

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 5 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18929

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞から作製した腸管上皮細胞の純化と消化管における薬物動態評価系の構築

研究課題名(英文) Isolation of human iPS-cell derived intestinal stem cells and constitution of pharmacokinetic evaluation system

研究代表者

岩尾 岳洋 (Iwao, Takahiro)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：50581740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトiPS細胞から作製した腸管細胞の単離および維持培養が可能であることが示された。単離した細胞は腸管幹細胞に似た細胞であり、腸管上皮細胞へ分化する能力を有していた。維持培養を行った細胞は、一定期間培養を続けても幹細胞性が維持されていた。維持培養した細胞を腸管上皮細胞に分化させると、腸管マーカーや薬物代謝酵素、薬物トランスポーターの発現が認められた。また、この細胞は薬物代謝酵素活性や薬物トランスポーターによる輸送活性を有していた。本研究における結果は、ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞を創薬研究で利用するにあたって、基盤となる有用な技術であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study indicated to be possible to isolate and maintain human iPS cell-derived intestinal cells. The isolated cells were intestinal stem cell-like cells and had a capacity of differentiation to the enterocytes. The maintained cells remained having a stemness after a certain period of a maintenance culture. When the maintained cells were differentiated to the enterocytes, the cells had pharmacokinetic functions such as CYP3A4 activity, CYP3A4 inducibility, and transporter activities of efflux transporters. It was thought that these results could be useful technical information to use of human iPS cell-derived enterocytes in drug development studies.

研究分野：薬物動態学

キーワード：iPS細胞 小腸 幹細胞 薬物動態

1. 研究開始当初の背景

経口投与された医薬品はまず小腸を通じて生体内に入るが、小腸には多くの薬物トランスporterや薬物代謝酵素が発現しており、これらが医薬品の生体内への吸収量を決定する要因の一つとして重要である。したがって、医薬品の吸収や代謝に対する消化管の寄与を医薬品開発の早期の段階から明らかにすることがますます重要になってきている。現在その評価には、実験動物や、Caco-2細胞、ヒト小腸ミクロソームなどが用いられている。しかし、これらの評価系には様々な問題もあることから、ヒト小腸における代謝を含めた吸収過程を正確に予測することは難しい。したがって、本来ならば初代ヒト小腸上皮細胞を用いることが望ましいが、これは入手自体がほぼ不可能である。つまり、現在ヒトの小腸における薬物の吸収および代謝を総合的に評価可能な適切なモデル系はなく、その構築が一刻も早く望まれている。

我々は創薬研究への応用を目指し、ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化誘導に関する研究を進めている。現在までに、薬物代謝酵素活性、薬物トランスporter活性およびCYP3A4応答性を有するヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の作製に成功している。また、ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化促進、薬物動態学的な機能の獲得に有用な低分子化合物を複数見出している。しかし、薬物動態試験をはじめとする創薬研究で利用するにあたっては、この機能的な細胞をより高純度で得ることが必要であると考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、消化管の新規薬物動態評価系の構築を目指し、より高純度のヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞を得ることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化

ヒトiPS細胞株は国立成育医療研究センター研究所の梅澤博士よりご供与頂いたものを使用した。ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化は、これまでに我々が確立した方法を基本として行った。具体的には、まずヒトiPS細胞をアクチビンAによって内胚葉へ分化させた。その後、線維芽細胞増殖因子2 (FGF2) によって、腸管幹細胞へ誘導した。その後、上皮成長因子 (EGF) および我々が見出した分化促進因子を用いることによって最終的に腸管上皮細胞へ分化させた。

(2) ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の単離

ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化の途中で細胞の単離を行った。単離後、上記(1)の方法によりさらに分化誘導を継続した。また、単離後、その細胞の維持培養も行った。これらの各段階において細胞を回収し、マーカー遺伝子の発現を解析した。

(3) 遺伝子発現解析

細胞を回収してRNAの抽出を行った。その後、腸管幹細胞や腸管上皮細胞のマーカー遺伝子、薬物トランスporterおよび薬物代謝酵素の発現をリアルタイムPCR法により測定した。

(4) CYP3A4誘導実験

分化終了48時間前より $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミンD₃を処理し、処理後の細胞を遺伝子発現解析および薬物代謝実験に用いた。

(5) CYP3A4代謝実験

分化終了後、CYP3A4の基質であるミダゾラムを含む培地でインキュベートした。所定の時間経過後、内部標準物質を含むアセトニトリルによって反応を停止させた。代謝物の定量はUPLC-MS/MS法により行った。

(5) 双方向性膜透過試験

トランスウェル上にヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞を播種し、排出トランスporterであるP-gpもしくはBCRPの基質を添加した。必要に応じて阻害剤も添加した。所定の時間経過後、レシーバー側の薬物濃度を定量し、見かけの膜透過係数を算出した。

4. 研究成果

ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化の途中で単離を行った細胞は、腸管幹細胞マーカーであるLGR5やEphB2、CD133、SOX9の発現が非単離群と比較して高かった。また、単離した細胞を引き続き腸管上皮細胞への分化プロトコールに沿って分化させると、腸管上皮細胞マーカーであるsucrase-isomaltase、villin、排出トランスporterであるBCRPの発現が認められた。これらの発現レベルは非単離群と比較して有意に高かった。したがって、単離した細胞は腸管幹細胞もしくは前駆細胞様の細胞であることが示唆された。

次に、ヒトiPS細胞由来腸管細胞の維持培養も行った。さまざまな培養条件の検討を行うことで、最も適した条件を見出すことができた。この方法にて培養した細胞は、CDX2、LGR5、EphB2、SOX9、Ki67などの腸管マーカー、腸管幹細胞マーカーおよび細胞増殖マーカーの発現が継代を繰り返しても維持されていた。また、維持培養培地から分化培地に切り替え、腸管上皮細胞へ分化させると、腸管細胞マーカーや薬物代謝酵素、薬物トランスporterの発現が認められた。さらに、CYP3A4活性やCYP3A4誘導能、排出トランスporterを介した輸送能も有していた。このことから、ヒトiPS細胞由来腸管細胞は維持培養が可能であることが示唆された。これについては、特許出願をしている。

本研究において、ヒトiPS細胞から作製した腸管細胞の単離および維持培養の可能性

が示された。これらの結果は、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞を創薬研究で用いるにあたって、基盤となる有用な技術であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Kabeya T, Matsumura W, Iwao T, Hosokawa M, Matsunaga T: Functional analysis of carboxylesterase in human induced pluripotent stem cell-derived enterocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **486**, 143–148, 2017. (査読有)

Kodama N, Iwao T, Katano T, Ohta K, Yuasa H, Matsunaga T: Characteristic analysis of intestinal transport in enterocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Drug Metab Dispos*, **44**, 1662–1667, 2016. (査読有)

Kodama N, Iwao T, Kabeya T, Horikawa T, Niwa T, Kondo Y, Nakamura K, Matsunaga T: Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase, DNA methyltransferase, and transforming growth factor- β promotes differentiation of human induced pluripotent stem cells into enterocytes. *Drug Metab Pharmacokin*, **31**, 193–200, 2016. (査読有)

岩尾岳洋, 松永民秀: ヒト iPS 細胞の分化誘導の現状と創薬研究への応用. *HAB Newsletter*, **22**, 6–7, 2016. (査読無)

Iwao T, Kodama N, Kondo Y, Kabeya T, Nakamura K, Horikawa T, Niwa T, Kurose K, Matsunaga T: 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. (査読有)

岩尾岳洋, 松永民秀: 個別化(オーダーメイド)医療を志向した薬物動態研究および毒性試験へのヒト iPS 細胞の利用. *Organ Biology*, **22** (1), 39–48, 2015. (査読無)

[学会発表](計18件)

壁谷知樹, 松村若菜, 岩尾岳洋, 細川正清, 松永民秀: ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞におけるカルボキシエステラーゼの機能解析. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 24 日–27 日(仙台国際センター他, 宮城・仙台).

邱 施萌, 長崎瑞佳, 壁谷知樹, 岩尾岳洋, 松永民秀: 基底膜成分を用いたヒト iPS 細

胞由来小腸幹細胞の単離. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 24 日–27 日(仙台国際センター他, 宮城・仙台).

木田有里子, 小野里太智, 赤川 巧, 小枝暁子, 岩尾岳洋, 松永民秀: カニクイザル iPS 細胞由来腸管オルガノイドの長期培養. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 24 日–27 日(仙台国際センター他, 宮城・仙台).

小野里太智, 山下美紗季, 木田有里子, 小枝暁子, 岩尾岳洋, 松永民秀: カニクイザル iPS 細胞由来腸管オルガノイドを用いた薬物動態学的機能解析. 細胞アッセイ研究会 シンポジウム, 2017 年 1 月 30 日(東京大学生産科学研究所, 東京).

山下美紗季, 小野里太智, 赤川 巧, 岩尾岳洋, 松永民秀: ヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドの機能評価. 細胞アッセイ研究会 シンポジウム, 2017 年 1 月 30 日(東京大学生産科学研究所, 東京).

小野里太智, 赤川 巧, 山下美紗季, 木田有里子, 小枝暁子, 岩尾岳洋, 松永民秀: 機能的なカニクイザル iPS 細胞由来腸管オルガノイドの作製. 日本薬物動態学会第 31 回年会, 2016 年 10 月 13 日–15 日(キッセイ文化ホール他, 長野・松本).

山下美紗季, 小野里太智, 赤川 巧, 岩尾岳洋, 松永民秀: ヒト iPS 細胞からの腸管オルガノイドの作製. 日本薬物動態学会第 31 回年会, 2016 年 10 月 13 日–15 日(キッセイ文化ホール他, 長野・松本).

岩尾岳洋: ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の薬物動態学的機能特性. 日本薬物動態学会第 31 回年会, 2016 年 10 月 13–15 日(キッセイ文化ホール他, 長野・松本). (招待講演)

鈴木香帆, 片野貴大, 太田欣哉, 保嶋智也, 壁谷知樹, 小玉菜央, 岩尾岳洋, 松永民秀, 湯浅博昭: ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞モデルにおける小腸特異的葉酸トランスポーター機能の検証. 日本薬剤学会第 31 年会, 2016 年 5 月 19 日–21 日(長良川国際会議場他, 岐阜・岐阜).

岩尾岳洋: ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞への分化と薬物動態機能評価. 日本薬物動態学会第 10 回ショートコース, 2016 年 5 月 12 日(千里ライフサイエンスセンター, 大阪・大阪). (招待講演)

Tomoki Kabeya, Takahiro Iwao, Nao Kodama, Tamihide Matsunaga: Small molecule compounds enhance the differentiation of human induced pluripotent stem cells to

enterocytes with pharmacokinetic functions. 11th International ISSX Meeting, Jun. 12-16, 2016 (Busan, Korea).

小野里太智, 福山了介, 赤川 巧, 小枝暁子, 岩尾岳洋, 松永民秀: 消化管毒性評価系の構築を目指したヒト iPS 細胞/カニクイザル ES 細胞由来腸管上皮様細胞及びオルガノイドの作製. 細胞アッセイ研究会シンポジウム, 2016 年 1 月 19 日 (東京大学生産科学研究所, 東京).

福山了介, 小野里太智, 小枝暁子, 岩尾岳洋, 松永民秀: カニクイザル胚性幹細胞から腸管上皮細胞様細胞の作製. 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年 12 月 1 日-4 日 (神戸ポートアイランド, 兵庫・神戸).

壁谷知樹, 岩尾岳洋, 小玉菜央, 中村克徳, 松永民秀: ヒト人工多能性幹細胞の腸管への分化に対する低分子化合物の有用性. 日本薬物動態学会第 30 回年会, 2015 年 11 月 12 日-14 日 (タワーホール船堀, 東京).

小玉菜央, 岩尾岳洋, 壁谷知樹, 中村克徳, 松永民秀: ヒト人工多能性幹細胞から分化誘導した腸管上皮細胞様細胞の薬物動態学的特性解析. 日本薬物動態学会第 30 回年会, 2015 年 11 月 12 日-14 日 (タワーホール船堀, 東京).

岩尾岳洋, 小玉菜央, 壁谷知樹, 松永民秀: ヒト人工多能性幹細胞由来腸管上皮細胞の薬物動態学的機能評価. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2015, 2015 年 11 月 1 日 (金城学院大学薬学部, 愛知・名古屋).

岩尾岳洋: ヒト iPS 細胞の腸管上皮細胞への分化と薬物動態機能評価. 第 22 回 HAB 研究機構学術年会, 2015 年 6 月 26 日-27 日 (昭和大学上條講堂, 東京). (招待講演)

小玉菜央, 岩尾岳洋, 松永民秀: 低分子化合物によるヒト iPS 細胞から機能的な腸管上皮細胞への分化促進. 第 22 回 HAB 研究機構学術年会, 2015 年 6 月 26 日-27 日 (昭和大学上條講堂, 東京).

〔図書〕(計 0 件)
該当なし

〔産業財産権〕
出願状況 (計 3 件)

名称: 人工多能性幹細胞の腸管上皮細胞への分化誘導
発明者: 岩尾岳洋, 壁谷知樹, 松永民秀
権利者: 公立大学法人 名古屋市立大学
種類:

番号: PCT/JP2017/008616
出願年月日: 2017 年 3 月 3 日
国内外の別: 国外

名称: 人工多能性幹細胞由来腸管幹細胞の維持培養
発明者: 岩尾岳洋, 松永民秀, 近藤聡志
権利者: 公立大学法人 名古屋市立大学
種類:
番号: 特願 2017-029448
出願年月日: 2017 年 2 月 20 日
国内外の別: 国内

名称: 人工多能性幹細胞の腸管上皮細胞への分化誘導
発明者: 岩尾岳洋, 壁谷知樹, 松永民秀
権利者: 公立大学法人 名古屋市立大学
種類:
番号: 特願 2016-044088
出願年月日: 2016 年 3 月 8 日
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
岩尾 岳洋 (IWAO, Takahiro)
名古屋市立大学・薬学研究科・准教授
研究者番号: 50581740

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし

(4) 研究協力者
該当なし