



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | ヒト腸管オルガノイドを用いた薬物動態評価系の構築  |
| Author(s)    | 山下, 智起  |
| Citation     | 大阪大学, 2022, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/87987">https://hdl.handle.net/11094/87987</a>   |
| 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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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 ( 山 下 智 起 )   |                          |
| 論文題名  | ヒト腸管オルガノイドを用いた薬物動態評価系の構築 |
| 論文内容の要旨   |                          |
| <p>経口投与医薬品は消化管を通ることにより初回通過効果（吸収、代謝、および排泄）を受け、そのバイオアベイラビリティに大きな影響が及ぶ。こうした影響を実験的に予測することができれば、臨床試験における適切な投与量の推定や化合物の構造最適化につながることから、<i>in vitro</i>における腸管薬物動態評価は非常に重要である。</p> <p>従来、生体から単離したヒト腸管上皮細胞はその入手と培養が困難であったため、既存の<i>in vitro</i>腸管薬物動態評価系には人工脂質膜を用いた透過性試験、げっ歯類由来腸管組織を用いた試験、およびCaco-2細胞等のがん細胞株を用いた試験等が用いられてきた。しかしながら、薬物代謝酵素・トランスポーターの発現が無い/低いこと、ヒトへの外挿性に関する懸念があること、および遺伝的変異の蓄積があること等がこれら従来系の課題となっている。そのため、ヒトの正常な腸管上皮を生理学的に再現し、経口投与医薬品の腸管におけるふるまいを正確に予測し得るシステムが求められている。</p> <p>生検由来腸管オルガノイドは、極性を有した複数種の上皮細胞で構成される3次元培養体で、<i>in vitro</i>においてほとんど際限なく増殖し継代が可能であることに加え、由来臓器に近い構造的特徴と機能を有するとして注目を集めている。この生検由来腸管オルガノイドは、腸管上皮における幹細胞の維持と分化、発癌、および炎症性疾患のメカニズム解明等に大きく貢献してきたことから、上述した従来の<i>in vitro</i>腸管薬物動態評価系が抱える課題を解決し得ると期待される。</p> <p>既に複数の分野に大きなインパクトをもたらしている生検由来腸管オルガノイドであるが、筆者の知る限り、薬物動態学的研究に応用された例は存在しない。この原因の1つとして、生検由来腸管オルガノイドが有する閉じた袋状の3次元構造が挙げられる。つまり、経口投与された医薬品が最初に相互作用するはずの細胞頂端膜側（腸管腔側）が、生検由来腸管オルガノイドにおいては袋の内を向いているため、<i>in vitro</i>薬物動態試験を実施する際、被験物質を頂端膜側に添加することが困難となる。このことから、生検由来腸管オルガノイドを出発材料とし、最も汎用性の高い形状である単層膜（2次元培養系）を作製する技術の開発と、その薬物動態学的研究への応用の可能性を評価することが、現状における喫緊の課題と言える。</p> <p>以上のような背景を踏まえ筆者は、ヒト生検由来腸管オルガノイドの薬物動態学的検討への応用の可能性を評価することを目的として本研究を実施した。材料として、ヒト十二指腸の生検を取得・使用し、ヒト十二指腸オルガノイドを樹立した。次に、各種の予備検討を行ってヒト十二指腸オルガノイド由来単層膜（オルガノイド単層膜）の作製・使用法を策定し、以降に結果を述べる種々の評価を行った。</p> <p>まず、作製したオルガノイド単層膜を位相差顕微鏡、および走査型電子顕微鏡により観察した結果、オルガノイド単層膜は円柱上皮様であり、微絨毛構造と密着結合構造を有することが分かった。次に、免疫染色によるタンパク質発現・局在評価を行った結果、上皮細胞マーカーであるE-cadherinと密着結合マーカーであるzonula occludens-1が細胞膜・細胞間接着部で発現していることに加え、刷子縁膜マーカーであるVillinが頂端膜で、腸管における主要な薬物代謝酵素であるcytochrome P450 (CYP) 3A4が細胞質で発現していること明らかとなった。さらに、バリア機能の指標となる経上皮電気抵抗（trans-epithelial electrical resistance: TEER）を測定した結果、オルガノイド単層膜のTEERは適正の範囲（100-800 Ω・cm<sup>2</sup>）内であった。これらの結果から、オルガノイド単層膜は極性を有した円柱上皮様、かつ腸管上皮様の単層膜で、密着結合等によるバリアを形成していることが示唆された。</p> <p>次に、オルガノイド単層膜の遺伝子発現レベルを評価するために、qRT-PCRを実施し、<i>in vitro</i>薬物動態評価系として汎用されているCaco-2細胞、およびヒト十二指腸との比較を行った。まず、ヒト小腸で発現する主要なCYP分子種について、オルガノイド単層膜における遺伝子発現レベルはCaco-2細胞と比較して高値であった。特に、オルガノイド単層膜におけるCYP3A4の遺伝子発現レベルは、ヒト十二指腸と同程度であった。次に、オルガノイド単層膜におけるUDP-glucuronosyltransferase 1A1の遺伝子発現レベルは、Caco-2細胞よりも高く、ヒト十二指腸と同程度であった。これらの結果から、オルガノイド単層膜は各種の薬物動態関連因子を高発現しており、生体の小腸に類似した特徴を</p> |                          |

有することから、*in vitro*薬物動態評価系として有望であると考えられる。

さらにオルガノイド単層膜の薬物代謝酵素・トランスポーターの活性評価を行った。まず、CYP3A4活性を評価するために、luciferin前駆体を用いた代謝試験を行った結果、オルガノイド単層膜はCaco-2細胞より高い活性を示した。次に、carboxylesterase (CES) 1/2活性プロファイルの評価するために、dabigatran etexilateを用いた代謝試験を行った結果、オルガノイド単層膜はヒト小腸に類似したプロファイル (CES2>CES1) を示した一方で、Caco-2細胞はその逆 (CES2<CES1) であった。さらに、主要な薬物排出トランスポーターであるP-glycoproteinの排出輸送活性を、digoxinを基質として測定した結果、オルガノイド単層膜はCaco-2細胞と同等の排出比 (排出トランスポーター活性の指標) を示した。また、主要なジペプチドトランスポーターであるpeptide transporter 1の活性を、glycylsarcosineを基質として測定した結果、オルガノイド単層膜はCaco-2細胞よりも高い活性を示した。これらの結果から、オルガノイド単層膜は、既存系よりも高い機能と生体に近い特徴を有しており、種々の薬物動態学的研究に応用可能であることが示唆された。

上記に加え、オルガノイド単層膜は既存の系と比較して幅広い薬物代謝酵素誘導能を有していること、および生体に近い網羅的遺伝子発現プロファイルを示すこと等も明らかとしている。以上により、オルガノイド単層膜は、経口投与された医薬品の薬物動態を予測するための強力なプラットフォームとなり得ると考えられ、今後の社会実装に向けてより一層の期待が高まるものである。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

|                 |     |           |
|-----------------|-----|-----------|
| 氏 名 ( 山 下 智 起 ) |     |           |
|                 | (職) | 氏 名       |
| 論文審査担当者         | 主 査 | 教 授 水口 裕之 |
|                 | 副 査 | 教 授 近藤 昌夫 |
|                 | 副 査 | 教 授 中川 晋作 |

## 論文審査の結果の要旨

経口投与医薬品は消化管を通ることにより初回通過効果（吸収、代謝、および排泄）を受け、そのバイオアベイラビリティに大きな影響が及ぶ。こうした影響を実験的に予測することができれば、臨床試験における適切な投与量の推定や化合物の構造最適化につながることから、*in vitro*における腸管薬物動態評価は非常に重要である。

従来、生体から単離したヒト腸管上皮細胞はその入手と培養が困難であったため、既存の*in vitro*腸管薬物動態評価系には人工脂質膜を用いた透過性試験、げっ歯類由来腸管組織を用いた試験、およびCaco-2細胞等のがん細胞株を用いた試験等が用いられてきた。しかしながら、薬物代謝酵素・トランスポーターの発現が無い/低いこと、ヒトへの外挿性に関する懸念があること、および遺伝的変異の蓄積があること等がこれら従来系の課題となっている。そのため、ヒトの正常な腸管上皮を生理学的に再現し、経口投与医薬品の腸管におけるふるまいを正確に予測し得るシステムが求められている。

生検由来腸管オルガノイドは、極性を有した複数種の上皮細胞で構成される3次元培養体で、*in vitro*においてほとんど際限なく増殖し継代が可能であることに加え、由来臓器に近い構造的特徴と機能を有するとして注目を集めている。この生検由来腸管オルガノイドは、腸管上皮における幹細胞の維持と分化、発癌、および炎症性疾患のメカニズム解明等に大きく貢献してきたことから、上述した従来の*in vitro*腸管薬物動態評価系が抱える課題を解決し得ると期待される。

既に複数の分野に大きなインパクトをもたらしている生検由来腸管オルガノイドであるが、薬物動態学的研究に応用された例は存在しない。この原因の1つとして、生検由来腸管オルガノイドが有する閉じた袋状の3次元構造が挙げられる。つまり、経口投与された医薬品が最初に相互作用するはずの細胞頂端膜側（腸管腔側）が、生検由来腸管オルガノイドにおいては袋の内を向いているため、*in vitro*薬物動態試験を実施する際、被験物質を頂端膜側に添加することが困難となる。このことから、生検由来腸管オルガノイドを出発材料とし、最も汎用性の高い形状である単層膜（2次元培養系）を作製する技術の開発と、その薬物動態学的研究への応用の可能性を評価することが、現状における喫緊の課題と言える。

以上のような背景を踏まえ筆者は、材料として、ヒト十二指腸の生検を取得・使用し、ヒト十二指腸オルガノイドを樹立した。次に、各種の予備検討を行ってヒト十二指腸オルガノイド由来単層膜（オルガノイド単層膜）の作製・使用法を策定し、種々の評価を行った。本検討により以下の結果を得た。

1. オルガノイド単層膜は播種後 3-8 日が使用時期として適切である。
2. オルガノイド単層膜は小腸上皮様かつ円柱上皮様であり、バリア機能と極性を有していた。
3. 複数の薬物動態関連因子が従来系より高発現・高活性で生体のレベル・特徴に近いものもあった。

以上、本論文では、オルガノイド単層膜が有する薬物動態学的研究への応用に向けた高い可能性が示され、経口投与された医薬品の薬物動態を予測するための強力なプラットフォームとなり得ると考えられる。本成果は、*in vitro*腸管薬物動態評価に革新をもたらし得るものであり、本論文は極めて意義深く、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。