

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08421

研究課題名(和文)薬物動態および相互作用の新規予測系としてのヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の応用

研究課題名(英文) Application of human iPS cell-derived intestinal epithelial cells as a novel prediction system for drug disposition and drug interaction

研究代表者

岩尾 岳洋 (Iwao, Takahiro)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・准教授

研究者番号：50581740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞の作製にあたり、有用な化合物を見出すことができた。この方法によって作製したヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞は、薬物代謝活性、CYP3A4誘導能、薬物トランスポーター活性、バリア機能を有していることが示された。また、医薬品の消化管吸収を定量的に予測するための評価系として利用可能であることも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒトiPS細胞から作製した腸管上皮細胞が医薬品の消化管吸収を定量的に評価できる系としての有用性を示すことができた。現在、よりよい医薬品の消化管吸収予測系の開発が望まれていることから、本研究で得られた成果はこの分野において有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We were able to find some useful small molecule compounds in the differentiation of human iPS cells to intestinal epithelial cells in this study. It was indicated that the human iPS cell-derived intestinal epithelial cells had drug metabolizing enzyme activities, CYP3A4 inducibility, drug transporter activities, and barrier functions. In addition, it was suggested that the cells would be available as an evaluation system to predict intestinal drug absorption quantitatively.

研究分野：薬物動態学

キーワード：小腸 薬物動態 iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医薬品の多くは経口的に投与され、消化管および肝臓を通過して、血中に移行することで薬効を発現する。しかし、消化管には多くの薬物トランスポーターや薬物代謝酵素が存在し、これらが医薬品の血中への吸収量を左右することで医薬品の効果や副作用に大きく寄与する。したがって、医薬品開発時には医薬品候補化合物の消化管からの吸収および消化管における代謝(動態)を定量的かつ正確に予測することが極めて重要である。現在、消化管における医薬品の動態の評価には実験動物や Caco-2 細胞などが用いられている。しかし、実験動物とヒトの間には種差が存在することや、Caco-2 細胞はがん細胞株であることからヒトの正常小腸上皮細胞とは異なる点が多い。したがって、これらの評価系を用いてヒト消化管における薬物動態を正確に予測することは困難である。正確な予測のためには、ヒト初代小腸細胞を用いることが望ましいが、比較的入手可能なヒト初代肝細胞とは異なり、小腸細胞は入手自体がほぼ不可能である。したがって、消化管における薬物の医薬品の吸収を適切に予測可能な評価系の構築が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト iPS 細胞から高機能な腸管上皮細胞を作製し、薬物の消化管吸収および相互作用の新規予測モデル系として構築することを目的とする。

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) および複数の分化誘導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) 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、薬物トランスポーター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。

(3) CYP3A4 誘導試験

分化終了前にリファンピシンまたは $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D_3 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。

(4) 薬物代謝試験

分化終了後、培地を CYP および UGT の基質(カクテル基質)を含む反応液に置換して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 により行った。

(5) 薬物取り込み試験

分化終了後、培地を薬物トランスポーターの基質を含む取り込み溶液に置換してインキュベートした。必要に応じて阻害剤も添加した。所定の時間経過後、取り込み溶液を除去した後、細胞を洗浄し、細胞内に取り込まれた基質の量を測定した。

(6) 双方向性膜透過試験

セルカルチャーインサート上にヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞を播種した。Apical もしくは basal 側を排出トランスポーターの基質を含む溶液に置換した。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。

(7) 薬物透過試験

セルカルチャーインサート上にヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞を播種した。Apical 側に薬物を添加して、所定の時間経過後、basal 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 細胞細胞から腸管上皮細胞への分化において cAMP シグナルを活性化することによって分化が促進されることを見出した。このシグナル経路を活性化する低分子化合物を腸管上皮細胞への分化の段階に用いることで、腸管マーカーや薬物トランスポーター、薬物代謝酵素の遺伝子発現が有意に増加し、ヒト成人小腸と同等もしくはそれ以上の発現レベルを示した。薬物動態学的機能としては、CYP や UGT、SULT による薬物代謝酵素活性を有してした。また、小腸において主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 の誘導能を評価したところ、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D_3 およびリファンピシンによって VDR および PXR を介した CYP3A4 の誘導が認められた。この誘導は遺伝子発現レベルだけでなく、代謝活性のレベルでも認められた。次に、小腸における代表的な取り込みトランスポーターである PEPT1 および OATP の基質を用いて取り込み試験を行ったところ、細胞内への基質の取り込みが認められ、この取り込みは阻害剤の添加によって著しく阻害されたことから、これら取り込みトランスポーターの活性も有していることが示された。セルカルチャーインサート上でヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞を分化誘導したところ、タイトジャンクションマーカーである Occludin のタンパクが細胞間に発現していることが認められ、また、バリア機能の指標となる TEER 値の経時的な上昇も認められた。この細胞で排出トランスポーターである P-gp の基質を用いて双方向性の膜透過試験を行ったところ、排出方向優位な輸送が認められ、この方向性の輸送は阻害剤の添加によって抑制された。以上の結果から、本研究で作製したヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞は薬物代謝酵素活性、CYP3A4 誘導能、トラン

スポンターの輸送活性、バリア機能などを有していることが明らかとなり、医薬品の消化管吸収を予測するための評価系として利用できる可能性が示された。そこで、この方法によって分化誘導した腸管上皮細胞を用いて消化管の薬物吸収の予測が可能かどうかの検証を行った。その結果、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞における薬物の見かけの膜透過係数 (P_{app}) と吸収率 (F_a) の相関は、Caco-2 細胞よりも高い相関を示した。このことから、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞は医薬品の消化管吸収率をより精度良く予測することができる系となり得ることが示唆された。しかし、一部の薬物においては相関曲線から外れていたことから、この点は今後評価系としての利用を考えていくうえで重要な課題であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kabeya Tomoki, Mima Shinji, Imakura Yuki, Miyashita Toshihide, Ogura Izumi, Yamada Tadanori, Yasujima Tomoya, Yuasa Hiroaki, Iwao Takahiro, Matsunaga Tamihide	4. 巻 in press
2. 論文標題 Pharmacokinetic functions of human induced pluripotent stem cell-derived small intestinal epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1016/j.dmpk.2020.04.334	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwao Takahiro, Matsunaga Tamihide	4. 巻 1
2. 論文標題 Intestinal cells differentiated from human induced pluripotent stem cells for use in drug development studies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Translational and Regulatory Sciences	6. 最初と最後の頁 24～30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.33611/trs.1_24	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwao Takahiro, Matsunaga Tamihide	4. 巻 154
2. 論文標題 Generation of human iPS cell-derived hepatocytes and enterocytes for application to drug disposition studies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 72～77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1254/fpj.154.72	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kabeya Tomoki, Qiu Shimeng, Hibino Momona, Nagasaki Mizuka, Kodama Nao, Iwao Takahiro, Matsunaga Tamihide	4. 巻 46
2. 論文標題 Cyclic AMP Signaling Promotes the Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Intestinal Epithelial Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Disposition	6. 最初と最後の頁 1411～1419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1124/dmd.118.082123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwao Takahiro	4. 巻 138
2. 論文標題 Development of an In Vitro System for Evaluating Intestinal Drug Disposition Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Intestinal Epithelial Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 1241 ~ 1247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1248/yakushi.18-00120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kabeya T, Matsumura W, Iwao T, Hosokawa M, Matsunaga T	4. 巻 486
2. 論文標題 Functional analysis of carboxylesterase in human induced pluripotent stem cell-derived enterocytes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 143-148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岩尾岳洋, 松永民秀	4. 巻 95
2. 論文標題 幹細胞からの薬物動態関連臓器細胞の分化誘導技術	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 461-464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 美馬伸治, 今倉悠貴, 小椋 泉, 後藤 俊, 柿沼千早, 岩尾岳洋, 松永民秀, 畠賢一郎
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞 (F-hiSIEC) の機能解析: 薬物吸収予測モデルへの応用とアプリケーション開発
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Iwao
2. 発表標題 Generation of intestinal cells from human iPS cells for application to drug development study
3. 学会等名 NCU Contact Points in Asia Symposium (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小椋 泉, 美馬伸治, 今倉悠貴, 後藤 俊, 柿沼千早, 岩尾岳洋, 松永民秀, 山田忠範, 畠賢一郎
2. 発表標題 iPS細胞由来腸管上皮細胞 (FUJIFILM human iPS cell-derived Small Intestinal Epithelial like Cell; F-hiSIEC) の特性と腸管吸収評価モデルとしての有用性
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会第32回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩尾岳洋
2. 発表標題 医薬品の消化管吸収や毒性評価に利用可能なヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞の開発
3. 学会等名 第4回トランスポーター研究会関東部会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩尾岳洋
2. 発表標題 創薬研究での利用に向けた小腸-肝臓連結デバイスの開発
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tamihide Matsunaga, Tomoki Kabeya, Shimeng Qiu, Takahiro Iwao
2. 発表標題 Differentiation of human iPS cells into enterocyte-like cells using cAMP-activating compounds and its function
3. 学会等名 International Conference on Cytochrome P450
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今倉悠貴, 美馬伸治, 小椋 泉, 柿沼千早, 壁谷知樹, 岩尾岳洋, 松永民秀, 山田忠範, 山本 武
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた腸管吸収評価モデルの開発
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 邱 施萌, 壁谷知樹, 岩尾岳洋, 松永民秀
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞への分化誘導に対する機能性ポリマーの検討
3. 学会等名 細胞アッセイ研究会シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 美馬伸治, 今倉悠貴, 小椋 泉, 柿沼千早, 壁谷知樹, 岩尾岳洋, 松永民秀, 山田忠範, 山本 武
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を活用した腸管吸収評価モデルの開発
3. 学会等名 細胞アッセイ研究会シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoki Kabeya, Shimeng Qiu, Momona Hibino, Mizuka Nagasaki, Nao Kodama, Takahiro Iwao, Tamihide Matsunaga
2. 発表標題 cAMP signaling promotes the intestinal differentiation of human induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinji Mima, Yuki Imakura, Izumi Ogura, Chihaya Kakinuma, Tomoki Kabeya, Takahiro Iwao, Tamihide Matsunaga, Tadanori Yamada, Takeshi Yamamoto
2. 発表標題 Characteristics of human small intestinal epithelial cells derived from induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimeng Qiu, Tomoki Kabeya, Takahiro Iwao, Tamihide Matsunaga
2. 発表標題 Effects of high-molecule compounds on differentiation to enterocytes derived from human induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木香帆, 太田欣哉, 保嶋智也, 壁谷知樹, 岩尾岳洋, 松永民秀, 湯浅博昭
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞モデルにおけるリポフラビントランスポーター機能の検証
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 難波莉子, 保嶋智也, 鈴木香帆, 壁谷知樹, 岩尾岳洋, 松永民秀, 湯浅博昭
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞モデルにおけるclonidine輸送の解析
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩尾岳洋
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来組織細胞の作製と薬物動態試験への応用に関する研究
3. 学会等名 日本薬物動態学会第32回年会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木香帆, 太田欣哉, 保嶋智也, 壁谷知樹, 岩尾岳洋, 松永民秀, 湯浅博昭
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞モデルにおけるPCFT及びASBTの機能の比較検討
3. 学会等名 日本薬物動態学会第32回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 邱 施萌, 壁谷知樹, 岩尾岳洋, 松永民秀
2. 発表標題 機能性ポリマーはヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化を促進する
3. 学会等名 日本薬物動態学会第32回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 壁谷知樹, 松村若菜, 岩尾岳洋, 細川正清, 松永民秀
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞を用いたカルボキシエステラーゼによる医薬品代謝の予測評価系の開発
3. 学会等名 第24回HAB研究機構学術年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岩尾岳洋, 松永民秀	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 293 (171-179)
3. 書名 臓器チップの技術と開発動向	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 多能性幹細胞の腸管上皮細胞への分化誘導	発明者 松永民秀, 岩尾岳洋, 邱 施萌, 金木達朗	権利者 公立大学法人 名古屋市立大学、日産化学工
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-210951	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 多能性幹細胞から腸管上皮細胞への分化誘導方法	発明者 松永民秀, 岩尾岳洋, 壁谷知樹, 美馬伸治, 宮下敏秀	権利者 公立大学法人 名古屋市立大学、富士フイル
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-021545	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----