

令和 5 年 4 月 26 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07034

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞から作製した腸管細胞を用いた消化管傷害の評価系の開発

研究課題名（英文）Development of evaluation model of intestinal damage with human iPS cell-derived intestinal cells

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒトiPS細胞から腸管オルガノイドを作製し、これを二次元的に培養することで陰窩絨毛様構造を有したままで培養可能な方法を開発することができた。また、この細胞を用いることで消化管の粘膜障害が評価できる可能性が示唆される予備的な知見を得ることができた。さらに、ヒトiPS細胞から内胚葉への効率的な分化誘導法を開発や、上記の二次元化腸管オルガノイドを比較的長期間形態を維持したまま培養する方法も開発することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではヒトiPS細胞から腸管上皮細胞および腸管オルガノイドを作製し、疾患や医薬品による消化管傷害を評価可能なin vitroモデル系を構築することを目的として研究を進めた。その結果、ヒトiPS細胞由来腸管細胞が消化管の粘膜障害を評価するためのin vitroモデル系としての応用の可能性を示唆することができた。したがって、本研究では創薬研究等での利用に向けて有用な知見を得ることができたと考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we generated the intestinal organoids from human iPS cells and were able to develop the method in which the cells were able to be cultured with maintaining crypt-villus structures by the two-dimensional culture of the intestinal organoids. We could obtain preliminary findings to be suggested that the intestinal mucosal damage could be able to be evaluated by using the two-dimensional cultured cells. Additionally, we were able to develop the differentiation method into the endodermal cells from human iPS cells efficiently and the culture method in which the two-dimensional intestinal organoids can be cultured for a relatively long term with keeping crypt-villus structures.

研究分野：医療系薬学

キーワード：消化管 粘膜障害 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患など消化管粘膜が傷害される疾患のメカニズム解明やそれに対する医薬品開発においては適切なモデル系が必要である。また、医薬品の安全性という観点から消化管に対する毒性の評価も重要である。しかしながら、現在消化管の粘膜傷害を正確に評価可能な *in vitro* モデル系の構築が一刻も早く待ち望まれているが、そのための適切なモデル系がないことが大きな課題となっている。その理由としては、実験動物とヒトとの種差、細胞株と初代細胞との違い、評価に使える初代細胞(または組織)の入手のしにくさなどがある。また近年は動物実験の代替となる評価系の開発も求められている。

2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまでに確立してきた分化誘導技術を基盤として、ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞および腸管組織様の 3 次元構造体(腸管オルガノイド)を作製し、疾患や医薬品による消化管傷害を評価可能な *in vitro* モデル系を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。腸管オルガノイドへの分化は、内胚葉から中後腸へ分化し、スフェロイドを形成させた後、分化誘導因子を加えることで腸管オルガノイドを作製した。また、この作製した腸管オルガノイドをシングルセル化してセルカルチャーインサート上に播種することで、二次元的に培養した(二次元化腸管オルガノイド)。

(2) 腸管上皮細胞および腸管オルガノイドの特性解析

遺伝子発現解析は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、薬物代謝酵素などをリアルタイム PCR 法により測定することで行った。薬物動態学的機能解析は薬物代謝酵素またはトランスポーターの基質薬物を用いて、これらの代謝活性または輸送活性により評価した。バリア機能の評価は経上皮電気抵抗値 (TEER 値) の測定またはルシファーイエローの見かけの膜透過係数の算出により行った。

4. 研究成果

(1) 内胚葉への効率的な分化誘導法の開発

ヒト iPS 細胞から内胚葉へ効率よく分化誘導を進めるために、分化誘導期間および分化誘導因子の検討を行った。その結果、分化誘導期間を 7 日間に行い、さらに分化誘導因子としてアクチビン A に加え、CHIR99021、PI-103、FGF2 を添加することで、未分化マーカーである OCT4 の有意な発現低下および内胚葉マーカーである SOX1、GATA4、FOXA1 の有意な発現上昇が認められた。また、この方法で作製した内胚葉細胞は腸管上皮細胞への分化が可能であり、分化させた腸管上皮細胞は CYP3A4 の代謝活性、P-gp の排出輸送活性を有しており、安定した TEER 値の推移も示した。したがって、腸管細胞のような内胚葉系の細胞の分化誘導において本方法が有用であることが示唆された。

(2) 二次元化腸管オルガノイドの作製法の開発

腸管オルガノイドはさまざまな細胞を含み腸管様の構造を示す。しかし三次元構造体であることから定量的な評価や操作性に課題がある。そこで、二次元化腸管オルガノイドを陰窩-絨毛様構造を有したまま培養可能な条件の検討を行った。その結果、条件を最適化することによって吸収上皮細胞や杯細胞、内分泌細胞、腸管幹細胞など腸管を構成するさまざまな細胞のマーカー遺伝子の発現が認められた。また、顕微鏡下で観察を行うと陰窩絨毛様の構造が認められた。また、さらに改良を行うことによって、比較的長期間培養が可能な培養条件を見出すことができた。これまでの方法で長期間の培養を行った際は、培養期間が長くなるにつれた TEER 値の急激な上昇が認められた。しかし、この方法では TEER 値が比較的安定したまま培養することが可能であった。これらの開発した方法は密度の高い陰窩絨毛様構造を有した二次元化腸管オルガノイドの培養を可能とした。また、長期間維持したままの培養も可能であることが示唆されたことから、長期間の化合物の曝露等による粘膜

障害の評価にもこの二次元化腸管オルガノイドが利用できることが示唆された。

(3) 腸管上皮細胞の機能向上に向けた検討

ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の機能の向上を目的として、従来の分化誘導法の改良を行った。その結果、新規法で作製した腸管上皮細胞は CYP3A4 などの薬物代謝酵素の遺伝子発現および活性の上昇が認められた。このことから、これまでよりも高い機能を有する腸管上皮細胞の作製が可能であることが示唆された。

(4) 消化管障害の評価

ヒト iPS 細胞から分化誘導した腸管オルガノイドが消化管障害の評価モデルとしての利用可能かどうかを探るため検討を行った。まず、三次元構造体の腸管オルガノイドをセルカルチャーインサート上の播種し、二次元的に培養したまま陰窩絨毛様構造を有した状態で培養した。これに消化管障害を引き起こすことが知られている化合物を処理すると、顕微鏡観察下で形態学的に細胞への障害が認められた。また、細胞間隙経路を透過するマーカー化合物であるルシファーイエローの見かけの膜透過係数の上昇や、さまざまな腸管細胞関連の遺伝子発現の低下もみとめられた。これらのことから、ヒト iPS 細胞由来の二次元化腸管オルガノイドは化合物や医薬品による消化管障害を評価可能なモデル系となり得ることが示唆された。また、免疫が関与する消化管障害の評価モデルとしての利用の可能性も探るための検討も行った。しかしながら免疫系の細胞株との共培養を行ったが消化管のバリア機能の指標となる TEER 値に有意な変化は認められなかった。したがって、免疫が関連する評価モデルとしての利用に向けては条件の最適化などの検討が今後さらに必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Qiu Shimeng, Li Yaling, Imakura Yuki, Mima Shinji, Hashita Tadahiro, Iwao Takahiro, Matsunaga Tamihide	4. 巻 10
2. 論文標題 An Efficient Method for the Differentiation of Human iPSC-Derived Endoderm toward Enterocytes and Hepatocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 812 ~ 812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10040812	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 岩尾岳洋, 堺 陽子, 深谷壮弥, 小川 勇, 松永民秀	4. 巻 39
2. 論文標題 小腸-肝臓連結MPSの開発と薬物動態・毒性評価への利用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 2573 ~ 2575
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 -

1. 著者名 Qiu Shimeng, Li Yaling, Imakura Yuki, Mima Shinji, Hashita Tadahiro, Iwao Takahiro, Matsunaga Tamihide	4. 巻 10
2. 論文標題 An Efficient Method for the Differentiation of Human iPSC-Derived Endoderm toward Enterocytes and Hepatocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 812 ~ 812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10040812	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩尾岳洋
2. 発表標題 消化管における薬物動態や粘膜障害の評価に向けたヒトiPS細胞の利用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩尾岳洋
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来腸管細胞の薬物動態評価への応用
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白井晃太郎, 邱 施萌, 岩尾岳洋, 松永民秀
2. 発表標題 Feeder-free条件下におけるヒトiPS細胞由来内胚葉の分化法確立と腸管上皮細胞および肝細胞への分化誘導
3. 学会等名 第31回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川 勇, 岩尾岳洋, 松永民秀
2. 発表標題 ヒト人工多能性幹細胞由来腸管細胞の作製法確立
3. 学会等名 第67回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水野由梨, 小川 勇, 岩尾岳洋, 松永民秀
2. 発表標題 二次元培養したヒトiPS細胞由来腸管オルガノイドの腸内細菌相互作用評価系としての利用に向けた検証
3. 学会等名 細胞アッセイ研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山名美帆, 邱 施萌, 小川 勇, 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の腸管バリア機能評価系としての応用
3. 学会等名 細胞アッセイ研究会シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川 勇, 岩尾岳洋, 松永民秀
2. 発表標題 陰窩-絨毛様構造を有するヒトiPS細胞由来腸管オルガノイドの二次元培養法の確立
3. 学会等名 日本薬物動態学会第35回年会
4. 発表年 2020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安全性評価のためのiPS細胞由来腸管細胞
3. 学会等名 日本薬物動態学会第37回年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川 勇, 岩尾岳洋, 松永民秀
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来腸管オルガノイドを用いた薬物吸収予測モデルの検証
3. 学会等名 日本薬物動態学会第37回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白井晃太郎, 邱 施萌, 菅谷幸子, 上野孝哉, 岩尾岳洋, 松永民秀
2. 発表標題 薬物動態研究に向けたヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞の培養法の改良
3. 学会等名 日本薬物動態学会第37回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井優里, 小川 勇, 岩尾岳洋, 松永民秀
2. 発表標題 乳酸菌とヒトiPS細胞由来腸管細胞との共培養系の確立
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 箕輪華子, 白井晃太郎, 岩尾岳洋, 松永民秀
2. 発表標題 薬物動態評価を目的としたヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞分化法の改良
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 多能性幹細胞由来の陰窩-絨毛様構造を有する腸管細胞の製造方法及びその用途	発明者 松永民秀, 岩尾岳洋, 小川 勇, 邱 施萌	権利者 名古屋市立大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 多能性幹細胞由来の陰窩-絨毛様構造を有する腸管細胞の製造方法及びその用途	発明者 松永民秀, 岩尾岳洋, 小川 勇, 邱 施萌	権利者 名古屋市立大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-016645	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 人工多能性幹細胞由来の内胚葉細胞を製造する方法及びその利用	発明者 松永民秀, 岩尾岳洋, 邱 施萌	権利者 名古屋市立大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-123228	出願年 2020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
研究協力者	松永 民秀 (Matsunaga Tamihide)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院・教授 (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------