

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15164

研究課題名(和文) ヒト及びサル iPS 細胞を用いた腸管毒性試験用モデルの構築と毒性バイオマーカー探索

研究課題名(英文) Construction of a model for intestinal toxicity test using human and monkey iPS cells and search for toxic biomarker

研究代表者

松永 民秀 (Matsunaga, Tamihide)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：40209581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化誘導において、低分子化合物により腸管マーカーや薬物動態因子の mRNA 発現レベルが上昇した。一方、腸管オルガノイドでは高分子化合物により腸管マーカーや薬物動態因子も高い mRNA 発現あるいは活性を示した。以上の結果より、これら化合物は分化誘導において機能の向上に寄与することが示唆された。腸管オルガノイドは、抗がん剤 5-FU による濃度依存的な細胞毒性が観察され、毒性評価系として有用だと考えられた。一方、炎症性サイトカインや再生腸上皮幹細胞マーカーの mRNA 発現量は増加した。

以上の結果から、これらの発現変動は細胞毒性マーカーとして有望であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the differentiation of human iPS cells into enterocytes, the mRNA expression levels of intestinal markers and pharmacokinetic-related factors were increased by addition of small molecule compounds. On the other hand, these mRNA expression levels were increased by high molecule compounds. These results suggested that these compounds contribute obtain of intestinal functions.

Intestinal organoids were useful as a toxicity evaluation system, because dose-dependent cytotoxicity was observed by an anti-cancer drug 5-FU. The mRNA expression of inflammatory cytokines and markers of regenerative intestinal epithelial stem cells was increased by 5-FU. These results suggested that these expression changes are promising as cytotoxic markers.

研究分野：薬物代謝学

キーワード：ヒト iPS 細胞 カニクイザル iPS 細胞 腸管上皮細胞 腸管オルガノイド 抗がん剤 細胞毒性 腸管毒性試験

## 1. 研究開始当初の背景

医薬品開発の初期段階で副作用を予測することは非常に重要である。医薬品による消化管障害には便秘、消化性潰瘍、麻痺性イレウス、下痢等がある。医薬品開発においてヒト正常細胞あるいは組織を用いた毒性試験が望ましいが、腸管の入手は不可能である。そのため、医薬品開発における *in vitro* 評価系として結腸がん細胞株である Caco-2 細胞が汎用されている。しかし、抗がん剤による消化管障害は、腸管幹細胞に対する毒性が原因だと考えられているため、腸管幹細胞を含まない Caco-2 細胞による評価系では消化管障害を正確に反映できない。

近年、消化管組織に近い 3 次元構造を有する腸管オルガノイドが新規 *in vitro* 評価系として注目されている。また、腸管オルガノイドは腸管幹細胞を含む複数の細胞種で構成されていることから、抗がん剤による消化管障害を正確に評価できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究においては、以下の事を目的とした。ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) からより機能的な腸管上皮細胞を効率的に分化誘導する方法を確立する。また、ヒト及びカニクイザル iPS 細胞より 3 次元組織構造体 (腸管オルガノイド) を作製、クリプトや絨毛など腸管特有の組織学的構造及び腸管の機能について解析を行う。さらに、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞及び腸管オルガノイドを用いて、消化管毒性が知られている薬物の毒性試験を行い、モデルとしての評価・検証と毒性発現の機構解析を行う。また、粘膜障害を引き起こすとして知られている炎症性腸疾患の病態を *in vitro* 評価系として反映できるか検証を行う。

## 3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化誘導：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。申請者らのヒト iPS 細胞分化誘導法に従い行い、改良の検討は、分化の最終段階で腸管上皮細胞への分化が促進される条件について行った。培地に分化誘導及び機能獲得を促進することを明らかにしている低分子化合物を添加し、その影響について検討を行った。

ヒト及びカニクイザル iPS 細胞から腸管オルガノイドの作製：ヒト iPS 細胞からのオルガノイド作製は、腸管上皮幹細胞に分化後、EGF、NOGGIN、R-spondin 1 と共にマトリゲル存在下で 3 次元培養 (オルガノイド培養) する際に、先の低分子化合物を添加培養することでオルガノイド形成条件を検索した。また、

高分子化合物添加の影響について検討した。

分化誘導した腸管細胞の機能解析：小腸に発現する主要な薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの基質薬物を用いて、その代謝活性や輸送活性の評価を行った。

オルガノイドの構造解析：オルガノイドが生体の腸管の構造を有しているか電子顕微鏡観察及び凍結切片を作成して組織染色及び免疫染色し光学顕微鏡観察を行った。また、オルガノイド中に薬物等が吸収されるかについて、蛍光プローブ薬物を用いて評価した。

5-フルオロウラシル (5-FU) による消化管毒性の評価：ヒト腸管オルガノイドの培地に 5-FU を添加し、培養した。培養後、毒性バイオマーカー候補として LGR-5、EGF、TGF- $\alpha$ 、Dll4、WNT-3 など、幹細胞維持に必須因子の発現変動を解析、細胞毒性と比較した。

## TNF- $\alpha$ 添加による粘膜障害の評価

分化誘導終了後、TNF- $\alpha$  を培地中に添加することで、その粘膜障害を遺伝子発現解析及び免疫蛍光染色、FD-4 を用いた透過試験により評価した。必要に応じて TNF- $\alpha$  の特異的抗体であるインフリキシマブを添加した。

## 4. 研究成果

### 1) 低分子化合物 X を用いた腸管上皮細胞への分化と腸管マーカー及び薬物代謝酵素の mRNA 発現に対する効果

分化開始後 8 日目以降に低分子化合物 X を添加することで、各種腸管マーカーの遺伝子発現レベルの有意な上昇が認められた。低分子化合物 X の腸管マーカー発現に対する効果は、従来の方法と比較していずれも増加した。特に、CYP3A4 及び SGLT1 の発現レベルが有意に上昇した。したがって、低分子化合物 A はヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化促進に寄与していることが示唆された。

### 2) ヒト及びカニクイザル iPS 細胞から腸管オルガノイドの作製とその機能解析

ヒト及びカニクイザル共に低分子化合物を添加することで、腸管での主要な薬物代謝酵素であるヒト CYP3A4/カニクイザル CYP3A8 が約 2,000 倍上昇するなど、多くの薬物動態関連遺伝子の発現が上昇した。また、腸管を構成している細胞のマーカー遺伝子の発現は低分子化合物非添加群に比べ、同程度もしくはそれ以上であった。さらに、これら遺伝子発現レベルは、ヒト成人小腸またはカニクイザル小腸へとより近づいた。また、免疫蛍光染色によりカニクイザル小腸組織と比較して、

ヒト及びカニクイザル iPS 細胞由来腸管オルガノイドでも腸管を構成している様々な細胞の存在が確認された。また、電子顕微鏡の観察からタイトジャンクション及び微絨毛の形成が認められた。さらに、基質であるローダミン 123 の腸管オルガノイド内への排出が認められ、その排出方向の輸送は P-gp の特異的阻害剤であるベラパミルにより顕著に抑制された。作製した腸管オルガノイドでは、CYP3A4 の代謝活性を有しており、リファンピシン及び活性型ビタミン D<sub>3</sub> の添加により、有意に CYP3A4 の mRNA 発現、代謝活性が誘導された。以上の結果から、ヒト及びカニクイザル iPS 細胞から薬物動態学的機能を有する腸管オルガノイドの新規分化誘導法の開発に成功した。

### 3) 高分子化合物 Y を用いた腸管上皮細胞への分化と腸管マーカー及び薬物代謝酵素の mRNA 発現に対する効果

高分子化合物 Y の添加により、従来法と比べ CYP3A4 や SLC15A1/PEPT1、ABCB1/MDR1 等のトランスポーターの発現が上昇した。また、腸管を構成する細胞マーカーの Villin (吸収上皮細胞) sucrose-isomaltase (上皮細胞の刷子縁) MUC2 (杯細胞) LGR5 (腸管幹細胞) もコントロール群と同程度もしくはそれ以上の mRNA 発現を示した。さらに、CYP3A4 活性や ABCB1/MDR1、ABCG2/BCRP の輸送活性も有意に高い値を示した。

これらの結果は、低分子化合物 X や高分子化合物 Y は分化誘導において機能の向上に寄与することが示唆された。

### 4) 5-フルオロウラシル (5-FU) による消化管毒性の評価

作製したヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドに 5-FU を 96 時間添加したところ、濃度依存的な細胞毒性が観察された。また、Caco-2 細胞と比較して、腸管オルガノイドの IC<sub>50</sub> 値が低濃度であったことから、腸管オルガノイドでは 5-FU に対する感受性が Caco-2 細胞に比べて高いことが示唆された。胞マーカーである LGR5 や CD44、増殖細胞マーカーである Ki67、腸管上皮細胞マーカーである villin、間葉系細胞マーカーである vimentin の mRNA 発現量が低下した。一方で、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$ 、再生腸上皮幹細胞マーカーである OLFM4 の mRNA 発現量は増加した。さらに、5-FU の活性化に関与する酵素であるオロテートホスホリボシルトランスフェラーゼの阻害剤であるオキシソニン酸カリウムを添加することによって、これらの遺伝子発現量の変動が抑制された。また、Ki67 と Caspase-3 の免疫蛍光染色の結果から、5-FU

添加群では、Ki67 陽性細胞の数は減少する傾向が見られたが、Caspase-3 陽性細胞の数は増加する傾向が見られた。以上の結果から、ヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドを用いることで、抗がん剤による消化管毒性、特に腸管幹細胞に対する毒性の評価が可能であると考えられる。

### 5) 粘膜障害のモデル化の検討

腸管での粘膜障害の一つとしてクローン病や潰瘍性大腸炎が知られている。これら病態の主要な原因は、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  の関与が示唆されている。そこで、申請者らは、作製した腸管オルガノイドに TNF- $\alpha$  を添加することで、炎症性腸疾患の病態を反映できるか検証した。腸管オルガノイドに TNF- $\alpha$  を添加することで、吸収上皮細胞マーカーである villin、杯細胞マーカーである MUC2、便の水分調節に関わる AQP3 の遺伝子発現が減少した。一方、TNF- $\alpha$  の抗体薬であるインフリキシマブの添加によりその発現変動は抑制された。なお、その他の腸管を構成する細胞のマーカー遺伝子の発現に変動はなかった。炎症性マーカーである TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$ 、再生腸上皮幹細胞マーカーである OLFM4 の遺伝子発現は TNF- $\alpha$  添加により増加し、インフリキシマブを添加することでその発現変動は抑制された。免疫蛍光染色にて、上皮細胞の障害を確認したところ、タイトジャンクションタンパク質である ZO-1 や occludin の構造が崩れていることが確認された。また、アポトーシスマーカーである caspase-3 陽性細胞は TNF- $\alpha$  を添加することで増加し、腸管オルガノイドの管腔内にアポトーシスを起こした細胞が脱落している様子も観察された。さらに、非吸収性マーカーである FD-4 の透過試験を行ったところ、EGTA 処理群同様 TNF- $\alpha$  添加群では腸管オルガノイド内への FD-4 の透過が確認されたが、インフリキシマブ添加群で、その透過は認められなかった。以上の結果から、我々が作製した腸管オルガノイドは炎症性腸疾患の病態の一つである粘膜障害を反映でき、現在の治療薬の一つであるインフリキシマブの効果を評価できることが示唆された。

### 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3件)

1 Onozato D, Yamashita M, Fukuyama R, Akagawa T, Kida Y, Koeda A, Iwao T, Matsunaga T. Efficient generation of cynomolgus monkey induced pluripotent stem cell-derived intestinal organoids. *Stem Cells Dev*. 2018 May 10. doi: 10.1089/scd.2017.0216.

- 2 Onozato D, Yamashita M, Nakanishi A, Akagawa T, Kida Y, Ogawa I, Hashita T, **Iwao T, Matsunaga T**. Generation of intestinal organoids suitable for pharmacokinetic studies from human induced pluripotent stem cells. *Drug Metab. Dispos.*, 2018 Apr 3. pii: dmd.118.080374. doi: 10.1124/dmd.118.080374. (査読有)
- 3 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) doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.014.

[学会発表] (計 25 件)

- 1 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: 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. 日本薬学会第 138 年会, 2018 年 3 月 25 日-28 日(金沢).
- 2 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: 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. 日本薬学会第 138 年会, 2018 年 3 月 25 日-28 日(金沢).
- 3 小川 勇, 小野里太智, **岩尾岳洋, 松永民秀**: 新規浮遊剤を用いたヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドの作製. 細胞アッセイ研究会シンポジウム, 2018 年 1 月 19 日(つくば).
- 4 小野里太智, 赤川 巧, 木田有里子, 小川 勇, **岩尾岳洋, 松永民秀**: ヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドを用いた炎症性腸疾患モデルの構築. 細胞アッセイ研究会シンポジウム, 2018 年 1 月 19 日(つくば).
- 5 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: 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. 日本薬物動態学会第 32 回年会, 2017 年 11 月 29 日-12 月 1 日(東京).
- 6 邱 施萌, 壁谷知樹, **岩尾岳洋, 松永民秀**: 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. 日本薬物動態学会第 32 回年会, 2017 年 11 月 29 日-12 月 1 日(東京).
- 7 小野里太智, 山下美紗季, 赤川 巧, 木田有里子, 中西杏奈, **岩尾岳洋, 松永民秀**: 薬物動態学的機能を有するヒト 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 32 回年会, 2017 年 11 月 29 日-12 月 1 日(東京).
- 8 小川 勇, 小野里太智, 坂下真大, **岩尾岳洋, 松永民秀**, 金木達朗, **松永民秀**: 効率的な 3 次元培養によるヒト 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 32 回年会, 2017 年 11 月 29 日-12 月 1 日(東京).
- 9 水野翔太, 近藤聡志, **岩尾岳洋, 松永民秀**: iPS 細胞由来小腸幹細胞維持培養法の確立. 日本薬物動態学会第 32 回年会, 2017 年 11 月 29 日-12 月 1 日.
- 10 赤川 巧, 小野里太智, 木田有里子, 山下美紗季, **岩尾岳洋, 松永民秀**: ヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドを用いた抗がん剤による消化管障害の評価系の構築. 日本薬物動態学会第 32 回年会, 2017 年 11 月 29 日-12 月 1 日(東京).
- 11 Yoko Sakai, **Takahiro Iwao**, Takeshi Susukida, Akinori Takemura, Takumi Nukaga, Shuichi Sekine, Kousei Ito, **Tamihide Matsunaga**: Establishment of cholestatic drug-induced liver injury evaluation system *in vitro* using sandwich culture human iPS cell-derived hepatocytes. 21<sup>st</sup> North American ISSX Meeting, Sep. 24-28, 2017 (Providence, USA).
- 12 Daichi Onozato, Misaki Yamashita, Anna Nakanishi, Takumi Akagawa, Yuriko Kida, Akiko Koeda, **Takahiro Iwao, Tamihide Matsunaga**: Efficient generation of human and cynomolgus monkey induced pluripotent stem cell-derived intestinal organoids with pharmacokinetic functions. 21<sup>st</sup> North American ISSX Meeting, Sep. 24-28, 2017 (Providence, USA).
- 13 Satoshi Kondo, Shota Mizuno, Yue Yu, Wakana Matsumura, **Takahiro Iwao, Tamihide Matsunaga**: Establishment of novel culture method for maintaining stemness of human iPS cell-derived intestinal stem cells. 21<sup>st</sup> North American ISSX Meeting, Sep. 24-28, 2017 (Providence, USA).
- 14 小宮雅美, 藤井 元, 宮本真吾, 中西西り, 鱧屋隆博, 田村秀哉, 黒川友理絵, 高橋麻衣子, **岩尾岳洋, 松永民秀**, 武藤倫弘: iPS 細胞由来原始下部消化管幹細胞を用いた培養下発がん研究系の開発. 第 24 回日本がん予防学会総会, 2017 年 6 月 16 日-17 日(大阪).
- 15 壁谷知樹, 松村若菜, **岩尾岳洋, 松永民秀**: 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. 第 24 回 HAB 研究機構学術年会, 2017 年 6 月 1 日-3 日(東京).
- 16 壁谷知樹, 松村若菜, **岩尾岳洋, 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. 第 137 年会日本薬学会 2017 年 3 月 25 日(仙台).
- 17 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 26 日(仙台).

- 18 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27日(仙  
 台).
- 19 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. シンポジウム: 細  
 胞アッセイ技術の現状と将来 2017年1月  
 31日(東京).
- 20 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. シンポジウム: 細  
 胞アッセイ技術の現状と将来 2017年1月  
 31日(東京).
- 21 阿武志保, 奥村啓樹, 坂下真大, 林 寿人,  
**岩尾岳洋**, 金木達朗, **松永民秀**: ヒトiPS  
 細胞の肝細胞への分化誘導における浮遊  
 培養培地の比較. 第39回日本分子生物学  
 学会年会 2016年12月1日(横浜).
- 22 Onozato D, Akagawa T, Yamashita M, Kida  
 Y, Koeda A, **Iwao T**, **Matunaga T**:  
 Generation of functional cynomolgus monkey  
 iPS cell-derived intestinal organoids. 日本薬  
 物動態学会 第31回年会 2016年10月13  
 日(木)~15日(土)(松本).
- 23 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14日(松本)
- 24 Kabeya T, **Iwao T**, Kodama N, **Matsunaga  
 T**: Small molecule compounds enhance the  
 differentiation of human induced pluripotent  
 stem cells to enterocytes with  
 pharmacokinetic functions. 11th International  
 ISSX Meeting June 13, 2016(釜山).
- 25 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(岐阜).

〔図書〕(計 1件)

- 1 **岩尾岳洋**, **松永民秀**: 第4章 経口投与  
 薬物の吸収・代謝過程を模倣した小腸-肝  
 臓連結デバイスの開発. 臓器チップの技術  
 と開発動向. 監修: 酒井康行, 金森敏幸.  
 株式会社シーエムシー出版. pp. 171-179,  
 2018年4月.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2件)

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  
 フィルム株式会社

番号: 特願 2018-021545

出願年月日: 2018年2月9日

国内外の別: 国内

名称: 多能性幹細胞由来腸管オルガノイドの  
 作製法

発明者: **松永民秀**, **岩尾岳洋**, 小野里太智

権利者: 公立大学法人名古屋市立大学

番号: 特願 2017-093418

出願年月日: 2017年5月9日

国内外の別: 国内

○取得状況(計 1件)

名称: 人工多能性幹細胞の腸管上皮細胞へ分  
 化誘導する方法

発明者: **松永民秀**, **岩尾岳洋**

権利者: 公立大学法人名古屋市立大学

番号: 特許第 6296399号

取得年月日: 2018年3月2日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 民秀 (MATSUNAGA, Tamihide)

名古屋市立大学大学院薬学研究科・教授

研究者番号: 40209581

(2) 連携研究者

岩尾 岳洋 (IWAHO, 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