

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15264

研究課題名（和文）ゲノム編集技術を用いた消化管吸収・代謝・毒性を予測可能な腸管モデルの作製

研究課題名（英文）Generation of predictive intestinal models of drug absorption, metabolism and toxicity using genome-editing technology.

研究代表者

根来 亮介（Negoro, Ryosuke）

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号：10844045

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：Caco-2細胞は医薬品の代謝に中心的な役割を果たす薬物代謝酵素であるCYP3A4やUGT1A1がほとんど発現しておらず、薬物代謝を評価できないことが問題となっている。本研究ではゲノム編集技術を用いてCaco-2細胞にCYP3A4およびUGT1A1を高発現させることで上記問題の解決を試みた。ゲノム編集したCaco-2細胞におけるCYP3A4およびUGT1A1活性は、野生型Caco-2細胞と比べ極めて高い値を示した。以上の結果より、ゲノム編集技術を用いて、CYP3A4・UGT1A1安定発現Caco-2細胞を作製することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のCaco-2細胞では、薬物吸収はある程度予測できるものの、薬物代謝、薬物代謝に起因する毒性を予測することは困難であった。本研究で開発したCYP3A4、UGT1A1を高発現したCaco-2細胞は、従来のCaco-2細胞よりも優れた安全性評価モデルになりうる可能性を示した意義は大きい。また、CYP3A4、UGT1A1を高発現したCaco-2細胞は、培養コストが安価、継代・凍結保存が可能のため、創薬研究に要するコストカットにも貢献できる可能性がある。さらに、安全性試験における実験動物の使用削減につながるだろう。

研究成果の概要（英文）：Caco-2 cells hardly express CYP3A4 and UGT1A1, drug-metabolizing enzymes that play a central role in drug metabolism, making it impossible to assess drug metabolism. This study attempted to solve the above problem by using genome-editing technology to induce high expression of CYP3A4 and UGT1A1 in Caco-2 cells. CYP3A4 and UGT1A1 activities in the genome-edited Caco-2 cells were extremely high compared to wild-type Caco-2 cells. These results suggest that I successfully generated stable CYP3A4 and UGT1A1-expressing Caco-2 cells using genome-editing technology.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム編集 CRISPR-Cas9 Caco-2 cell CYP3A4 UGT1A1

1. 研究開始当初の背景

医薬品の多くは経口投与され、小腸において吸収・代謝され肝臓を経由して全身へと移行する。そのため、ヒト小腸における医薬品の吸収・代謝を精度良く予測できるモデルの構築は有用である。また、抗がん剤（イリノテカン、フルオロウラシルなど）による、腸管毒性に起因した激しい下痢のため薬物治療が中止されることも問題となっており、医薬品候補化合物の腸管毒性を創薬研究段階で評価することも重要である。

現在、ヒト消化管吸収・代謝・毒性評価モデルとして実験動物を用いた *in vivo* 評価系や Caco-2 細胞などの細胞株を用いた *in vitro* 評価系がある。しかしながら、実験動物を用いた評価系では種差の問題がある。Caco-2 細胞を用いた評価系では、消化管吸収性 (Fa) はある程度予測できるものの、小腸の薬物代謝に中心的な役割を果たすシトクロム P450 3A4 (CYP3A4) や UDP グルクロン酸転移酵素 1A1 (UGT1A1) などの発現量が低く薬物代謝特性 (Fg) を評価することはできない。そのため、幅広いがん種に処方されているイリノテカンのような CYP3A4 や UGT1A1 の代謝能に起因する毒性を予測することもできない。また、UGT1A1 には遺伝子多型 (SNP) が存在することが知られている。中でも、UGT1A1*6 (UGT1A1 Exon1 における 211G → A の変異) はグルクロン酸抱合能が低下し、イリノテカン投与時において、腸管毒性による激しい下痢などの重篤な副作用の発現頻度が高くなることが報告されている。また UGT1A1*6 の頻度は、日本をはじめとするアジア人では 11~23% と高いが、コーカシアンではほとんど認められない。そのため、日本では、イリノテカン投与前の患者においては、UGT1A1 の遺伝子多型検査は保険適応である。

製薬企業などは、薬物代謝特性 (Fg) を予測するために、ヒト小腸マイクロソームを用いて予測している。ヒト小腸マイクロソームを用いることで比較的精度良く腸管における薬物代謝特性 (Fg) が予測可能である。しかしながら、市販されているヒト小腸マイクロソームのほとんどは、ドナーの遺伝子情報が不明であるため、そのサンプルが薬物代謝に大きな影響を与える SNP を有しているのか不明である。さらにヒト小腸マイクロソームのドナーのほとんどはコーカシアンであるため、創薬研究段階においてアジア人の消化管代謝予測を十分に行うことはできない。そのような背景もあり、遺伝子多型 (SNP) に起因した腸管毒性などにより臨床研究(治験)が中断し、抗がん剤の開発が進まないことがある。そのため、SNP による影響も加味した消化管吸収・代謝・毒性評価モデルの構築が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、ゲノム編集技術である CRISPR-Cas9 システムを用いて、ヒト成人小腸に匹敵する CYP3A4 および UGT1A1 代謝能を有する Caco-2 細胞を作製することを目的とする。さらに、UGT1A1 に関しては、UGT1A1*6 による影響を加味した代謝・毒性を評価できるか検討した。

3. 研究の方法

Caco-2 細胞の培養

Caco-2 細胞 (Riken BRC Cell Bank) は 10% FBS (Sigma-Aldrich)、1% NEAA (Nacalai Tesque)、antibiotic-antimycotic mixed stock solution (Nacalai Tesque) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Nacalai Tesque) を用いて培養した。で Caco-2 細胞を分化させる際には、細胞を播種し、コンフルエントになった日から 21 日間培養を行った。

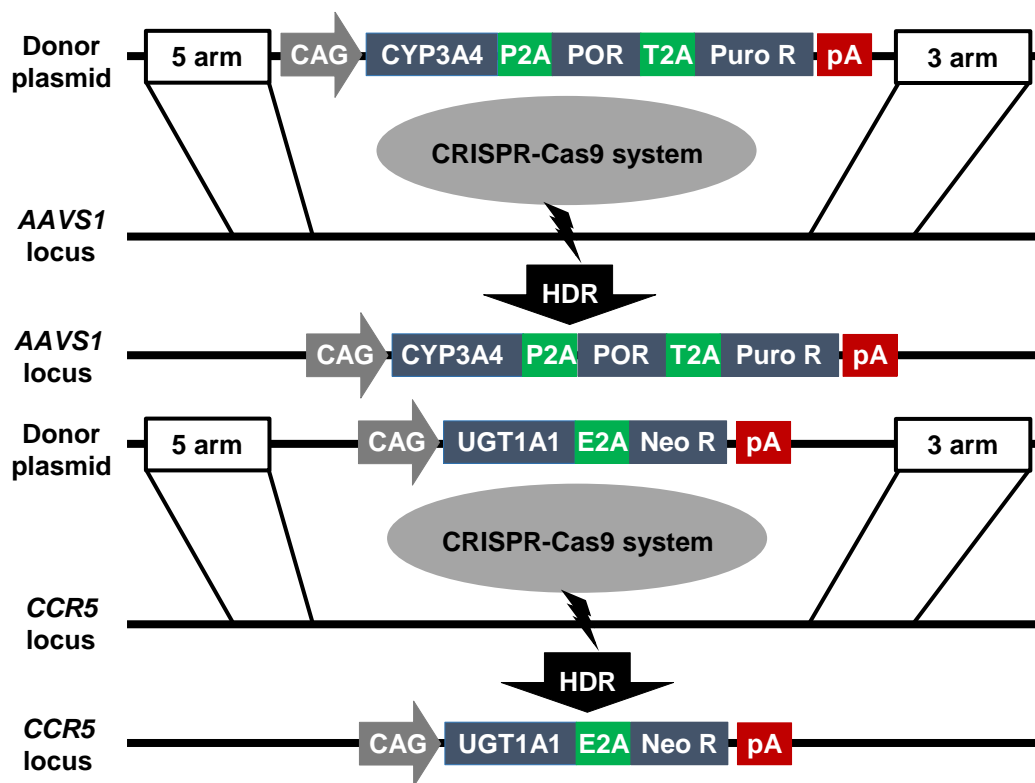
CRISPR-Cas9 ベクターの作製

CRISPR-Cas9 ベクターは、pX330A-1x2 (Addgene, no 58766) 及び pX330S-2-PITCh (Addgene, no 63670) を用いて、広島大学 山本らのプロトコルに従い構築した (PMID: 26678082)。gRNA は CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no/#>) を用いて設計した。

ドナープラスミドベクターの作製

Hybrid construct consisting of the cytomegalovirus (CMV) enhancer fused to the chicken beta-actin promoter (CAG) プロモーターの制御下で、2A ペプチドを用いて、CYP3A4、POR 及びピューロマイシン耐性 (Puro R) 遺伝子を共発現するドナープラスミドおよび UGT1A1、ネオマイシン耐性遺伝子 (NeoR) を共発現するドナープラスミドを構築した。相同組換えを用いて、AAVS1 locus にノックインするための homology arm の設計は、PITCh designer 2.0 (<http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/smg/PITChdesigner/index.html>) を用いて行った。Homology arm コンストラクトはファスマック社に外注した。CYP3A4 遺伝子 (NM_017460.6)、POR 遺伝子 (NM_001367562.1)、Puro R 遺伝子、UGT1A1 (NM_000463.2) 遺伝子、Neo R 遺伝子は、Tks Gflex DNA polymerase (Takara Biomedicals) を用いて増幅した。次に、P2A、T2A あるいは E2A 配列を挿入するため、増幅 primer に P2A、T2A あるいは E2A 配列を付与して、Tks Gflex DNA polymerase (Takara Biomedicals) を用いて再度 PCR を行った。この時、2A ペプチ

ドによる共発現を引き起こすため、CYP3A4 遺伝子、POR 遺伝子、UGT1A1 遺伝子の終止コドンを除いた。増幅した CYP3A4 遺伝子、POR 遺伝子、Puro R 遺伝子、UGT1A1 遺伝子、Neo R 遺伝子は、pCAG-Neo (FUJIFILM Wako) に、In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Biomedicals) によりクローニングし、CYP3A4、POR、Puro R 遺伝子共発現ドナープラスミドベクターおよび UGT1A1、Neo R 遺伝子共発現ドナープラスミドベクターを得た。



エレクトロポレーション

Caco-2 細胞は TrypLE[™] Express (Thermo Fisher Scientific) を用いて単細胞に剥離し、Opti-MEM で懸濁した。その後、エレクトロポレーションキュベット (BMBio, BM165-2088) に Caco-2 細胞 1.0×10^6 cells、CRISPR-Cas9 プラスミドベクター及びドナープラスミドベクターをそれぞれ $10 \mu\text{g}$ ずつ加えた。エレクトロポレーションは Gene Pulser Xcell[™] (Bio-Rad) を用いて、下記の条件で行った。

電圧：300 V、パルス幅：5 ms、パルス間隔：0.1 sec、パルス回数：2、Cuvette：0.4 mm、Electroporation Volume：400 μl

エレクトロポレーション後、6 well-plate に Caco-2 細胞を播種し、その2日後より $10 \mu\text{g/ml}$ ピューロマイシン (FUJIFILM Wako) あるいは、 1.5 mg/ml G418 (FUJIFILM Wako) による薬剤セレクションを行った。

4. 研究成果

複数薬物代謝酵素を発現させるため、セーフ・ハーバー座位を標的にした gRNA、Cas9 共発現プラスミドベクターおよび薬物代謝酵素遺伝子発現カセット挿入用ドナープラスミドベクターを Caco-2 細胞に遺伝子導入することで、CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞および CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞を作製した。CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞および CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞がゲノム編集実験により、ネガティブな影響を受けていないか評価するために、腸管マーカーである VIL1、SI および ISX の遺伝子発現量を解析した。CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞および CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞における VIL1、SI 及び ISX の遺伝子発現量は、野生型 (WT)-Caco-2 細胞とほぼ同程度発現していた。次に、ゲノム編集した遺伝子である CYP3A4 および UGT1A1 が高発現しているか評価するために、遺伝子発現量を解析した。CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞及び CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞における CYP3A4 および UGT1A1 遺伝子発現量は、ヒト成人小腸に匹敵する発現量であった。

CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞及び CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞における CYP3A4 および UGT1A1 代謝能を評価するために、それぞれの薬物代謝酵素特異的基質を用いて評価した。前述の遺伝子発現量の結果と一致して、CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞および CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞における CYP3A4 代謝能は、WT-Caco-2 細胞に比べ極めて高い活性を示した。興味深いことに、CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞における UGT1A1 代謝活性は、CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞比べ高い活性を示した。

次に、CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞および CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞を用いて、in vivo におけるヒトの CYP3A4 および UGT1A1 の活性を予測できるかどうかを検討した。ポジティブコントロールとしてヒト小腸 S9 を用いた。CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞および CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞の S9 における CYP3A4 活性は、WT-Caco-2 細胞の S9 における活性よりも高かった。しかし、CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞および CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞における S9 における CYP3A4 活性は、ヒト小腸における活性よりも低かった。CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞の S9 の UGT1A1 活性は、WT-Caco-2 細胞の S9 分画の活性よりも高かった。これらの結果から、CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞および CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞は、WT-Caco-2 細胞よりも小腸薬物代謝予測モデルとして適していることが示唆された。

最後に、CYP3A4-POR-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞を用いて SN-38 による腸管毒性を評価できるかどうかを調べた。その結果、CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞の生存率は、WT-Caco-2 細胞および CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞の生存率よりも低かった。以上の結果から、CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞は、WT-Caco-2 細胞および CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞のいずれよりも SN-38 による腸管毒性に対して感受性が高いことが示唆された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Watanabe Keita, Negoro Ryosuke, Fujita Takuya	4. 巻 664
2. 論文標題 5-ALA treatment increases intracellular heme levels and enhances CYP3A4 activity in genome-edited Caco-2 cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 94 ~ 99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.04.077	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 Yamada Naoki, Negoro Ryosuke, Watanabe Keita, Fujita Takuya	4. 巻 50
2. 論文標題 Generation of Caco-2 cells with predictable metabolism by CYP3A4, UGT1A1 and CES using the PITCh system	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100497 ~ 100497
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2023.100497	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 Negoro Ryosuke, Yamada Naoki, Watanabe Keita, Kono Yusuke, Fujita Takuya	4. 巻 96
2. 論文標題 Generation of Caco-2 cells stably expressing CYP3A4・POR・UGT1A1 and CYP3A4・POR・UGT1A1*6 using a PITCh system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Toxicology	6. 最初と最後の頁 499 ~ 510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00204-021-03175-0	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8件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 根来 亮介
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いた高機能な腸管上皮細胞・肝細胞の作製と腸-肝チップの開発
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ryosuke Negoro
2. 発表標題 Generation of highly functional intestinal epithelial cell and hepatocyte models applicable to pharmacokinetic studies using genome editing technology
3. 学会等名 The Academy of Pharmaceutical Science and Technology, Japan Global Education Seminar 2023-1st (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 根来 亮介、藤田 卓也
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いた創薬研究に応用可能な腸管上皮細胞モデルの作製 CYP3A4、UGT1A1、CES 代謝を評価可能なCaco-2細胞
3. 学会等名 第73回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryosuke Negoro, Takuya Fujita
2. 発表標題 Generation of Caco-2 cells with predictable metabolism by CYP3A4, UGT1A1 and CES using genome-editing technology.
3. 学会等名 2023 ICCP450/JSSX (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 根来 亮介、出口 清香、高山 和雄、藤田 卓也
2. 発表標題 PITChシステムを用いた安価に繰り返し薬物代謝実験が可能な腸・肝細胞モデルの開発
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 根来 亮介、出口 清香、高山 和雄、藤田 卓也
2. 発表標題 PITChシステムを用いて複数の薬物代謝酵素を安定発現した腸・肝細胞モデルの開発
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 根来 亮介、出口 清香、高山 和雄、藤田 卓也
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いて複数の薬物代謝酵素を安定発現した腸・肝細胞モデルの開発
3. 学会等名 日本組織培養学会 第94回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田尚生、根来亮介、藤田卓也
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いた CYP3A4 および加水分解酵素による代謝を予測可能なCaco-2 細胞 の作製
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------