



Title	オルガノイド培養技術と腸管分化誘導技術を組み合わせた高機能なヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の開発
Author(s)	乾, 達也
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/96138
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

博 士 論 文

オルガノイド培養技術と腸管分化誘導技術を組み合わせた
高機能なヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の開発



2023 年（令和 5 年）度

大阪大学大学院 薬学研究科 創成薬学専攻
分子生物学分野 博士後期課程

乾 達也

目次

略語一覧	2
緒論	4
本論	5
第一章：ヒト生検由来腸オルガノイドとヒト iPS 細胞由来腸オルガノイドの比較	5
材料と方法	6
結果	13
考察	28
第二章：高機能なヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドの開発とその機能評価	31
材料と方法	33
結果	41
考察	62
総括	65
謝辞	67
参考文献	68
主論文	73
参考論文	73

略語一覽

BCRP; breast cancer resistance protein
CES1; carboxylesterase 1
CES2; carboxylesterase 2
CDX2; caudal type homeobox 2
CHGA; chromogranin A
CYP2C9; cytochrome P450 2C9
CYP2C19; cytochrome P450 2C19
CYP2D6; cytochrome P450 2D6
CYP3A4; cytochrome P450 3A4
DCN; decorin
EpCAM; epithelial cell adhesion molecule
FGF4; fibroblast growth factor 4
FN1; fibronectin 1
FRZB; frizzled related protein
GATA4; GATA binding protein 4
GAPDH; glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
hTERT; human telomerase reverse transcriptase
iPS; induced pluripotent stem
LGALS3; galectin 3
LGR5; leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5
LYZ; lysozyme
MCT1; monocarboxylate transporter 1
MDR1; multidrug resistance 1
MRP; multidrug resistance associated protein
MUC2; mucin 2
NANOG; Nanog homeobox
OATP; solute carrier organic anion transporter family member
OCT1; organic cation/carnitine transporter1
OST; organic solute transporter
P-gp; P-glycoprotein
PEPT1; peptide transporter 1
PERP; p53 apoptosis effector related to PMP22
POSTN; periostin

SOX2; sex determining region Y-box transcription factor 2
SOX17; sex determining region Y-box transcription factor 17
TEER; transepithelial electrical resistance
UGT1A1; UDP-glycosyltransferase 1A1
VIL1; villin 1
VIM; vimentin

緒論

経口投与された医薬品は、最初に小腸で吸収・代謝・排泄を受ける。この一連の反応は医薬品の体内動態に大きな影響を与えるため、小腸における薬物動態を *in vitro* で評価することは創薬研究において重要な検討項目となっている¹。現状の創薬研究では、上記の反応を *in vitro* で評価するために実験動物由来の小腸組織²やヒト結腸癌由来細胞株である Caco-2 細胞³を用いた評価系が汎用されている。しかしながら、それぞれ種差があること^{4,6}や薬物動態関連分子の発現量がヒト小腸上皮細胞と比べて著しく低い⁷等の問題があり、ヒト小腸における薬物動態を正確に評価できる系の確立が求められている^{8,9}。

そのような評価系として新たに開発が進められてきたのがヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞である。ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞を分化誘導する研究は本邦を中心にこれまで盛んに行われており、当研究室をはじめ多くの研究室でヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞が開発されてきた¹⁰⁻²²。しかしながら、いずれも分化誘導期間が長期にわたる点やそれに伴うロット間差の大きさ、分化誘導法にさらなる向上の余地があるなどの課題があった。

一方で、腸管オルガノイドの研究^{23,24}が近年盛り上がりを見せてきている。腸管オルガノイドは、ヒト生体から単離した腸管上皮幹細胞を適切な条件で培養することで樹立される3次元培養体であり、ヒト腸管上皮細胞を本来の機能のある程度保ったまま長期に渡り *in vitro* 継代・維持培養が可能である。しかし、元となる生体組織の供給が限られることや倫理的な問題があり、利便性に問題がある。それに対して、ヒト iPS 細胞から直接腸管オルガノイドを分化誘導する手法²⁵も開発されたため、それらを用いて創薬研究への応用にに向けた検討^{12,26}が進んでいるが、機能面で未だ課題が多いのが実情である。

そこで本研究では、創薬研究に応用可能な腸管上皮細胞モデルとして、ヒト iPS 細胞から継代・維持培養できる高機能な腸管オルガノイドを開発することを目指した。第一章では、現状のヒト iPS 由来腸管オルガノイドの課題を明確にするため、ヒトの小腸生検組織から作製された腸管オルガノイド（生検オルガノイド：b-IO）との比較を行った。まず、同一個人からヒト生検オルガノイドおよびヒト iPS 細胞の樹立、および樹立したヒト iPS 細胞を用いてヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイド（i-IO）の樹立を試みた。その後、両オルガノイドについて3次元培養状態での特性、および実際の薬物動態研究への応用を想定して、インサート上に播種した2次元培養状態における特性を比較した。第二章では、より高機能なヒト iPS 由来腸管オルガノイドを作製するため、当研究室が開発したヒト iPS 細胞から腸管上皮様細胞（ELC）を分化誘導する手法¹⁴を改良し、ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞を分化誘導し、その細胞から腸管オルガノイド（ELC-org）の樹立を試みた。樹立したオルガノイドおよびその単層膜について、最適な培養条件を検討するとともに、その3次元培養状態および単層膜状態での特性について、遺伝子発現レベルや薬物動態因子の活性を指標として評価した。

本論

第一章：ヒト生検由来腸オルガノイドとヒト iPS 細胞由来腸オルガノイドの比較

元来、ヒト腸管上皮細胞は機能を維持したまま長期間培養することは困難であったため、マウスなどの実験動物の小腸組織やヒト大腸がん由来の Caco-2 細胞株が広く利用されてきた³。しかしながら、前者はヒトに外挿できず、後者は薬物代謝酵素の発現量がヒト小腸上皮細胞よりもはるかに低いという制限があった²⁷。このような問題を解決するために、近年ヒト生検由来腸管オルガノイド (b-IO) やヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイド (i-IO) が開発され研究が進められてきた。

b-IO は Sato らによって初めて報告された腸管上皮細胞の 3 次元培養体であり、腸管上皮のニッチ因子を含む培地中で腸管幹細胞を含む陰窩を培養することで 2009 年にマウス、2011 年にヒトから樹立された^{23,28}。b-IO は、上皮細胞のみで構成され²³、ヒトの腸管に類似した機能・構造をしており、*in vitro* で長期間維持・培養できる。その後、当研究室を含む多くの研究者により、b-IO の薬物動態研究²⁴、病理学的研究²⁹、感染実験³⁰などの様々な分野への応用が報告された。

i-IO は、2011 年に Spence らによって初めて報告された²⁵。i-IO は、腸管の発生過程を模倣するために、様々な液性因子を適切な順序と時期に作用させていくことで、ヒト iPS 細胞から分化誘導される。ヒト iPS 細胞を出発材料としているため、上皮細胞だけでなく、線維芽細胞や筋肉細胞などの間葉系細胞も含んでいることが b-IO と異なる点である²⁵。

b-IO は元となる幹細胞を含む組織を外科的な手法で個人から採取してくるため、侵襲性が高く入手に関して制限があるのが現状である。一方、i-IO の元となる iPS 細胞は容易に採取できる血液細胞などからも樹立できるため、侵襲性が低い。さらに、iPS 細胞は容易に増幅培養が可能であり、生体組織と異なり安定した供給が可能である。

上記のように i-IO の方が利用のしやすさで優れており、幅広い応用が期待される。しかし、生体組織由来の機能を有する b-IO に対して i-IO の機能は分化誘導技術に大きく依存する。そのため、まずは現状における両者の特性を理解することで、既存の i-IO の抱える課題を明らかにする必要がある。一方で、著者の知る限り、b-IO と i-IO を直接的かつ詳細に比較した例は存在しない。チトクローム P450 (CYP) などの薬物動態関連遺伝子の遺伝子発現量や活性は個人差が大きいため、これら 2 種類のオルガノイドを直接的かつ厳密に比較するためにはその由来を揃える必要がある。そこで本研究では、同一個人のヒト十二指腸生検から b-IO とヒト iPS 細胞を樹立し、その iPS 細胞から i-IO を作製した。両者における 3 次元培養状態と 2 次元培養状態のそれぞれについて、その特性を詳細に比較した。

材料と方法

生検由来腸管オルガノイド (b-IO) の樹立と維持培養

ヒト十二指腸生検組織採取は、札幌医科大学および大阪大学大学院薬学研究科の研究倫理委員会（倫理審査承認番号：薬人 2019-3、課題名：クローン病、潰瘍性大腸炎の小腸および大腸における薬物動態関連タンパク質の発現量解析と腸オルガノイドの薬物動態試験への有用性の評価）の承認の元、札幌医科大学附属病院・仲瀬裕志先生のもので行われた。即ち、札幌医科大学附属病院の患者を対象に、上部消化管内視鏡検査中にヒト十二指腸生検を行った。内視鏡観察下、十二指腸の非炎症性固有層粘膜から 2-4 個の生検サンプルを得た。得られたサンプルは、オルガノイドを樹立するまでの間、 $1\times$ penicillin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific) を含む氷冷 PBS 中で保存した。b-IO の樹立は、以前の報告³¹に記載された方法に若干の修正を加えて行った²⁴。簡潔に説明すると、得られた十二指腸サンプルを 2.5 mM EDTA 中に 4°C で 30 分間インキュベートし、上下に激しくピペッティングして陰窩を分離した。陰窩をマトリゲル (Corning) に懸濁し、その懸濁液 25-40 μ L を 24 ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific) の各ウェルにドーム状の液滴としてアプライした。マトリゲルを 37°C で 10 分間重合させ、そこに $1\times$ penicillin-streptomycin を含むオルガノイド培地 (IntestiCult Organoid Growth Medium (Human), STEMCELL Technologies) を 500 μ L/well 加えた。b-IO を維持するため、培地 (IntestiCult Organoid Growth Medium (Human)) は 2 日ごとに交換し、オルガノイドは 1 週間ごとに 1:3-1:10 で継代した。継代は主に Miyoshi ら³¹の報告に基づいて行った。各ウェルを 0.5 mM EDTA で洗浄した後、TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific) を加えてオルガノイドをチップで掻き取りながら懸濁した。この懸濁液を 37°C で 5-7 分間インキュベートしマトリゲルを溶解させた後、オルガノイドを 2-5 回上下にピペッティングし、適切な濃度になるようにマトリゲルで再懸濁した。次に、25-40 μ L のオルガノイド懸濁液を 24 ウェルプレートの各ウェルにドーム状の液滴としてアプライした。マトリゲルを 37°C で 10 分間重合させ、 $1\times$ penicillin-streptomycin を含むオルガノイド培地を 500 μ L/well 加えた。

ヒト iPS 細胞 (b-iPS 細胞) の樹立

b-IO の樹立に用いたヒト十二指腸生検から分離した陰窩 (1.0×10^6 個以上) を 90 μ L の Opti-MEM に懸濁し、ヒト iPS 細胞の樹立に必要なプラスミドミックス 10 μ L (2.1 mg/mL の pCE-hOCT3/4 を 2.1 μ L、1 mg/mL の pCE-hSK を 2.1 μ L、1 mg/mL の pCE-hUL を 2.1 μ L、1 mg/mL の pCE-mp53DD を 2.1 μ L、1 mg/mL の pCXB-EBNA を 1.6 μ L (沖田博士提供)) を加えた³²。その懸濁液をキュベットに移し、エレクトロポレーションを行った (各パルス波長は **Table 1** を参照)。エレクトロポレーションした細胞を、樹立補因子 (2 μ M SB431542、

0.5 μ M PD0325901、10 μ M Y27632、および 2.5 μ M Thiazovivin) および 0.5×Antibiotic-Antimycotic を含む IntestiCult Organoid Growth Medium (Human) 9 mL に懸濁した。その細胞懸濁液を iMatrix-511 silk でコートした 6 ウェルプレート の各ウェルに 1.5mL ずつ加え、樹立補因子を含む StemFit AK02N 培地で培養した。14 日目にコロニーを継代し、StemFit AK02N を用いて培養した。ここで樹立したヒト iPS 細胞を b-iPS 細胞と呼称した。

Table 1. エレクトロポレーション法で用いたパルス波長

	Voltage	Pulse width	Pulse interval	Times	Attenuation Ratio	Polarity
	(V)	(ms)	(ms)		(%)	
Perforation pulse	125	5	50	2	10	+
Introduction pulse	20	50	50	5	40	+ / -

ヒト iPS 細胞の維持培養

ヒト胎児肺線維芽細胞由来の Tic-iPS 細胞 (JCRB1331) は JCRB 細胞バンクから提供された。これらの細胞と b-iPS 細胞は、iMatrix-511 コーティングしたプレートと StemFit AK02N 培地を用いて、メーカー (Ajinomoto) の指示に従って維持した。

ヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイド (i-IO) への分化と維持

既報²⁵に基づいて i-IO の樹立を行った。簡単に説明すると、b-iPS 細胞を 2%マトリゲルでコートした 6 ウェルプレートに播種し ($1.1 \times 10^6 \sim 3.0 \times 10^6$ 個/ウェル)、播種後 24 時間以内に分化誘導を開始した。まず、内胚葉細胞に分化させるため、b-iPS 細胞を 100ng/ml アクチビン A と Defined FBS (dFBS) を含む基礎培地 (2mM L-グルタミン、1×penicillin-streptomycin を含む RPMI1640 培地) で 3 日間培養した。その際、1 日目、2 日目、3 日目の各 dFBS 濃度 (vol/vol) はそれぞれ 0、0.2、2%であった。次に、この内胚葉細胞を後腸内胚葉細胞に分化させるため、を 2% dFBS、500 ng/ml FGF4、500 ng/ml WNT3A を含む基礎培地で 4-7 日間培養した。7 日目に、培地中に浮遊またはウェルの底に形成されたオルガノイド様の構造体を回収し、マトリゲルに包埋し、IntestiCult Organoid Growth Medium (human)を用いて培養した。継代は 2~3 週間に 1 回行い、12~23 継代の i-IO を実験に用いた。

Short tandem repeat (STR) 解析

DNA は DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて b-IO および b-iPS 細胞から抽出した。STR 解析はタカラバイオ社によって行われた。

アルカリホスファターゼ (ALP) 染色

ALP 染色は、Red-Color AP Staining Kit (System Biosciences) を用い、メーカーの指示に従って行った。染色した標本は位相差顕微鏡で観察した。

腸管オルガノイドの 2 次元培養

既報²⁴に基づいてオルガノイドを 2 次元培養した。簡単に説明すると、細胞培養用インサート (24 ウェル、孔径 $0.4\ \mu\text{m}$ 、Corning) に、2% (vol/vol) のマトリゲルを含んだ Advanced DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific) $250\ \mu\text{L}$ を加え、 37°C で 1 時間インキュベーションし、マトリゲルコートした。オルガノイドを TrypLE Select で懸濁して 37°C 、10 分間インキュベートしマトリゲルを溶解させた。それをピペティングし、オルガノイドを単一細胞に解離させ、 $10\ \mu\text{M}$ Y-27632 (FUJIFILM Wako Pure Chemical) を含むオルガノイド培地 (IntestiCult Organoid Growth Medium) で再懸濁した。この細胞懸濁液を $40\ \mu\text{m}$ のセルストレーナー (Corning) で濾過し、マトリゲルコートしたインサートに $3.0 \times 10^5 \text{ cells/well}$ 以上になるように播種した。1-2 日ごとに培地交換を行い、7 日間 2 次元培養した後、各アッセイに使用した。

qRT-PCR 解析

ISOGEN (NIPPON GENE) を用いてサンプルから RNA を回収し、1 サンプルあたり 500 ng の RNA を用いて Superscript VILO cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific) により cDNA 合成を行った。ターゲットとなる遺伝子の mRNA 発現レベルは $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法を用いて相対的に定量した。なお、内部標準遺伝子として *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) を用いた。qRT-PCR に用いたプライマーの配列 (Table 2) は PrimerBank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) から取得した。

Table 2. qRT-PCR 実験に用いたプライマーの配列

Gene Symbol	Primers (forward/reverse; 5' to 3')
<i>BCRP</i>	TGCAACATGTACTGGCGAAGA/TCTTCCACAAGCCCCAGG
<i>CES1</i>	ACCCCTGAGGTTTACTCCACC/TGCACATAGGAGGGTACGAGG
<i>CES2</i>	CTAGGTCCGCTGCGATTTG/TGAGGTCCTGTAGACACATGG
<i>CHGA</i>	TAAAGGGGATACCGAGGTGATG/TCGGAGTGTCTCAAAACATTCC

<i>CYP2C19</i>	ACTTGGAGCTGGGACAGAGA/CATCTGTGTAGGGCATGTGG
<i>CYP2C9</i>	GGACAGAGACGACAAGCACA/CATCTGTGTAGGGCATGTGG
<i>CYP2J2</i>	TGGCTTGCCCTTAATCAAAGAA/GGCCACTTGACATAATCAATCCA
<i>CYP2S1</i>	GCGCTGTATTCAGGGCTCAT/CTTCCAGCATCGCTACGGTT
<i>CYP3A4</i>	AAGTCGCCTCGAAGATACACA/AAGGAGAGAACACTGCTCGTG
<i>DCN</i>	ATGAAGGCCACTATCATCCTCC/GTCGCGGTCATCAGGAAGTT
<i>ECAD</i>	CGAGAGCTACACGTTACGG/GGGTGTCGAGGGAAAAATAGG
<i>EPCAM</i>	AATCGTCAATGCCAGTGTACTT/TCTCATCGCAGTCAGGATCATAA
<i>FGF4</i>	CTCGCCCTTCTTCACCGATG/GTAGGACTCGTAGGCGTTGTA
<i>FN1</i>	CGGTGGCTGTCAGTCAAAG/AAACCTCGGCTTCCTCCATAA
<i>FRZB</i>	GAGCCCATACTCATCAAGTACCG/CCTCGGGAGAGATGCACAC
<i>GAPDH</i>	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA/GTGGTCGTTGAGGGCAATG
<i>GATA4</i>	CATCAAGACGGAGCCTGGCC/TGACTGTCGGCCAAGACCAG
<i>hTERT</i>	CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA/GGATGAAGCGGAGTCTGGA
<i>LGALS3</i>	GTGAAGCCCAATGCAAACAGA/AGCGTGGGTAAAGTGGAAGG
<i>LGR5</i>	CTCCCAGGTCTGGTGTGTTG/GAGGTCTAGGTAGGAGGTGAAG
<i>LYZ</i>	GGCCAAATGGGAGAGTGGTTA/CCAGTAGCGGCTATTGATCTGAA
<i>MCT1</i>	CCGCGCATATAACGATATTT/ATCCAACTGGACCTCCAA
<i>MDR1</i>	GCCAAAGCCAAAATATCAGC/TTCCAATGTGTTCCGGCATT
<i>MRP2</i>	TGAGCAAGTTTGAAACGCACAT/AGCTCTTCTCCTGCCGTCTCT
<i>MRP3</i>	GTCCGCAGAATGGACTTGAT/TCACCACTTGGGGATCATTT
<i>MUC2</i>	GAGGGCAGAACCCGAAACC/GCGAAGTTGTAGTCGCAGAG

<i>NANOG</i>	AGAAGGCCTCAGCACCTAC/GGCCTGATTGTTCCAGGATT
<i>OATPIA2</i>	TGGGGAACCTTTGAAATGTGG/AAGGCTGGAACAAAGCTTGA
<i>OATP2B1</i>	TGATTGGCTATGGGGCTATC/CATATCCTCAGGGCTGGTGT
<i>OCT1</i>	TAATGGACCACATCGCTCAA/AGCCCCTGATAGAGCACAGA
<i>OCT3/4</i>	CTTGAATCCCGAATGGAAAGGG/GTGTATATCCCAGGGTGATCCTC
<i>OSTA</i>	GAAGACCAATTACGGCATCC/AGTGAGGGCAAGTTCCACAG
<i>OSTB</i>	GAGCTGCTGGAAGAGATGCT/TGCTTATAATGACCACCACAGC
<i>PEPT1</i>	AATGTTCTGGGCCTTGTTTG/CATCTGATCGGGCTGAATTT
<i>PERP</i>	CTTCACCCCTTCATGCCAACC/GCCAATCAGGATAATCGTGGCT
<i>POSTN</i>	CTCATAGTCGTATCAGGGGTCG/ACACAGTCGTTTTCTGTCCAC
<i>SOX17</i>	GTGGACCGCACGGAATTTG/GAGGCCCATCTCAGGCTTG
<i>SOX2</i>	GGCAGCTACAGCATGATGATGCAGGAGC/CTGGTCATGGAGTTGTACTGCAGG
<i>UGT1A1</i>	CTGTCTCTGCCCACTGTATTCT/TCTGTGAAAAGGCAATGAGCAT
<i>UGT2B17</i>	GCTCTGGGAGTTGTGGAAAG/ATCACCTCATGACCCCTCTG
<i>UGT2B7</i>	GGGAAAGCTGACGTATGGCT/ACAGAAGAAAGGGCCAACGT
<i>VILI</i>	AGCCAGATCACTGCTGAGGT/TGGACAGGTGTTCTCCTTC

透過型電子顕微鏡 (TEM) 像

オルガノイドを細胞培養用インサート（12 ウェルフォーマット、Corning）上で 5 日間培養した後、リン酸緩衝化 2% グルタルアルデヒドで固定した。固定後の操作（脱水、包埋、超薄切片化、染色、観察）は大阪大学微生物病研究所中央実験室にて行った。

増殖能評価

CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay（Promega）を用い、細胞内 ATP を定量することで生細胞数を評価した。発光強度は、マルチモードマイクロプレートリーダー（Berthold Technologies）を用いて、1 ウェルあたり 0.25 秒間測定した。

FACS 解析

単細胞懸濁液を 4%PFA で 4°C、10 分間固定し、一次抗体、二次抗体とインキュベートした。解析は MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec) と FlowJo ソフトウェア (FlowJo LLC, <http://www.flowjo.com/>) を用いて行った。すべての抗体を **Table 3** に示す。

Table 3. FACS 解析で使した抗体

Name	Company	Catalogue No.	Dilution
CD326 (EpCAM)-APC, human monoclonal	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany	130-091-254	1:50
Villin Antibody	Santa Cruz Biotechnology, TX, USA	sc-7672	1:50
Donkey anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	A11055	1:1000

経上皮電気抵抗 (TEER) 測定

TEER の測定には、Millicell ERS-2 voltohmmeter with STX01 Electrode (Merck)を用いた。測定値は細胞培養用インサートの面積に基づいて $\Omega \times \text{cm}^2$ に変換された後、ブランクの抵抗値を差し引くことで実際の TEER を求めた。

CYP3A4 活性測定

CYP3A4 活性の測定は P450-Glo CYP3A4 Assay Kit (Promega) を用いて行った。CYP3A4 基質には キット付属の Luciferin-IPA を用いた。蛍光活性の測定にはルミノメーター (Lumat LB 9507; Berthold Technologies) を用いた。CYP3A4 活性は、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、メーカーの指示に従い、各ウェルに含まれるタンパク質量で正規化した。CYP3A4 の阻害剤として、 $10 \mu\text{M}$ ケトコナゾール (FUJIFILM Wako Pure Chemical) を基質と共に添加して使用した。

Carboxylesterase 2 (CES2) 活性測定

細胞ホモジネートを回収し、CES2 基質である $10 \mu\text{M}$ の fluorescein diacetate (FUJIFILM Wako Pure Chemical) とインキュベートした。CES2 の阻害剤として、 1mM の loperamide (FUJIFILM Wako Pure Chemical) を基質と共に添加して使用した。

P-gp (multidrug resistance 1; MDR1) のトランスポーター活性測定

細胞培養用インサート上の細胞に、10 μ M の Rhodamine123 (Sigma-Aldrich) を含む Hank's Balanced Salt Solution (HBSS ; Thermo Fisher Scientific) 緩衝液を加えて 90 分間インキュベートし、レシーバー側からサンプリングした。Rhodamine123 の蛍光シグナルは、TriStar LB 941 (Berthold Technologies) を用い、485 nm の励起および 535 nm の発光フィルターを用いて測定した。

P_{app} と ER の算出

トランスポーターアッセイにおける P_{app} は、以下の式に従って計算された。

$$P_{app} = \delta C_r / \delta t \times V_r / (A \times C_0)$$

- ・ δC_r : レシーバー側での終濃度
- ・ δt : インキュベーション時間
- ・ V_r : レシーバー側の体積
- ・ A : インサートの底面積
- ・ C_0 : ドナー側での初濃度

排出比 (efflux ratio: ER) は下記の式を用いて算出した。

$$ER = P_{app \text{ B to A}} / P_{app \text{ A to B}}$$

$P_{app \text{ A to B}}$: 頂端膜側 (apical side: A) から基底膜側 (basolateral side: B) 方向の P_{app}

$P_{app \text{ B to A}}$: 基底膜側から頂端膜側方向の P_{app}

RNA-seq 解析

RNA は ISOGENE (NIPPON GENE) を用いて単離した。RNA の品質評価には BioAnalyzer (Agilent Technologies) と RNA 6000 nanochip (Agilent Technologies) を用い、すべての RNA サンプルが RNA integrity number (RIN) 7 以上であることを確認した。RNA シーケンス用のライブラリー構築は、TruSeq Stranded Total RNA Library Prep kit (Illumina) を用いて行った。シーケンスには HiSeq 4000 システム (Illumina) を使用し、FASTQ ファイルを作成した。FASTQ ファイルの品質チェックには、FastQC、FASTX、FastQ Screen³³ を使用した。FASTQ ファイルから得られたシングルエンドリードは、STAR aligner³⁴ を用いて Genome Reference Consortium Human Build 38 に対してマッピングした。その後の解析は、integrated Differential Expression and Pathway analysis (iDEP)³⁵ と Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)^{36,37} を用いて行った。

結果

b-IO と b-iPS 細胞の樹立およびその性状評価

まず、同一個人のヒト十二指腸生検から b-IO と iPS 細胞 (b-iPS 細胞) を材料と方法に記載したように樹立した。本研究の主目的である b-IO と b-iPS 細胞の遺伝的背景の同一性を確認するため、Short tandem repeat (STR) 解析を行った。その結果、b-IO のゲノム DNA と b-iPS 細胞のゲノム DNA から、解析対象とした遺伝子上の 10 個の座位全てに同一の STR 型が検出された。このことから、b-IO と b-iPS 細胞は、確かに単一個体由来であることが確認された (**Fig. 1A**)。樹立した b-iPS 細胞の性状を評価するため、位相差顕微鏡による形態観察、アルカリホスファターゼ (ALP) 染色、qRT-PCR 解析による未分化および分化マーカー遺伝子の発現解析を行った。b-iPS 細胞とポジティブコントロールであるヒト胎児肺線維芽細胞由来の Tic-iPS 細胞³⁸ (JCRB Cell Bank; JCRB1331) との間に形態学的な差は認められなかった。両者とも、細胞間の境界は不明瞭、核は比較的大きく明瞭、輪郭が明瞭なコロニーを形成するなど、iPS 細胞の典型的な形態を有していた (**Fig. 1B**)。ALP による染色でも両方で染まり方に差異は見られなかった (**Fig. 1C**)。qRT-PCR 解析の結果、b-iPS 細胞における未分化マーカー遺伝子 (*nanog homeobox*; *NANOG*, *sex determining region Y-box transcription factor 2*; *SOX2*, *fibroblast growth factor 4*; *FGF4*, *human telomerase reverse transcriptase*; *hTERT*) の発現レベルは、Tic-iPS 細胞と同様であり、b-iPS 細胞樹立の材料となった腸管上皮の生検組織よりも高いことが明らかになった (**Fig. 1D**)。また、b-iPS 細胞における内胚葉分化マーカー遺伝子 (*GATA binding protein 4*; *GATA4*, *sex determining region Y-box transcription factor 17*; *SOX17*) の発現レベルは、Tic-iPS 細胞と同程度であり、生検組織よりも低かった (**Fig. 1E**)。これらの結果は、b-iPS 細胞が腸管上皮細胞の初期化に成功し、一般的な iPS 細胞の典型的な特徴を有していたことを示している。

Figure 1

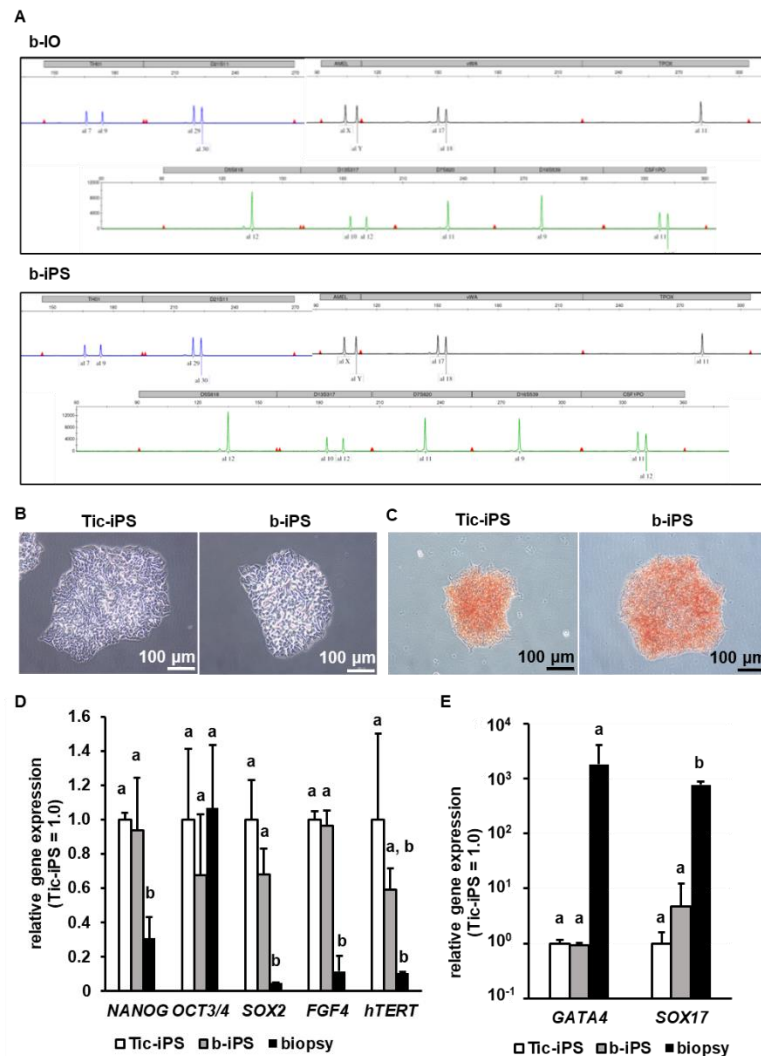


Figure 1. Undifferentiated potential of human duodenal biopsy-derived iPS cells

(A) The waveform data in b-IOs and human duodenal biopsy-derived iPS cells (b-iPS) by STR analysis. (B) The phase contrast images of Tic-iPS and b-iPS cells. Tic-iPS cells, which is derived from human fetal lung fibroblast, were used as a positive control. (C) Alkaline phosphatase staining of Tic-iPS and b-iPS cells. (D) The gene expression levels of undifferentiated markers (*NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2*, *FGF4*, and *hTERT*) in Tic-iPS cells, b-iPS and duodenal biopsy (biopsy) were examined by qRT-PCR analysis. The gene expression levels in Tic-iPS cells were taken as 1.0. Data represent the means \pm S.D. (n = 3, biological replicate). (E) The gene expression levels of endoderm cell markers in Tic-iPS cells, b-iPS and biopsy were examined by qRT-PCR analysis. The gene expression levels in the Tic-iPS were taken as 1.0. Data represent the means \pm S.D. (n = 3, biological replicate). Statistical significance was evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Groups that do not share the same letter had significantly different results (p < 0.05).

i-IO の樹立と性状評価

i-IO は、**材料と方法**に記載したように樹立した (**Fig. 2A**)。i-IO の分化誘導過程を位相差顕微鏡で観察した (**Fig. 2B**)。過去の報告³⁹と一致して、未分化の b-iPS 細胞 (**Fig. 2B**、0 日目) から内胚葉細胞 (**Fig. 2B**、3 日目) へと分化する過程で細胞サイズが大きくなり、後腸内胚葉細胞へと分化する段階 (**Fig. 2B**、7 日目) では 3 次元の隆起構造が見えるようになった。この後腸内胚葉細胞をマトリゲルに包埋して 3 次元培養を行うと、既報³⁹と同様に増殖し典型的なオルガノイドの形態を示した (**Fig. 2B**、腸管オルガノイド P0、10、17)。さらに、樹立された i-IO は 6 ヶ月以上継代培養が可能であった (Data not shown)。次に、樹立した i-IO に多能性が残っているかどうかを確認するため、qRT-PCR 解析により未分化マーカー遺伝子の発現を確認した。未分化マーカー遺伝子 (*NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2*, *FGF4*, *hTERT*) は、i-IO の継代数に関わらず、b-iPS 細胞よりも i-IO の方が低い発現量を示した (**Fig. 2C**)。このように、i-IO は正常に樹立され、長期間自己増殖し、多能性を失っていることが確認された。

Figure 2

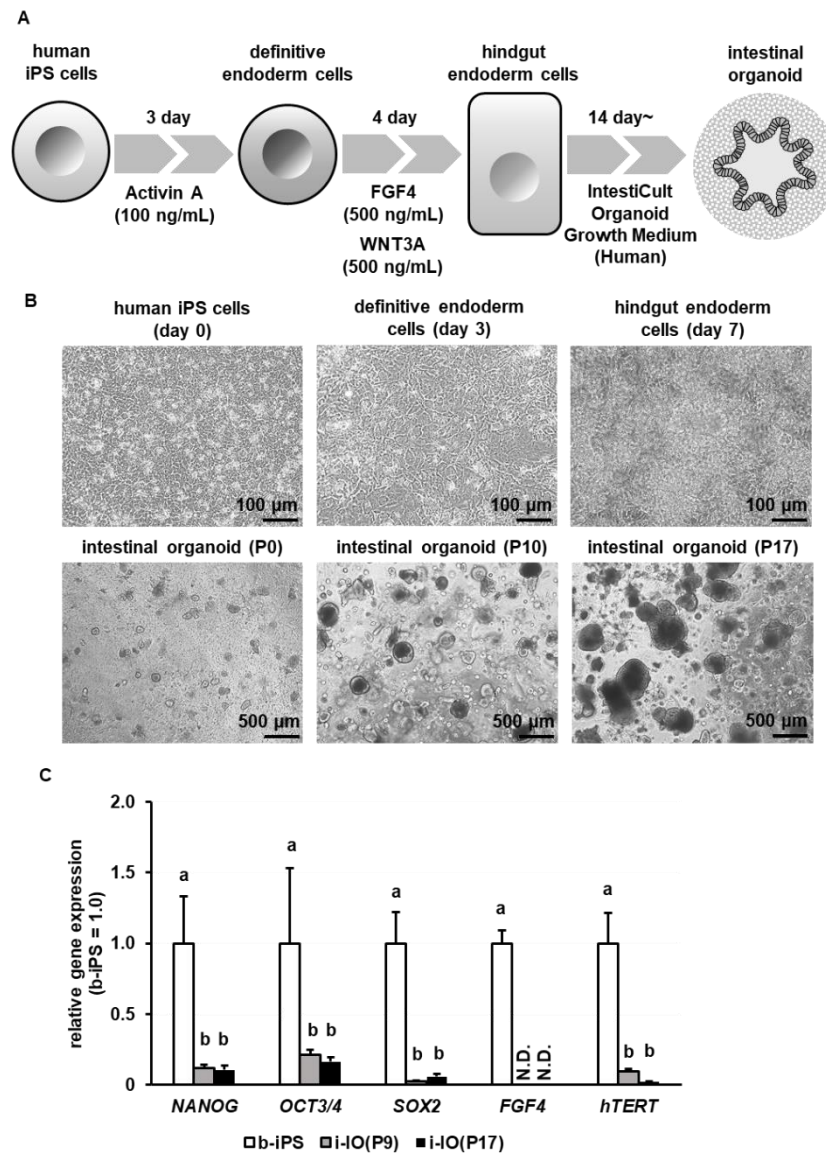


Figure 2. Establishment of b-iPS cell-derived intestinal organoids

(A) The procedure for differentiation of intestinal organoids from b-iPS cells is shown. (B) The phase contrast images of differentiation process of intestinal organoids from b-iPS cells. P means a passage number, for example, P0 means a passage number of 0. (C) The gene expression levels of undifferentiated markers (*NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2*, *FGF4*, and *hTERT*) in b-iPS (passage 15), b-iPS cell-derived intestinal organoids (i-IO, passage 9) and i-IO (passage 17) were examined by qRT-PCR analysis. The gene expression levels in the b-iPS were taken as 1.0. Data represent the means \pm S.D. (n = 3, biological replicate). Statistical significance was evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Groups that do not share the same letter had significantly different results (p < 0.05).

3次元（3D）培養状態における b-IO と i-IO の性状比較

b-IO と i-IO を様々な面から比較するため、まず形態の違いを明らかにした（**Fig. 3A**）。b-IO は表面が滑らかで細胞層が薄い（約 10 μ m）球形の形態をしていたのに対し、i-IO は細胞層が厚く（約 40 μ m）、表面の凹凸が目立つ球形の形態をしていた。内腔については、ほとんどの b-IO は無色透明であったが、i-IO は黒く不透明であった。このように、b-IO は上皮細胞のみからなる比較的単純な形状であったのに対して、i-IO は間葉系細胞の存在により、既報²⁵のように複雑な形状をしていた。

透過型電子顕微鏡（TEM）解析の結果、b-IO は厚さ約 10 μ m の単一細胞層であったのに対し、i-IO は複数の細胞層を持ち、その厚さは合計約 40 μ m であった（**Fig. 3B：上**）。この結果は位相差顕微鏡による観察から推定された値と一致する。b-IO では、タイトジャンクション構造（**Fig. 3B：左下パネル中の矢頭**）と高さ約 0.5 μ m の密な微絨毛構造が観察された（**Fig. 3B：左下パネル中の矢印**）。一方、i-IO ではタイトジャンクション構造が確認されたものの（**Fig. 3B：右下パネル中の矢頭**）、密な微絨毛構造は観察されず、i-IO は b-IO よりも 0.2 μ m 短かった（**Fig. 3B：右下パネル中の矢印**）。以上の結果から、両オルガノイドの細胞層の厚さの違いは細胞層の重なりの有無によるものであり、b-IO は i-IO よりも成熟した腸管上皮細胞であることが示唆された。また、既報²⁵での知見を考慮すると、i-IO で観察された複数の細胞層は上皮細胞とそれを裏打ちする間葉系細胞で構成されていると推定された。

次に両オルガノイドの増殖能について調べた（**Fig. 3C**）。b-IO は継代後 6 日目まで増殖し、その後徐々に減少した（**Fig. 3C：白丸**）。一方、i-IO は測定期間の限界である 21 日目まで増殖し続けた（**Fig. 3C：黒四角**）。倍加時間は b-IO で約 59 時間、i-IO で約 148 時間と推定された。

両オルガノイドの構成細胞種の割合を評価するため、FACS 解析を行った。その結果、b-IO を構成する細胞の約 99% が上皮細胞接着分子である EpCAM 陽性で、そのピークは 1 つであったのに対し、i-IO を構成する細胞の約 56% は EpCAM 陽性でそのピークは 2 つであった（**Fig. 3D：上**）。b-IO を構成する細胞の約 70% が腸管上皮細胞マーカーである Villin 陽性であったのに対し、i-IO を構成する細胞の約 71% が Villin 陽性であった（**Fig. 3D：下**）。以上の結果から、b-IO はほとんどが上皮細胞で構成され、i-IO は上皮細胞以外の細胞を含んでいることが示唆され、TEM 観察の結果が支持された。

Figure 3

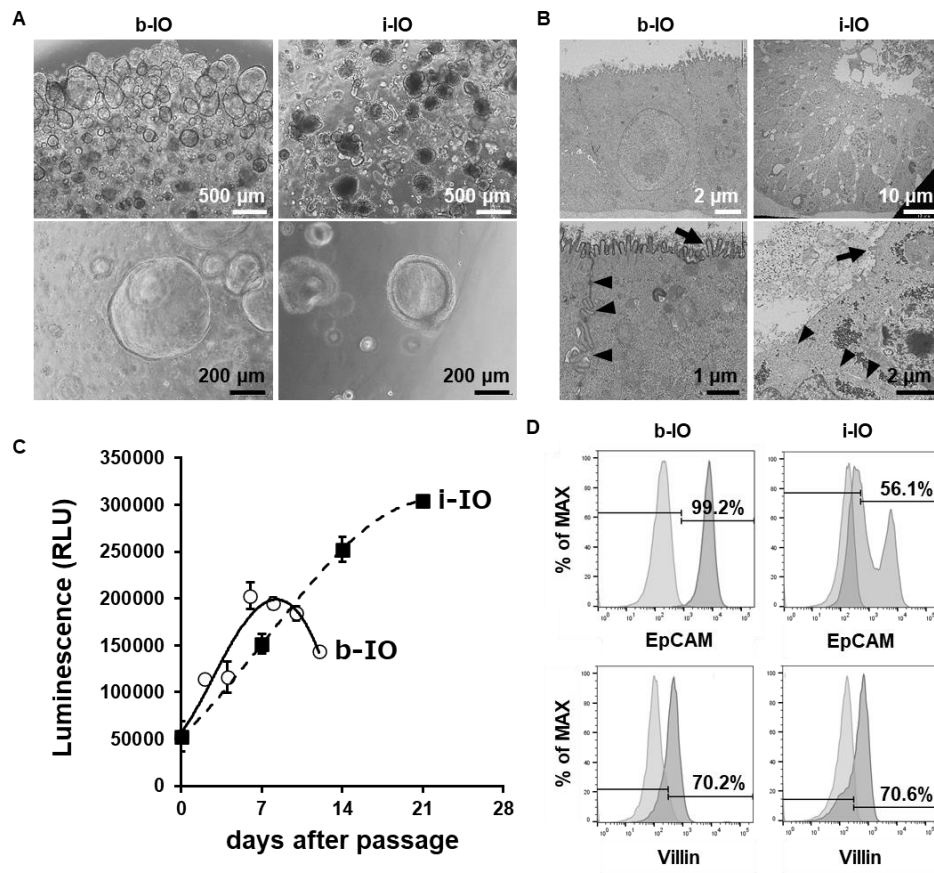


Figure 3. Morphological and histological differences between b-IOs and i-IOs.

(A) Phase-contrast images of b-IOs and i-IOs. (B) TEM images of b-IOs and i-IOs. Microvilli (black arrows) and tight junctions (black arrowheads) are indicated. (C) The growth curves of b-IOs and i-IOs are shown. Cell growth was measured by the CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay. Data acquisitions of b-IOs were performed every 2 days (until day 12) and those of i-IOs were performed every 7 days (until day 21) after passage. Data are presented as means \pm S.D. ($n = 3$, biological replicate). (D) Percentages of EpCAM- and Villin-positive cells in b-IOs and i-IOs were measured by FACS analysis. Isotype control (white) and stained cells (gray) are represented.

両オルガノイドの遺伝子発現プロファイルを qRT-PCR により解析し比較した。まず、薬物トランスポーター遺伝子(*multidrug resistance 1*; *MDR1*, *organic solute transporter beta*; *OSTB*, *multidrug resistance associated protein 2*; *MRP2*, *solute carrier organic anion transporter family member 1A2*; *OATP1A2*) の発現レベルは両オルガノイドで同等であった。一方、他の遺伝子(*peptide transporter 1*; *PEPT1*, *organic solute transporter alpha*; *OSTA*, *multidrug resistance associated protein 3*; *MRP3*, *monocarboxylate transporter 1*; *MCT1*, *solute carrier organic anion transporter family member 2B1*; *OATP2B1*) の発現レベルは i-IO に比べて b-IO の方が高く、最大で約 100 倍であった。*breast cancer resistance protein* (BCRP) と *organic cation transporter 1* (OCT1) については、i-IO の方が b-IO よりも高い発現レベルを示した (Fig. 4A)。薬物代謝酵素の一部 (*cytochrome P450 2J2*; *CYP2J2*, *UDP-glycosyltransferase 2B7*; *UGT2B7*, *UGT2B17*, *carboxylesterase 1*; *CES1*) は i-IO と同等であったが、その他の酵素 (*CYP3A4*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *UGT1A1*, *CES2*) は i-IO よりも b-IO の方が高く、最大で約 20 倍であった (Fig. 4B)。腸管上皮細胞マーカー (*villin 1* ; *VIL1*) とパネート細胞マーカー (*lysozyme* ; *LYZ*) の遺伝子発現レベルは、i-IO よりも b-IO の方が高く、内分泌細胞マーカー (*chromogranin A* ; *CHGA*) と幹細胞マーカー (*LGR5*) の発現レベルは b-IO の方が低かった (Fig. 4C)。この傾向は、微絨毛構造の発達の程度 (Fig. 3B) および細胞増殖の持続性 (Fig. 3C) に関する所見と一致している。上皮細胞関連因子(*galectin 3*; *LGALS3* *p53 apoptosis effector related to PMP22*; *PERP*)の発現レベルは、i-IO よりも b-IO の方が高かった (Fig. 4D)。一方、間葉細胞関連因子 (*fibronectin 1*; *FN1*, *periostin*; *POSTN*, *frizzled related protein*; *FRZB*, *decorin*; *DCN*)の発現レベルは、b-IO の方が低かった (Fig. 4E)。この傾向は TEM 観察 (Fig. 3B) や FACS 解析 (Fig. 3D) で得られた結果と一致する。以上の結果から、b-IO は薬物トランスポーターや薬物代謝酵素の発現が高く、薬物動態学的応用に適している可能性が示唆された。

Figure 4

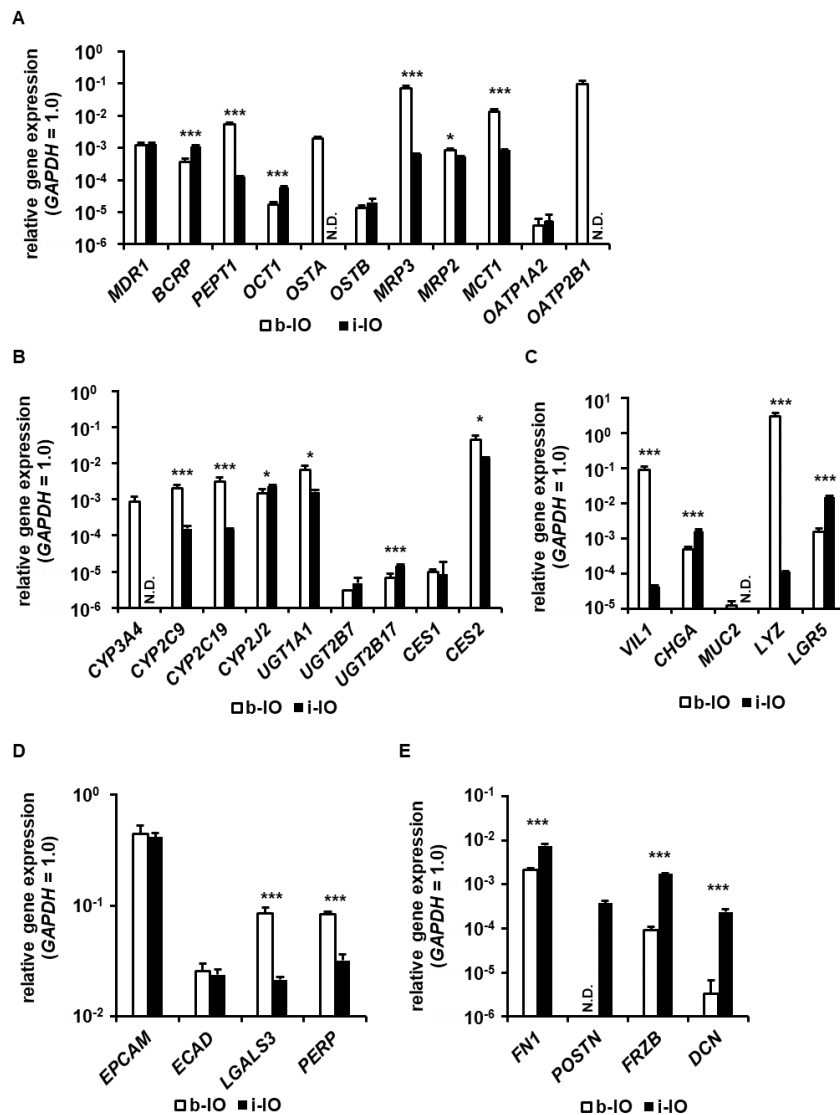


Figure 4. Gene expression profiles of b-IOs and i-IOs in 3D culture.

Gene expression levels of drug transporters (A), drug-metabolizing enzymes (B), intestinal cell markers (C), epithelial cell-associated factors (D), and mesenchymal cell-associated factors (E) in b-IOs and i-IOs were examined by qRT-PCR analysis. The GAPDH expression level was taken as 1.0. Data represent the means \pm S.D. (n = 3, biological replicate). Statistical significance was evaluated by the unpaired two-tailed Student's t-test (*p < 0.05, ***p < 0.005). N.D. means "not detected".

2次元培養状態における b-IO と i-IO の性状比較

腸管オルガノイドの薬物動態学的応用のために、それぞれを2次元培養し (b-IO 2D, i-IO 2D)、その特性を比較した。この時、各2次元培養オルガノイド (2D オルガノイド) は、各アッセイに使用する前に7日間培養した。すると、両者は均一な円柱状上皮様形態の細胞で構成されていることが認められた (**Fig. 5A**)。膜としての緊密性を評価したところ i-IO 2D は b-IO 2D よりも TEER 値が高く、前者の方が高いバリア機能を有することが示唆された (**Fig. 5B**)。i-IO 2D の TEER 値が高いのは、培養系に含まれる間葉系細胞が上皮細胞を裏打ちしている可能性が考えられる。

オルガノイドで行った検討と同様に FACS 解析を行ったところ、b-IO 2D では、細胞の約 86% が EpCAM 陽性で1つのピークを示したのに対し、i-IO 2D では約 37% が EpCAM 陽性であり2つのピークを示した (**Fig. 5C : 左**)。b-IO 2D では細胞の約 52% が Villin 陽性であったが、i-IO 2D では約 88% が Villin 陽性であった (**Fig. 5C : 右**)。この結果は、2次元培養によって b-IO では上皮細胞の割合が減少したが、i-IO では増加したことを示唆している。

Figure 5

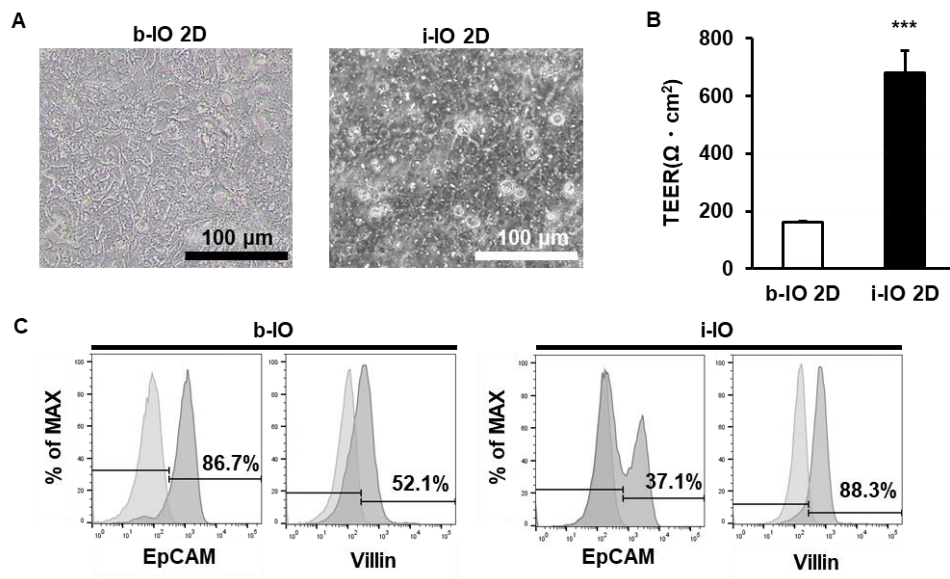


Figure 5. Morphological differences between b-IOs and i-IOs in 2D culture.

After 2D culture for 7 days by IntestiCult Organoid Growth Medium, each monolayer was used for each assay. (A) Phase-contrast images of b-IOs and i-IOs in 2D culture (b-IO 2D and i-IO 2D). (B) TEER values of b-IO 2D and i-IO 2D were measured by Millicell-ERS2. (C) Percentages of EpCAM- and Villin-positive cells in b-IOs and i-IOs in 2D culture were measured by FACS analysis. Isotype control (white) and stained cells (gray) are represented.

薬物トランスポーターおよび薬物代謝酵素の遺伝子発現量は、i-IO 2D よりも b-IO 2D の方が高い傾向にあり (Fig. 6A&6B)、その傾向は 3D 培養状態 (Fig. 2) よりも顕著であった。さらに、腸管上皮細胞マーカー (VIL1) とパネート細胞マーカー (LYZ) の遺伝子発現レベルは、i-IO 2D よりも b-IO 2D の方が高かった (Fig. 6C)。いずれのオルガノイドでも、2D 培養によって多くの遺伝子の発現レベルが上昇し、幹細胞マーカーの発現レベルは低下した (Fig. 4)。これらの結果から、b-IO は i-IO と比較して、様々な分化細胞を含む高度に機能的な 2 次元培養系を形成し、2D 培養が腸管上皮細胞への分化を促進することが示唆された。

Figure 6

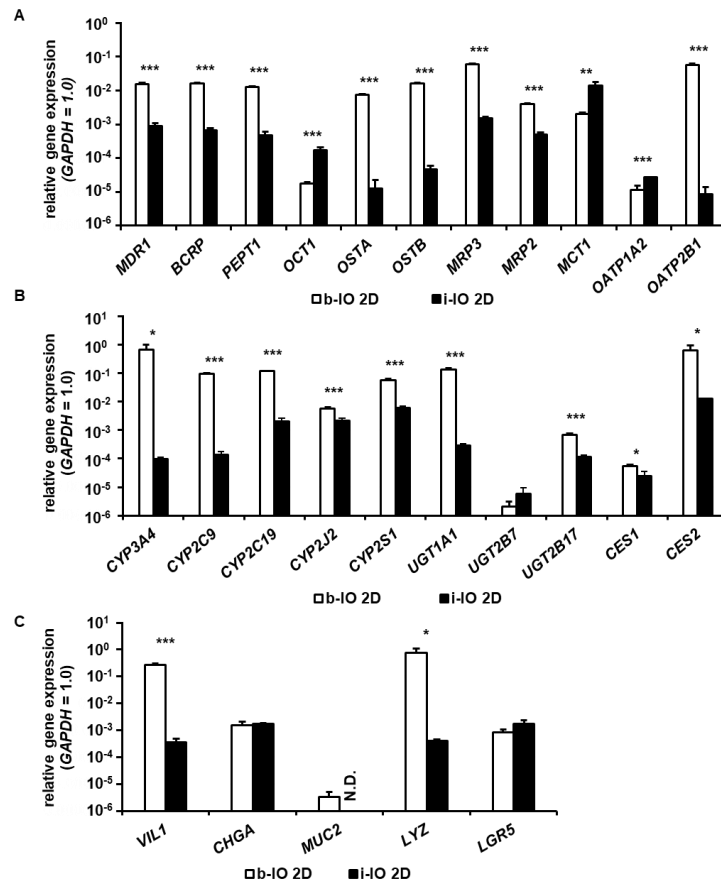


Figure 6. Gene expression profiles of b-IOs and i-IOs in 2D culture.

After 2D culture for 7 days by IntestiCult Organoid Growth Medium, each monolayer was used. Gene expression levels of drug transporters (A), drug-metabolizing enzymes (B), and intestinal cell markers (C) in b-IOs and i-IOs in 2D culture (b-IO 2D and i-IO 2D) were examined by qRT-PCR analysis. The gene expression levels of GAPDH were taken as 1.0. Data represent the means \pm S.D. (n = 3, biological replicate). Statistical significance was evaluated by the unpaired two-tailed Student's t-test (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005). N.D. means "Not detected".

実際の 2 次元培養系としての機能を評価するため、多くの抗がん剤の排出に関与する P-糖タンパク質 (P-gp; MDR1 の通称)⁴⁰、小腸における薬物の初回通過時の代謝の大部分に関与する CYP3A4⁴¹、腸管での初回通過時における加水分解に関与する CES2⁴² の活性を両 2D オルガノイド間で比較した。b-IO 2D は i-IO 2D よりも P-gp の排出活性 (ER) が高く (**Fig. 7A**)、CYP3A4 (**Fig. 7B**) および CES2 (**Fig. 7C**) の代謝活性も高かった。これらの結果は、遺伝子発現レベル (Fig. 6) と相関していた。したがって、少なくとも本研究での条件下では、b-IO は i-IO よりも薬物動態評価に適していることが示唆された。

Figure 7

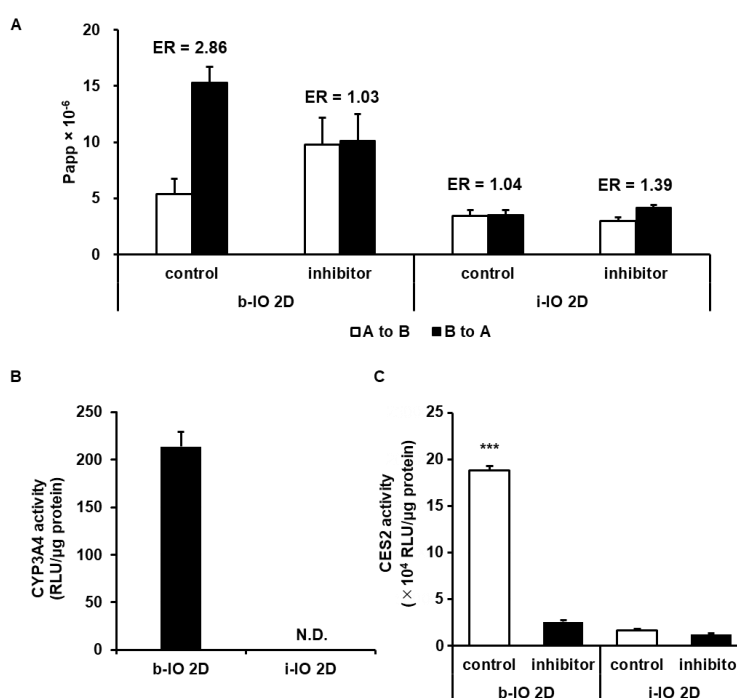


Figure 7. Activities of drug transporters or drug-metabolizing enzymes of b-IOs and i-IOs in 2D culture.

After 2D culture for 7 days by IntestiCult Organoid Growth Medium, each monolayer was used for each assay. (A) The apical-to-basolateral permeability of rhodamine123 (a substrate of P-gp) across b-IOs and i-IOs in 2D culture in the presence or absence of 50 μ M cyclosporine A (a P-gp inhibitor) was evaluated. Efflux ratio (ER) was used to evaluate P-gp function. The following equation was used for calculation. $ER = Papp (B \text{ to } A) / Papp (A \text{ to } B)$. (B) CYP3A4 activity in b-IOs and i-IOs in 2D culture was examined by using the P450-Glo CYP3A4 assay kit. (C) CES2 activity in b-IOs and i-IOs in 2D culture was measured by treatment with fluorescein diacetate (a CES2 substrate) in the presence or absence of 1 mM loperamide (a CES2 inhibitor). Data represent the means \pm S.D. (n = 3, biological replicate). Statistical significance was evaluated by the unpaired two-tailed Student's t-test (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005).

RNA-seq 解析による b-IO と i-IO の性状比較

最後に、RNA-seq 解析を行った (Fig. 8 および 9)。両オルガノイドの 3D 培養において高発現していた遺伝子を比較した結果、b-IO では i-IO に比べて 744 遺伝子が高発現しており、i-IO では b-IO に比べて 967 遺伝子が高発現していた (Fig. 8A)。同定された差次発現遺伝子 (DEG) に対して GO エンリッチメント解析を行い、p 値の小さい上位 10 項を Fig. 8B に示した。まず、腸管上皮細胞分化、腸管吸収、消化、上皮細胞分化に関する遺伝子群が b-IO では高発現していた (Fig. 8B : 上)。これは、b-IO が i-IO よりも腸管上皮細胞として成熟していることを示唆している。一方、i-IO では神経細胞、血管内皮細胞、間葉系ニッチに関する遺伝子群が高発現していた。すなわち、b-IO とは対照的に、i-IO では腸管上皮細胞以外の細胞の存在が示唆された (Fig. 8B : 下)。これらの結果は、b-IO と i-IO におけるこれまでの結果を補強するものであった。

同様に、2D 培養の両オルガノイドで高発現している遺伝子を同定し、volcano plot で示した (Fig. 9A)。各遺伝子群間の関係を明らかにするために、検出された DEG に対してエンリッチメント解析を行い、ネットワーク図としてプロットした (Fig. 9B)。Fig. 8B に示した遺伝子群に加え、b-IO 2D では脂質代謝に関連する遺伝子群が高発現していた。生体の小腸が脂質の消化と吸収において重要な器官であることを考慮すると、このことは b-IO 2D が腸管上皮としてより成熟していることを示唆している。一方、i-IO 2D では、Fig. 8B に示した遺伝子群に加えて、形態形成に関連する遺伝子群が高発現していた。このことは、i-IO は 2D 培養において b-IO よりも複雑な構造体であることを示唆している。

Figure 8

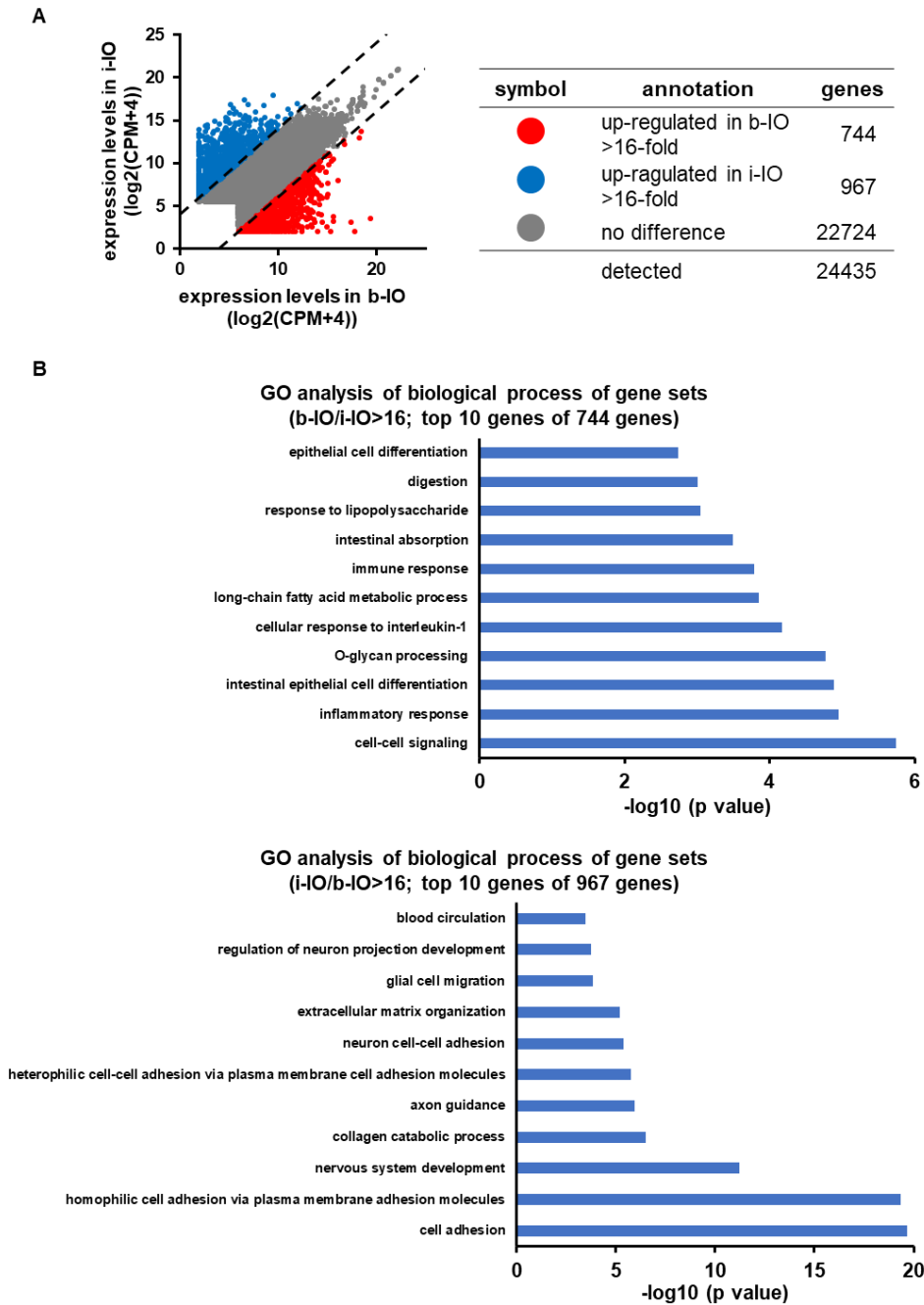


Figure 8. Gene expression comparison between the b-IOs and i-IOs by RNA-seq analysis.

(A) A scatter plot comparing gene expression levels in the b-IOs with those in the i-IOs is shown. (B) GO enrichment analysis was performed for DEGs. The 10 terms with the smallest p-values are listed.

Figure 9

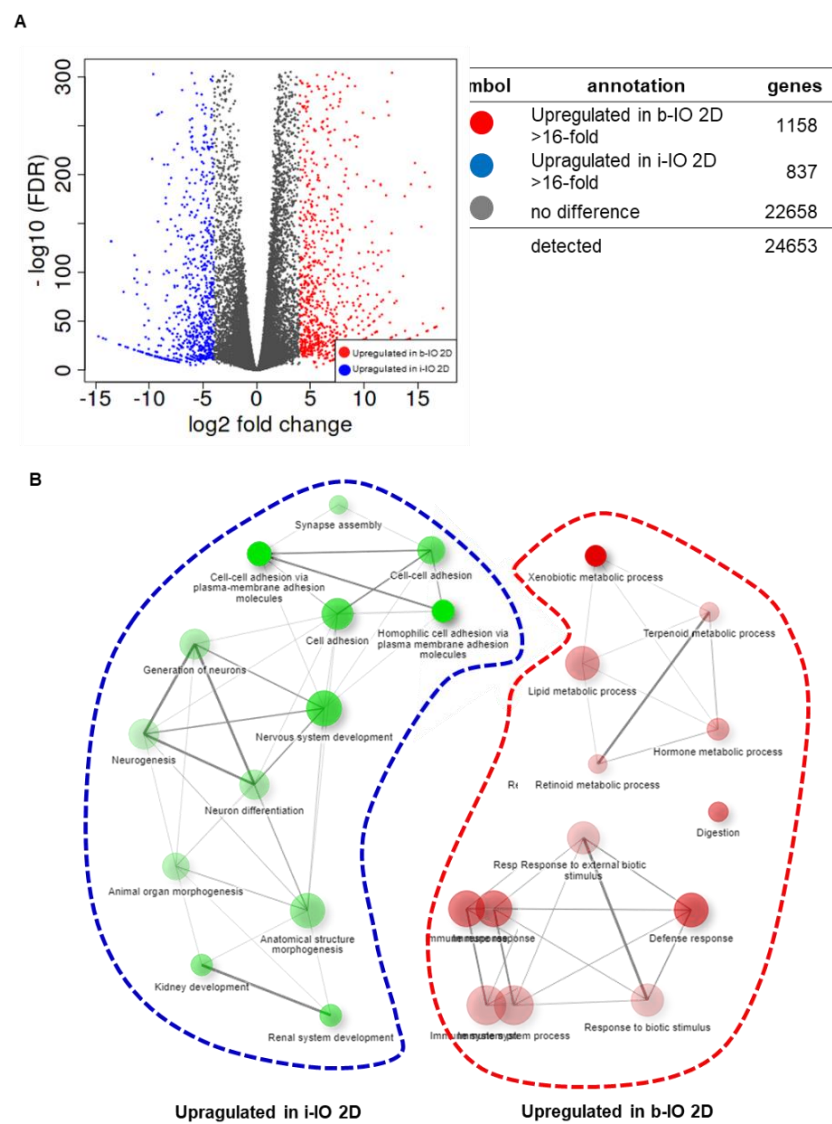


Figure 9. Gene expression comparison between the b-IOs and i-IOs in 2D culture by RNA-seq analysis.

(A) A volcano plot comparing gene expression levels in the b-IOs with those in the i-IOs in 2D culture is shown. (B) Weighted gene co-expression network analysis was performed for DEGs whose gene expression levels were increased more than 16-fold or decreased less than 16-fold.

考察

本研究の目的は、様々な研究に広く用いられている b-IO と i-IO の性状や機能の違いを明らかにすることで、現状の i-IO が抱える課題について知見を得ることである。遺伝子発現プロファイルについては、3次元培養、2次元培養のいずれの状態においても、主要な薬物トランスポーターおよび薬物代謝酵素の発現レベルは、b-IO が i-IO よりも優れていた。各 2D オルガノイドの薬物輸送活性および薬物代謝活性は、遺伝子発現プロファイルの結果と相関していた。本研究で得られたデータは、ヒト腸管オルガノイドの薬物動態試験への応用に有益な知見を提供するものである。

VIL1 の遺伝子発現レベルは b-IO の方が i-IO よりもはるかに高かったが、FACS 解析の結果では Villin 陽性細胞の割合は 2 つのオルガノイド間で有意な差はなかった (Fig. 4C)。これは、i-IO の Villin 陽性細胞には、EpCAM 発現の低い腸管上皮細胞として未成熟な細胞が含まれていたと考えられる。そのため、Villin と EpCAM を共発現する成熟した腸管上皮細胞の割合は、b-IO の方が高い可能性がある。また、FACS 解析の結果、2D 培養を 7 日間行った b-IO では、3D 培養時に比べて上 VIL1 の陽性細胞率が低下していた (Fig. 3D 及び 5C)。既報では、b-IO を 2D 培養すると VIL1 の発現レベルが低下し、培養 4 日目にピークに達することが示されている²⁴。7 日目よりも早期では、2D 培養の b-IO における VIL1 の発現レベルははるかに高いと推定される。b-IO の 2D 培養により腸管上皮細胞の分化が促進され、多くの分化細胞が生じた結果、腸管上皮のターンオーバーと相まって、VIL1 陽性の吸収上皮細胞の数が減少したと考えられる。

Ichinose らは、間葉系組織に発現する delta like non-canonical Notch ligand 1 (DLK1) が上皮幹細胞の増殖を促進することを報告している⁴³。Ørskov らは、CHGA 陽性腸内分泌細胞から分泌される GLP-2 が上皮筋線維芽細胞に作用し、腸管細胞の増殖を制御している可能性を明らかにした⁴⁴。間葉系細胞を含んでいる i-IO は、in vivo ヒト腸管における上皮細胞と間葉系細胞間の相互作用を再現できる系と考えられ、上記のような現象の再現が期待される。

3D 培養時、i-IO は未成熟な絨毛構造を有し、CYP3A4 および CYP2J2 の発現レベルは、それぞれ b-IO のそれよりも前者は低く、後者は高かった (Fig. 3B)。このような特徴は、胎児の腸管細胞で見られる特徴と一致する^{45,46}。i-IO の機能が未熟であるもう一つの理由として、i-IO では近位腸様の細胞と遠位腸様の細胞が混在していることが考えられる²⁵。最近、Onozato らはヒト iPS 細胞から CYP3A4 を発現する腸管オルガノイドを作製できることを示した⁴⁷。この報告では、均一な大きさのスフェロイドを大量に形成できるように設計された特殊な培養基材である EZSPHERE プレートが使用され、腸管細胞から効率的に腸管オルガノイドを形成させることに成功していた。i-IO を薬物動態研究に用いるためには、既報のような成熟した腸管オルガノイドを作製する必要がある。

i-IO の 2D 培養では、3D 培養時には検出されなかった CYP3A4 遺伝子の発現が確認されたが (Fig. 6)、薬物代謝活性は検出されなかった (Fig. 7)。本研究では、両オルガノイドの特性を比較するため可能な限り条件を統一したため、上皮細胞のソーティングを行わずに両者を 2D 培養した。それに対して、ヒト iPS 細胞由来オルガノイドに含まれる上皮細胞のみを選別して 2D 培養を行うことで、その代謝酵素の活性を示した先行報告^{17,26}がいくつか存在する。本研究の結果と既報の結果をあわせて考慮すると、i-IO において生体の腸管を模倣すると考えられている間葉系細胞の存在は、i-IO を薬物動態試験に使用する際には取り除く必要があることが示唆された。さらに、上述した報告^{17,26}で使用された培地の組成は、3次元培養と2次元培養でわずかに異なっており、2次元培養に使用された培地には腸管上皮細胞の未分化性を維持するのに不可欠な Wnt3A は含まれていなかった。本研究では、Wnt3A を含む共通の培地を3次元培養と2次元培養の両方に使用していたため、腸管細胞の分化の促進は、2次元培養時に培地から Wnt3A などの液性因子を除去することで達成されるかもしれない。今後は、2次元培養における腸管上皮細胞のソーティングと培地の最適化により、i-IO をより成熟させ、b-IO と比較することも検討したい。

ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮様細胞 (iPS-ELC) の単層膜を作製する方法は、一般的に2種類ある。ひとつは、今回の検討のようなオルガノイド^{17,47}を介した ELC の作製であり、もうひとつは、オルガノイドを介さずにヒト iPS 細胞から ELC を直接分化させる方法である^{13,14,16,19}。本研究では b-IO との比較に重点を置いたため、Spence ら²⁵が開発した前者の方法を用いたが、異なる分化誘導法を用いれば、また違った結果が得られるであろう。近年、オルガノイドを介さない手法で高機能な iPS-ELC が開発されている^{13,14,16,19}。今後、このような細胞を 2D 培養した b-IO と比較することが期待される。

RNA-seq 解析により、i-IO には神経細胞や血管内皮細胞が存在することが示唆された。Loffet らは、ヒト多能性細胞から発達した神経系を持つ腸オルガノイドを分化させるプロトコルを報告している³³。また、Holloway らは、多能性細胞から血管内皮細胞を持つ腸管オルガノイドの誘導に成功したことを報告している⁴⁸。これらの報告は、i-IO が神経細胞や血管内皮細胞を保有できる可能性を示しており、今回の結果を裏付けている。b-IO よりも i-IO の方が細胞接着関連の遺伝子群の発現が高いのは、電子顕微鏡像で見られたように i-IO が多層構造であるため、b-IO よりも i-IO の方が細胞同士の接着がより多く存在しているためと考えられる。

本研究の結果は、少なくとも今回のオルガノイドの分化誘導法では、i-IO よりも b-IO の方が薬物動態学的応用に適していることを示唆している。しかし、決定的な結論を得るためには、ヒト iPS 細胞から ELC や腸管オルガノイドへの分化誘導法の改良に加えて、両者のオルガノイドを様々な側面から特性を評価する必要がある。一方で、今回の検討では、遺伝的背景を揃えた b-IO と i-IO を1組ずつしか使用できていないため、複数組で同様の研究を行うことで両者の差異をより明確化することも重要である。また、本研究の知見により、b-

IO と i-IO の優劣を議論するのではなく、薬物動態研究、腸内細菌との共培養、上皮細胞と間葉系細胞とのクロストークなどの目的ごとに適した培養系を適切に選択するための枠組みの提案につながることを願っている。

第二章：高機能なヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドの開発とその機能評価

第一章での検討において、生検由来腸管オルガノイドより iPS 細胞由来腸管オルガノイドの機能が総合的に低く、その原因として未熟な腸管細胞（後腸細胞）からオルガノイドを樹立したためだと考えられた。そのため、高機能なヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドを作製するには、iPS 細胞からより成熟した腸管上皮細胞を分化誘導することが必要と考えられた。

ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞を分化誘導する研究は本邦を中心に盛んに行われており、当研究室を含め多くの研究室でヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞^{11,12,14,16,18,26,49-51}の分化誘導法が開発されてきた。現在当研究室で確立されている分化誘導法においても、ヒト iPS 細胞から機能的な腸管上皮様細胞（ELC）を作製可能である¹⁴。しかし、現在のプロトコルでは ELC への分化誘導に約 1 ヶ月を要する上、分化誘導後の ELC は継代による維持培養が不可能であった。そのため、大規模なスクリーニング検査などのために迅速かつ大量の腸管上皮細胞を供給することは困難であるとともに、作製された腸管上皮細胞の機能がロットによって大きく異なる点も課題とされてきた。

一方で、ELC のこうした課題はオルガノイド化により克服できる可能性が考えられた。ELC から腸管オルガノイドを樹立しそれを安定的に培養できれば、長期にわたる分化誘導期間が短縮されるだけでなく、オルガノイドを供給源とすることで大量の腸管上皮細胞を迅速に供給することが可能になる。また、オルガノイド自体が自己組織化により安定した培養系であるため、ELC よりロット間差が低減すること、および 3 次元培養により腸管上皮への分化・成熟化が促進されることが期待された。実際、ヒト iPS 細胞から腸管オルガノイドを樹立する試みはこれまでいくつかなされてきた^{12,26,49}。しかし、いずれも腸管の前駆細胞から腸管上皮細胞への分化・成熟を促進する目的でオルガノイド化を行っており、オルガノイドとして安定的に培養することに主眼は置かれてこなかった。

本研究では、ヒト iPS 細胞由来の ELC を用いて、安定的に継代・維持培養が可能な腸管オルガノイド（ELC-org）の開発を試みた。また、腸管上皮の培養系は薬物動態評価のための各種試験への応用を考えると単層膜である必要があったため、ELC-org から単層膜（ELC-org-mono）の作製も試みた。その結果、ELC-org および ELC-org-mono の開発に成功した。ELC-org-mono は、凍結保存したヒト初代小腸細胞に匹敵する CYP3A4 活性を示しただけでなく、P-gp、BCRP、PEPT1 といった主要な薬物トランスポーターの活性も示した。興味深いことに、薬物代謝酵素の発現量が高い ELC-org-mono の作製には、単層膜培養に用いる培地の最適化が不可欠であり、オルガノイド培地は単層膜培養に不向きであった。ELC-org および ELC-org-mono の薬物動態試験への適用性を評価するため、様々な解析を行った。その

結果、ELC-org-mono は現在の腸管モデルの限界を克服し、頑健で再現性の高い薬物動態アッセイを提供することが期待された。

材料と方法

ヒト iPS 細胞の培養

本研究では、ヒト iPS 細胞株 YOW および先の報告で作製した b-iPS 細胞を用いた^{52,53}。ヒト iPS 細胞株 Tic は JCRB セルバンク (JCRB: JCRB1331) から提供された。実験には主に YOW 株を用いたが、本研究で開発したプロトコルの頑健性を示すため、一部の実験では他の細胞株も用いた。ヒト iPS 細胞株は、0.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ iMatrix-511 (Nippi) を含む StemFit AK02N 培地 (Ajinomoto) で培養した。

ヒト初代小腸細胞 (凍結保存)

凍結されたヒト初代小腸細胞 (ロット ; CHIM6005、20 歳男性の回腸由来) は Discovery Life Sciences 社から購入した。解凍直後に基質を作用させ、その代謝物量を UPLC-MS/MS で分析し、CYP3A4、CYP2D6、CYP2C9、CYP2C19 活性を測定した。

ヒト iPS 細胞から腸管上皮様細胞 (ELC) への分化誘導

ヒト iPS 細胞から腸管上皮様細胞を分化誘導するためのプロトコルは、私たちの過去の報告に基づき、若干の修正を加えた¹⁴。簡単に説明すると、腸管前駆細胞の誘導のために、ヒト iPS 細胞から 7 日間分化誘導して作製した後腸細胞を、最終分化培地で 10 日間培養した。最終分化培地とは、10% KnockOut Serum Replacement (KSR; Thermo Fisher Scientific)、1% non-essential amino acid solution (NEAA; Thermo Fisher Scientific)、P/S、0.5×B27 supplement minus vitamin A、1×GlutaMAX supplement を加えた DMEM high-glucose 培地に、2 μM SB431542 (SB ; FUJIFILM Wako Pure Chemical)、3nM LY2090314 (LY ; MedChem Express)、100nM 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 (VD3 ; Cayman Chemical)、および 50ng/mL の epidermal growth factor (EGF ; R&D Systems) を添加したものである。その後、腸管前駆細胞をシングルセルに解離し、Matrigel コートした細胞培養用インサート (24 ウェルプレート、孔径 0.4 μm 、PET Membrane、Corning) または 96 ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific) に 5.0×10⁵ 個/well の密度になるように播種した。小腸上皮細胞の分化誘導のために、播種した細胞は 3 μM PD0325901 (PD ; FUJIFILM Wako Pure Chemical 工業) を添加した最終分化培地で 10 日間培養された。この培地を腸管成熟化培地 (IMM) と定義する (Table 4)。この過程で産生された腸細胞様細胞を ELC と定義した。

Table 4. 腸管成熟化培地 (IMM) の培地組成

Name	final conc.
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (High Glucose)	(Basal medium)
GlutaMAX	1 mM
penicillin/streptomycin	1%
MEM NEAA	1%
B-27 Supplement	0.5×
KnockOut Serum Replacement	10%
EGF	50 ng/ml
SB431542	2 μ M
1 α ,25-dihydroxyvitamin D3	100 nM
LY2090314	3 nM
PD0325901	3 μ M

ELC 由来腸管オルガノイド (ELC-org) の樹立と培養

腸管オルガノイドは ELC から樹立した。分化誘導により作製した ELC をピペッティングで剥がし、PBS で懸濁した後マトリゲル (Corning) で再懸濁した。次に、その懸濁液 25-40 μ L を 24 ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific) の各ウェルの中央に塗布しドームを形成させた。マトリゲルドームを 37°C で 10 分間重合させ、以前の報告⁵⁴で開発されたオルガノイド培養用培地 (OCM) を 400 μ L/ウェル加えた。OCM に含まれる Wnt3a については Wnt3a を安定して発現する HEK293 細胞のコンディショナルメディアウムを用いた⁵⁵。

このオルガノイドを維持するため、培地は 2 日ごとに交換し、細胞は 1 週間ごとに 1:4 から 1:8 で継代した。

ELC-org 由来単層膜 (ELC-org-mono) の作製

ELC-org 由来の単層膜は、以前の報告²⁴に従って作製した。簡単に説明すると、ELC-org をシングルセルに解離し、マトリゲルコートした細胞培養用インサートまたは 96 ウェルプレートに、 5.0×10^5 個/well の密度になるように播種した。この単層膜を腸管成熟化培地 (IMM) で 3~7 日間培養した。

qRT-PCR

Total RNA は ISOGEN (Nippon Gene) を用いて単離した。ポジティブコントロールとして、小腸の total RNA を Total RNA-Human Adult Normal Tissue 5 Donor Pool: Small Intestine (Biochain) から得た。各 RNA の 500 ng を用い、Superscript VILO cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA を合成した。qRT-PCR は、Fast

SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用い、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。標的遺伝子の Ct 値は、ハウスキーピング遺伝子である *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* の Ct 値で正規化した。PCR プライマー配列は **Table 5** に記した。

Table 5. qRT-PCR に使用されたプライマーの配列

Gene Symbol	Primers (forward/reverse; 5' to 3')
<i>BCRP</i>	TGCAACATGTACTGGCGAAGA/TCTTCCACAAGCCCCAGG
<i>CDX2</i>	TCCGTGTACACCACTCGATATT/GGAACCTGTGCGAGTGGAT
<i>CES1</i>	ACCCCTGAGGTTTACTCCACC/TGCACATAGGAGGGTACGAGG
<i>CES2</i>	CTAGGTCCGCTGCGATTTG/TGAGGTCTGTAGACACATGG
<i>CYP3A4</i>	AAGTCGCCTCGAAGATACACA/AAGGAGAGAACTGCTCGTG
<i>DES</i>	GAGACCATCGCGGCTAAGAAC/GTGTAGGACTGGATCTGGTGT
<i>EPCAM</i>	AATCGTCAATGCCAGTGTACTT/TCTCATCGCAGTCAGGATCATAA
<i>GAPDH</i>	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA/GTGGTCGTTGAGGGCAATG
<i>LGR5</i>	CTCCCAGGTCTGGTGTGTTG/GAGGTCTAGGTAGGAGGTGAAG
<i>LYZ</i>	GGCCAAATGGGAGAGTGGTTA/CCAGTAGCGGCTATTGATCTGAA
<i>MDR1</i>	GCCAAAGCCAAAATATCAGC/TTCCAATGTGTTTCGGCATT
<i>MUC2</i>	GAGGGCAGAACCCGAAACC/GGCGAAGTTGTAGTCGCAGAG
<i>PEPT1</i>	AATGTTCTGGGCTTGTTTG/CATCTGATCGGGCTGAATTT
<i>UGT1A1</i>	CTGTCTCTGCCCCTGTATTCT/TCTGTGAAAAGGCAATGAGCAT
<i>VIL1</i>	AGCCAGATCACTGCTGAGGT/TGGACAGGTGTTCCCTCCTTC
<i>VIM</i>	AGTCCACTGAGTACCGGAGAC/CATTTACGCATCTGGCGTTC

経上皮電気抵抗 (TEER) の測定

細胞培養用インサート上の ELC-org-mono の TEER 値は、Millicell ERS-2 voltohmmeter with STX01 Electrode (MERS00002; Merck)を用いて測定した。生データは、培養インサートの面積に基づいて $\Omega \times \text{cm}^2$ に変換した。測定した抵抗値からブランク抵抗値を差し引き、実際の TEER 値を求めた。

透過型電子顕微鏡 (TEM) 像の撮影

細胞培養用インサート上で培養した各サンプルは、リン酸緩衝 2% グルタルアルデヒドで固定した。固定後の操作である、脱水、包埋、超薄切片化、染色、観察は大阪大学微生物病研究所中央実験室にて行った。

免疫蛍光染色

細胞もしくは凍結切片に 4% Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution (FUJIFILM Wako Pure Chemical) を添加し、室温で 15 分間インキュベートすることにより固定した。次に、2% bovine serum albumin (Nacalai tesque) と 0.2 vol% Triton X-100 (Merck) を含む PBS (ブロッキングバッファー) を添加し、室温で 15 分間ブロッキングを行った。その後、一次抗体 (Table 6) を含むブロッキングバッファーを添加して 4°C で一晩インキュベートし、最後に二次抗体 (Table 7) を含むブロッキングバッファーを添加して室温で 1 時間インキュベートした。その際、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Nacalai tesque) を用いて核染色も行った。観察および撮影は、共焦点レーザー走査顕微鏡 FV10i (Olympus) を用いた。

Table 6. 免疫蛍光染色に用いた一次抗体

Name	Host	Company	Catalog number
Anti-Cytochrome P450 3A4 antibody	rabbit	abcam	ab135813
Anti-Villin antibody	rabbit	abcam	ab130751
Anti-E Cadherin antibody	rabbit	abcam	ab40772
Anti-CDX2 antibody	rabbit	abcam	ab76541
Anti-Chromogranin A antibody	mouse	abcam	ab715
Anti-Lysozyme antibody	mouse	abcam	ab36362
Anti-MUC2 antibody	mouse	abcam	ab118964
Villin Antibody	mouse	Santa Cruz Biotechnology	sc-58897

Table 7. 免疫蛍光染色に用いた二次抗体

Name	Host	Company	Catalog number
Donkey anti-mouse IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 conjugate	donkey	Thermo Fisher Scientific	A-21203
Donkey anti-rabbit IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 conjugate	donkey	Thermo Fisher Scientific	A-21206

FACS 解析

各サンプルの細胞懸濁液を 2%パラホルムアルデヒドで 4°C、10 分間固定し、一次抗体、二次抗体の順に反応させた。解析は MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec) と FlowJo ソフトウェア (FlowJo LLC, <http://www.flowjo.com/>) を用いて行った。すべての抗体を **Table 8** に示した。

Table 8. FACS 解析に用いた抗体

Name	Company	Catalogue No.	Dilution
CD326 (EpCAM)-APC, human monoclonal	Miltenyi Biotec	130-091-254	1:50
Anti-Villin antibody [SP145]	abcam	ab130751	1:50
Isotype Control Antibody, mouse IgG1, APC	Miltenyi Biotec	130-113-196	1:50
Donkey anti-rabbit IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 conjugate	Thermo Fisher Scientific	A-21206	1:1000

CYP3A4 活性測定

CYP3A4 活性の測定は P450-Glo CYP3A4 Assay Kit (Promega) を用いて行った。CYP3A4 基質には Luciferin-IPA を用いた。発光は、ルミノメーター (Lumat LB 9507; Berthold Technologies) を使い、メーカーの指示に従って測定した。各サンプルのタンパク質は、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を使い、メーカーの指示に従って定量した。その後、ウェルあたりのタンパク質量で発光を正規化し活性値を算出した。CYP3A4 の阻害剤として、10 μ M ケトコナゾール (FUJIFILM Wako Pure Chemical) を基質と共に添加した。

Carboxylesterase 2 (CES2) 活性測定

細胞ホモジネートを回収し、CES2 基質である $10\ \mu\text{M}$ の fluorescein diacetate (FUJIFILM Wako Pure Chemical) とインキュベートした。CES2 の阻害剤として、 1mM の loperamide (FUJIFILM Wako Pure Chemical) を使用した。

P-gp (MDR1) および BCRP のトランスポーター活性測定

P-gp (multidrug resistance 1; MDR1) 活性は、以前の報告⁵⁶に基づいて測定した。簡単に説明すると、細胞培養インサート上の ELC-org-mono に、 $1\ \mu\text{M}$ ^3H 標識 digoxin (Digoxin, [3H(G)]-, PerkinElmer) または $10\ \mu\text{M}$ の Rhodamine123 (Sigma-Aldrich) を含む Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Thermo Fisher Scientific) 緩衝液を加えて 90 分間インキュベートした。シンチレーションカウンター (MicroBeta2; PerkinElmer) を用いて、ドナー側からレシーバー側へ透過した ^3H 標識基質の量を測定した。Rhodamine123 の蛍光シグナルは、TriStar LB 941 (Berthold Technologies) を用い、 $485\ \text{nm}$ の励起および $535\ \text{nm}$ の発光フィルターを用いて測定した。BCRP 活性の場合、基質として $10\ \mu\text{M}$ ^3H 標識 estrone sulfate (Estrone 3-sulfate ammonium salt, [6,7- ^3H (N)]-, ARC) を用いた。P-gp および BCRP の阻害剤として、 $100\ \mu\text{M}$ の verapamil (FUJIFILM Wako Pure Chemical) および 100mM の Ko143 (FUJIFILM Wako Pure Chemical) を用いた。

P_{app} と ER の算出

トランスポーターアッセイにおける P_{app} は、以下の式に従って計算された。

$$P_{\text{app}} = \delta C_r / \delta t \times V_r / (A \times C_0)$$

- δC_r : レシーバー側での終濃度
- δt : インキュベーション時間
- V_r : レシーバー側の体積
- A : インサートの底面積
- C_0 : ドナー側での初濃度

排出比 (efflux ratio: ER) は下記の式を用いて算出した。

$$\text{ER} = P_{\text{app B to A}} / P_{\text{app A to B}}$$

$P_{\text{app A to B}}$: 頂端膜側 (apical side: A) から基底膜側 (basolateral side: B) 方向の P_{app}

$P_{\text{app B to A}}$: 基底膜側から頂端膜側方向の P_{app}

PEPT1 の細胞内輸送活性の測定

$5\ \mu\text{M}$ の ^{14}C 標識 Glycyl-sarcosine (Glycyl-sarcosine, [1- ^{14}C]-, ARC) を含む HBSS を ELC-org-mono に加え、 37°C で 90 分間インキュベートした。その後、70% メタノールを加えてピペティングし、細胞内に蓄積した Glycyl-sarcosine を抽出し、その上清を回収した。上清

は液体シンチレーションカウンター (MicroBeta2; PerkinElmer) を用いて測定した。PEPT1 活性は、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてウェルあたりのタンパク質量で測定値を正規化し算出した。PEPT1 の阻害剤として、100 μ M の glibenclamide (FUJIFILM Wako Pure Chemical) を用いた。

UPLC-MS/MS 解析による CYP 活性測定

UPLC-MS/MS 分析を行い、細胞培養用インサート上の ELC-org-mono における CYP3A4、CYP2D6、CYP2C9、CYP2C19 活性を調べた。各基質 (表 S6) を含む HBSS を ELC-org-mono の A 側に添加した。対照群として、市販されている凍結ヒト小腸初代細胞 (解凍直後) を用いた。37°C で 60 分間インキュベートした後、A 側の上清をサンプルとして回収した。それらを UPLC-MS/MS を用いて、以下の代謝物の生成を評価した: 1-hydroxy midazolam (MDOH; CYP3A4 の代謝物)、6 β -hydroxy testosterone (TSOH; CYP3A4 の代謝物)、1-hydroxy bufuralol (BFOH; CYP2D6 の代謝物)、4-hydroxy diclofenac (DFOH; CYP2C9 の代謝物)、および 4-hydroxy mephenytoin (MPOH; CYP2C19 の代謝物)。UPLC は Acquity UPLC (Waters, Milford, MA) を用いて行い、MS/MS は Xevo TQ-S (Waters, Milford, MA) を用いて行った。LC 分離は Acquity UPLC BEH C18 カラム、1.7 μ m、2.1 \times 50mm (Waters) を用いて 40°C で行った。移動相は、溶媒 A (0.1% ギ酸/蒸留水) と溶媒 B (0.1% ギ酸/アセトニトリル) からなるグラジエント溶出プロファイルを用いて、1.0 mL/分の流速で供給した。サンプル溶液 5 μ L をカラムに注入した。各代謝物の濃度は、各標準物質に従って算出した後、Pierce BCA Protein Assay Kit を使用しウェルあたりのタンパク質量で正規化した。

RNA-seq 解析

サンプル中の RNA は ISOGENE (Nippon Gene) を用いて単離した。RNA の品質評価には、BioAnalyzer (Agilent Technologies) と RNA 6000 nanochip (Agilent Technologies) を用い、すべての RNA サンプルが RNA integrity number (RIN) 7 以上であることを確認した。RNA シーケンス用のライブラリー調製は、TruSeq stranded mRNA sample prep kit (Illumina, San Diego, CA) を用い、メーカーの説明書に従って行った。ライブラリーは MGIEasy Universal Library Conversion Kit (App-A) を用いて DNBSEQ 用のライブラリーに変換した。シーケンシングは DNBSEQ-G400RS プラットフォーム (MGI, Shenzhen, China) を用い、2 \times 100 bp ペアエンドモードで行った。RNA-Seq データは、リードの 3' 末端から低品質塩基およびシーケンスアダプターをトリミングするために Trimomatic を用いて処理した。リードは HISAT2⁵⁷ を用いてヒトゲノムの GRCh38.p13 にマッピングした。HISAT2 の出力は featureCounts⁵⁸ に入力し、転写産物の定量を行った。DESeq2⁵⁹ を使用して、マッピングされた 100 万リードあたりのエキソンモデルキロベースあたりのフラグメント数 (FPKM) を算出した。その後、integrated Differential Expression and Pathway analysis (iDEP 96) platform³⁵

(<http://bioinformatics.sdstate.edu/idep96/>) を用いてヒートマップを作成し、k-means クラスタリングと GO エンリッチメント解析を行った。iDEP.96 では、DESeq2 を用いて発現差のある遺伝子 (DEG) を同定した。本研究におけるすべての RNA-seq データは、GEO にアクセッション番号 GSE240322 で寄託されている。

増殖能評価

生細胞数の変化は、CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay (Promega) を用い、細胞内 ATP を定量することで評価した。発光強度は、マルチモードマイクロプレートリーダー (Berthold Technologies) を用いて、1 ウェルあたり 0.25 秒間測定した。

ELC-org から凍結細胞懸濁液の作製および保存

ELC-org は、単層膜作製時と同様の手法でシングルセルにまで解離し遠心してペレットにした。それらを STEM-CELLBANKER (ZENOGEN PHARMA) に懸濁し、-80°C で一晩凍結した後、-150°C で 2 週間凍結した。

凍結細胞懸濁液からの ELC-org-mono の作製

凍結保存した ELC-org 細胞懸濁液を解凍し、マトリゲルコートした細胞培養用インサート (24-well plate, 0.4 μ m pore size, PET Membrane, Corning) または 96 ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific) に 5.0×10^5 個/well の密度になるように直接播種した。単層膜培養は腸管成熟化培地 (IMM) で 3~7 日間行った。

CYP3A4 誘導試験

ELC-org-mono を VD3 (-V) 無添加の腸管成熟化培地 (IMM) で 5 日間培養した。その後、CYP3A4 を発現誘導する^{60,61} ことで知られる 100 nM の VD3 または 20 mM の rifampicin (RIF, FUJIFILM Wako Pure Chemical) で 2 日間処理した。

結果

ヒト iPS 細胞由来腸管上皮様細胞を用いた腸管オルガノイドの樹立

ヒト iPS 細胞由来の腸管上皮様細胞 (ELC) は、**材料と方法**に記載した方法で作製した。報告されている腸管オルガノイドの多くはヒト iPS 細胞由来の後腸内胚葉細胞または腸管前駆細胞^{12,17,25,49,62,63}から樹立されていることから、まず腸管オルガノイドの樹立に最適な ELC の分化段階を検討した。そこでヒト iPS 細胞から腸管上皮様細胞を分化誘導する際、2つの分化誘導段階の細胞について、それぞれから腸管オルガノイドを樹立し、それぞれ pre-ELC-org (分化誘導期間 17 日)、ELC-org (分化誘導期間 27 日) と定義した (**Fig. 10A**)。それぞれのオルガノイドは 1 年以上培養できた。位相差顕微鏡像から、培養期間が同じであれば ELC-org の方が pre-ELC-org よりもサイズが大きいことが確認された (**Fig. 10B**)。各オルガノイドの遺伝子発現レベルを比較するために、qRT-PCR 解析を行った。その結果、ヒト iPS 細胞から分化させた ELC の薬物代謝酵素、薬物トランスポーター、腸管マーカーの遺伝子発現レベルは、ヒト小腸のそれと類似していた。また、後腸分化マーカー (*caudal type homeobox 2*; CDX2)、吸収上皮細胞マーカー (*villin*; VIL1)、上皮細胞マーカー (*epithelial cell adhesion molecule*; EpCAM) の遺伝子発現量レベルに関して、元となった ELC と 2 つのオルガノイド間で有意な差はなかった。一方で、薬物代謝酵素 (*cytochrome P450 3A4*; CYP3A4, *UDP-glycosyltransferase 1A1*; UGT1A1) の遺伝子発現レベルは、pre-ELC-org、ELC-org ともに ELC よりも優位に低かった。また、間葉系細胞マーカー (*vimentin*; VIM) の遺伝子発現レベルは、有意差はないものの ELC-org より pre-ELC-org の方が低かった (**Fig. 10C**)。両オルガノイドの増殖能を調べたところ、pre-ELC-org は 21 日間で 500 倍、ELC-org は 1200 倍に増殖した (**Fig. 11**)。ELC-org の方が高い増殖能を示し、遺伝子発現レベルから間葉系細胞の混入が少ないと思われたので、以降の検討では ELC-org を用いた。また、ELC-org は、他のヒト iPS 細胞株から分化させた ELC からも同様の方法で作製できた (**Fig. 12A**)。さらに、それぞれの ELC-org における遺伝子発現プロファイルは、各オルガノイド間で同様の傾向を示した (**Fig. 12B**)。

Figure 10

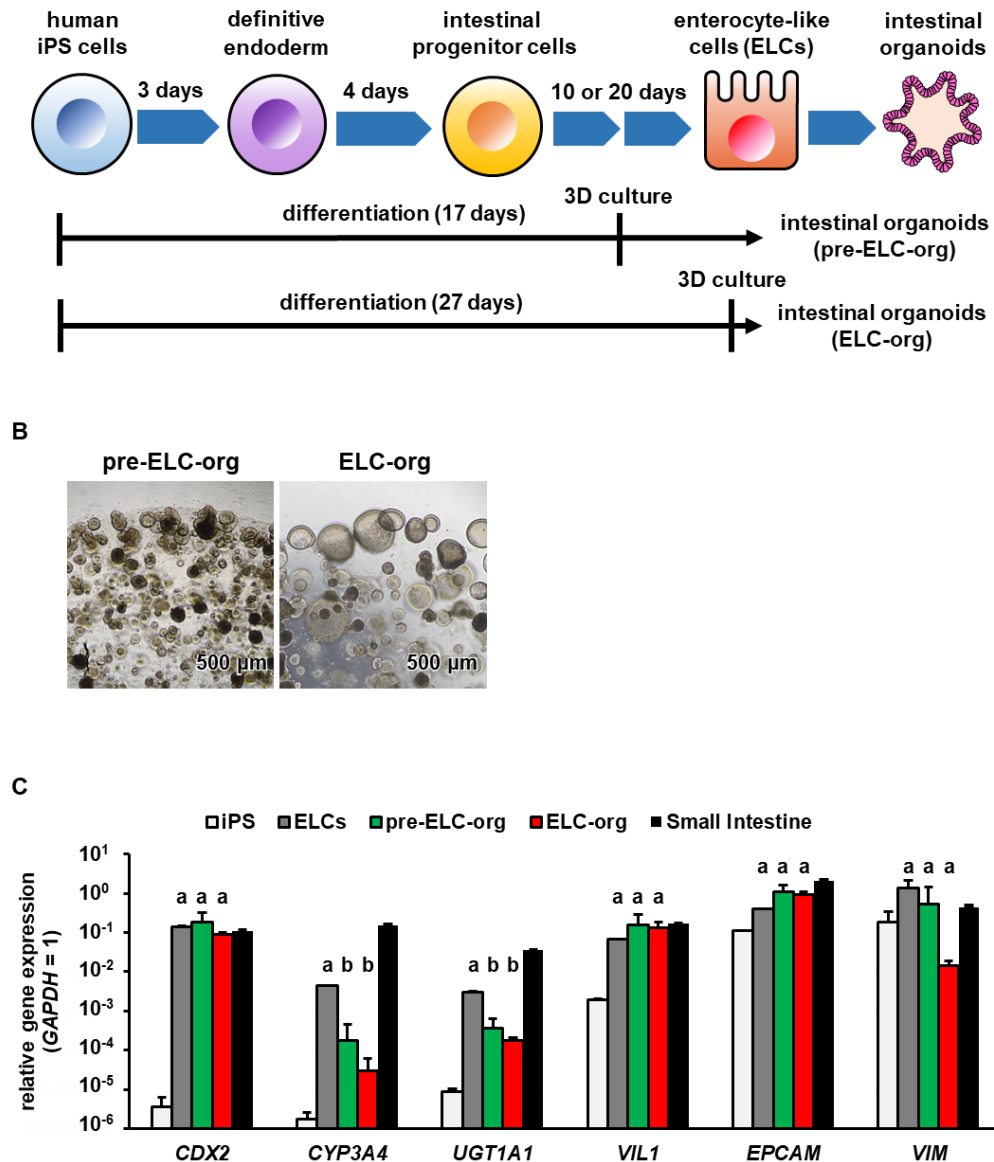


Figure 10. Establishment of pre-ELC-org and ELC-org

(A) Diagram of the protocol for generating pre-ELC-org and ELC-org from human iPS cells. (B) Phase-contrast images of pre-ELC-org and EC-org are shown. (C) The gene expression levels of drug-metabolizing enzymes (*CYP3A4*, *UGT1A1*), intestinal markers (*CDX2*, *VIL*, *EPCAM*) and a mesenchymal cell marker (*VIM*) were examined in human iPS cells, ELCs, pre-ELC-org, ELC-org, and the human small intestine by qRT-PCR. The GAPDH expression level was taken as 1.0. Data represent the mean \pm S.D. (n = 3, biological replicates). Statistical significance was evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Groups that do not share the same letter had significantly different results (p < 0.05).

Figure 11

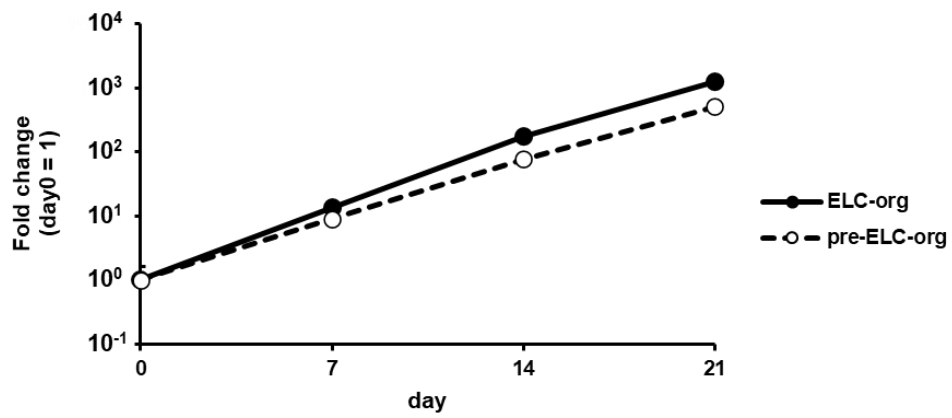


Figure 11. ELC-org had higher proliferative capacity than pre-ELC-org.

The growth curves of ELC-org and pre-ELC-org are shown. Cell growth was measured by the CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay. Data acquisitions of each organoid were performed every 7 days (until day 21) after passage. Data are presented as means \pm S.D. (n = 3, biological replicate).

Figure 12

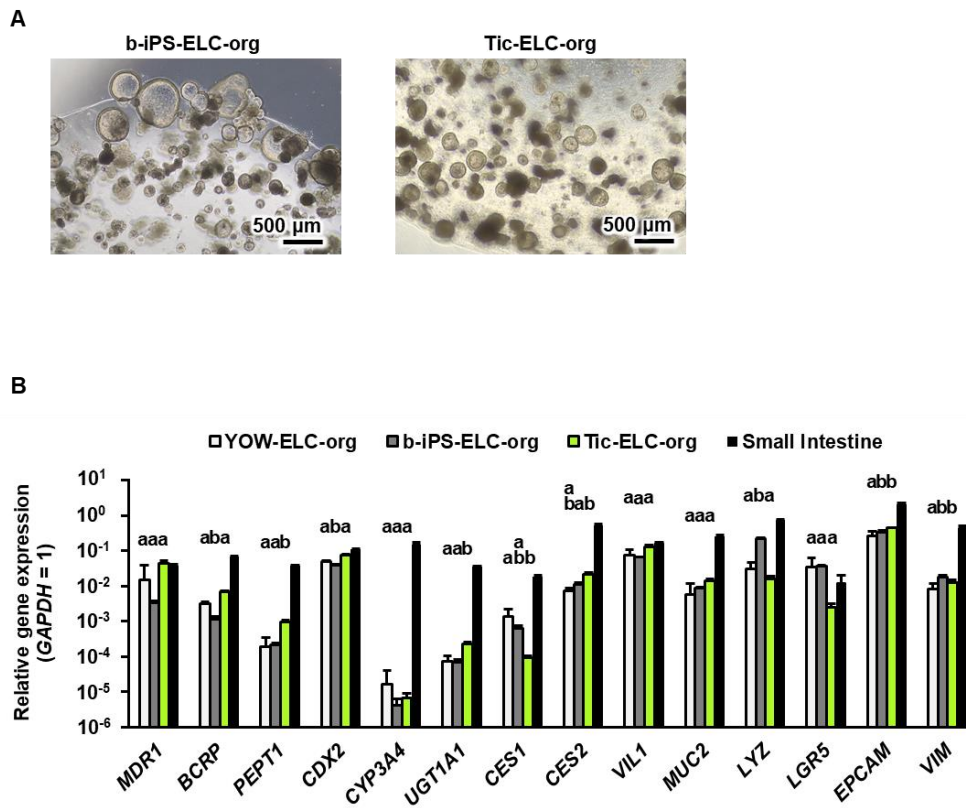


Figure 12. ELC-org were generated from other iPS cell lines.

(A) Phase-contrast images of ELC-org generated from other iPS cell lines (b-iPS and Tic) are shown.

(B) The gene expression levels of drug transporters (*MDR1*, *BCRP*, *PEPT1*), drug-metabolizing enzymes (*CYP3A4*, *UGT1A1*, *CES1*, *CES2*), intestinal cell markers (*CDX2*, *VIL*, *MUC2*, *LYZ*, *LGR5*, *EPCAM*) and a mesenchymal cell marker (*VIM*) were examined in ELC-org generated from various iPS cell lines (YOW, b-iPS and Tic) and the human small intestine by qRT-PCR. The *GAPDH* expression level was taken as 1.0. All data represent the mean \pm S.D. ($n = 3$, biological replicates). Statistical significance was evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Groups that do not share the same letter had significantly different results ($p < 0.05$).

高機能な ELC-org-mono 作製のための最適な培地の検討

薬物動態評価への応用には、腸管オルガノイドを 2 次元の単層膜の状態で培養し、タイトジャンクションを形成させる必要がある。著者の既報では、ヒト生検由来の腸管オルガノイドをシングルセルにまで解離し播種することで単層膜培養が可能であること、オルガノイド培地を用いて 2 次元培養することで CYP3A4 の発現レベルが 100 倍以上に増加することを示した²⁴。したがって、ELC-org から作製した単層膜 (ELC-org-mono) も同様にオルガノイド培地 (OCM) を用いて単層膜培養することで、CYP3A4 の遺伝子発現レベルは向上しヒト小腸の発現レベルに近づくと考えられた。一方で、ELC-org の元となった ELCs は最終的に腸管成熟化培地 (IMM) で培養していた。それを考慮すると、ELC-org-mono の培養にも IMM が適しているように思われた。そこで、どちらの培地が ELC-org-mono の培養に適しているかを確認するため、各培地で培養した ELC-org-mono について、主要な遺伝子の発現レベルを qRT-PCR で調べた。その結果、OCM で培養するより IMM を用いて ELC-org-mono を培養すると、CYP3A4 や UGT1A1 といった遺伝子の発現レベルが劇的に向上し、CYP3A4 についてはヒト小腸の遺伝子発現レベルに匹敵していた (**Fig. 13A**)。この結果から、ELC-org では一時的に元の ELC にあった小腸の機能を一部失ったものの、単層膜化し最適な培地で培養することで元の ELC と同等以上の機能を獲得できたことが示唆された。また、経上皮電気抵抗 (TEER) および CYP3A4 活性も IMM で培養した方が高い値を示した (**Fig. 13B および 13C**)。

以上より、オルガノイド化することにより ELC を継代により維持培養できるだけでなく、より高い機能を有する in vitro 評価系を作製できることが示された。そこで、以降の検討では、IMM で ELC-org-mono を培養した。

重要なこととして、複数回継代 (最大 53 回; 1 年以上) した ELC-org から作製しても、ELC-org-mono の遺伝子発現パターンは一定の傾向を維持していた (**Fig. 14A**)。このことは、ELC-org が継代を繰り返して長期培養しても遺伝的に安定した培養系であることを示唆している。

Figure 13

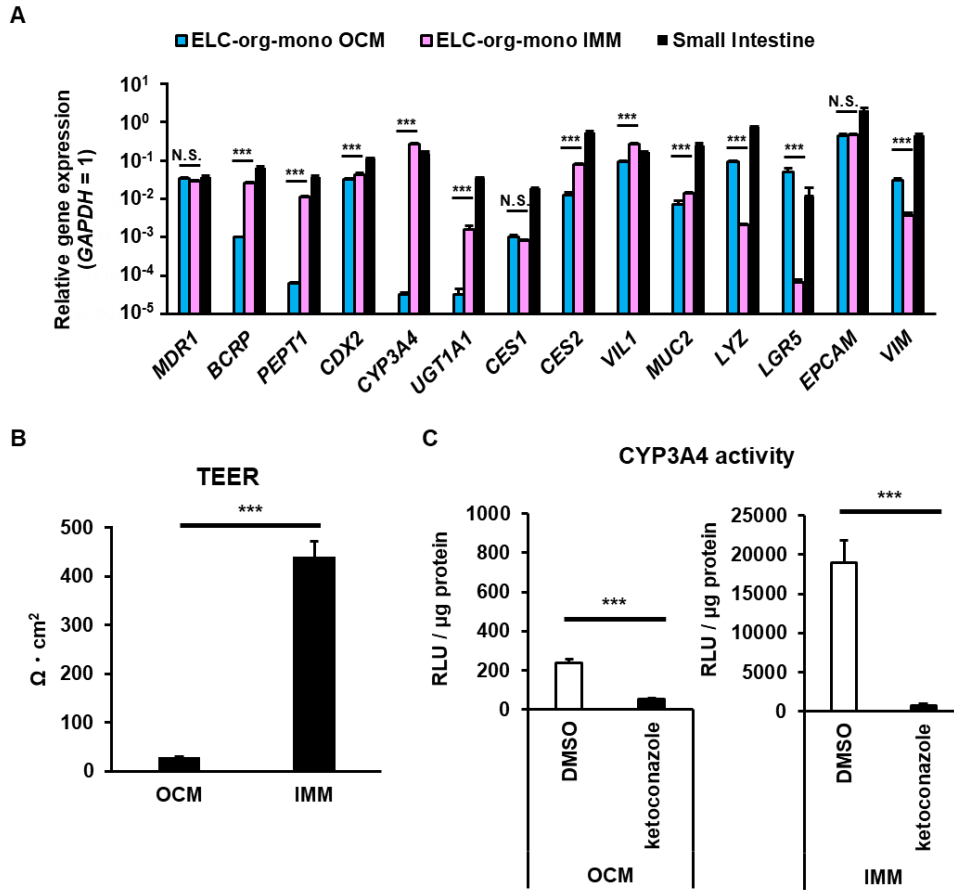


Figure 13. Optimal medium for monolayer culture of ELC-org (ELC-org-mono)

(A) The gene expression levels of drug transporters (*MDR1*, *BCRP*, *PEPT1*), drug-metabolizing enzymes (*CYP3A4*, *UGT1A1*, *CES1*, *CES2*), intestinal cell markers (*CDX2*, *VIL*, *MUC2*, *LYZ*, *LGR5*, *EPCAM*) and a mesenchymal cell marker (*VIM*) were examined in ELC-org and ELC-org-mono cultured with different media and in the human small intestine by qRT-PCR. The organoid culture medium (OCM) was the same as the medium previously used for the organoid culture, while intestinal maturation medium (IMM) was the same as the final medium previously used for the differentiation of ELCs differentiation from human iPS cells. Details are shown in the Materials and Methods section. The *GAPDH* expression level was taken as 1.0. (B) The TEER values in each cell monolayer cultured on cell culture inserts were measured by Millicell-ERS2. (C) The CYP3A4 activity in each cell monolayer was examined by using the P450-Glo CYP3A4 assay kit in the presence or absence of 10 μM ketoconazole (a CYP3A4 inhibitor). All data represent the mean ± S.D. ($n = 3$, biological replicates). Statistical analyses were performed using the unpaired two-tailed Student's t-test (***) $p < 0.005$.

Figure 14

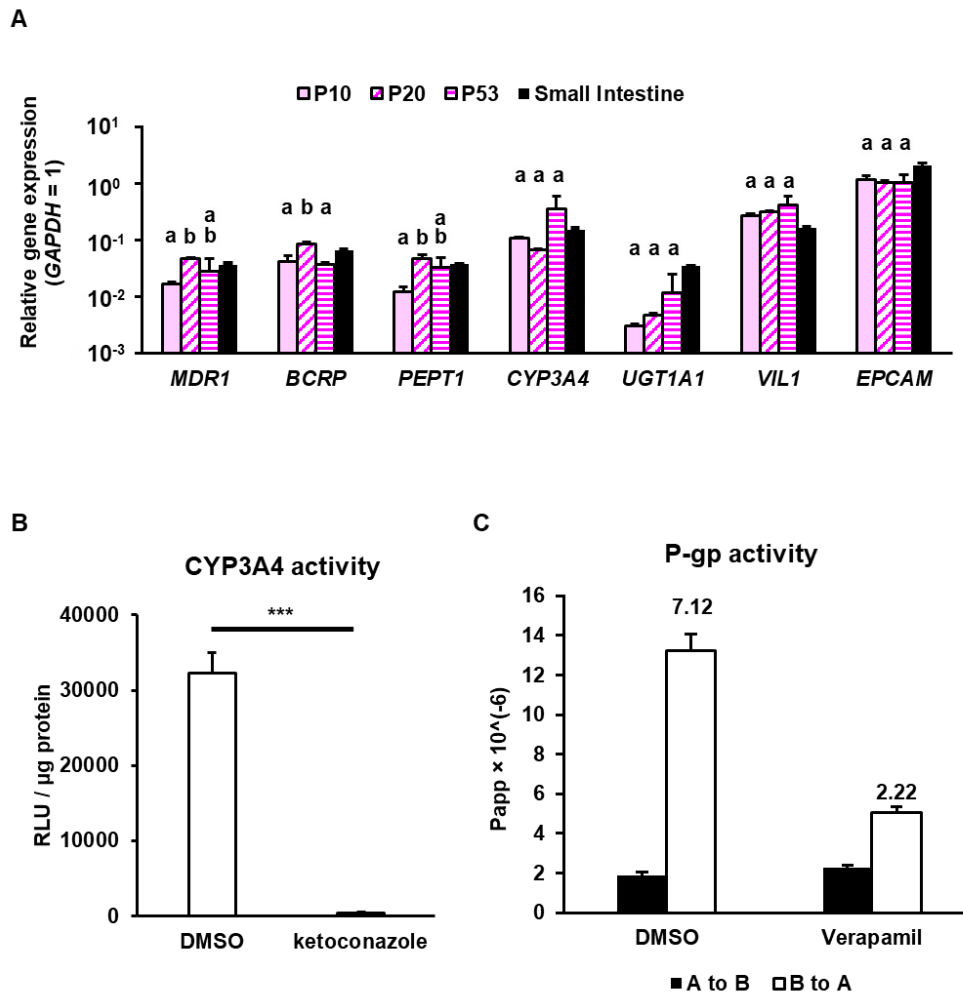


Figure 14. ELC-org maintained their function even after long-term culture

(A) The gene expression levels of drug transporters (*MDR1*, *BCRP*, *PEPT1*), drug-metabolizing enzymes (*CYP3A4*, *UGT1A1*), and intestinal cell markers (*VIL*, *EPCAM*) were examined by qRT-PCR in each monolayer derived from ELC-org with 10, 20, and 53 successive passages and in the human small intestine. The *GAPDH* expression level was taken as 1.0. Statistical significance was evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Groups that do not share the same letter had significantly different results ($p < 0.05$). (B) The CYP3A4 activity in the monolayer derived from ELC-org with 51 successive passages was examined by using the P450-Glo CYP3A4 assay kit in the presence or absence of 10 μ M ketoconazole (a CYP3A4 inhibitor). Statistical analyses were performed using the unpaired two-tailed Student's t-test ($***p < 0.005$). (C) The permeabilities of Rhodamine123 (a P-gp substrate) in the monolayer derived from ELC-org with 52 successive passages were measured. The efflux ratio ($P_{app\ B\ to\ A}/P_{app\ A\ to\ B}$) of each group is shown above the bar. All data represent the mean \pm S.D. ($n = 3$, biological replicates).

ELC-org-mono の最適な培養期間の検討

先の検討で単層膜培養における最適な培地を選択できた。続いて、薬物代謝活性および薬物輸送活性の評価に最適な培養期間を決定するため、同じ日に作製した ELC-org-mono を用いて異なる培養期間で培養した後、いくつかのアッセイを行った。まず、小腸の機能や分化に関連する主要な遺伝子の発現量を qRT-PCR で調べた。その結果、多くの遺伝子の発現レベルは単層膜での培養期間が長くなるにつれて増加したが、その変化はわずかであった (**Fig.15A**)。TEER 値は、どの培養期間でも薬物動態研究に使用できるほど高かった (**Fig.15B**)。CYP3A4 活性は、単層膜での培養期間が長いほど高くなる傾向があったが、3 日目でも十分に高かった (**Fig.15C**)。Rhodamine123 を基質とする P-gp のトランスポーター活性は、培養の初期 (3~5 日目) の方が後期 (7 日目) よりも高かった (**Fig.15D**)。以上の結果を踏まえ、以降の検討では単層膜培養 7 日目の ELC-org-mono を用いて薬物代謝酵素活性を、単層膜培養 3 日目の ELC-org-mono を用いて薬物輸送活性を評価した。

Figure 15

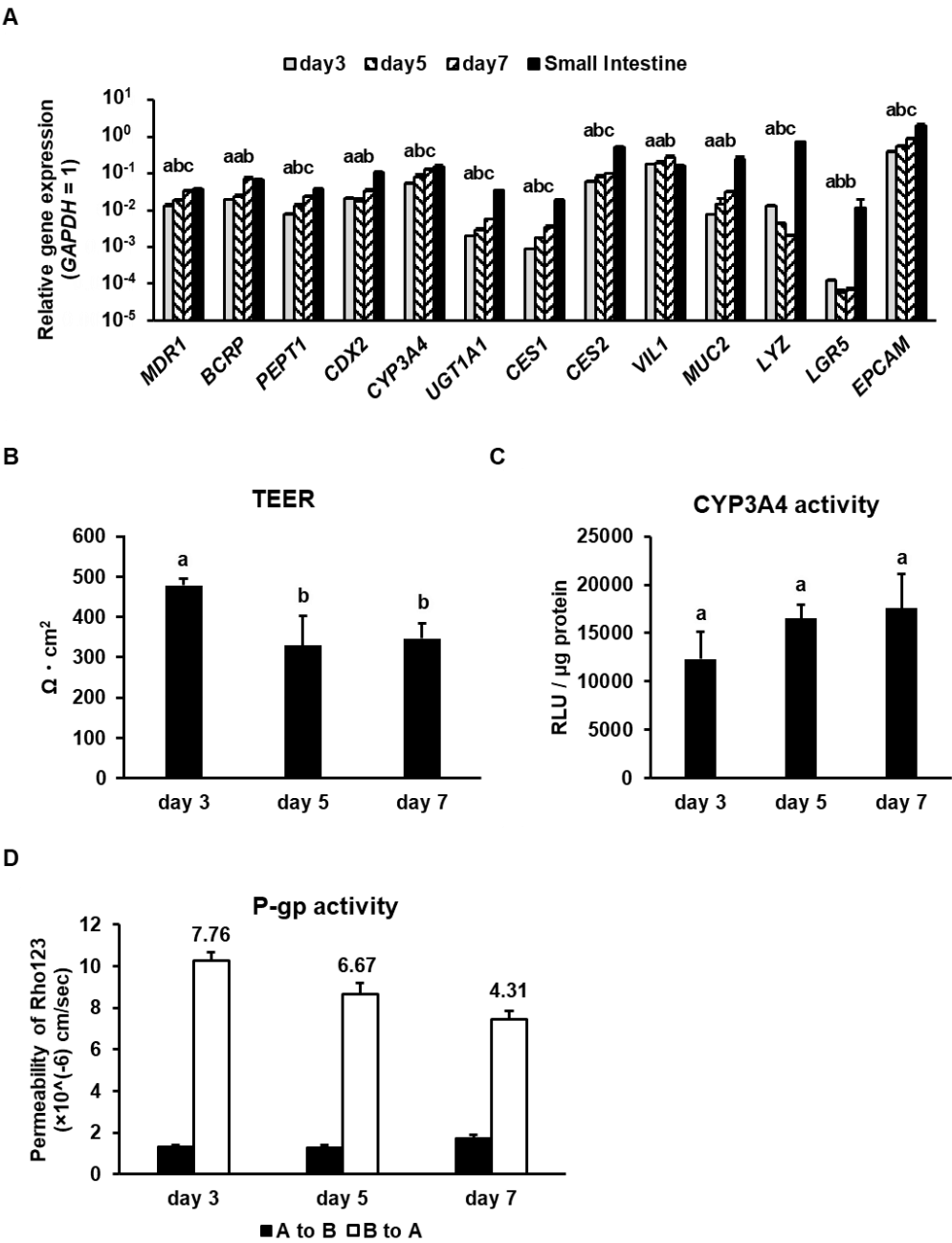


Figure 15. Optimal monolayer culture period for ELC-org-mono

(A) The gene expression levels of drug transporters (MDR1, BCRP, PEPT1), drug-metabolizing enzymes (CYP3A4, UGT1A1, CES1, CES2) and intestinal cell markers (CDX2, VIL, MUC2, LYZ, LGR5, EPCAM) were examined by qRT-PCR in ELC-org-mono cultured for different culture periods and in the human small intestine. The GAPDH expression level was taken as 1.0. (B) The TEER values in each cell monolayer were measured by Millicell-ERS2. (C) The CYP3A4 activity in each cell monolayer was examined by using the P450-Glo CYP3A4 assay kit in the presence or absence of 10 μ M ketoconazole (a CYP3A4 inhibitor). (D) The permeabilities of Rhodamine123 (a P-gp substrate) in each cell monolayer were measured. The efflux ratio (Papp B to A/Papp A to B) of each group is shown above the bar. All data represent the mean \pm S.D. (n = 3, biological replicates). Statistical significance was evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Groups that do not share the same letter had significantly different results (p < 0.05).

樹立された ELC-org は生体の小腸を構造的に模倣していた

ELC-org と ELC-org-mono について *in vitro* ヒト小腸モデルとしての特性を調べた。まず、形態学的評価を行った (**Fig. 16A および 16B**)。位相差顕微鏡による観察では、ELC-org は表面が滑らかで細胞層が薄い (約 10 μ m) 球状の形態を示し、ELC-org-mono は円柱上皮細胞様の形態であった。透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察では、ELC-org および ELC-org-mono の細胞層はそれぞれ単一の細胞層からなり、微絨毛 (**Fig. 16B : 右パネル矢印**) とタイトジャンクション構造 (**Fig. 16B : 右パネル矢頭**) が確認された。微絨毛については、ELC-org-mono の方が ELC-org より発達し高くなっていた。これらの結果から、ELC-org は単層膜化することで構造的に成熟することが示唆された。

続いて ELC-org と ELC-org-mono における様々な分子のタンパク質レベルでの発現を調べた。各培養系に占める上皮細胞の割合を確認するために、上皮細胞マーカーである EpCAM と吸収上皮細胞マーカーである Villin を標的とした FACS 解析を行った。その結果、ELC-org の EpCAM 陽性細胞率は 100%、Villin 陽性細胞率は 85%を超えていた (**Fig.16C**)。このことから、ELC-org を様々な薬物動態評価に適用する際、上皮細胞のみソーティングするような操作が不要であることが確認された。同様に各マーカーの陽性細胞率を ELC-org-mono で確認した結果、ELC-org-mono でも EpCAM 陽性細胞率は 100%であったが、Villin 陽性細胞率は 77%と ELC-org よりも低い割合であった。以上の結果から、ELC-org と ELC-org-mono はともに上皮細胞のみで構成されており、その大部分は吸収上皮細胞であることが示唆された。

ヒト小腸で見られる主要な分化細胞の存在を確認するために、免疫蛍光染色も行った。その結果、ELC-org および ELC-org-mono には、吸収上皮細胞 (VIL)、内分泌細胞 (CHGA)、およびパネート細胞 (LYZ) が含まれていることが確認された (**Fig.16D および 16E**)。ELC-org-mono では杯細胞 (MUC2) の存在も確認された (**Fig.16E**)。以上より、ELC-org-mono はヒト小腸に存在する上皮細胞および分化細胞を含む培養系であることが示唆された。

Figure 16

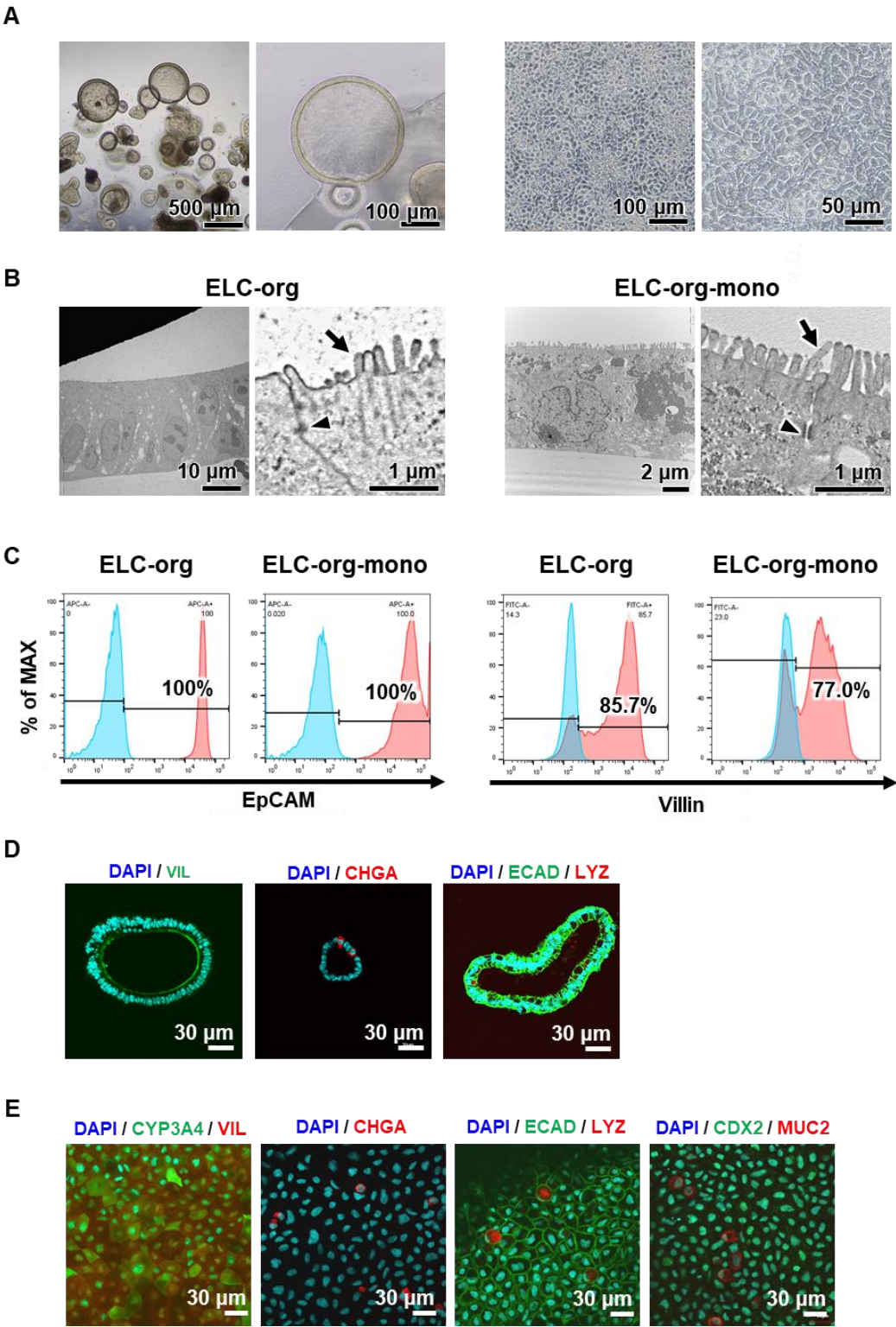


Figure 16. Differences in morphological and protein expression between ELC-org and ELC-org-mono

(A) Phase-contrast images of ELC-org and ELC-org-mono are shown. (B) TEM images of ELC-org and ELC-org-mono are shown. Microvilli (black arrows) and tight junctions (black arrowheads) are indicated. (C) Percentages of EpCAM- and Villin-positive cells in ELC-org and ELC-org-mono were measured by FACS analysis. Negative control (blue) and stained cells (red) are represented. (D) The protein expressions of VIL, CHGA, ECAD and LYZ in ELC-org were characterized by immunostaining. (E) The protein expressions of CYP3A4, VIL, CHGA, ECAD, LYZ, CDX2 and MUC2 in ELC-org-mono were characterized by immunostaining.

ELC-org-mono の薬物動態能評価

ELC-org-mono の薬物動態能を確認するために、様々な方法でその機能を評価した。その結果、明らかな CYP3A4 活性 (**Fig. 17A**) や CES2 活性 (**Fig. 17B**) といった薬物代謝活性、および P-gp 活性 (**Fig. 17C**)、BCRP 活性 (**Fig. 17D**)、PEPT1 活性 (**Fig. 17E**) といった薬物輸送活性が確認され、それぞれの活性は阻害剤によって阻害されることが示された。さらに、ELC-org-mono の CYP3A4 活性および P-gp 活性は、ELC-org を 50 回以上継代しても維持されていた (**Fig. 14B および 14C**)。以上の結果から、ELC-org-mono は薬物代謝や薬物輸送の研究に用いるのに十分な機能を有していることが示唆された。

CYP3A4 誘導は薬物間相互作用を引き起こす主要なメカニズムである。そこで ELC-org-mono が CYP3A4 誘導能を保持しているかどうかを検討した。しかしながら、単層膜培養に用いた腸管成熟化培地 (IMM) にはすでに CYP3A4 の誘導物質である vitamin D3 (VD3)^{60,61} が含まれていたため、ELC-org-mono を VD3 無添加の IMM (-V) で 5 日間培養した後、IMM または VD3 無添加の IMM に rifampicin (RIF) を添加または無添加 (IMM/-V, +RIF/-RIF) して 2 日間培養した (**Fig. 18A**)。その結果、ELC-org-mono における CYP3A4 の遺伝子発現レベルは、RIF 添加によって明らかに上昇した (**Fig. 18B**)。また、ELC-org-mono を VD3 を含む IMM で 5-7 日間培養しただけでも、CYP3A4 の遺伝子発現レベルはヒト小腸のそれに近く、RIF 添加によって遺伝子発現レベルはさらに上昇した (**Fig. 18C**)。一方、MDR1 と UGT1A1 の遺伝子発現レベルも RIF によって誘導されることが確認されたが、他の遺伝子の発現レベルは VD3 と RIF の影響をほとんど受けなかった (**Fig. 18C**)。これらの結果から、ELC-org-mono は CYP3A4 の誘導能を保持していることが示唆された。

次に、ELC-org を凍結し保存した細胞懸濁液から機能的な単層膜を形成できるかどうかを調べた。その際、ELC-org をシングルセルにまで解離し、凍結保存液で懸濁して細胞懸濁液とした。それを 2 週間-150°C で凍結保存した後、解凍して直接インサート上に播種しその機能を調べた。以降、凍結細胞懸濁液から作製した単層膜を F-ELC-org-mono と呼称する。qRT-PCR 解析の結果、F-ELC-org-mono の遺伝子発現プロファイルに凍結保存による悪影響は見られなかった (**Fig. 19A**)。さらに、F-ELC-org-mono は十分な CYP3A4 活性と P-gp 活性を示し (**Fig. 19B および C**)、その活性は凍結保存を経ていない通常の ELC-org-mono (**Fig. 14D** および **Fig. 18A**) と同程度のものではあった。このことは、ELC-org を細胞懸濁液の状態で凍結保存することで、いつでも機能的な ELC-org-mono を作製できることを示唆している。

また、ELC-org-mono の各種 CYP の薬物代謝活性を LC-MS/MS で解析した。その際、比較対象として凍結保存されていたヒト小腸初代細胞の融解直後の状態に対しても同様の解析を行った (**Fig. 20**)。その結果、ELC-org-mono の CYP3A4 活性、CYP2D6 活性、CYP2C9 活性は、ヒト初代小腸細胞のそれぞれの活性と同等であった。一方で ELC-org-mono の CYP2C19 活性はヒト初代小腸細胞よりも高かった。以上より、ELC-org-mono の薬物代謝能がヒト小腸を模倣していることが示唆された。

Figure 17

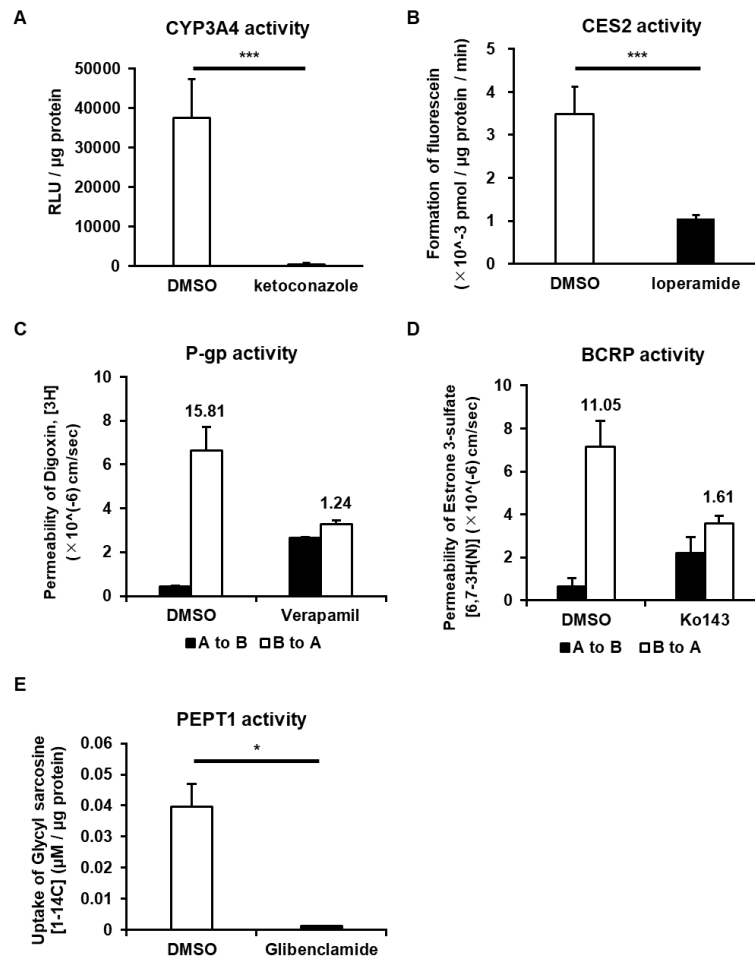


Figure 17. Drug-metabolizing activities and drug transport activities in ELC-org-mono

Drug-metabolizing activities and drug transport activities were examined in ELC-org-mono. The CYP3A4 (A) and CES2 (B) activities were measured. (C) The permeabilities of ^3H -labeled digoxin (substrate for P-gp) in ELC-org-mono with or without 100 μM verapamil (P-gp inhibitor) were measured. The efflux ratio ($P_{app\ B\ to\ A} / P_{app\ A\ to\ B}$) of each group is shown above the bar. (D) The permeabilities of ^3H -labeled estrone sulfate (substrate for BCRP) with or without 100 μM Ko143 (BCRP inhibitor) were measured. The efflux ratio ($P_{app\ B\ to\ A} / P_{app\ A\ to\ B}$) of each group is shown above the bar. (E) The PEPT1 activity was measured by evaluating the amount of ^{14}C -labeled Glycyl sarcosine (substrate for PEPT1) uptake into the cells with or without 100 μM glibenclamide (PEPT1 inhibitor). All data represent the mean \pm S.D. ($n = 3$, biological replicates). Statistical analyses were performed using the unpaired two-tailed Student's t-test (* $p < 0.05$, *** $p < 0.005$).

Figure 18

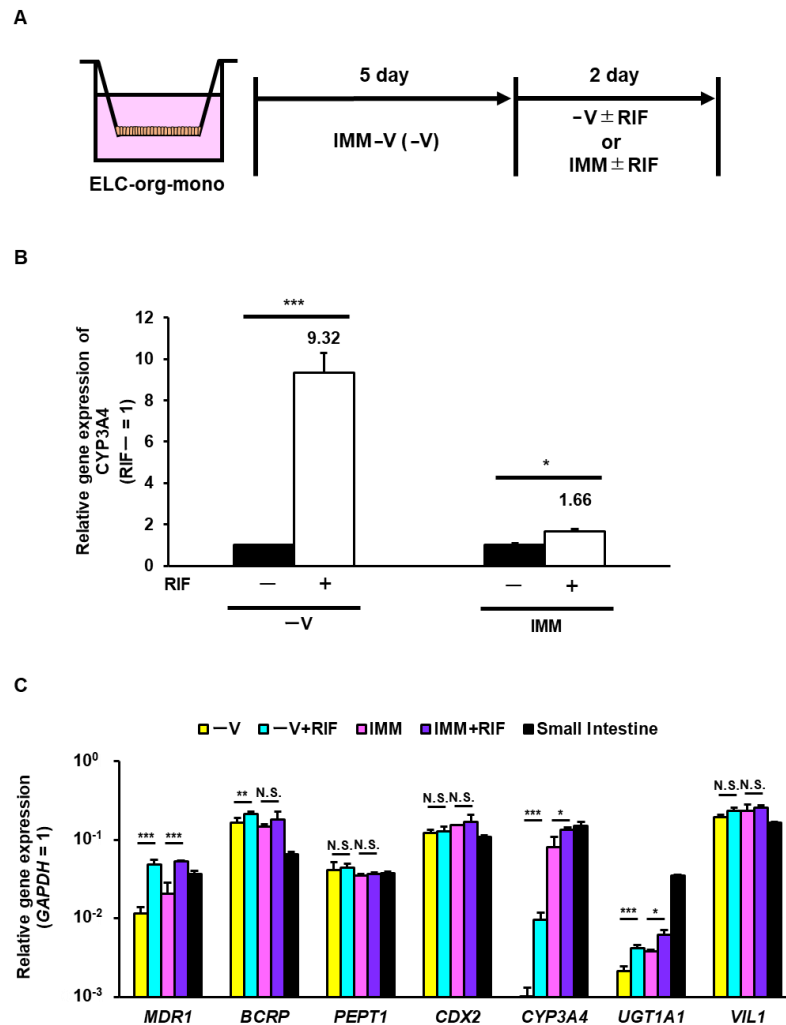


Figure 18. CYP3A4 induction in ELC-org-mono

ELC-org-mono were cultured with intestinal maturation medium with/without VD3 or RIF (-V or IMM, respectively). (A) Diagram of the protocol for CYP3A4 induction. (B) The gene expression level of CYP3A4 was examined in ELC-org-mono with or without RIF by qRT-PCR. The expression level in ELC-org-mono without RIF was taken as 1.0. Statistical analyses were performed using the unpaired two-tailed Student's t-test (*p < 0.05, ***p < 0.005). (C) The gene expression levels of drug transporters (MDR1, BCRP, PEPT1), drug-metabolizing enzymes (CYP3A4, UGT1A1) and intestinal cell markers (CDX2, VIL) were examined in ELC-org-mono with or without RIF and the human small intestine by qRT-PCR. The GAPDH expression level was taken as 1.0. Groups that do not share the same letter had significantly different results (p < 0.05). All data represent the mean ± S.D. (n = 3, biological replicates). Statistical analyses were performed using the unpaired two-tailed Student's t-test (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005). N.S. means "Not Significant".

Figure 19

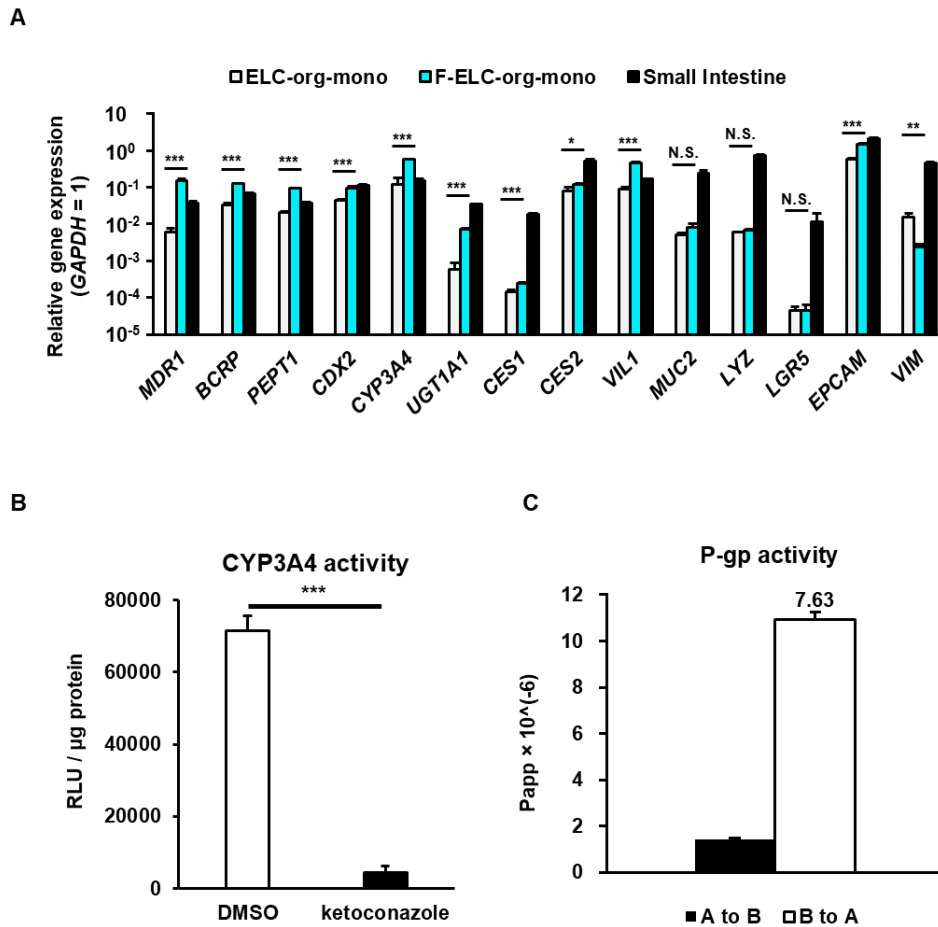


Figure 19. ELC-org can form functional monolayers from cryopreserved cell suspensions

ELC-org were dissociated into single cells and cryopreserved for 2 weeks. Then, cryopreserved ELC-org cell suspensions were thawed, seeded directly onto cell culture inserts, and cultured for 3 to 7 days (F-ELC-org-mono). (A) The gene expression levels of drug transporters (*MDR1*, *BCRP*, *PEPT1*), drug-metabolizing enzymes (*CYP3A4*, *UGT1A1*, *CES1*, *CES2*), intestinal cell markers (*CDX2*, *VIL*, *MUC2*, *LYZ*, *LGR5*, *EPCAM*) and a mesenchymal cell marker (*VIM*) were examined in F-ELC-org-mono by qRT-PCR. As a control, the gene expression levels in ELC-org-mono without cryopreservation and in the human small intestine were examined. The *GAPDH* expression level was taken as 1.0. (B) The CYP3A4 activity in F-ELC-org-mono was examined by using the P450-Glo CYP3A4 assay kit in the presence or absence of 10 µM ketoconazole (a CYP3A4 inhibitor). (C) The permeabilities of Rhodamine123 (substrate for P-gp) in F-ELC-org-mono were measured. The efflux ratio ($P_{app\ B\ to\ A}/P_{app\ A\ to\ B}$) of each group is shown above the bar. All data represent the mean ± S.D. ($n = 3$, biological replicates). Statistical analyses were performed using the unpaired two-tailed Student's t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$). N.S. means "Not Significant".

Figure 20

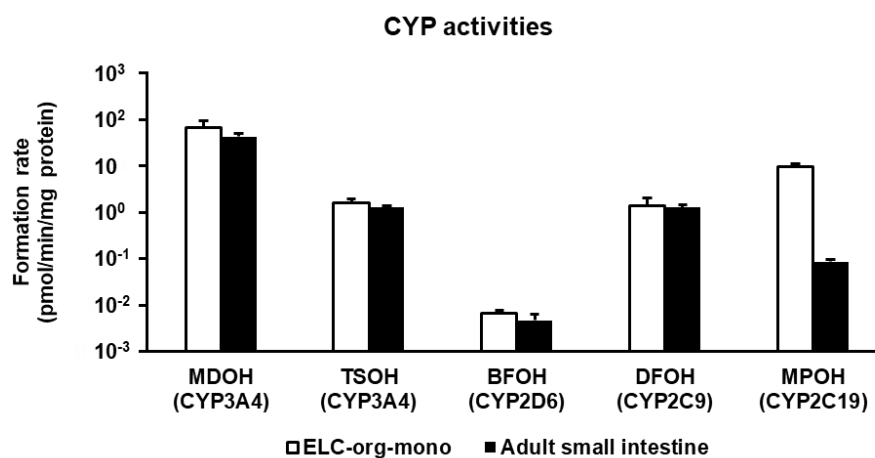


Figure 20. Comparison of drug-metabolizing activities of various CYPs between ELC-org-mono and primary cryopreserved human small intestinal cells

Drug-metabolizing activities of CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, and CYP2C19 between ELC-org-mono and primary cryopreserved human small intestinal cells were examined by quantifying the metabolites of each substrate (MDOH, TSOH, BFOH, DFOH and MPOH) by UPLC-MS/MS analysis. In the case of CYP3A4, midazolam and testosterone were used as substrates. Drug-metabolizing activities in primary cryopreserved human small intestinal cells were measured just after the cells were thawed. All data represent the mean \pm S.D. ($n = 3$, biological replicates).

ELC、ELC-org、ELC-org-mono の RNA-seq 解析

最後に、ELC、ELC-org、ELC-org-mono をより詳細に比較するために、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析を行った (**Fig. 21**)。K-means クラスタリングにより、各サンプル間で最も変動が大きかった 2000 遺伝子を 4 つのクラスターに分けた (**Fig. 21A**)。ELC から ELC-org を経て ELC-org-mono に至るまでに発現が上昇した遺伝子群を含むクラスター A についてエンリッチメント解析を行い、p 値が最小の 14 項をリストアップした (**Fig. 21B**)。クラスター A では、消化に関連する遺伝子群 (“Digestion”、“Digestive system process”) と代謝プロセスに関連する遺伝子群 (“Small molecule metabolic process”、“Monocarboxylic acid metabolic process”、“Lipid metabolic process”、“Terpenoid metabolic process”、“Steroid metabolic process”、“Oxoacid metabolic process”) が同定された。これらのことから、ELC から ELC-org を、ELC-org から ELC-org-mono を作製する過程で、小腸としての機能が向上していったことが示唆された。

最終的な ELC-org-mono における遺伝子発現が、元の ELC からどのような変化をしたかを詳細に調べるために、同定された発現差遺伝子 (DEGs) に対してエンリッチメント解析を行った。ELC と ELC-org-mono の間で発現が大きく変化した遺伝子を同定し、volcano plot で示した (**Fig. 21C**)。578 遺伝子が ELC から ELC-org-mono で発現上昇し (発現上昇遺伝子)、1692 遺伝子が ELC から ELC-org-mono で発現低下した (発現低下遺伝子) ことが確認された。それぞれの遺伝子について、p 値が最小の 10 項をリストアップした (**Fig. 21D および 21E**)。発現上昇遺伝子では、この上位 10 遺伝子群はすべて代謝プロセスに関連したものであった (“Small molecule metabolic process”、“Oxoacid metabolic process”、“Organic acid metabolic process”、“Lipid metabolic process”、“Monocarboxylic acid metabolic process”、“Carboxylic acid metabolic process”、“Fatty acid metabolic process”、“Cellular lipid metabolic process”、“Alcohol metabolic process”、“Organic hydroxy compound metabolic process”)。このことから、ELC-org-mono では ELC と比較して代謝能が亢進していることが示唆された。一方で、発現低下遺伝子では、間葉系組織に関連する遺伝子群 (“Nervous system development”、“Mesenchyme development”、“Muscle structure development”、“Generation of neurons”) が同定された。このことは、ELC-org-mono が ELC の時点で混在していた間葉系細胞を排除できていることを示唆している。

以上の RNA-seq の結果から、ELC-org-mono は ELC とは異なり、間葉系細胞を含まない高機能な上皮細胞で構成されていることが示された。

Figure 21

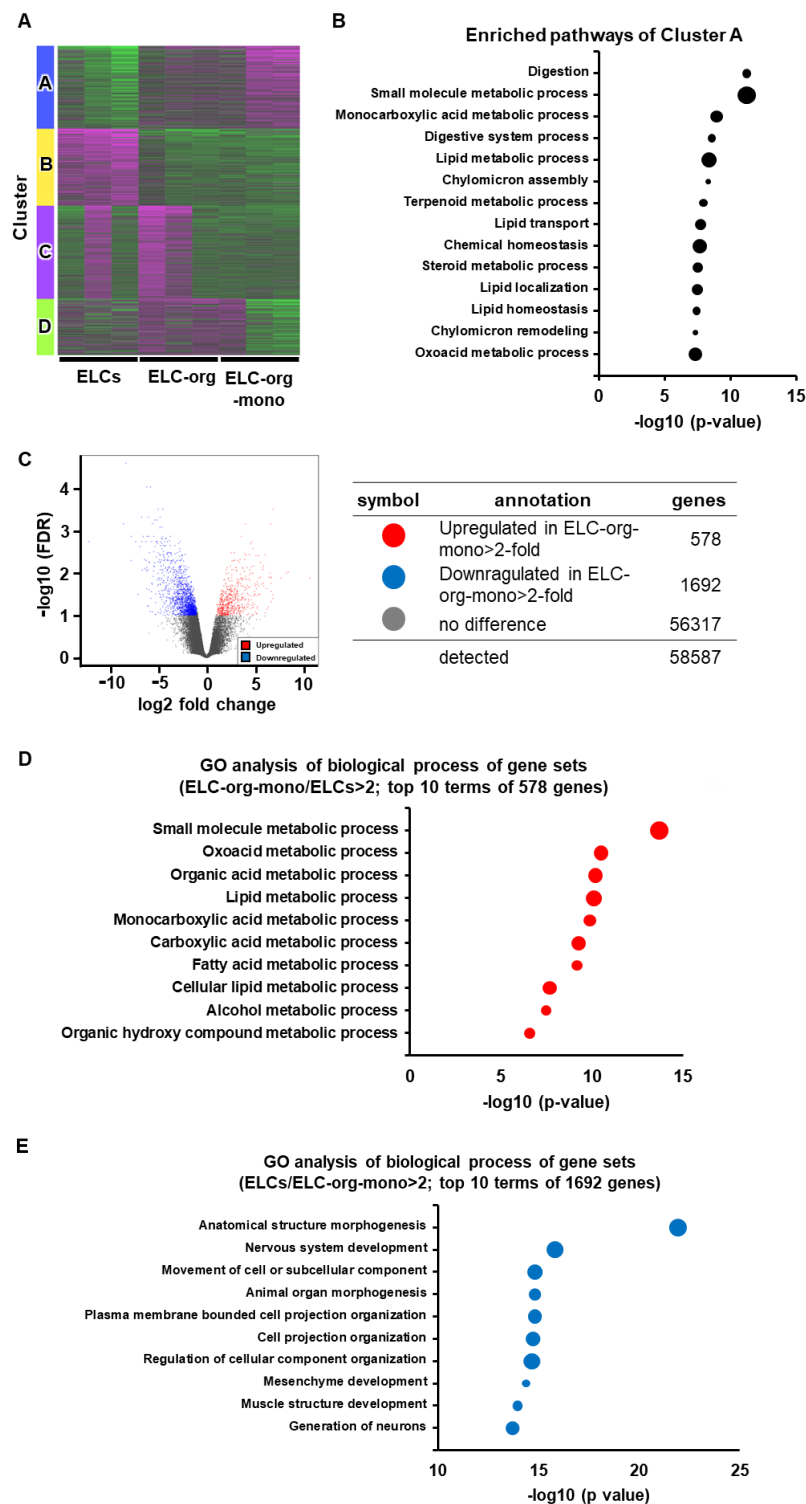


Figure 21. Comprehensive gene expression analysis in ELCs, ELC-org and ELC-org-mono

- (A) The top 2000 most variable genes across all samples were visualized by heatmap and k-means clustering. Gene expression variation was calculated by Z-score, with magenta indicating an increase in expression compared to the mean across all samples, and green indicating a decrease in expression.
- (B) Enriched bubble chart of the top 14 GO pathways of enriched cluster A. The y-axis is the enriched pathway, and the x-axis is the $-\log_{10}$ adjusted P-value. The bubble size represents the gene number.
- (C) A volcano plot comparing gene expression levels in the ELC-org-mono with those in the ELCs.
- (D) Enriched bubble chart of the top 10 up-regulated GO pathways of DEGs between the ELCs vs ELC-org-mono groups. The y-axis is the enriched pathway, and the x-axis is $-\log_{10}$ adjusted P-value. The bubble size represents the gene number.
- (E) Enriched bubble chart of the top 10 down-regulated GO pathways of DEGs between the ELCs vs ELC-org-mono groups. The y-axis is the enriched pathway, and the x-axis is $-\log_{10}$ adjusted P-value. The bubble size represents the gene number.

考察

本研究の目的は、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮様細胞 (ELC) から腸管オルガノイド (ELC-org) とその単層膜 (ELC-org-mono) を作製することで、創薬研究に応用可能な高機能な腸管上皮細胞を安定供給できる培養系を開発することである。その結果、ELC から間葉系細胞を含まない長期培養可能な ELC-org を樹立することに成功し、ELC-org から高機能な ELC-org-mono を作製するための培養法を開発した。このオルガノイドから作製された ELC-org-mono は、元となった ELC や ELC-org における遺伝子発現プロファイルよりも、成人のヒト小腸における遺伝子発現プロファイルに類似していた。さらに、凍結保存したヒト初代小腸細胞と同等の薬物代謝能と、創薬研究に適した薬物輸送能を有していた。さらに、1 年以上の長期培養後も腸管遺伝子の発現は安定しており、凍結保存細胞を細胞培養用インサート上で直接培養することにも成功した。

先の第一章でもヒト iPS 細胞から腸管オルガノイドを樹立したが、小腸としての機能は今回作製した ELC-org よりはるかに低かった。第一章では、ヒト iPS 細胞が後腸内胚葉細胞に分化した時点（分化誘導期間 7 日）でオルガノイドを作製したが、これは McCracken らの報告に基づいていた³⁹。本研究では、ヒト iPS 細胞が ELC すなわち成熟した腸管上皮細胞に完全に分化（分化誘導期間 27 日）した時点でオルガノイドを作製することで、オルガノイド培養と単層膜培養のそれぞれに最適な培地で ELC-org の培養系を培養できた。このように、オルガノイド培養の開始時期、すなわち培養開始時の細胞の特性は、高機能な腸管オルガノイドおよびその単層膜の作製に重要であった。

本研究では、アッセイの種類に応じて異なる培養期間で培養した ELC-org-mono を使用した。培養期間を検討した結果 (Fig. 15)、薬物代謝活性を検討する場合は 7 日目に、薬物輸送活性を検討する場合は 3 日目に ELC-org-mono を使用した。しかし、ELC-org-mono は単層膜培養 3-7 日目の範囲で十分な CYP3A4 活性と P-gp 活性を示していた。したがって、ELC-org-mono は 3~7 日の範囲内であれば、いつでも様々な薬物動態試験に応用でき、同じ培養期間の ELC-org-mono を用いて薬物代謝活性と薬物輸送活性を検討することも可能であると推測された。

本研究で作製された ELC-org は、他の研究グループ^{12,17,25,26,49,64}が以前に報告したヒト iPS 細胞由来の腸管オルガノイドよりもいくつかの点で優れている。第一に、ELC-org の作製、すなわち ELC のオルガノイド化に特別な道具を必要としない。これまでの報告では、オルガノイドの形成を容易にする小さな凹凸のある特殊なプレートを用いてオルガノイドを作製していた^{12,49}。一方、本研究の ELC-org は、ELC をピペッティングで断片化し、マトリゲルに埋め込むというシンプルな方法で作製された。さらに、ELC-org は単層膜を作製する際に腸管上皮細胞のソーティングを必要としない。ヒト iPS 細胞由来の腸管オルガノイドには間葉系細胞が含まれているため^{25,64}、いくつかの報告では高機能な腸管上皮細胞の単層膜を

作製する際に、間葉系細胞をソーティングによって除去していた^{17,26}。別の報告では、腸管前駆細胞から腸管オルガノイドを作製する際に腸管上皮細胞をソーティングすることで、間葉系細胞を含まない腸管オルガノイドを作製していた⁶⁵。本研究で作製された ELC-org は腸管上皮細胞のみから構成されているため、既報のようにソーティングといった煩雑な操作をせずとも間葉系細胞を含まない機能的な単層膜を作製することができた。簡便に単層膜を作製できる本培養系は、幅広い創薬研究への応用に有利である。

FACS 解析について、第一章で作製したヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドでは、EpCAM 陽性細胞率は 56%であった⁵²。一方で、データでは示していないが、本研究で作製した pre-ELC-org の EpCAM 陽性細胞率は ELC-org と同様 100%であった。今回の検討では、pre-ELC-org を作製するための分化誘導期間だけでも、第一章での期間より 10 日長かった。従って、ヒト iPS 細胞から間葉系を含まない腸管上皮細胞を分化誘導するには、最適化された分化誘導プロトコルに加えて、一定の分化誘導期間が必要となると思われる。対して、ELC-org-mono の Villin 陽性細胞率は、ELC-org のそれより減少していた (Fig. 16C)。この傾向は、第一章でのヒト生検由来腸管オルガノイドの FACS 解析でも確認されており、単層膜培養で腸管細胞への分化が促進され、様々な分化細胞が生じた結果、吸収上皮細胞 (Villin 陽性) の数が減少したものと考えられる。実際、ELC-org-mono では、内分泌細胞、パネート細胞、杯細胞などの分化細胞が免疫染色で観察されており (Fig. 16E)、この見解を支持している。

本研究では、ELC-org から高機能な単層膜 (ELC-org-mono) を作製するための最適な培地を決定した。単層膜培養に使用する培地を、ヒト iPS 細胞から ELC を作製する際に用いる腸管成熟化培地に置き換えることで、ELC-org-mono は最も重要な薬物代謝酵素である CYP3A4 の高い活性を取り戻した (Fig. 13C)。おそらくオルガノイド培養培地 (OCM) にオルガノイドの増殖性の維持に重要な因子である Wnt が含まれているのに対して、腸管成熟化培地 (IMM) にはそれが含まれていないため、幹細胞の増殖が抑えられ、単層膜全体がより腸管上皮に分化したからと考えられる。また、今回は分化誘導に使用していた IMM の組成をそのまま利用したが、最適な単層膜培養培地の組成についての検討はできていない。ELC-org-mono の腸管としての機能をさらに向上させる上で、培地組成の詳細なスクリーニングと最適化を行うことも重要である。

ELC-org-mono における P-gp 活性は、過去の報告^{17,19,22} よりも高い排出比を示し、既報での生検由来腸管オルガノイド由来単層膜や Caco-2 細胞²⁴ の排出比と同程度であった (Fig. 17C)。米国食品医薬品局 (FDA) のガイダンスでは、薬剤開発の初期段階において、薬剤候補化合物を MDR1 (P-gp) および BCRP の基質として評価することが求められている (<https://www.fda.gov/drugs/guidance-compliance-regulatory-information/guidances-drugs>)。ELC-org-mono は P-gp と BCRP の両方の活性を有しており、FDA の要件を満たす有用な評価系であると言える。

本研究では、ヒト iPS 細胞由来の ELC からオルガノイド培養により高機能な単層ブラッ

トフォーム（ELC-org-mono）の開発に成功し、薬物動態試験への適合性を実証した。ELC-org-mono は間葉系細胞の混入がなく、ヒト小腸で同定された腸管分化細胞で構成されていた。多くの薬物動態酵素やトランスポーターの遺伝子発現レベルは、ヒト小腸と同等であった。さらに、薬物動態学的研究に応用可能な高い薬物代謝および薬物輸送活性を有していた。ELC-org-mono の薬物代謝能が、凍結保存されたヒト初代小腸細胞（解凍直後）の薬物代謝能を模倣していることは、非常に興味深く重要である。この機能は、1 年以上培養したオルガノイドから作製された ELC-org-mono でも健在であった。ELC-org を基盤とした ELC-org-mono を用いたこの評価系は、創薬プロセスの飛躍的な向上のみならず、ヒト腸管細胞を用いた様々な基礎研究や再生医療研究に貢献するものと期待される。

総括

経口投与された医薬品は小腸にて吸収・代謝・排泄されるため、ヒト小腸におけるそれらの薬物動態を非臨床的に評価することは創薬研究において重要な検討項目である。しかし、現在汎用されている動物実験や Caco-2 細胞を用いた評価系は種々の課題を有しており、それらに代わるヒト小腸での薬物動態を正確に評価できる系の開発が行われてきた。

2011 年、これまで困難であったヒト小腸上皮細胞の長期培養がオルガノイド培養技術により可能となったことで、新たな小腸上皮細胞モデルとしての小腸オルガノイドの研究が活発になった。そして、奇しくも同時期にヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞を分化誘導できることが示され、それを機にヒト iPS 細胞から薬物動態評価可能な高機能な腸管上皮細胞を分化誘導する技術の開発が進められるようになった。

そのような状況の中で、本研究では iPS 細胞の汎用性とオルガノイドの応用性に注目し、ヒト iPS 細胞から高機能な腸管オルガノイドを作製することで、創薬研究に応用可能な新たな腸管上皮細胞モデルの確立を目指した。しかしながら、既存のヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドの機能の高さが不明確であったため、同一個人から生検由来腸管オルガノイドと iPS 細胞由来腸管オルガノイドを樹立し、両者の特性や機能を比較した（第一章）。その結果、多くの点において生検由来腸管オルガノイドの方が優れていることが明らかになった。しかしながら、ヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドの機能の低さは分化誘導法に起因している可能性が高く、その改良が必要であることが示された。そこで、当研究室にて培われてきたヒト iPS 細胞から高機能な腸管上皮様細胞を分化誘導するプロトコルに改良を加え、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮様細胞から腸管オルガノイドを樹立し、その機能を評価した（第二章）。その結果、安定して長期培養可能な腸管オルガノイドの樹立およびその単層膜化に成功した。腸管オルガノイドから作製された単層膜は生体に類似した遺伝子発現プロファイルを示したばかりか、薬物動態試験に適用可能な薬物代謝能と薬物輸送能を有していた。

本研究によりヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイド（ELC-org）が薬物動態試験に十分応用可能であることが確認された。一方で、薬物動態試験では、小腸での初回通過効果における各薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの寄与を明らかにするために化学的な阻害剤を用いるのが一般的である。実際、医薬品の成分がどの分子の基質となっているかを明確化することを米国食品医薬品局（FDA）が要請している。しかしながら、多くの阻害剤が標的分子以外にも阻害してしまうことが知られており、既存の系では特定分子の寄与を評価することは困難である。それに対して、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集により、特定の遺伝子をノックアウトしたヒト iPS 細胞からも ELC-org を樹立できる。そのため、主要な薬物動態分子をそれぞれノックアウトした ELC-org を組み合わせて利用することで、これまでより容易かつ高精度に寄与する薬物動態分子を特定できるようになることが期待される。

はじめに述べたように創薬研究における腸管モデルの需要は高まっている。特に近年の FDA の方針変更により新薬開発における動物実験の義務化が廃止されたことから、生体を模倣した培養系がこれまでより必要とされるであろう。また、他の分野においても腸管モデルを用いた研究が進んでいる。例えば、ヒトとの深い関係性が明らかになっている腸内細菌叢に関する研究では細菌と共培養できる腸管モデルは必須である。そのような需要の増加に対して、ヒト iPS 細胞から作製される腸管上皮細胞が市販されているものの、製作コストの高さや競合製品の不在などから非常に高額であることため、未だに使いやすい腸管モデルは存在しないのが現状である。本研究で開発された ELC-org のような高機能かつ大量培養が容易な培養系が台頭することで、安価で高機能な腸管モデルの実用化が期待される。

今後、分化誘導技術が発展することでより生体に近いヒト iPS 細胞由来の腸管モデルが開発されることおよびそのような腸管モデルが創薬研究で広く実用化されることを期待する。また、オルガノイド技術は培養系に関わる研究において有用なツールであるため、様々な研究においてオルガノイド技術が応用されることを期待する。そして、iPS 細胞の分化誘導技術とオルガノイド技術の組み合わせにより、腸管だけでなく生体の様々な組織の培養系が構築され、各分野の研究が加速することを期待したい。

謝辞

本研究および本稿執筆にあたり、懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野教授水口裕之博士に心より感謝いたします。

本研究に関して多大なるご助言、ご指導を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野 櫻井文教博士、立花雅史博士、酒井英子博士、植山由希子博士に心より感謝いたします。

本研究のオルガノイド培養用培地作製に関して、Wnt3a を安定して発現する HEK293 細胞を提供していただいた大阪大学蛋白質研究所の高木淳一教授に心より感謝いたします。

本研究の LC-MS/MS 解析について支援を受けました国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 生命科学・創薬研究支援基盤事業創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) (課題番号: JP23ama121054, JP23ama121052) およびその際にご協力いただきました布村一人准教授はじめ関係者の方々に感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、多大なるご協力を賜りました大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野の皆様は厚く御礼を申し上げます。特に腸管チームの皆様については本研究に関して様々な面でサポートいただいたことを重ねて感謝いたします。

大学院博士後期課程において経済的な援助を賜りました、独立行政法人日本学生支援機構ならびに国立研究開発法人科学技術振興機構に心より感謝いたします。

最後に、博士後期課程進学まで経済的、精神的に支え続け、卒業まで温かく励まし見守ってくれた両親ならびに、時にライバルとして、時に良き理解者として、同じ研究室で切磋琢磨してきた弟に感謝いたします。

参考文献

1. Mizuma, T. Impact of intestinal metabolism on drug development. *Folia Pharmacol. Jpn.* **134**, 142–145 (2009).
2. Emoto, C. *et al.* Use of everted sacs of mouse small intestine as enzyme sources for the study of drug oxidation activities in vitro. *Xenobiotica* **30**, 971–982 (2000).
3. Artursson, P., Palm, K. & Luthman, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 27–43 (2001).
4. Martignoni, M., Groothuis, G. M. M. & de Kanter, R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2**, 875–894 (2006).
5. Chu, X., Bleasby, K. & Evers, R. Species differences in drug transporters and implications for translating preclinical findings to humans. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* vol. 9 237–252 (2013).
6. Hu, Y. & Smith, D. E. Species differences in the pharmacokinetics of cefadroxil as determined in wildtype and humanized PepT1 mice. *Biochem. Pharmacol.* **107**, 81–90 (2016).
7. Prueksaritanont, T., Gorham, L. M., Hochman, J. H., Tran, L. O. & Vyas, K. P. Comparative studies of drug-metabolizing enzymes in dog, monkey, and human small intestines, and in Caco-2 cells. *Drug Metab. Dispos.* **24**, (1996).
8. Cheng, K. C., Li, C. & Uss, A. S. Prediction of oral drug absorption in humans - From cultured cell lines and experimental animals. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* vol. 4 581–590 (2008).
9. Nishimuta, H., Sato, K., Yabuki, M. & Komuro, S. Prediction of the Intestinal First-pass Metabolism of CYP3A and UGT Substrates in Humans from in vitro Data. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **26**, 592–601 (2011).
10. Iwao, T. *et al.* Generation of enterocyte-like cells with pharmacokinetic functions from human induced pluripotent stem cells using small-molecule compounds. *Drug Metab. Dispos.* **43**, 603–610 (2015).
11. 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. Reports 2015* **5**, 1–11 (2015).
12. Onozato, D. *et al.* Generation of Budding-Like Intestinal Organoids from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *J. Pharm. Sci.* **110**, 2637–2650 (2021).

13. Yoshida, S. *et al.* Generation of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Functional Enterocyte-Like Cells for Pharmacokinetic Studies. *Stem Cell Reports* **16**, 295–308 (2021).
14. Ichikawa, M. *et al.* Vinblastine treatment decreases the undifferentiated cell contamination of human iPSC-derived intestinal epithelial-like cells. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **20**, 463–472 (2021).
15. Negoro, R. *et al.* Modeling of drug-mediated CYP3A4 induction by using human iPS cell-derived enterocyte-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **472**, 631–636 (2016).
16. 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).
17. Akazawa, T. *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.* **46**, 1497–1506 (2018).
18. Takayama, K. *et al.* Generation of Human iPSC-Derived Intestinal Epithelial Cell Monolayers by CDX2 Transduction. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **8**, 513 (2019).
19. Kabeya, T. *et al.* Pharmacokinetic functions of human induced pluripotent stem cell-derived small intestinal epithelial cells. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **35**, 374–382 (2020).
20. Kawai, K. *et al.* Establishment of SLC15A1/PEPT1-Knockout Human-Induced Pluripotent Stem Cell Line for Intestinal Drug Absorption Studies. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **17**, 49–57 (2020).
21. Kondo, S., Mizuno, S., Hashita, T., Iwao, T. & Matsunaga, T. Establishment of a novel culture method for maintaining intestinal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells. *Biol. Open* **9**, (2020).
22. Negoro, R. *et al.* Establishment of MDR1-knockout human induced pluripotent stem cell line. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **35**, 288–296 (2020).
23. Sato, T. *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* **459**, 262–265 (2009).
24. Yamashita, T. *et al.* Monolayer platform using human biopsy-derived duodenal organoids for pharmaceutical research. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **22**, 263–278 (2021).
25. Spence, J. R. *et al.* Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* **470**, 105–110 (2011).
26. Yoshida, S., Miwa, H., Kawachi, T., Kume, S. & Takahashi, K. Generation of intestinal organoids derived from human pluripotent stem cells for drug testing. *Sci. Rep.* **10**, 1–11 (2020).

27. T Prueksaritanont, L M Gorham, J H Hochman, L. O. T. and K. P. V. Comparative studies of drug-metabolizing enzymes in dog, monkey, and human small intestines, and in Caco-2 cells. *Drug Metab. Dispos.* **24**, 634–642 (1996).
28. Sato, T. *et al.* Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett’s epithelium. *Gastroenterology* **141**, 1762–1772 (2011).
29. Dekkers, J. F. *et al.* A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat. Med.* **19**, 939–945 (2013).
30. Zou, W. Y. *et al.* Human Intestinal Enteroids: New Models to Study Gastrointestinal Virus Infections. *Methods Mol. Biol.* **1576**, 229–247 (2019).
31. Sugimoto, S. & Sato, T. Establishment of 3D intestinal organoid cultures from intestinal stem cells. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1612 97–105 (Humana Press Inc., 2017).
32. Okita, K. *et al.* An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells* **31**, 458–466 (2013).
33. Loffet, E., Brossard, L. & Mahe, M. M. Pluripotent stem cell derived intestinal organoids with an enteric nervous system. *Methods Cell Biol.* **159**, 175–199 (2020).
34. Dobin, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
35. Ge, S. X., Son, E. W. & Yao, R. iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC Bioinforma.* 2018 191 **19**, 1–24 (2018).
36. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 2009 41 **4**, 44–57 (2008).
37. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1–13 (2009).
38. Makino, H. *et al.* Mesenchymal to embryonic incomplete transition of human cells by chimeric OCT4/3 (POU5F1) with physiological co-activator EWS. *Exp. Cell Res.* **315**, 2727–2740 (2009).
39. McCracken, K. W., Howell, J. C., Wells, J. M. & Spence, J. R. Generating human intestinal tissue from pluripotent stem cells in vitro. *Nat. Protoc.* **6**, 1920–1928 (2011).
40. Ambudkar, S. V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z. E. & Gottesman, M. M. P-glycoprotein: From genomics to mechanism. *Oncogene* vol. 22 7468–7485 (2003).
41. Thummel, K. E. Gut instincts: CYP3A4 and intestinal drug metabolism. *Journal of Clinical Investigation* vol. 117 3173–3176 (2007).

42. Imai, T. & Ohura, K. The Role of Intestinal Carboxylesterase in the Oral Absorption of Prodrugs. *Curr. Drug Metab.* **11**, 793–805 (2011).
43. Ichinose, M. *et al.* Stromal DLK1 promotes proliferation and inhibits differentiation of the intestinal epithelium during development. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* ajpgi.00445.2020 (2021) doi:10.1152/ajpgi.00445.2020.
44. Ørskov, C. *et al.* GLP-2 stimulates colonic growth via KGF, released by subepithelial myofibroblasts with GLP-2 receptors. *Regul. Pept.* **124**, 105–112 (2005).
45. Miki, Y., Suzuki, T., Tazawa, C., Blumberg, B. & Sasano, H. Steroid and xenobiotic receptor (SXR), cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance gene 1 in human adult and fetal tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.* **231**, 75–85 (2005).
46. Finkbeiner, S. R. *et al.* Transcriptome-wide Analysis Reveals Hallmarks of Human Intestine Development and Maturation In Vitro and In Vivo. *Stem Cell Reports* **4**, 1140–1155 (2015).
47. Onozato, D. *et al.* Generation of Budding-Like Intestinal Organoids from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *J. Pharm. Sci.* **110**, 2637–2650 (2021).
48. Holloway, E. M. *et al.* Differentiation of Human Intestinal Organoids with Endogenous Vascular Endothelial Cells. *Dev. Cell* **54**, 516–528.e7 (2020).
49. Onozato, D. *et al.* Generation of intestinal organoids suitable for pharmacokinetic studies from human induced pluripotent stem cells. *Drug Metab. Dispos.* **46**, 1572–1580 (2018).
50. Yoshida, S. *et al.* Generation of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Functional Enterocyte-Like Cells for Pharmacokinetic Studies. *Stem Cell Reports* **16**, 295–308 (2021).
51. Leo, S. *et al.* The Effect of Vitamin D3 and Valproic Acid on the Maturation of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Enterocyte-Like Cells. *Stem Cells* (2023) doi:10.1093/STMCLS/SXAD042.
52. Inui, T. *et al.* Comparison of human biopsy-derived and human iPS cell-derived intestinal organoids established from a single individual. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **48**, 100482 (2023).
53. Takayama, K. *et al.* Prediction of interindividual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 16772–16777 (2014).
54. Fujii, M. *et al.* Human Intestinal Organoids Maintain Self-Renewal Capacity and Cellular Diversity in Niche-Inspired Culture Condition. *Cell Stem Cell* **23**, 787–793.e6 (2018).
55. Mihara, E. *et al.* Active and water-soluble form of lipidated wnt protein is maintained by a serum glycoprotein afamin/ α -albumin. *Elife* **5**, (2016).
56. Inui, T. *et al.* Establishment of MDR1-knockout human enteroids for pharmaceutical application. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **48**, 100476 (2023).

57. Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C. & Salzberg, S. L. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat. Biotechnol.* **2019** 378 **37**, 907–915 (2019).
58. Liao, Y., Smyth, G. K. & Shi, W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**, 923–930 (2014).
59. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 1–21 (2014).
60. Thummel, K. E. *et al.* Transcriptional Control of Intestinal Cytochrome P-4503A by 1 α ,25-Dihydroxy Vitamin D3. *Mol. Pharmacol.* **60**, 1399–1406 (2001).
61. Glaeser, H., Drescher, S., Eichelbaum, M. & Fromm, M. F. Influence of rifampicin on the expression and function of human intestinal cytochrome P450 enzymes. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **59**, 199 (2005).
62. Takahashi, Y. *et al.* Reciprocal Inflammatory Signaling Between Intestinal Epithelial Cells and Adipocytes in the Absence of Immune Cells. *EBioMedicine* **23**, 34–45 (2017).
63. Takahashi, Y. *et al.* Organoid-derived intestinal epithelial cells are a suitable model for preclinical toxicology and pharmacokinetic studies. *iScience* **25**, (2022).
64. Watson, C. L. *et al.* An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nat. Med.* **20**, 1310–1314 (2014).
65. Mithal, A. *et al.* Generation of mesenchyme free intestinal organoids from human induced pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* **11**, 1–15 (2020).

主論文

1. Inui T., Yamashita T., Tomita J., Yokota J., Kishimoto W., Nakase H., Mizuguchi H.
Comparison of human biopsy-derived and human iPS cell-derived intestinal organoids established from a single individual. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **48**, 100482 (2023).
2. Inui T., Uraya Y., Yokota J., Yamashita T., Kawai K., Okada K., Ueyama-Toba Y., Mizuguchi H.
Functional intestinal monolayers from organoids derived from human iPS cells for drug discovery research. *submitted*.

参考論文

1. Yokota, J. Yamashita T., Inui T., Nomoto R., Kishimoto W., Nakase H., Mizuguchi H.
Comparison of culture media for human intestinal organoids from the viewpoint of pharmacokinetic studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **566**, 115–122 (2021).
2. Yamashita, T, Inui T., Yokota J., Kawakami K., Morinaga G., Takatani M., Hirayama D., Nomoto R., Ito K., Cui Y., Ruez S., Harada K., Koshimoto W., Nakase H., Mizuguchi H.
Monolayer platform using human biopsy-derived duodenal organoids for pharmaceutical research. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **22**, 263–278 (2021).
3. Inui T., Nomoto R., Yokota, J. Yamashita T., OkadaK., Kishimoto W., Nakase H., Mizuguchi H.
Establishment of MDR1-knockout human enteroids for pharmaceutical application. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **48**, 100476 (2023).
4. Okada, K., Yokota J., Yamashita T., Inui T., Kishimoto W., Nakase H., Mizuguchi H.
Establishment of human intestinal organoids derived from commercially available cryopreserved intestinal epithelium and evaluation for pharmacokinetic study. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 100532 (2024)