21 にはヒト成人小腸に類似した小腸細胞へと分化できることを確認した。

しかし一方で、市販 M3-0 培地の組成は不明であり、小腸前駆細胞の成熟化に有用な因子の解析が困難であるため、独自の成熟化培地の作製検討を行った。成熟化を促す因子として、細胞周期の調節により多能性幹細胞の分化を促進する dimethyl sulfoxide (DMSO) [17][45]、glucocorticoid receptor (GR) 及び pregnane X receptor (PXR) を介した P-gp の誘導作用や肝細胞の成熟化を促す dexamethasone (Dex) [15][46][47]、胎児小腸の成熟化 [48] や CYP3A4 の誘導作用を示す 1 α ,25- dihydroxy vitamin D3 (VD3) [49]、肝細胞の成熟化を促す hepatocyte growth factor (HGF) [15] を用い、Dex/VD3/HGF を添加した M3-1 培地、DMSO/Dex/VD3 を添加した M3-2 培地について、小腸細胞への成熟化を検討した。内胚葉 (D3) あるいは小腸前駆細胞 (D10) を CVM 上に播種し、M3-1 培地あるいは M3-2 培地で分化させた細胞 (D21, D23 あるいは D25) について遺伝子発現解析を行った結果、小腸マーカー (*CDX2*, *VILLIN*)、薬物代謝酵素及び薬物トランスポーター、それぞれについてヒト成人小腸に類似の遺伝子発現が確認されたことから、M3-1、M3-2 培地は共に、小腸細胞へと成熟化可能な培地と考えられた。また、M3-2 培地で培養した細胞は、M3-1 培地で培養した細胞に比べて、*CYP3A4* の遺伝子発現量が有意に高かったことから、M3-2 培地の方がより成熟化に適した培地であると推察された。また、タイトジャンクションによるバリア機能の指標である TEER を測定した結果、M3-2 培地で分化させた時のヒト iPS 細胞由来小腸細胞 (D30) における TEER は 204 $\Omega \times \text{cm}^2$ であり高い TEER 値を示したことから、タイトジャンクションを形成していると考えられた。さらに小腸細胞の成熟化指標の一つである alkaline phosphatase (ALP) 活性を評価した結果 [23][33]、D30 において 70.3%が陽性であり、一部未成熟な細胞と ALP 活性を有する成熟化細胞の不均一な細胞集団であることが示唆された。

M3-1 及び M3-2 培地は市販 M3-0 培地と同様、小腸細胞の成熟化に有用であり、M3-2 培地の方が成熟化に適した培地と考えられたことから、続いて、M3-2 培地を用いて小腸細胞への成熟化に有用な因子について解析を行った。M3-2 培地の内、多能性幹細胞の分化を促進する DMSO、DR 及び PXR を介して P-gp の誘導作用を示す Dex、胎児小腸の成熟化や CYP3A4 の誘導作用を示す VD3 が候補因子と推察されることから、DMSO, Dex, VD3 の内、1 つあるい

は2つ除いた計8条件の培地 (condition #1-8) について評価した。まず、P-gp 基質 rhodamine123 の吸収方向 (A to B) 及び排泄方向 (B to A) の透過性から、P-gp 活性を指標に成熟化作用を検証した。Condition #3 (DMSO/Dex) において、condition #1 (Dex), #5 (VD3) に比べて排泄方向の膜透過性が有意に高かったことから、P-gp の活性向上には DMSO が有用と考えられた。また、condition #6 (DMSO/VD3)、#7 (DMSO)、#5 (VD3) において、condition #1-4 に比べて低い flux ratio (B to A/A to B) であったことから、P-gp の活性向上には Dex も有用であると考えられた。次に、condition #3 (Dex/DMSO), #4 (Dex/DMSO/VD3), #8 (Dex/DMSO/VD3 [D23-25]) の細胞 (D25) の遺伝子発現解析により VD3 の成熟化作用を評価した。VD3 を添加した condition #4, 8 において、VD3 を添加していない condition #3 に比べて、CYP3A4 の遺伝子発現量が有意に高かったことから、VD3 は CYP3A4 酵素活性の向上に有用と考えられた。また、condition #4, 8 は、condition #3 に比べて、小腸の成熟化マーカー ALPI (intestinal alkaline phosphatase)、二次代謝酵素である UGT1A1 (UDP glucuronosyltransferase 1-1)、CYP2B6、CYP3A7 遺伝子の発現量が有意に高かったことから、これら酵素活性の向上に対しても有用と考えられる。続いて、M3-2 培地を用いて作製したヒト iPS 細胞由来小腸細胞 (D30) について、典型的 CYP3A 基質である testosterone (50 μ M)、midazolam (20 μ M) に対する代謝反応を評価した。その結果、主酸化代謝物である 6 β -OH testosterone、1'-OH midazolam が生成し、その代謝クリアランスはそれぞれ 0.6 nmol/hr/mg cellular protein (6 β -OH testosterone)、3.7 nmol/hr/mg cellular protein (1'-OH midazolam)。また、典型的 CYP3A 阻害剤である ketoconazole (0.5, 5 μ M) 存在下、両 CYP3A 基質の代謝物物が減少し、代謝反応の阻害が確認された。市販 M3-0 培地で作製した小腸細胞における midazolam の代謝クリアランスは 463.8 pmol/hr/mg cellular protein であったが、基質濃度が半分、かつ反応時間も長く代謝反応が飽和している可能性もあるため、それぞれの細胞の CYP3A 活性に差があるとは考えていない。

ヒト小腸吸収率 Fa (fraction absorbed, %) 既知の 15 個のモデル薬物 [5][12][43][50][51] を用いて、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞 (D23, D30) の単膜透過性 (P_{app}) を評価し、ヒト Fa との相関性を検証した。モデル薬物は、ヒト Fa が $\geq 90\%$ である testosterone, antipyrine, propranolol,

metoprolol, diclofenac、ヒト Fa が < 90%かつ ≥ 30%である digoxin (P-gp 基質), hydrochlorothiazide, atenolol, ranitidine (P-gp 基質), famotidine (P-gp 基質), sulpiride, nadolol、ヒト Fa が < 30%である acyclovir, sulfasalazine (BCRP 基質), fexofenadine (P-gp 基質) を用いた。その結果、ヒト Fa が ≥ 90%のモデル薬物における P_{app} は、D23 では $8.03\text{--}48.4 \times 10^{-6}$ cm/s、D30 では $12.0\text{--}41.9 \times 10^{-6}$ cm/s、ヒト Fa が < 90%かつ ≥ 30%のモデル薬物における P_{app} は、D23 では $2.10\text{--}6.15 \times 10^{-6}$ cm/s、D30 では $5.18\text{--}9.50 \times 10^{-6}$ cm/s、ヒト Fa が < 30%のモデル薬物における P_{app} は、D23 では $1.02\text{--}3.62 \times 10^{-6}$ cm/s、D30 では $2.65\text{--}10.0 \times 10^{-6}$ cm/s であり、ヒト Fa が ≥ 90%で小腸における吸収率が高いモデル薬物の P_{app} は、ヒト Fa が < 30%で小腸における吸収率が低いモデル薬物の P_{app} に比べて高かった。また、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞における膜透過性 P_{app} とヒト Fa の相関性を解析した結果、シグモイドカーブの相関曲線が示され、決定係数 (R^2) が D23 で 0.749、D30 で 0.553 と高い相関性を示した。

以上の結果から、本研究で作製したヒト iPS 細胞由来小腸細胞は、薬物トランスポーター P-gp、BCRP の基質となる化合物も含め、そのヒト経口吸収性を予測可能な新規 *in vitro* 小腸モデルとして有用と考えられる。

第 4 章

総括

医薬品は経口薬、注射薬、貼付薬、点眼薬、吸入薬、座薬など様々な方法で患部へと薬物を送達し薬効を発揮するが、許容される化合物の物性の広さや薬を処方される患者の利便性を考慮すると経口薬は最も選択されやすい製剤と考えられる。口から服用した医薬品は、小腸において吸収された後に循環血液中あるいは全身の組織へ分布した後に薬効を示すことから、創薬においてはヒト小腸で吸収される医薬品候補化合物を効率良くスクリーニングする必要がある。経口吸収性の評価として、非臨床安全性動物を用いた *in vivo* 評価が挙げられるが、ヒトと比べて生理的条件が大きく異なることから種差が懸念される。また、PAMPA や Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 膜透過性評価が挙げられるが、薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの発現量がヒト小腸と大きく異なることから、ヒト小腸吸収性の予測には課題がある。

そこで本研究では、ヒト iPS 細胞から小腸細胞への分化誘導法を検討し、作製したヒト iPS 細胞由来小腸細胞の機能的な解析を行うことで、新規 *in vitro* 小腸モデルとして、ヒト小腸吸収性の予測に対する有用性について検討した。以下に本研究によって得られた知見を要約する。

3 次元培養を用いたヒト iPS 細胞から小腸細胞への分化誘導検討

生体における内部細胞塊から組織細胞へと分化する過程を模倣する、すなわち内胚葉、その後内胚葉の後方化を促し、小腸細胞へと成熟化する方法により、ヒト iPS 細胞から小腸オルガノイドへと分化することができた (Figure 4-1)。Vimentin 陽性の間質細胞が含まれる小腸オルガノイドから、上皮細胞特異的な表面抗原である EpCAM を指標とした MACS により、小腸細胞を高効率にソーティングする手法を見出した。また、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞を純化したことで、タイトジャンクションによるバリア機能を有する単層膜を作製することができ、さらに小腸に主な薬物代謝酵素 CYP3A 及び CYP2J2 活性を有することを明らかにし

た。以上のことから、3次元培養を用いて作製したヒト iPS 細胞由来小腸細胞は、ヒト経口吸収性を評価可能な新しい *in vitro* 小腸モデルとなることが期待される。

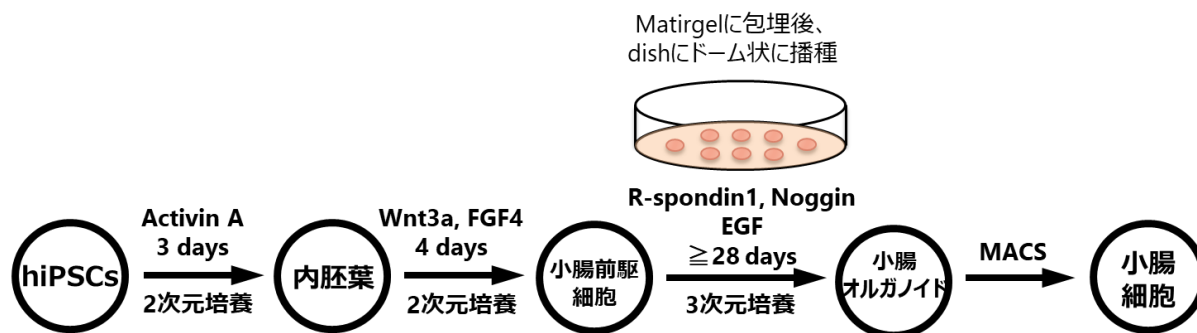


Figure 4-1: 3次元培養法を用いたヒト iPS 細胞由来小腸細胞の作製 (模式図)

2次元培養を用いたヒト iPS 細胞から小腸細胞への分化誘導検討

当研究室において、これまでの研究から得られている知見を組み合わせることで、ヒト iPS 細胞からより簡便な小腸細胞への分化誘導法の検討を行った。まず、一過性にメチオニンを除去した培地で培養することで分化を促したヒト iPS 細胞を用い、M15 フィーダー細胞上で培養することで高効率に内胚葉へと分化させた。次に、生体内の微小環境に類似し分化をサポートする培養基材である CVM 上に播種後、小腸前駆細胞への分化並びに小腸細胞への成熟化作用を示す BIO, DAPT を添加した培地で培養することで、21 日間の短い分化期間でヒト iPS 細胞由来小腸細胞を得ることができた。続いて、小腸細胞への成熟化培地の検討の結果、DMSO 及び Dex によって薬物トランスポーターである P-gp 活性が向上し、VD3 によって小腸の主な薬物代謝酵素 *CYP3A4* の遺伝子発現量が有意に増加したことから、DMSO、Dex、VD3 は小腸細胞への成熟化に有用な因子であることが分かった (Figure 4-2)。さらに、ヒト iPS 細胞由来小腸細胞を用いて、ヒト小腸吸収率 Fa 既知のモデル薬物における膜透過性を評価した結果、その膜透過性とヒト Fa には高い相関性があることを確認した。以上の結果から、より簡便な分化誘導法を用いて作製したヒト iPS 細胞由来小腸細胞は、ヒト経口吸収性を評価可能な新しい *in vitro* 小腸モデルとして有用と考えられた。

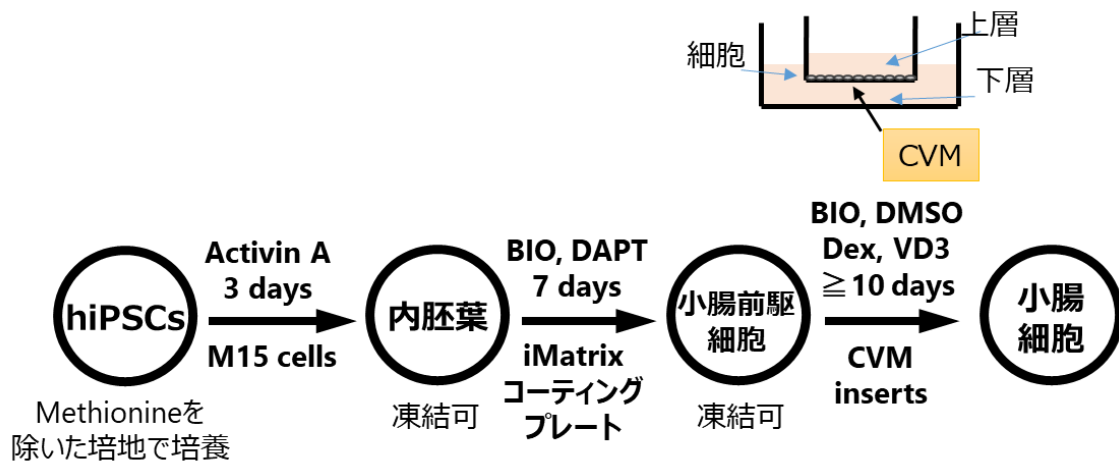


Figure 4-2: 2次元培養法を用いたヒト iPS 細胞由来小腸細胞の作製 (模式図)

本研究によって得られた知見により、3次元培養によって作製したヒト iPS 細胞由来小腸オルガノイド、2次元培養によって作製したヒト iPS 細胞由来小腸細胞、それぞれがヒト経口吸収性を評価可能な *in vitro* 小腸モデルとなることが期待される。3次元培養は、2次元培養に比べて培養操作が煩雑かつ分化誘導期間が長いという側面はあるが、小腸オルガノイドを用いた消化管毒性評価への活用も期待される [53][54]。2次元培養は、分化誘導期間が D21 と短く、また CVM insert 上で分化させるため、細胞播種操作なしでそのまま吸収評価が可能のため、利便性に優れると考えられる。今後、*in vitro* 小腸モデルとして、創薬における薬物動態研究ならびに毒性研究に広く使われることが期待される。

なお、本研究の第2章である3次元培養法を用いたヒト iPS 細胞から小腸細胞への分化誘導検討については、CiRA ISSCR international symposium (京都、2016) 及び第48回日本毒性学会学術年会ワークショップ (兵庫及び Web 開催、2021) にて公表し、Scientific Reports (2020) にて掲載された。本研究の第3章である2次元培養法を用いたヒト iPS 細胞から小腸細胞への分化誘導検討については、第32回日本動物実験代替法学会 (茨城、2019) 及び第5回トランスポーター研究会関東部会 (Web 開催、2020) にて公表し、Stem Cell Reports (2021) にて掲載された。

発表学会目録

1. ○Shinpei Yoshida, Hiroto Miwa, Tomoyuki Kawachi, Koji Takahashi, Yoshitaka Yamaguchi and Hiroshi Takemoto.
Generation of functional intestinal epithelial cells from human induced pluripotent stem cells.
CiRA ISSCR international symposium, March 2016, Kyoto
2. ○吉田 晋平、飯生 啓太、石部 隆之介、渡邊 輝彦、石川 晶也、白木 伸明、糸 昭苑
薬物動態評価モデルとしてのヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の開発
第 32 回日本動物実験代替法学会、2019 年 11 月、茨城
3. ○吉田晋平、本荘貴之、飯生啓太、石部隆之介、Sylvia Leo、嶋田智花、渡邊輝彦、石川晶也、前田和哉、楠原洋之、白木伸明、糸昭苑
薬物動態評価モデルとしてのヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の開発
第 5 回トランスポーター研究会関東部会、2020 年 11 月、Web 開催
4. ○Shinpei Yoshida
Application of intestinal organoids for drug discovery.
第 48 回日本毒性学会学術年会ワークショップ、2021 年 7 月、兵庫及び Web 開催

論文目録

1. Shinpei Yoshida, Hiroto Miwa, Tomoyuki Kawachi, Shoen Kume, Koji Takahashi.
Generation of intestinal organoids derived from human pluripotent stem cells for drug testing.
Scientific Reports. 2020 Apr 6;10(1):5989.
2. Shinpei Yoshida, Takayuki Honjo, Keita Iino, Ryunosuke Ishibe, Sylvia Leo, Tomoka Shimada,
Teruhiko Watanabe, Masaya Ishikawa, Kazuya Maeda, Hiroyuki Kusuhara, Nobuaki Shiraki, Shoen
Kume.
Generation of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Functional Enterocyte-Like Cells for
Pharmacokinetic Studies.
Stem Cell Reports. 2021 Feb 9;16(2):295-308

参考文献

1. White RE, Manitpisitkul P. Pharmacokinetic theory of cassette dosing in drug discovery screening. *Drug Metab Dispos.* 2001 Jul;29(7):957-66.
2. Chen, X. et al. A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. *Pharm Res.* 25, 1511-1520 (2008).
3. Teksin, Z. S, Seo PR, Polli JE. Comparison of drug permeabilities and BCS classification: three lipid-component PAMPA system method versus Caco-2 monolayers. *AAPS J.* 12, 238-241 (2010).
4. Marino, A. M. et al. Validation of the 96 well Caco-2 cell culture model for high throughput permeability assessment of discovery compounds. *Int J Pharm.* 297, 235–241 (2005).
5. Skolnik, S. et al. Towards prediction of *in vivo* intestinal absorption using a 96-well Caco-2 assay. *J Pharm Sci.* 99, 3246-3265 (2010).
6. Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stammati, A., and Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol. Toxicol.* 21, 1–26.
7. Sun, D., Lennernas, H., Welage, L.S., Barnett, J.L., Landowski, C.P., Foster, D., Fleisher, D., Lee, K.D., and Amidon, G.L. (2002). Comparison of human duodenum and Caco-2 gene expression profiles for 12,000 gene sequences tags and correlation with permeability of 26 drugs. *Pharm. Res.* 19, 1400–1416.
8. Paine MF. et al. The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos.* 34, 880-886 (2006).
9. Williams J.A. et al. Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: A pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_I/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos.* 32, 1201-1208 (2004).
10. Stoch SA et al. Effect of Different Durations of Ketoconazole Dosing on the Single-Dose Pharmacokinetics of Midazolam: Shortening the Paradigm. *J Clin Pharmacol.*, 49, 398-406, 2009.

11. Hayashi R. et al. Comparison of drug transporter gene expression and functionality in Caco-2 cells from 10 different laboratories. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 35, 383-396, 2008.
12. Takenaka, T. et al. Application of a Human Intestinal Epithelial Cell Monolayer to the Prediction of Oral Drug Absorption in Humans as a Superior Alternative to the Caco-2 Cell Monolayer. *J Pharm Sci*. 105, 915-924 (2016).
13. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872.
14. Shiraki N., Yoshida T., Araki K., Umezawa A., Higuchi Y., Goto H., Kume K., Kume S. (2008). Guided differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing regional-specific definitive endoderm. *Stem Cells*, 26, 874-885.
15. Nakai, S., Shibata, I., Shitamichi, T., Yamaguchi, H., Takagi, N., Inoue, T., Nakagawa, T., Kiyokawa, J., Wakabayashi, S., Miyoshi, T., et al. (2019). Collagen vitrigel promotes hepatocytic differentiation of induced pluripotent stem cells into functional hepatocyte-like cells. *Biol. Open* bio.042192.
16. Ogaki, S., Shiraki, N., Kume, K., and Kume, S. (2013). Wnt and Notch signals guide embryonic stem cell differentiation into the intestinal lineages. *Stem Cell* 31, 1086–1096.
17. Ogaki, S., Morooka, M., Otera, K., and Kume, S. (2015). A cost-effective system for differentiation of intestinal epithelium from human induced pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* 5, 17297.
18. Nakamura, T., Tsuchiya, K., and Watanabe, M. (2007). Crosstalk between Wnt and Notch signaling in intestinal epithelial cell fate decision. *J. Gastroenterol.* 42, 705–710.
19. Sato, T. et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature*. 459, 262-265 (2009).
20. Sato, T., and Clevers, H. (2013). Growing Self-Organized Mini-Guts from a Single Intestinal Stem Cell: Mechanisms and Applications. *Science* 340, 190–194.

21. Chiba, S. (2006). Concise Review: Notch Signaling in Stem Cell Systems. *Stem Cells* 24, 2437–2447.
22. Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449, 1003–1007.
23. Sato, T. et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*. 141, 1762-1772 (2011).
24. D'Amour, K. A. et al. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol.* 23, 1534-1541 (2005).
25. Ameri, J., Ståhlberg, A., Pedersen, J., Johansson, J.K., Johannesson, M.M., Artner, I., and Semb, H. (2010). FGF2 specifies hESC-derived definitive endoderm into foregut/midgut cell lineages in a concentration-dependent manner. *Stem Cells* 28, 45–56.
26. Spence, J. R. et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*. *Nature*. 470, 105-109 (2011).
27. Negoro, R., Takayama, K., Kawai, K., Harada, K., Sakurai, F., Hirata, K., and Mizuguchi, H. (2018). Efficient Generation of Small Intestinal Epithelial-like Cells from Human iPSCs for Drug Absorption and Metabolism Studies. *Stem Cell Reports* 11, 1539–1550.
28. Takayama, K., Negoro, R., Yamashita, T., Kawai, K., Ichikawa, M., Mori, T., Nakatsu, N., Harada, K., Ito, S., Yamada, H., et al. (2019). Generation of Human iPSC–Derived Intestinal Epithelial Cell Monolayers by CDX2 Transduction. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 513–526.
29. Iwao, T., Kodama, N., Kondo, Y., Kabeya, T., Nakamura, K., Horikawa, T., Niwa, T., Kurose, K., and Matsunaga, T. (2015). Generation of Enterocyte-Like Cells with Pharmacokinetic Functions from Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Small- Molecule Compounds. *Drug Metab. Dispos.* 43, 603–610.

30. Kodama, N., Iwao, T., Katano, T., Ohta, K., Yuasa, H., and Matsunaga, T. (2016). Characteristic Analysis of Intestinal Transport in Enterocyte-Like Cells Differentiated from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Drug Metab. Dispos.* 44, 1662-1667.
31. Lee CA, et al. Identification of novel substrates for human cytochrome P450 2J2. *Drug Metab Dispos.* 2010 Feb;38(2):347-56.
32. Takayama, N. et al. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med.* 207, 2817-2830 (2010).
33. Watson, C. L. et al. An *in vivo* model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nat Med.* 20, 1310-1314 (2014).
34. Cao. L. et al. Intestinal lineage commitment of embryonic stem cells. *Differentiation.* 81, 1-10 (2011).
35. Lei Z, et al. EpCAM contributes to formation of functional tight junction in the intestinal epithelium by recruiting claudin proteins. *Dev Biol.* 2012 Nov 15;371(2):136-45.
36. Magness ST, et al. A multicenter study to standardize reporting and analyses of fluorescence-activated cell-sorted murine intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013 Oct 15;305(8):G542-51.
37. Furuse, M. et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* 123, 1777-1788 (1993).
38. Giacomini, K.M., Huang, S.M., Tweedie, D.J., Benet, L.Z., Brouwer, K.L.R., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K.M., et al. (2010). Membrane transporters in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 215–236.
39. Akazawa. T, Yoshida. S., et al. Application of Intestinal Epithelial Cells Differentiated from Human Induced Pluripotent Stem Cells for Studies of Prodrug Hydrolysis and Drug Absorption in the Small Intestine. *Drug Metab Dispos.* 2018 Nov;46(11):1497-1506.

40. Shiraki N., Shiraki Y., Tsuyama T., Obata F., Miura M., Nagae G., Aburatani H., Kume K., Endo F., Kume S. 2014, Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Metabolism*, 19, 780-794.
41. Shiraki N., Yoshida T., Araki K., Umezawa A., Higuchi Y., Goto H., Kume K., Kume S. Guided Differentiation of Embryonic Stem Cells into Pdx1-Expressing Regional-Specific Definitive Endoderm. (2008) *Stem Cells*, 26, 874-885.
42. Asplund, A., Pradip, A., van Giezen, M., Aspegren, A., Choukair, H., Rehnström, M., Jacobsson, S., Ghosheh, N., El Hajjam, D., Holmgren, S., et al. (2016). One Standardized Differentiation Procedure Robustly Generates Homogenous Hepatocyte Cultures Displaying Metabolic Diversity from a Large Panel of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev. Reports* 12, 90–104.
43. Amidon, G.L., Sinko, P.J., and Fleisher, D. (1988). Estimating Human Oral Fraction Dose Absorbed: A Correlation Using Rat Intestinal Membrane Permeability for Passive and Carrier-Mediated Compounds. *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* 5, 651–654.
44. Andrew Williams, J., Ring, B.J., Cantrell, V.E., Jones, D.R., Eckstein, J., Ruterbories, K., Hamman, M.A., Hall, S.D., and Wrighton, S.A. (2002). Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab. Dispos.* 30, 883–891.
45. Chetty S. et al. A simple tool to improve pluripotent stem cell differentiation. (2013) *Nature Methods*. 10, 553-556.
46. Zhang, Y., Lu, M., Sun, X., Li, C., Kuang, X., and Ruan, X. (2012). Expression and activity of p-glycoprotein elevated by dexamethasone in cultured retinal pigment epithelium involve glucocorticoid receptor and pregnane X receptor. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 3508–3515.
47. Zhao, B., Xie, G.J., Li, R.F., Chen, Q., and Zhang, X.Q. (2015). Dexamethasone protects normal human liver cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand by upregulating the expression of P-glycoproteins. *Mol. Med. Rep.* 12, 8093–8100.

48. Delvin, E.E., Lopez, V., Lévy, É., and Ménard, D. (1996). Calcitriol Differentially Modulates mRNA Encoding Calcitriol Receptors and Calcium-Binding Protein 9 kDa in Human Fetal Jejunum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 544–548.
49. Theodoropoulos, C., Demers, C., Delvin, E., Ménard, D., and Gascon-Barré, M. (2003). Calcitriol regulates the expression of the genes encoding the three key vitamin D3 hydroxylases and the drug-metabolizing enzyme CYP3A4 in the human fetal intestine. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 58, 489–499.
50. Sjöberg, Å., Lutz, M., Tannergren, C., Wingolf, C., Borde, A., and Ungell, A.L. (2013). Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique. *Eur. J. Pharm. Sci.* 48, 166–180.
51. Sugano, K., Takata, N., Machida, M., Saitoh, K., and Terada, K. (2002). Prediction of passive intestinal absorption using bio-mimetic artificial membrane permeation assay and the paracellular pathway model. *Int. J. Pharm.* 241, 241–251.
52. Gupta, V., Doshi, N., and Mitragotri, S. (2013). Permeation of Insulin, Calcitonin and Exenatide across Caco-2 Monolayers: Measurement Using a Rapid, 3-Day System. *PLoS One* 8.
53. Leslie, J.L., et al. Persistence and Toxin Production by *Clostridium difficile* within Human Intestinal Organoids Result in Disruption of Epithelia Paracellular Barrier Function. *Infect Immun.* 2015 Jan;83(1):138-45.
54. Belair, D.G., et al. Human ileal organoid model recapitulates clinical incidence of diarrhea associated with small molecule drugs. *Toxicol In Vitro.* 2020 Oct;68:104928.

謝辞

終わりに鑑み、本研究の遂行また論文の執筆に関しまして終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東京工業大学糸白木研究室 糸 昭苑教授に甚大なる謝意を表します。糸先生は常にデータに対して真摯に向き合い深く考察することに加え、研究者としてのあるべき姿についても御指導くださいました。数々の議論や研究の方向性に関して、懇切丁寧に御指導いただきました東京工業大学糸白木研究室 白木 伸明准教授に深甚なる謝意を表します。

論文の執筆に際し、ご支援、有益なご助言を賜りました東京大学分子薬物動態学教室 楠原 洋之教授に深甚なる謝意を表します。

論文の執筆に際し、ご支援、有益なご助言を賜りました北里大学薬剤学教室 前田 和哉教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の機会と種々の御支援を頂きました塩野義製薬株式会社イノベーティブ医療研究所 高橋 浩治氏に深謝いたします。本研究に際し、御協力頂きました塩野義製薬株式会社イノベーティブ医療研究所三輪 寛人氏、塩野義製薬創薬開発研究所 河内 智行 氏並びにシオノギテクノアドバンスリサーチ株式会社 嶋田 智花氏に感謝いたします。

本研究全般にわたり、御協力頂きました東京工業大学糸白木研究室の本荘 貴之氏、飯生 啓太氏、石部 隆之介氏、Sylvia Leo 氏、同教室出身者並びに研究生各位に感謝いたします。本研究全般にわたり、ご協力いただいた塩野義製薬株式会社 研究者諸氏、シオノギテクノアドバンスリサーチ株式会社 研究者諸氏に感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、強力なご支援を頂きました関東化学株式会社 渡邊 輝彦氏、石川 晶也氏に感謝いたします。

最後に研究並びに論文作成に理解を示し、生活面や精神面など全ての面で支えてくれた妻に親愛と感謝の意を表します。精神面で支えてくれた愛ウサギ、愛犬に親愛と感謝の意を示します。私を育ててくれた父母に感謝いたします。