

令和元年6月13日現在

機関番号：32659

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15165

研究課題名(和文)小腸絨毛上皮モデルを用いた革新的in vitro薬物吸収性予測システムの開発

研究課題名(英文) Evaluation of Oral Drug Absorption by Developing In Vitro Culture System for Intestinal Villus Cells

研究代表者

白坂 善之 (Shirasaka, Yoshiyuki)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60453833

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)：小腸絨毛上皮モデルの構築を目的として、Transwellシステムに流路を作製し、Caco-2細胞の灌流培養を試みた。タイトジャンクション指標となるTEERは、通常の培養条件下に比べ顕著に高い値を示し、灌流培養法による細胞形態変化が示唆された。一方、MUCおよびCYP3A4のmRNA発現に低下傾向が示されたことから、より妥当な細胞モデルの獲得が必要と考えられた。そこでCYP3A4安定発現系の作成を試みた結果、顕著なCYP3A4発現/活性が確認された。本細胞の灌流培養による機能形態変化が期待されることから、今後、小腸絨毛上皮モデルの構築と活用を目指した発展的な研究が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、医薬品開発の効率化を目的として、培養細胞や人工脂質膜を用いたin vitroでの薬物吸収性評価法が広く適用されている。しかし、いずれの評価系も実際の小腸における構造や環境を簡略化したシステムとして確立されているため、高精度な薬物吸収性予測を行うことは困難である。したがって、本研究の成果および展開として、よりリアルな小腸モデルの獲得が実現すれば、絨毛構造などに依存した機能性タンパク質発現、粘液分泌および有効表面積などを考慮できる高精度な薬物吸収性予測が可能となる。本細胞培養モデルの構築は、医薬品開発に大きく貢献することが期待されることから、本研究がもたらす成果の意義は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：To develop intestinal villus model, a flow channel was built in the Transwell system, and Caco-2 cells was cultured under steady flow conditions. As a result, this culture method markedly increased TEER, which shows well-formed tight junctions compared to general culture conditions, suggesting an alteration of cellular morphology. On the other hand, mRNA expressions of MUC and CYP3A4 was decreased, and it was considered necessary to obtain alternative cell models. Therefore, next, we tried to establish a CYP3A4 stable expression system. Consequently, remarkable CYP3A4 expression and activity were confirmed in the cells. Change in this cellular morphology is expected by means of cell culture method with steady flow conditions. Furthermore, it is expected that this methodology contributes to improve the prediction efficiency of in vivo intestinal drug absorption.

研究分野：薬物動態学

キーワード：消化管吸収 経口吸収 消化管 細胞培養 小腸モデル 代謝酵素 トランスポーター

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

培養細胞を用いた *in vitro* での薬物吸収性評価法は、実験動物を用いた手法に比べ種差などの問題を克服できる上、迅速かつ簡便な評価が可能である。そのため、医薬品開発での積極的な導入が試みられてきた。しかし、そのような評価系は、実際の小腸における組織構造や生理環境の影響を簡略化し、迅速性と簡便性を優先させた単純なシステムとして確立されているため、高精度な薬物吸収性予測を行うことは事実上不可能となる。したがって、将来的に極めて有望な候補化合物に対して、粗雑あるいは不適切な評価を与える可能性もあり、今後はより高精度な吸収性予測システムの構築が望まれる。

現在、薬物の消化管吸収性の *in vitro* 評価法として、ヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞や人工脂質膜 PAMPA が多くの製薬企業で導入されている。Caco-2 細胞は、通常の培養法によって小腸上皮細胞と同様の単層膜構造を形成し、細胞膜表面には微絨毛が高密度に発現する。しかしながら、(1) 代謝酵素やトランスポーターの分子種や発現量がヒト消化管膜と一致しない、(2) 細胞間隙経路を介した透過性がヒト消化管膜と異なる、(3) 粘液産生機能がヒト消化管膜と異なる、(4) 細胞の分化・成熟に伴って透過性がバラつくなど、*in vivo* における吸収性との相関を図る上での問題点も多い。特に、(5) その平坦な単層膜構造が実際の消化管上皮の絨毛構造と大きく異なっている点は、現行の *in vitro* 実験系が抱える最大の問題点であり、(1)-(4)の全現象も本論点に起因している可能性は高い。実際に、研究代表者はこれまでに、Caco-2 細胞の分化と共に各種機能性タンパク質発現が変動することを報告している。したがって、平坦な上皮構造をとる現行の *in vitro* 評価システムを改善し、絨毛構造と分化・成熟過程を再現できるよりリアルな小腸絨毛上皮モデルを構築できれば、高精度な薬物吸収性予測が可能になると期待できる。そこで本研究では、近年注目されている灌流培養法を応用して、絨毛構造と分化・成熟機能を備えた新しい *in vitro* 小腸絨毛上皮モデルの構築を試み、さらにその薬物吸収性予測システムへの導入に対する可能性を検討することで、医薬品開発への大きな貢献が可能になると確信し、本検証への着想に至った。

2. 研究の目的

現在、医薬品開発の効率化を目的として、培養細胞や人工脂質膜を用いた *in vitro* での薬物吸収性評価法が広く適用されている。しかし、いずれの評価系についても、実際の小腸における絨毛上皮構造や生理環境の影響を簡略化し、迅速性と簡便性を優先させた単純なシステムとして確立されているため、高精度な薬物吸収性予測を行うことは事実上不可能となる。したがって、将来的に極めて有望な候補化合物に対し、粗雑あるいは不適切な吸収性評価を与える可能性もあり、今後はより高精度な吸収性予測システムの構築が望まれる。そこで本研究では、絨毛構造と分化・成熟機能を備えた新しい *in vitro* 小腸絨毛上皮モデルを構築し、それを用いた高精度な薬物吸収性予測システムの開発を試みる。

3. 研究の方法

本研究では、種々検討から培養細胞株や初代培養細胞を用いた「灌流培養法」を確立し、「小腸絨毛上皮モデルの構築」を試みる。さらに、本構築細胞と各種モデル薬物を用いた薬物動態学的検討から「新しい *in vitro* 薬物吸収性予測システムの開発」を試みる。具体的には、下記に示した計画（概要）を進めた。

- (1) 灌流培養デバイスの作製
灌流培養法を確立するにあたっては、その後の *in vitro* 薬物吸収性予測システムの構築を考慮した上で、特殊な培養デバイスを作製する必要がある。そこでまず、多孔性メンブレン (polyethylene terephthalate (PET)あるいは polytetrafluoroethylene (PTFE))を有した従来型の Transwell Insert (12 well)システムを基盤にし、basal側に血管を模倣した流路 (血管模倣)を作製して、その流路に培養液を灌流して細胞培養 (すなわち、灌流培地条件下にて細胞培養)を行った。
- (2) 灌流培養法の確立
モデル細胞として Caco-2 細胞を用い、最適な培養条件を選定した。すなわち、① 12 well Transwell Insert 上に細胞を播種した。② 培養初期は、細胞接着の安定化を考慮し流路を止め通常の滞留培地条件下で培養した。③ シリンジポンプを用いて流路から定常流の灌流培養を行った。④ 一定期間培養後 (5-21 日間)、種々検討を行った。
- (3) 絨毛上皮細胞モデルの精査
灌流培養による細胞形態変化を観察した。すなわち、① 絨毛構造を倒立顕微鏡にて観察した。② 分化・成熟過程に依存したタイトジャンクションの状態を電気抵抗値測定により評価した。③ 機能性タンパク質 (CYP3A4、P-gp、MUC など)発現を PCR 法などにより確認した。
- (4) 機能性タンパク質の発現/活性評価に基づく最適な小腸モデル細胞の選定
小腸絨毛上皮モデルの構築にあたっては、最も情報量の多い小腸モデル細胞の一つである Caco-2 細胞を中心に検討を行ったが、Caco-2 細胞については CYP3A4 をはじめとした重要代謝酵素の発現が著しく低下していることが既に報告されており、薬物の吸収性評価にあたって致命的な問題となる可能性がある。Caco-2 細胞を用いた灌流培養法により得られる小腸絨毛上皮モデルで CYP3A4 の誘導発現が観察されることも期待できるが、ここでは、

そのバックアップあるいはより妥当なモデル細胞を獲得することを目的として、いくつかのモデル細胞候補を検索、構築した。

(5) *In vitro* 薬物吸収性予測システムの確立

種々モデル薬物を対象に、モデル細胞の妥当性評価を行った。すなわち、① Caco-2 細胞を用いた現行型 *in vitro* 評価システムおよび小腸マイクロソームを用いた代謝活性試験により、各モデル薬物の膜透過性、代謝活性ならびに種々薬物動態学的パラメータを概算した。② 選定した細胞モデルを用い、モデル薬物の膜透過性、代謝活性ならびに種々薬物動態学的パラメータを概算した。③ ①と②の結果に基づいて、ヒト吸収性などの臨床データと十分に定量比較することで、本研究で構築した細胞モデルによる *in vitro* 薬物吸収性予測の優位性ならびに有益性を精査した。

4. 研究成果

灌流培養法を確立するにあたっては、その後の *in vitro* 薬物吸収性予測システムの構築を考慮した上で、特殊な培養デバイスを作製する必要があった。そこでまず、Transwell の basal 側に回転子を導入したシステムとして予備検討を行ったところ、回転動作に伴う過剰な加温により、培地に想定外の熱が加わり、適切な細胞培養環境を得ることが困難となることが明らかとなった。そこで、今回、計画当初より目指していた灌流培養法を直接試みることにした。すなわち、従来型の Transwell システムの basal 側に流路を作製し、培養液を灌流することで、モデル細胞の物理的刺激環境下での培養を試みた。本検討に用いるモデル細胞としては、最も汎用性の高いヒト大腸がん由来の Caco-2 細胞を選定した。連続培養の可能性と培養環境の妥当性を検証するために、細胞膜抵抗 (transepithelial electrical resistance (TEER)) に基づくタイトジャンクション (細胞間隙) 形成の評価・検討を行ったところ、灌流培養 (dynamic) 条件下における Caco-2 細胞の TEER は、培養期間に伴い高値を示し、十分なタイトジャンクション形成が確認された (Fig. 1)。一方、興味深いことに、通常の培養条件下 (灌流を伴わない静置 (static) 条件下) に比べて顕著に高い TEER を示したことから、灌流培養が細胞形態に影響を及ぼしている可能性が推察された (Fig. 1)。また、倒立顕微鏡下で観察される細胞状態においても、灌流培養下のそれは通常培養下に比べ明らかな差異を認めた。

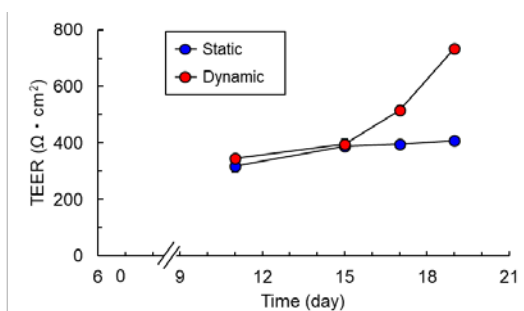


Fig. 1 灌流 (dynamic) 条件下における TEER の経時的変化

一方、種々機能性タンパク質の発現評価を行ったところ、MUC および CYP3A4 の mRNA 発現に低下傾向が示された (Fig. 2)。ヒトの小腸上皮細胞には、主に CYP3A4 が高発現していることが明らかになっているが、Caco-2 細胞については CYP3A4 をはじめとした重要代謝酵素の発現が著しく低下していることが既に報告されている。したがって、薬物の吸収性評価にあたっては、CYP3A4 の発現が重要な課題となるため、灌流培養法により得られる Caco-2 細胞の形態変化が、小腸絨毛上皮モデルとして CYP3A4 誘導に繋がることを期待したが、本結果に伴い、培養条件の改善、あるいはより妥当なモデル細胞を獲得する必要性が考えられた。そこで、より妥当なモデル細胞を獲得することを目的として、次に、CYP3A4 の安定発現を期待する CYP3A4 発現系 (MDCKII/CYP3A4 細胞) の作成を試みた。

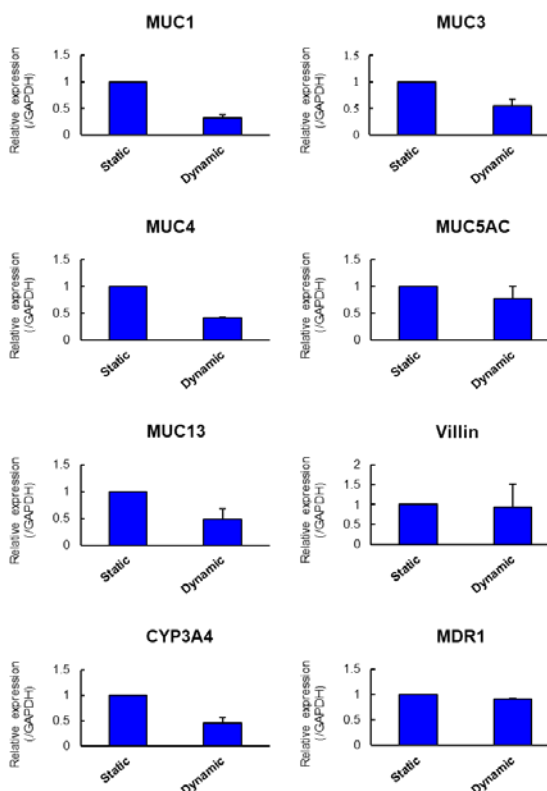


Fig. 2 灌流 (dynamic) 条件下における各種機能性タンパク質の mRNA 変動

まず、MDCKII 細胞にヒト CYP3A4 遺伝子を導入し、geneticin (G418) 抵抗性の細胞を選択することで、MDCKII/CYP3A4 を構築した。次に、MDCKII/Mock 細胞を用い、4 種の CYP3A4 基質 (midazolam [MDZ]、testosterone [TST]、diltiazem [DTZ]、erythromycin [ERY]) の膜透過性を評価したところ、ERY < DTZ < TST < MDZ となった。さらに、MDCKII/CYP3A4 細胞に

おける各薬物の細胞抽出率を算出したところ、MDZ < DTZ < TST < ERYとなった。一方、肝ミクロソームを用いた代謝試験から得られた固有クリアランスは、ERY < DTZ < TST < MDZとなった。すなわち、TSTおよびDTZは両パラメータ間で相関性が観察された一方で、MDZおよびERY間においては明らかな矛盾が示された。ここで、MDCKII/CYP3A4細胞から得られる抽出率は、実際のin vivo小腸代謝を反映した「代謝過程と膜透過過程を含むハイブリッドパラメータ」と考えることができる。したがって、両薬物の膜透過性を考慮すると、本矛盾は薬物の小腸代謝に及ぼす膜透過過程の影響を反映した結果と考えられる。以上より、MDCKII/CYP3A4細胞が代謝過程と膜透過過程を考慮した合理的な小腸モデルとなる可能性が示唆された。

薬物のbioavailabilityを適切に予測するためには、消化管からの吸収率(Fa)、消化管での代謝回避率(Fg)、肝臓での代謝回避率(Fh)を分離評価する必要がある。現在、肝臓における代謝活性については、肝ミクロソームを用いたin vitro代謝試験から比較的簡単に推定することができる。一方、小腸における初回通過代謝は上皮細胞透過過程で起こるためその考察は非常に複雑になる。したがって、薬物の膜透過性の違いに起因した消化管代謝活性を定量的に評価できる本細胞の獲得は、今後、灌流培養により新しいin vitro小腸絨毛上皮モデルの構築ならびに薬物吸収性予測システムの確立を試みる本研究の展開に大きく貢献できるものと期待される。

以上、本研究においては、灌流培養環境条件下における細胞の形態変化は観察されたものの、タンパク質発現などに大きな変化を観察することはできず、特に小腸モデルとして重要な機能性タンパク質発現となるCYP3A4の有意な発現あるいは発現誘導を認めることができなかった。一方、新たに構築したMDCKII/CYP3A4細胞が、代謝過程と膜透過過程を考慮した合理的な小腸モデルとなる可能性が示唆された。今後は、本細胞を用い、灌流速度の影響などを考慮したより詳細かつ実用的な検討に発展させる予定である。本研究の成果はこれまでにない新しい小腸モデルを提唱する可能性を示唆するものであり、今後期待されるその展開は、高精度な薬物吸収性予測システムの提供を可能にし、新規医薬品開発にはもちろんのこと、薬物間相互作用の予測など医薬品の適正使用に対しても貢献できると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- 1) Suzuki S, Shirasaka Y, Okada R, Eguchi A, Kishimoto H, Langguth P, and Inoue K. Quantitative analysis of the effect of controlled-release formulation on nonlinear gastrointestinal absorption of P-glycoprotein substrate talinolol using physiologically based pharmacokinetic absorption model. *J Drug Deliv Sci Technol*. **In press** (2019). 査読有
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S177322471930423X>
- 2) Funai Y, Shirasaka Y, Ishihara M, Takemura M, Ichijo K, Kishimoto H, and Inoue K. Effect of osmolality on the pharmacokinetic interaction between apple juice and atenolol in rats. *Drug Metab Dispos*. **47**(4): 386-391 (2019). 査読有
doi: 10.1124/dmd.118.084483.
- 3) Ichijo K, Oda R, Ishihara M, Okada R, Moteki Y, Funai Y, Horiuchi T, Kishimoto H, Shirasaka Y, and Inoue K. Osmolality of orally administered solutions influences luminal water volume and drug absorption in intestine. *J Pharm Sci*. **106**(9): 2889-2894 (2017). 査読有
doi: 10.1016/j.xphs.2017.04.030.

[学会発表] (計 8 件)

- 1) Koki Tamura, Yoshiyuki Shirasaka, Mizuho Matsuo, Takuya Horiuchi, Chika Shimakura, Hisanao Kishimoto and Katsuhisa Inoue. Evaluation of the effect of permeability on intestinal first-pass metabolism of CYP3A4 substrates by in vitro expression system The 3rd Workshop for Japan-Korea Young Scientists on Pharmaceutics (第三回日韓若手薬剤学研究者ワークショップ) Urayasu Concert Hall, Tokyo, Japan (2019.07.10).
- 2) 松尾瑞帆, 白坂善之, 田村航輝, 小俣智穂, 堀内琢矢, 茂木友里, 岸本久直, 井上勝央 CYP3A4 基質薬物の消化管代謝に及ぼす膜透過性の影響 日本薬剤学会第 34 年会、富山国際会議場/富山 (2019.05.16)
- 3) 松尾瑞帆, 白坂善之, 堀内琢矢, 田村航輝, 小俣智穂, 茂木友里, 岸本久直, 井上勝央 CYP3A4 基質薬物の消化管代謝に及ぼす膜透過性の影響 第 62 回 日本薬学会 関東支部大会 帝京平成大学薬学部/東京 (2018.09.15)
- 4) 鈴木悟, 白坂善之, 岡田怜, 岸本久直, Peter Langguth, 井上勝央 消化管水分動態 (3): 消化管内水分挙動を考慮した薬物吸収動態予測 日本薬剤学会第 33 年会、静岡コンベンションアーツセンター グランシップ/静岡 (2018.05.31)
- 5) 鮒井悠汰, 白坂善之, 竹村美由記, 石原麻梨華, 一條一貴, 岸本久直, 井上勝央 消化管水分動態 (2): 浸透圧に起因した薬物-フルーツジュース間相互作用 日本薬剤学会第 33 年会、静岡コンベンションアーツセンター グランシップ/静岡 (2018.05.30)

- 6) 一條一貴、白坂善之、鮎井悠汰、鈴木悟、竹村美由記、岸本久直、井上勝央 消化管水分動態 (1): 消化管水分調節機構の定量的解析 日本薬剤学会第 33 年会、静岡コンベンションアートセンター グランシップ/静岡 (2018.05.30)
- 7) 堀内琢矢、白坂善之、松尾瑞帆、茂木友里、一條一貴、岸本久直、井上勝央 CYP3A4 基質薬物の消化管吸収性/代謝安定性評価システムの構築 日本薬剤学会第 33 年会、静岡コンベンションアートセンター グランシップ/静岡 (2018.05.30)
- 8) 堀内琢矢、白坂善之、茂木友里、一條一貴、松尾瑞帆、岸本久直、井上勝央 CYP3A4 基質薬物の消化管代謝/吸収性評価システムの構築 第 61 回 日本薬学会 関東支部大会 慶應義塾大学薬学部 (芝共立キャンパス)/東京 (2017.09.16)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名： 井上勝央

ローマ字氏名： INOUE, Katsuhisa

(3) 研究協力者

研究協力者氏名： 岸本久直

ローマ字氏名： KISHIMOTO, Hisanao

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。