

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2018～2021

課題番号：18H05373・20K20381

研究課題名（和文）ヒト小腸オルガノイド由来吸収上皮細胞の作製と創薬研究への応用

研究課題名（英文）Development of human biopsy-derived intestinal organoids monolayers and application for pharmaceutical research

研究代表者

水口 裕之（Mizuguchi, Hiroyuki）

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：50311387

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：小腸吸収上皮細胞は、経口投与された薬物の吸収や排泄・代謝において重要な役割を担う。本研究では、近年確立されたヒト腸オルガノイド培養技術を用いて、ヒト小腸（十二指腸）オルガノイドから吸収上皮細胞への分化誘導技術の開発と、“吸収・代謝・排泄”を同時に評価できる新規in vitro評価系の開発を進めた。本オルガノイドは30継代（10e30倍）以上の細胞増幅が可能であり、単細胞化し、セルカルチャーインサートに単層培養したところ、極めて高い薬物代謝酵素活性やトランスポーター活性を示すことを明らかにし、薬物の吸収・代謝・排泄の正確な予測を可能にするプラットフォームになり得ることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりヒト小腸での“吸収・排泄・代謝”を同時に評価可能なin vitro評価系が開発されることで、現在までモデル&シミュレーションでしか予測できなかった薬物の消化管での利用率予測を正確に見積もることが可能となり、ヒト投与量の正確な見積もり、並びにより精度の高い薬物吸収過程における薬物相互作用の予測がin vitro試験で可能となる。即ち、小腸アベイラビリティを評価できる初めてのin vitroモデルの基盤が構築され、創薬プロセスの飛躍的な効率化が期待できる。これらは合理的な医薬品審査へも寄与し、もって国民の健康の増進に資することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The human small intestine is the key organ for absorption, metabolism, and excretion of orally administered drugs. To preclinically predict these reactions in drug discovery research, a cell model that can precisely recapitulate the in vivo human intestinal monolayer is desired. Here, we developed a monolayer platform using human biopsy-derived duodenal organoids for application to pharmacokinetic studies. The human duodenal organoid-derived monolayer was prepared by a simple method in 3 to 8 days. It consisted of polarized absorptive cells and had tight junctions. It showed much higher cytochrome P450 (CYP) 3A4 and carboxylesterase (CES) 2 activities than the existing models (Caco-2 cells). It also showed efflux activity of P-glycoprotein (P-gp) and inducibility of CYP3A4. This monolayer assay system can be a general platform for a wide range of applications including pharmaceutical research.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヒト小腸オルガノイド ヒト小腸吸収上皮細胞 分化 創薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

小腸吸収上皮細胞は、様々な薬物代謝酵素や薬物トランスポーターを発現しているため、経口投与された薬物の吸収や排泄・代謝において重要な役割を担う。創薬研究において、医薬品候補化合物の小腸での吸収・排泄・代謝を評価するための *in vitro* 評価系としては、ヒト小腸吸収上皮細胞の入手が困難であるため、小動物由来小腸組織を用いた反転腸管法や Ussing chamber 法、あるいはヒト大腸癌細胞株である Caco-2 細胞を用いた系が汎用されてきた。しかしながら、前者は種差の問題があり、後者は Caco-2 細胞がヒト小腸吸収上皮細胞に比べ、薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの発現量が著しく低く、“吸収・排泄・代謝”を同時に評価できないという決定的な欠点を有する。In vivo 機能を反映したヒト小腸吸収上皮細胞および評価系の開発が切望されていた。

## 2. 研究の目的

本研究は、近年確立されたヒト腸オルガノイド（3次元的に培養して作らせた立体組織構造体）培養技術を用いて、生検より得たヒト小腸組織からオルガノイドを作製し、さらに小腸吸収上皮細胞への分化誘導法の開発を行って、創薬研究における *in vitro* 消化管吸収・排泄・代謝実験系を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒト十二指腸あるいは空腸の生検を取得・使用して、ヒト小腸オルガノイドを樹立した。オルガノイドを継代培養し、セルカルチャーインサート上で単層膜を形成させ、形態学的評価や遺伝子発現解析、薬物代謝酵素活性、薬物トランスポーターの活性評価を行った。さらに、現在汎用されている3種類の主要な培養法を用いて、樹立したヒト腸管オルガノイドを培養し、各培養法で培養した腸管オルガノイド、およびその単層膜の特性を解析した。比較として、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞についても同様の試験を行った。

## 4. 研究成果

ヒト十二指腸生検サンプルより樹立した小腸オルガノイドをシングルセルにし、セルカルチャーインサート上へ播種することで単層膜を得た。作製したオルガノイド単層膜を位相差顕微鏡、および走査型電子顕微鏡により観察した結果、オルガノイド単層膜は円柱上皮様であり、微絨毛構造と密着結合構造を有することが分かった。次に、免疫染色によるタンパク質発現・局在評価を行った結果、上皮細胞マーカーである E-cadherin と密着結合マーカーである zonula occludens-1 が細胞膜・細胞間接着部で発現していることに加え、刷子縁膜マーカーである Villin が頂端膜で、腸管における主要な薬物代謝酵素である cytochrome P450 (CYP) 3A4 が細胞質で発現していること確認した。さらに、バリア機能の指標となる経上皮電気抵抗 (TEER) を測定した結果、オルガノイド単層膜の TEER は適正の範囲 (100-800  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) 内であった。これらの結果から、オルガノイド単層膜は極性を有した円柱上皮様、かつ腸管上皮様の単層膜で、密着結合等によるバリアを形成していることが示唆された。

次に、オルガノイド単層膜の遺伝子発現レベルを評価するために、qRT-PCR を実施し、*in vitro* 薬物動態評価系として汎用されている Caco-2 細胞、およびヒト十二指腸との比較を

行った。まず、ヒト小腸で発現する主要な CYP 分子種について、オルガノイド単層膜における遺伝子発現レベルは Caco-2 細胞と比較して高値であった。特に、オルガノイド単層膜における CYP3A4 の遺伝子発現レベルは、ヒト十二指腸と同程度であった。これらの結果から、オルガノイド単層膜は各種の薬物動態関連因子を高発現しており、生体の小腸に類似した特徴を有することから、*in vitro* 薬物動態評価系として有望であると考えられた。

オルガノイド単層膜の薬物代謝酵素・トランスポーターの活性評価を行った。CYP3A4 活性を測定したところ、オルガノイド単層膜は Caco-2 細胞より 2 オーダー以上高い活性を示した。carboxylesterase (CES) 1/2 活性プロファイルを評価するために、dabigatran etexilate を用いた代謝試験を行った結果、オルガノイド単層膜はヒト小腸に類似したプロファイル (CES2>CES1) を示した一方で、Caco-2 細胞はその逆 (CES2<CES1) であった。また、主要な薬物排出トランスポーターである P-glycoprotein の排出輸送活性を、digoxin を基質として測定した結果、オルガノイド単層膜は Caco-2 細胞と同等の排出比 (排出トランスポーター活性の指標) を示した。これらの各種薬物動態学的特性を、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞 (ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の作製法の改良についても実施) と比較したところ、オルガノイド単層膜の方が優れていた。これらの結果から、オルガノイド単層膜は、既存系よりも高い機能と生体に近い特徴を有しており、種々の薬物動態学的研究に応用可能であることが示唆された。

さらに、ヒト空腸生検サンプルより樹立した小腸オルガノイドについて、各種薬物動態学的な機能比較解析を行ったところ、ヒト十二指腸生検サンプル由来オルガノイドの場合とほぼ同等の機能を示すことも明らかにした。また、3 種の異なる培地で培養した腸管オルガノイドは、薬物動態関連遺伝子に関してそれぞれ特有の遺伝子発現プロファイルを示すことが明らかにした。これらのことから、ヒト腸管オルガノイドを用いた創薬研究を行う際には、具体的な用途に応じて最適な培養方法を選択することが必要であると考えられた。

以上のように、ヒト生検由来腸管オルガノイドから作製された単層膜が、次世代型の薬物動態評価系として有用であることを実証し、従来系と比べて体内動態予測精度が向上することにより、医薬品の安全で効率的な開発を加速することが期待された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Negoro R., Kawai K., Ichikawa M., Deguchi S., Takayama K., Mizuguchi H.	4. 巻 35
2. 論文標題 Establishment of MDR1/ABCB1-knockout human induced pluripotent stem cell line.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug. Metab. Pharmacokinet.	6. 最初と最後の頁 288-296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2020.01.009	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 Takayama K., Ito K., Matsui A., Yamashita T., Kawakami K., Hirayama D., Kishimoto W., Nakase H., Mizuguchi H.	4. 巻 49
2. 論文標題 In vivo gene expression profile of human intestinal epithelial cells: from the viewpoint of drug metabolism and pharmacokinetics.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug. Metab. Dispos.	6. 最初と最後の頁 221-232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/dmd.120.000283	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 Ichikawa M., Negoro R., Kawai K., Yamashita T., Takayama K., Mizuguchi H.	4. 巻 20
2. 論文標題 Vinblastine treatment enhances the intestinal functions and decreases the undifferentiated cell contamination of human iPS cell-derived intestinal epithelial-like cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol. Ther. Methods. Clin. Dev.	6. 最初と最後の頁 463-472
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtm.2021.01.005	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 Kawai K., Negoro R., Ichikawa M., Yamashita T., Deguchi S., Harada K., Hirata K., Takayama K., Mizuguchi H.	4. 巻 17
2. 論文標題 Establishment of SLC15A1/PEPT1-knockout human induced pluripotent stem cell line for intestinal drug absorption studies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol. Ther. Methods. Clin. Dev.	6. 最初と最後の頁 49-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtm.2019.11.008	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 Negoro R., Takayama K., Kawai K., Harada K., Sakurai F., Hirata K., Mizuguchi H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Efficient Generation of Small Intestinal Epithelial-like Cells from Human iPSCs for Drug Absorption and Metabolism Studies.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1539-1550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2018.10.019	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 Yamashita T., Inui T., Yokota J., Kawakami K., Morinaga G., Takatani M., Hirayama D., Nomoto R., Ito K., Cui Y., Ruez S., Harada K., Kishimoto W., Nakase H., Mizuguchi H.	4. 巻 22
2. 論文標題 Monolayer platform using human biopsy-derived duodenal organoids for pharmaceutical research.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol. Ther. Methods. Clin. Dev.	6. 最初と最後の頁 263-278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2021.05.005. eCollection 2021 Sep 10	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 該当する

1. 著者名 Yokota J., Yamashita T., Inui T., Nomoto R., Kishimoto W., Nakase H., Mizuguchi H.	4. 巻 566
2. 論文標題 Comparison of culture media for human intestinal organoids from the viewpoint of pharmacokinetic studies.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 115-122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.06.007. Epub 2021 Jun 10.	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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 乾達也、山下智起、野元隆我、横田純平、川上賢太郎、岸本航、仲瀬裕志、水口裕之
2. 発表標題 同一個人由来のヒト生検由来腸管オルガノイドとヒトiPS細胞由来腸管オルガノイドの比較検討
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横田純平、山下智起、乾達也、野元隆我、川上賢太郎、岸本航、仲瀬裕志、水口裕之
2. 発表標題 薬物動態学的応用のためのヒト腸管オルガノイド培養法の比較
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市河萌、河合夏苗、根来亮介、高山和雄、水口裕之
2. 発表標題 Vinblastine作用によるヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の機能向上と未分化細胞排除
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下智起、乾達也、横田純平、川上賢太郎、平山大輔、野元隆我、岸本航、仲瀬裕志、水口裕之
2. 発表標題 生検由来ヒト腸管オルガノイドの薬物動態試験への応用
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村田美治佳、市河萌、赤嶺寛樹、高山和雄、水口裕之
2. 発表標題 CYP3A4発現Caco-2細胞株の樹立と機能評価
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水口裕之
2. 発表標題 再生医療技術を利用したヒト肝細胞および腸管上皮細胞の作製と創薬応用
3. 学会等名 薬物動態談話会 第43年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 乾達也、山下智起、野元隆我、川上賢太郎、高山和雄、岸本航、仲瀬裕志、水口裕之
2. 発表標題 ヒト十二指腸オルガノイドの樹立と薬物動態評価系への応用
3. 学会等名 第69 回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawai K., Negoro R., Harada K., Hirata K., Takayama K., Mizuguchi H.
2. 発表標題 Establishment of intestinal and hepatic drug transporter-knockout human induced pluripotent stem cell lines for pharmacokinetic studies
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 Ichikawa M., Kawai K., Negoro R., Takayama K., Mizuguchi H.
2. 発表標題 Maturation of the enterocyte-like cells differentiated from human iPS cells using Vinblastine
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 乾達也、山下 智起、野元隆我、川上 賢太郎、高山和雄、岸本航、仲瀬裕志、水口裕之
2. 発表標題 ヒト十二指腸オルガノイドの薬物動態評価系への応用
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河合夏苗、根来亮介、市河萌、原田和生、平田收正、高山和雄、水口裕之
2. 発表標題 薬物トランスポーター欠損ヒトiPS細胞の作製と薬物動態試験への応用
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市河萌、河合夏苗、根来亮介、高山和雄、水口裕之
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の機能向上をもたらす化合物の探索
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takayama K, Negoro R, Mori T, Ito S, Yamaura Y, Mizuguchi H.
2. 発表標題 GENERATION OF INTESTINAL EPITHELIAL CELL MONOLAYERS FROM HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS BY CDX2 TRANSDUCTION
3. 学会等名 日本薬物動態学会第33回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高山和雄、根来亮介、水口裕之
2. 発表標題 ヒトiPS細胞から「小腸型」腸管上皮細胞への分化誘導法の開発と創薬応用
3. 学会等名 シンポジウム「細胞アッセイ技術の現状と将来」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高山和雄、根来亮介、森貴則、山浦由之、水口裕之
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来腸管単層膜の作製と薬物透過試験・薬物代謝試験への応用
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 小腸上皮様細胞の製造方法	発明者 水口裕之、高山和雄、根来亮介、ほか	権利者 国立大学法人大阪大学、医薬基盤・健康・栄養
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/024909	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 腸上皮様細胞及びその作製方法	発明者 水口裕之、高山和雄、山下智起、仲瀬裕志、川上賢太郎、	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-016592	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
研究分担者	仲瀬 裕志  (Nakase Hiroshi)  (60362498)	札幌医科大学・医学部・教授    (20101)	

#### 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
---------	---------