

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860120

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞から機能的な腸管上皮細胞への分化と創薬研究への応用

研究課題名(英文) Differentiation of human iPS cells to pharmacokinetically functional enterocytes

研究代表者

岩尾 岳洋 (Iwao, Takahiro)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：50581740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000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への分化の促進もしくは分化させた細胞の薬物動態学的機能の獲得に有用な低分子化合物を複数見出すことができた。これらの化合物を用いて分化させた細胞は腸管マーカーを発現しており、薬物代謝能、CYP3A4誘導能およびペプチドトランスポーターを介したペプチドの取り込み能を有していた。また、ヒトiPS細胞から分化させた腸管幹細胞は、腸管上皮細胞への分化能を維持したまま、1ヶ月程度培養することが可能であった。さらに、この細胞は凍結保存も可能であった。本研究で得られた成果は、ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の創薬研究への応用に向けて有用な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found several effective small-molecule compounds on inducing differentiation of human iPS cells to enterocytes and gain of pharmacokinetic function. The enterocyte-like cells differentiated by using these compounds expressed intestinal markers and exhibited drug-metabolizing enzyme activities, CYP3A4 inducibility, and active peptide transport. We demonstrated to culture the intestinal stem cell-like cells with differentiation capability for about 1 month and to cryopreserve the cells. These results would provided useful information for application of iPS cell-derived enterocytes to drug development studies.

研究分野：薬物動態学

キーワード：iPS細胞 小腸 分化誘導 薬物動態

1. 研究開始当初の背景

医薬品の体内動態(吸収・分布・代謝・排泄)は効果や毒性を左右する要因として重要である。小腸には多くの薬物代謝酵素や薬物トランスポーターが発現していることから、医薬品の体内動態に関わる主要な臓器であり、小腸における医薬品の代謝や取り込みを解析・評価することの必要性は、医薬品開発の早期の段階から高まってきている。そのため、実験動物やヒトの細胞などを用いて、医薬品の代謝や吸収の解析・評価が行われている。しかし、体内動態には種差があることから、実験動物におけるデータのヒトへの外挿は困難である。一方、小腸上皮細胞については入手自体が困難であることから、薬物の吸収特性の評価には、ヒト結腸ガン由来の Caco-2 細胞がよく用いられている。しかし、Caco-2 細胞における薬物トランスポーターや薬物代謝酵素の発現はヒト小腸上皮細胞とは異なることが知られている。したがって、今のところ小腸における吸収および代謝を総合的に解析・評価できる系はなく、そのためモデル系の構築が望まれている。

胚性幹細胞(ES細胞)と同じ高い増殖能およびさまざまな細胞に分化できる多分化能を有する人工多能性幹細胞(iPS細胞)が、OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYCなどの初期化因子を体細胞に導入することで樹立され、再生医療だけでなく医薬品開発への利用にも期待されている。現在、ヒトiPS細胞から膵臓細胞、神経細胞、心筋細胞、肝細胞などさまざまな組織細胞への分化誘導の報告がある一方、iPS細胞から腸管組織への分化に関する知見は非常に乏しく、2010年にマウスiPS細胞から胚様体を形成し、腸管組織を作成したとの報告が最初である。その後、腸管上皮幹細胞の培養法を応用し、初めてヒトiPS細胞から腸管様構造を形成させたとの報告がなされた。しかし、これらの報告では、薬物動態などの機能に関する解析は全くなされていない。そこで、我々はヒトiPS細胞から腸管上皮細胞へ分化誘導させ、この分化させた細胞を薬物動態試験における評価系として利用するための研究を進めており、これまでに腸管上皮細胞特異的なペプチド輸送機能を有する細胞への分化誘導に成功している。

2. 研究の目的

本研究ではヒトiPS細胞より薬物代謝能および薬物輸送能を有し、創薬研究などの薬物動態試験に利用可能な腸管上皮細胞を効率よく、かつ選択的に分化誘導する方法を確立することを目的とした。

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(Windy)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。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、最終的には上皮成長因子(EGF)によって腸管上皮細胞へ分化させた。

(2)ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化に効果的な低分子化合物の探索

腸管幹細胞から腸管上皮細胞の分化の段階で、さまざま低分子化合物を組み合わせで添加した。分化の程度はマーカー遺伝子の発現量により評価した。

(3)遺伝子発現解析

分化終了後細胞を回収し、RNAを回収した。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。

(4)免疫蛍光染色

分化終了後細胞を固定し、一次抗体および二次抗体を処理した。その後核染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて細胞を観察した。

(5)薬物代謝酵素活性測定

分化終了後、シトクロムP450(CYP)、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ(UGT)およびスルホトランスフェラーゼ(SULT)のプロープ基質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。各代謝物の定量はUPLC-MS/MS法により行った。

(6)CYP3A4誘導実験

分化終了48時間前より1 α ,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。

(7)ペプチド取り込み実験

分化終了後、蛍光ラベルされたジペプチド(β -Ala-Lys-AMCA)を含む培地でインキュベートした。所定の時間経過後、細胞を固定し、共焦点レーザー顕微鏡にて細胞を観察した。

4. 研究成果

(1)ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化に対する低分子化合物の効果

これまでに我々はヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化誘導法を確立している。本研究では、より効率的に腸管上皮細胞への分化が進む低分子化合物の探索を行った。予備的なスクリーニングの結果から、腸管上皮細胞への分化を促進する可能性のある低分子化合物を複数ピックアップすることができた。その後、これらの低分子化合物を組み合わせで腸管上皮細胞への分化誘導の際に用いた

ところ、腸管上皮細胞マーカーであるスクラーゼ-イソマルターゼの mRNA 発現が有意に増加した (Fig. 1)。また、薬物トランスポーターである SLC15A1/PEPT1、ABCG2/BCRP および ABCB1/MDR1 の発現レベルも有意に増加した。一方で、その他の腸管上皮細胞マーカーであるピリン1や ISX の高い発現も認められたものの、発現レベルに有意な変化は認められなかった。さらに、これらと共通の作用を有する化合物群を用いて検討を行ったところ、同様の傾向が認められた。

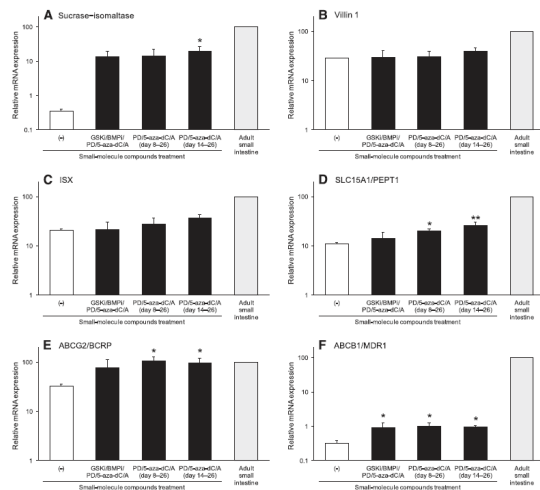


Fig. 1. Relative mRNA expression levels of intestinal markers sucrase-isomaltase (A) villin 1 (B), intestine specific homeobox (ISX) (C), SLC15A1/PEPT1 (D), ABCG2/BCRP (E), and ABCB1/MDR1 (F) in differentiated enterocyte-like cells.

(2) 低分子化合物を用いて分化させた細胞の薬物代謝酵素活性

低分子化合物を用いて分化させた細胞において、CYP1A1/2、CYP2C9、CYP2C9、CYP2D6、CYP3A4/5、UGT および SULT による薬物代謝活性が認められた。特に、CYP2C19 の薬物代謝活性は低分子化合物非存在下で分化させた場合に認められなかったが、低分子化合物を用いて分化させることで、その活性が検出された。

(3) 低分子化合物を用いて分化させた細胞の CYP3A4 誘導能

低分子化合物を用いて分化させた細胞は、低分子化合物非存在下で分化させた細胞と比較して、CYP3A4 の mRNA 発現および CYP3A4/5 活性の上昇が認められた (Fig. 2)。また、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D_3 により CYP3A4 mRNA 発現の顕著な誘導が認められた。さらに、遺伝子発現だけでなく、CYP3A4/5 活性の誘導も認められた。

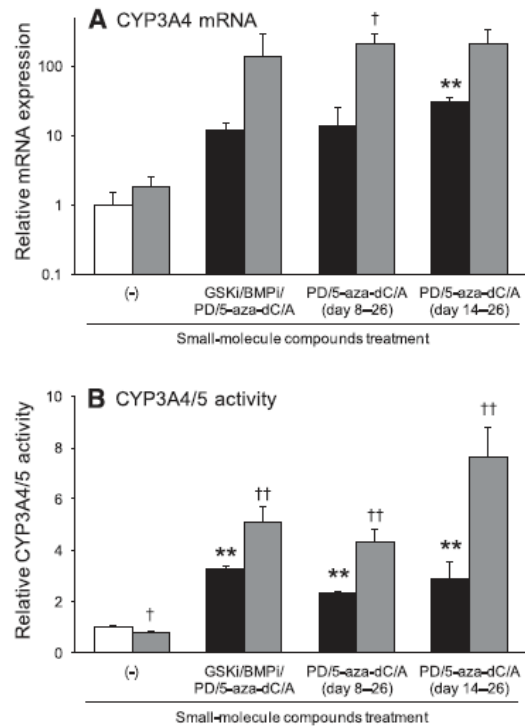


Fig. 2. Induction of CYP3A4 mRNA expression level (A) and CYP3A4/5 activity (B) in differentiated enterocyte-like cells by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 .

The vehicle groups are represented by white and black bars, and $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 addition groups are represented by gray bars.

(4) 低分子化合物を用いて分化させた細胞のペプチド取り込み能

低分子化合物を用いて分化させた細胞において β -Ala-Lys-AMCA の取り込みが観察された (Fig. 3)。またこの取り込みは、SLC15A1/PEPT1 の阻害剤であるイブプロフェンの処理および取り込み温度を 4°C にすることによって抑制された。

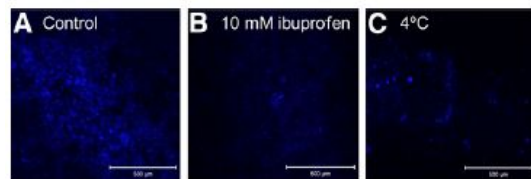


Fig. 3. The uptake of β -Ala-Lys-AMCA into differentiated enterocyte-like cells.

(5) 腸管幹細胞の維持培養および凍結保存

ヒト iPS 細胞から分化させた腸管幹細胞様細胞を維持培養用培地で培養することによって、1 ヶ月程度培養することが可能であった。また、凍結保存が可能かどうか検討したところ、緩慢凍結法およびガラス化保存法のいずれの方法によっても凍結保存が可能であった。さらに、これらの細胞を分化用培地に切り替えて腸管上皮細胞に分化させたところ、腸管マーカーや薬物トランスポーター、薬物代謝酵素の発現が認められたことから、

分化能を維持していることが示唆された。

以上の結果から、我々はヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化誘導に効果的な低分子化合物を見出すことができた。また、この方法によって作製した細胞は腸管上皮細胞に特異的な薬物動態学的機能を有していた。さらに、腸管幹細胞様細胞の維持培養および凍結保存が可能であったことから、本研究で得られた結果は、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の創薬研究への利用に向けた基盤となる成果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3件)

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及び毒性試験へのヒト iPS 細胞の利用. *Organ Biology*, in press.

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.
doi: 10.1124/dmd.114.062604.

Iwao T, Toyota M, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T: Differentiation of human induced pluripotent stem cells into functional enterocyte-like cells using a simple method. *Drug Metab Pharmacokinet*, **29**, 44–51, 2014.
doi: 10.2133/dmpk.DMPK-13-RG-005.

〔学会発表〕(計3件)

壁谷知樹, 岩尾岳洋, 小玉菜央, 中村克徳, 松永民秀: ヒト iPS 細胞由来小腸幹細胞の至適培養法の開発. 第 66 回日本生物工学会大会, 2014 年 9 月 9 日–11 日(札幌).

小玉菜央, 岩尾岳洋, 壁谷知樹, 堀川隆司, 丹羽卓朗, 黒瀬光一, 中村克徳, 松永民秀: 複数の低分子化合物はヒト iPS 細胞から機能性を持った小腸上皮細胞様細胞への分化効率を改善する. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3 日–6 日(神戸).

岩尾岳洋, 近藤祐樹, 小玉菜央, 中村克徳, 堀川隆司, 丹羽卓朗, 黒瀬光一, 松永民秀: 低分子化合物はヒト 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 28 回年会, 2013 年 10 月 9 日–11 日(東京).

〔図書〕(計1件)

1. 松永民秀, 岩尾岳洋: 多能性幹細胞 (ES 細胞, iPS 細胞) の利用. 「薬剤学実験法必携マニュアル—Pharmaceutical Scientist のために—」, 日本薬学会出版委員会編, 南江堂, 東京, pp. 299–311, 2014 年 4 月 5 日発行.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 人工多能性幹細胞を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: 名古屋市立大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2014/054379

出願年月日: 2014 年 2 月 24 日

国内外の別: 国外

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・大学院薬学研究科・講師
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