



Title	高効率なヒトiPS細胞から小腸型の腸管上皮細胞への分化誘導法の開発と薬物吸収・代謝試験への応用
Author(s)	根来, 亮介
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72309
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (根来 亮介)

論文題名

高効率なヒトiPS細胞から小腸型の腸管上皮細胞への分化誘導法の開発と薬物吸収・代謝試験への応用

論文内容の要旨

多くの医薬品は、錠剤やカプセル剤、散剤などの剤形により経口投与される。経口投与された医薬品は、小腸において吸収されると同時に代謝され、肝臓を経て全身へ移行する。小腸は、医薬品の吸収に関わるpeptide transporter 1 (PEPT1) や排泄に関わるmultidrug resistance 1などの様々な薬物トランスポーターを発現しているため、単純拡散による吸収だけでなく薬物トランスポーターによる吸収や排泄を評価する必要がある。また、小腸はcytochrome P450 3A4 (CYP3A4) や、carboxylesterase 2 (CES2) などの薬物代謝酵素を発現しているため、医薬品候補化合物の代謝を予測することも重要である。現在、ヒト初代培養小腸上皮細胞は入手及び培養が困難であるため、マウスやラットなどの実験動物や、癌細胞株を用いた評価系が汎用されている。しかしながら、上記のモデルには種差の問題や薬物代謝酵素・薬物トランスポーターの発現パターンがヒト成人小腸と異なるなどの問題を抱えており、医薬品候補化合物の消化管吸収率 (F_a) 及び、消化管非代謝率 (F_g) の十分に高精度な予測を行うことは難しい。そこで近年、新たなヒト小腸モデルを作製するツールとして、ほぼ無限の増殖能と多分化能を有するヒトiPS細胞が期待を集めている。ヒトiPS細胞から機能的な腸管上皮細胞を高効率に作製することができれば、 F_a および F_g を高精度に予測できるモデルとなりうる。当研究室ではこれまでに、内胚葉分化以降の細胞にGlycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β)の阻害剤であるBIOおよびNotch阻害剤であるDAPTを使用する分化誘導法を基に腸管上皮細胞への分化を促す化合物や液性因子を探索した。その結果、WNT3A、epithelial growth factor (EGF) 及び、transforming growth factor beta (TGF β) 阻害剤であるSB431542を作用することで、腸管上皮細胞マーカーであるvillin 1陽性細胞率を約20%から約40%に上昇させることに成功したが、分化誘導法には依然として改善の余地がある¹。

ところでヒトにおける腸は、小腸と大腸の2つに大別できる。食事由来の栄養成分や、経口投与薬のほとんどは大腸ではなく、小腸で吸収される。また大腸は小腸と異なり、PEPT1やCYP3A4の発現量が低く、経口投与薬の吸収や代謝への寄与率が低い。従って、経口投与薬の評価系を構築するためには、大腸型の腸管上皮細胞でなく小腸型の腸管上皮細胞を作製することが必須である。しかしながら、当研究室に限らず多くの研究者らが作製したヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞が小腸と大腸のどちらに近い性質を有しているか検証した例はほぼない。本研究では、腸管オルガノイドの培養方法などを参考に、ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への高効率な分化誘導法の開発を行い、作製したヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞は、小腸あるいは大腸領域の性質を有しているのか評価した。さらに、作製したヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞が薬物吸収・代謝試験への応用が可能か検討した。

本研究ではまず、ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化にマトリゲル（腸管オルガノイド培養に汎用される試薬）を重層することで腸管上皮細胞への分化を促進できないか検討を行った²。マトリゲルとは、細胞外マトリックスを豊富に含むマウスEngelbreth-Holm-Swarm肉腫より抽出した可溶性基底膜調整品であり、ラミニンなどの様々な細胞外マトリックスおよび、IGF-1などの様々な液性因子が含まれている。マトリゲルを重層することにより、ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞におけるvillin 1陽性細胞率は約55%にまで向上した。以上の結果より、マトリゲルを重層することにより、ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化誘導効率を上昇させることに成功した。

腸管上皮細胞への分化最終段階でマトリゲルを重層することにより約55%の効率で分化誘導することができたものの、依然として改善の余地があった。分化誘導効率が改善しない原因としてNotch阻害剤であるDAPTの使用が考えられた。生体において、腸管幹細胞から腸管上皮細胞への分化にはNotchシグナルの活性化が重要であることが知られている。また、BIOはGSK3 β の阻害作用だけではなく、JAK/STATシグナルを阻害することが知られている。JAK/STATシグナルは、腸管幹細胞の増殖に必要な経路であることが知られており、JAK/STATシグナルの阻害は腸管上皮細胞への分化に影響を及ぼす可能性がある。

そこで、高効率なヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化誘導法を開発する為に、内胚葉細胞から腸管前駆細胞への分化により適したGSK3 β 阻害剤の探索を行った。さらに、Notch阻害剤を用いずに、腸管前駆細胞から腸管上皮細胞へ

の分化を促進できる化合物あるいは液性因子の探索を行った³。その結果、内胚葉細胞から腸管前駆細胞への分化に LY2090314 を作用させ、腸管前駆細胞から腸管上皮細胞への分化には、WNT3A、R-spondin 3、Noggin、EGF、IGF-1、DEX、SB202190 を作用することで villin 1 陽性細胞率を指標に約95%の効率でヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞へ分化誘導することに成功した。さらに、本分化誘導法で作製したヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞は小腸あるいは大腸領域の性質を有しているのか評価するために DNA マイクロアレイ解析を行った。ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の遺伝子発現パターンがヒト大腸よりもヒト小腸に類似していたことから、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞は大腸領域ではなく小腸領域の性質を有した腸管上皮細胞であることが示唆された。

ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞が薬物吸収・代謝試験に応用できるか評価した。まず、CYP3A4 誘導能を評価するために、CYP3A4 誘導作用を有するリファンピシンあるいはビタミン D3 を作用させたのち、CYP3A4 の遺伝子発現量を定量的 RT-PCR 法により解析した。その結果、リファンピシンあるいはビタミン D3 の作用により、CYP3A4 の遺伝子発現量は有意に上昇した。次に、CES2 の基質である Fluorescein diacetate (FD) を用いた代謝試験を実施することにより、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞は CES2 代謝能を有することを確認した。さらに、cell culture insert 上でヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞を分化誘導し、薬物透過試験に応用できるか評価した。アメリカ食品医薬品局 (FDA) は薬物透過試験を行うに当たり、TEER が 100-800 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 、マンニトールのような傍細胞透過性の基質の膜透過係数が $0.2-2 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$ の範囲に収まる単層膜の使用を推奨している。そこで、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞における TEER の測定及び、傍細胞透過性の基質である Lucifer Yellow の膜透過係数を算出した。その結果、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の TEER 値は約 656 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 、Lucifer Yellow の膜透過係数は約 $1.4 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$ であり、薬物透過試験に適した単層膜であると考えられた。最後に、PEPT1 の基質である glycylsarcosine を用いた透過試験により、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞は PEPT1 輸送能を有することを確認した。以上の結果より、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞は CYP3A4 誘導試験および CES2 代謝試験、傍細胞透過性基質の透過試験、PEPT1 輸送試験に応用できる可能性が示唆された。

本研究では、ヒト iPS 細胞から小腸型の腸管上皮細胞への高効率な分化誘導法の開発に成功した。また、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞が薬物吸収・代謝試験に応用できる可能性を示した。今後は、消化管吸収率の異なる様々な医薬品の膜透過係数を算出し、*Fa* との相関性について評価すると同時に、消化管代謝率の異なる様々な医薬品の代謝試験を行い、*Fg* との相関性について評価する必要がある。さらに、生体の臓器-臓器間のつながりを *in vitro* において再現しうる Micro physiological system (MPS) モデルを用いた腸管-肝臓が一体となった創薬モデルを構築できれば、*in vitro* において初回通過効果 (*Foal*) を予測できる可能性がある。今後、ヒト iPS 細胞を用いた創薬研究がさらに加速し、医薬品候補化合物の *Fa*、*Fg* だけではなく *Foal* が予測可能なモデルが誕生することを期待する。

参考文献

1. Ozawa, T. *et al.* Generation of enterocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells for drug absorption and metabolism studies in human small intestine. *Sci. Rep.* **5**, 16479 (2015).
2. Negoro, R. *et al.* Modeling of drug-mediated CYP3A4 induction by using human iPS cell-derived enterocyte-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **472**, 631- 6 (2016).
3. Negoro, R. *et al.* Efficient Generation of Small Intestinal Epithelial-like Cells from Human iPSCs for Drug Absorption and Metabolism Studies. *Stem Cell Reports* **11**, 1539- 1550 (2018).

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (根 来 亮 介)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教 授 水口 裕之
	副 査 教 授 中川 晋作
	副 査 教 授 近藤 昌夫

論文審査の結果の要旨

多くの医薬品は、錠剤などの剤形により経口投与される。経口投与薬は、小腸において吸収されると同時に代謝され、肝臓を経て全身へ移行する。そのため、医薬品候補化合物における小腸の吸収・代謝を予測可能なモデルは非常に有用である。しかしながら現在汎用されているモデルでは正確に薬物吸収・代謝を予測できないことが問題となっている。そこで近年、新たなヒト小腸モデルを作製するツールとして、ほぼ無限の増殖能と多分化能を有するヒトiPS細胞が期待を集めている。ヒトiPS細胞から機能的な腸管上皮細胞を高効率に作製することができれば、薬物吸収・代謝を高精度に予測できるモデルとなりうる。ところでヒトにおける腸は、小腸と大腸の2つに大別できる。経口投与薬のほとんどは大腸ではなく、小腸で吸収される。従って、経口投与薬の評価系を構築するためには、小腸型の腸管上皮細胞を作製することが必須である。しかしながら、当研究室に限らず多くの研究者らが作製したヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞が小腸と大腸のどちらに近い性質を有しているか検証した例はほぼない。そこで、申請者はヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への高効率な分化誘導法の開発を行い、作製したヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞は、小腸あるいは大腸領域の性質を有しているのか評価した。さらに、作製したヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞が薬物吸収・代謝試験への応用が可能か検討し、以下の結果を得た。

1. 内胚葉細胞から腸管前駆細胞への分化に LY2090314 を作用させ、腸管前駆細胞から腸管上皮細胞への分化には、WNT3A、R-spondin 3、Noggin、EGF、IGF-1、DEX、SB202190 を作用することで villin 1 陽性細胞率を指標に約 95%の効率でヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞へ分化誘導できることを示した。
2. 本分化誘導法で作製した腸管上皮細胞は、大腸領域ではなく小腸領域の性質を有した腸管上皮細胞であることを示した。
3. ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞は、CYP3A4 誘導試験、CES2 代謝試験、傍細胞透過性基質の透過試験、PEPT1 透過試験に応用できる可能性を示した。

以上本研究により、ヒトiPS細胞から小腸型の腸管上皮細胞への高効率な分化誘導法の開発に成功した。さらに、ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞が薬物吸収・代謝試験に応用できる可能性を示した。本研究にて得られた知見が、消化管吸収・代謝予測モデルの開発に大きく貢献するものと期待されることから、極めて意義深く、博士(薬学)の学位論文に値するものと認める。