

## 創薬研究向けヒトiPS細胞由来分化細胞セミナー

# ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞 F-hiSIEC (I7・ハイシーク) の 研究データご紹介

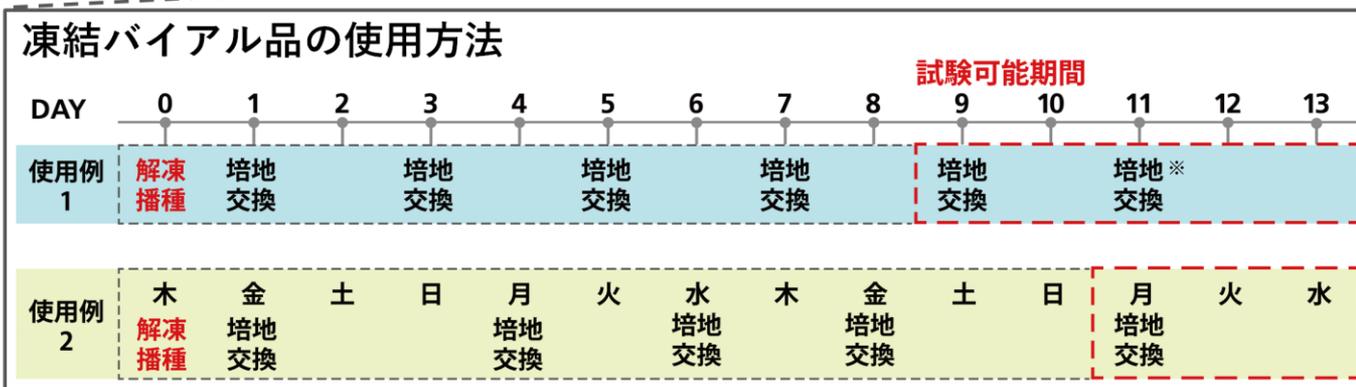


ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞  
**F-hiSIEC**<sup>TM</sup>  
FUJIFILM human iPS cell-derived Small Intestinal Epithelial like Cell

2020年10月15日  
富士フイルム株式会社  
美馬伸治

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞  
**F-hiSIEC**<sup>TM</sup>

FUJIFILM human iPS-derived Small Intestine Epithelial like Cell



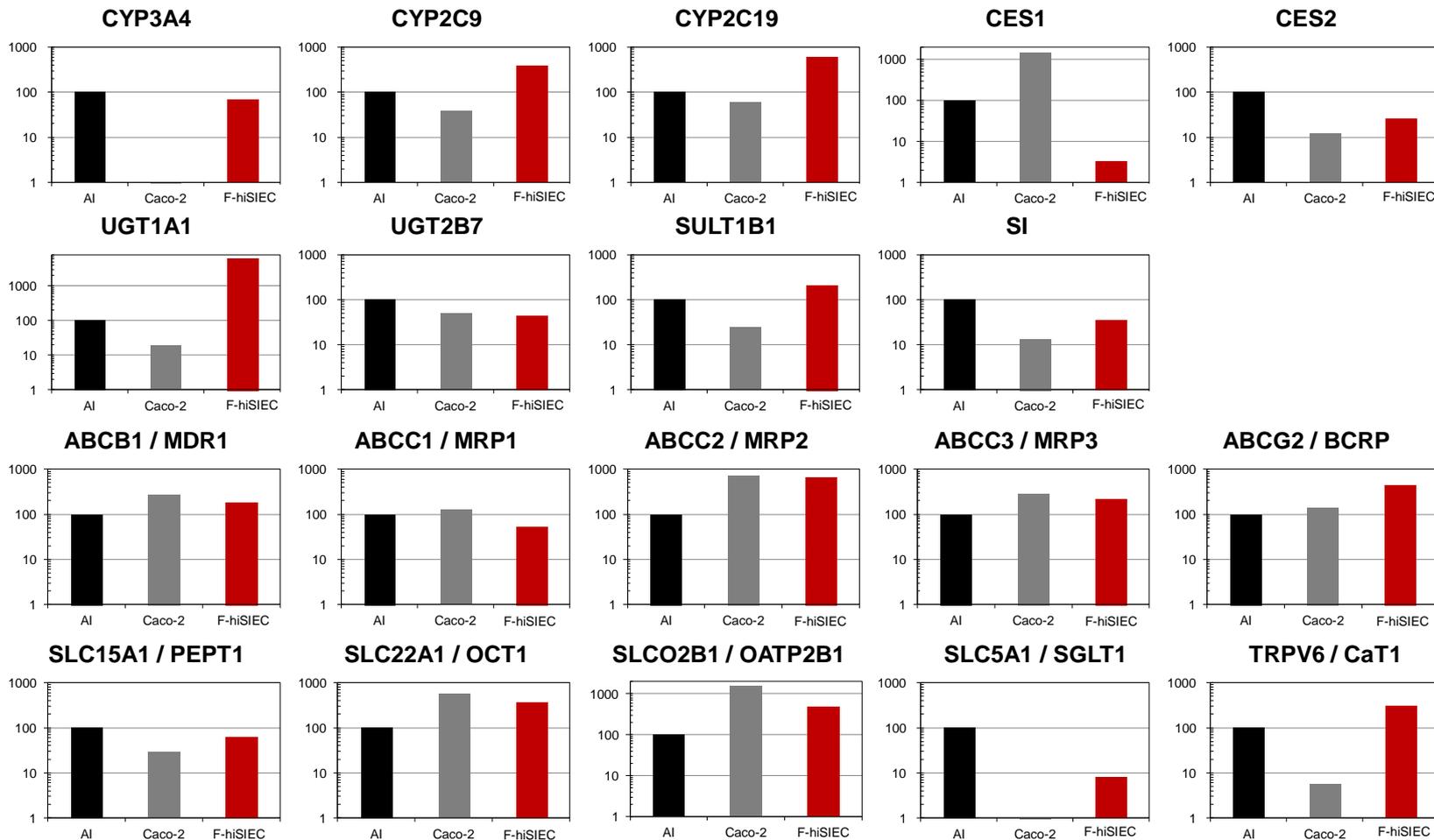
- ・分化途中の細胞を凍結保存し、F-hiSIECとして開発
- ・細胞解凍後、9-11日培養で成熟した腸管上皮細胞として使用可

pmol/2h/mg protein

	CYP3A4/5	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP1A2
Human primary enterocytes	848 ± 148	1330 ± 780	20 ± 11	15 ± 2	N.D.
Caco-2 cells	26 ± 3	N.D.	N.D.	3 ± 1	225 ± 94
F-hiSIEC	840 ± 50*	130 ± 43	76 ± 18	3 ± 0	364 ± 76

Each cells were incubated with 5 μM midazolam, 5 μM diclofenac, 45.7 μM (S)-mephenytoin, 5 μM bufuralol, 40 μM phenacetin for 2 h at 37°C. \*CYP3A4/5 in F-hiSIEC was measure with F-hiSIEC assay medium. The supernatants were collected and the metabolites were measured by UPLC-MS/MS. All data are presented as mean ± standard deviation (n = 3-6). Human Enterocytes (purchased from In Vitro ADMET Laboratories, Inc.) were used as primary small intestinal cells.

**F-hiSIECはヒト生体小腸と同程度のCYPs活性を示した**



**F-hiSIECは主要な代謝酵素・トランスポーターを生体小腸同程度に発現している**

- 薬物間相互作用（酵素誘導）評価系
- 腸管免疫評価系
- 腸管ウイルス培養系の可能性

- **薬物間相互作用（酵素誘導）評価系**
- 腸管免疫評価系
- 腸管ウイルス培養系の可能性

## 通常時

医薬品A



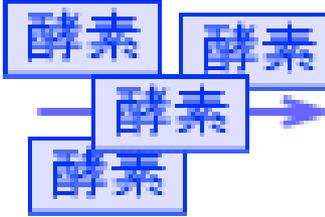
酵素

分解



## 酵素誘導時

医薬品A



分解↑

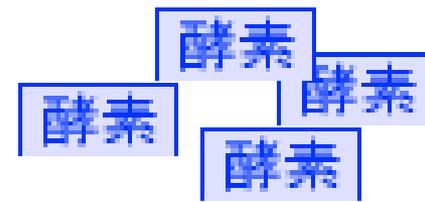
医薬品B

代謝酵素が誘導されると、医薬品が分解され、全身を循環する薬物量が減少

小腸での酵素誘導例：



Rifampicin, Vitamin D3等の曝露



CYP3A4発現量の上昇

F-hiSIECを用いた酵素誘導の評価系を検討した

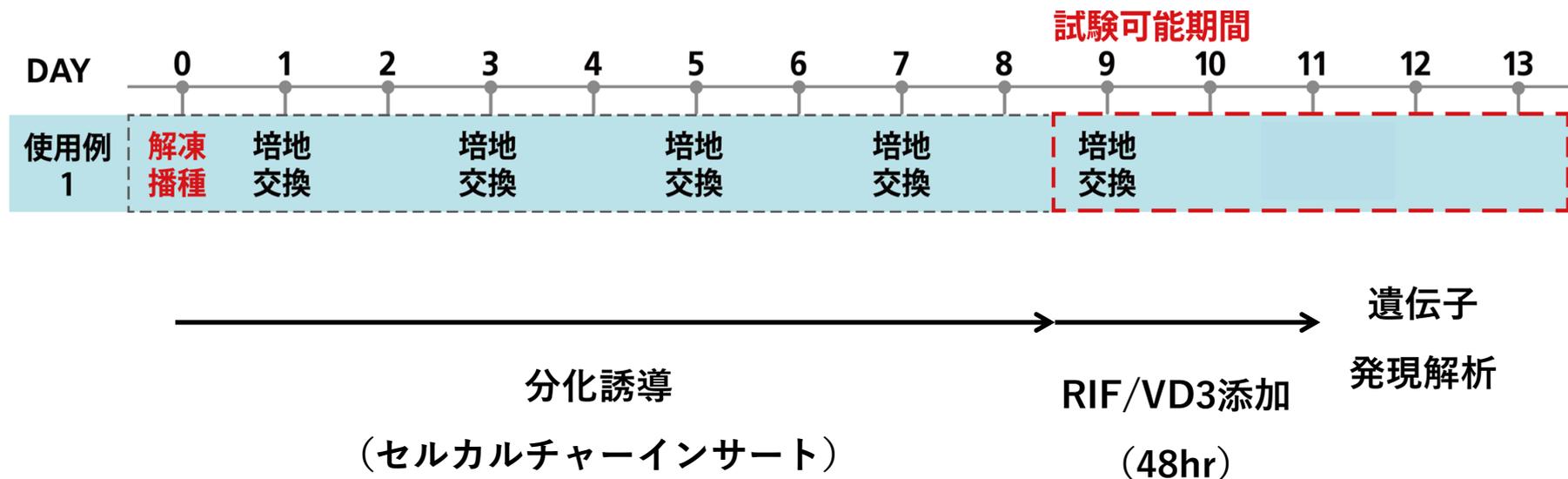
ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞

F-hiSIEC™

FUJIFILM human iPS-derived Small Intestine Epithelial like Cell



使用例 1 の場合：2日に1回培地交換



F-hiSIECのRIF, VD3によるCYP3A4の誘導を評価した

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞

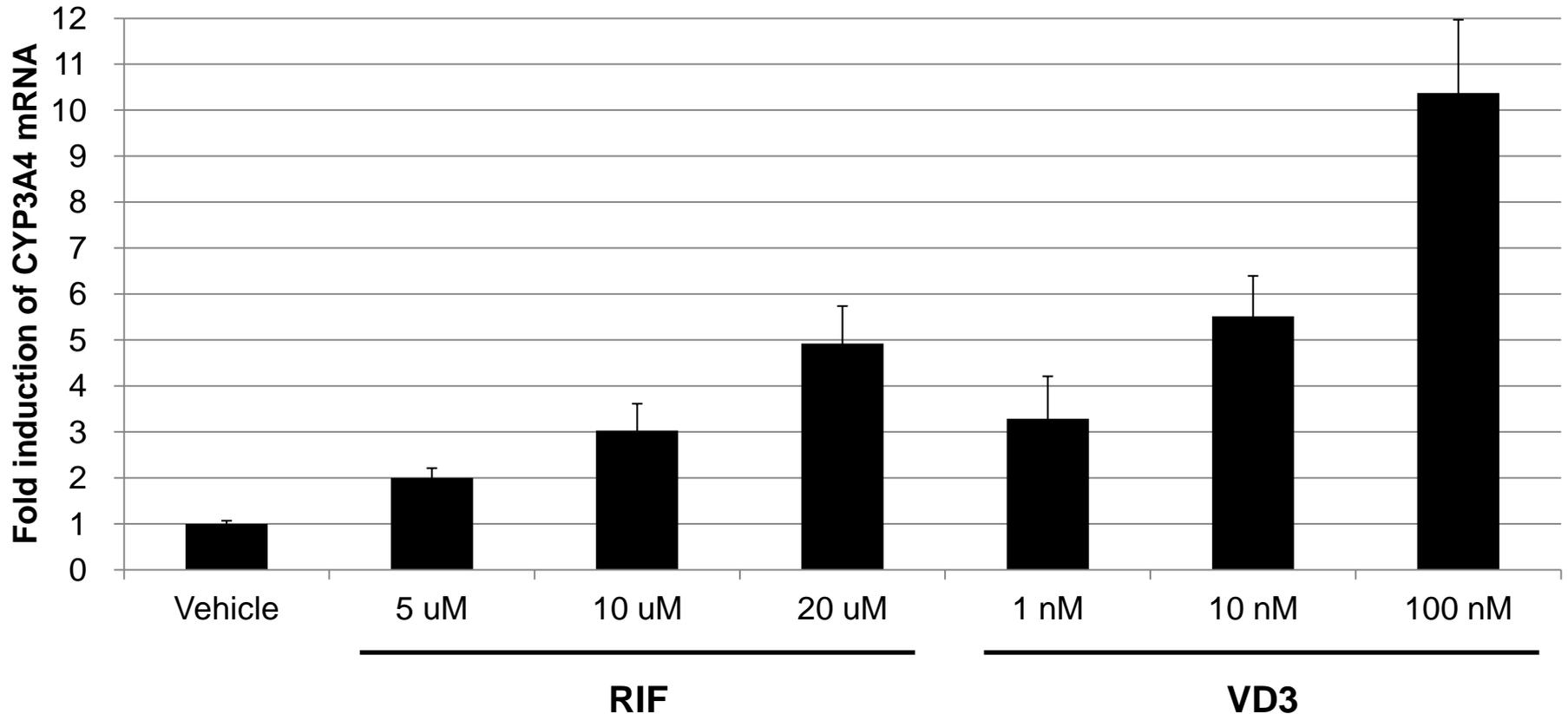
F-hiSIEC™

FUJIFILM human iPS-derived Small Intestine Epithelial like Cell



# 酵素誘導の評価 -mRNA発現量の変動-

Induction of CYP3A4 mRNA expression levels in F-hiSIEC on cell culture insert. Differentiated cells were treated with 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 (VD3) or rifampicin (RIF) for 48 hours at terminal differentiation.



RIFにより2~5倍、VD3により3~10倍のCYP3A4 mRNA発現量の上昇が濃度依存的に見られた。

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞

F-hiSIEC™

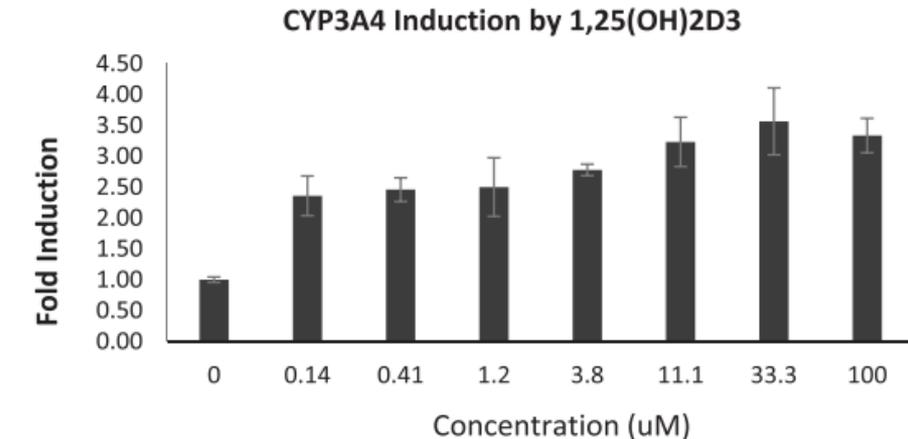
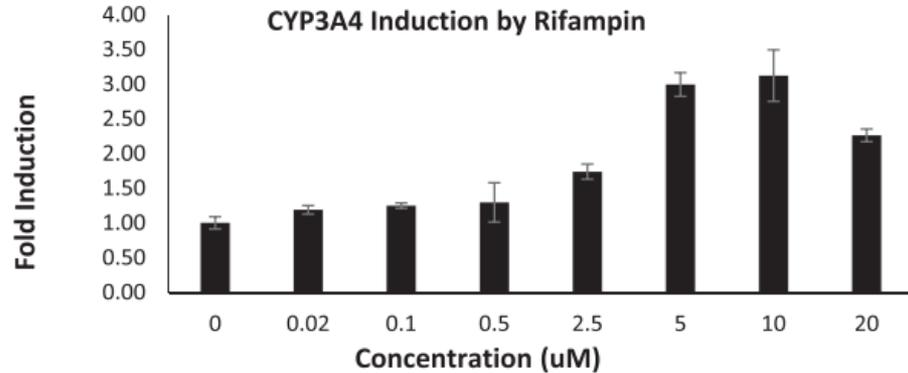
FUJIFILM human iPS-derived Small Intestine Epithelial like Cell



# 酵素誘導の評価 -ヒト生体小腸との比較-

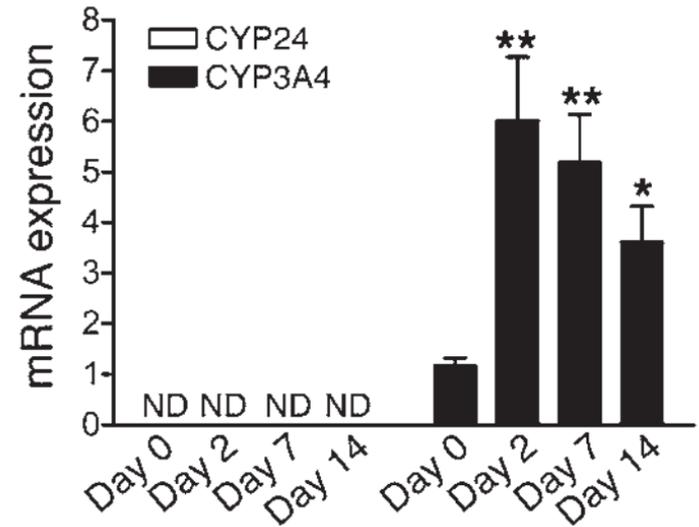
*Drug Metab. Dispos.* **46**, 1562 (2018).

*J. Clin. Invest.* **116**, 1703 (2006).



ヒト凍結小腸細胞にRIF, VD3を曝露

→ 2~3倍程度の上昇



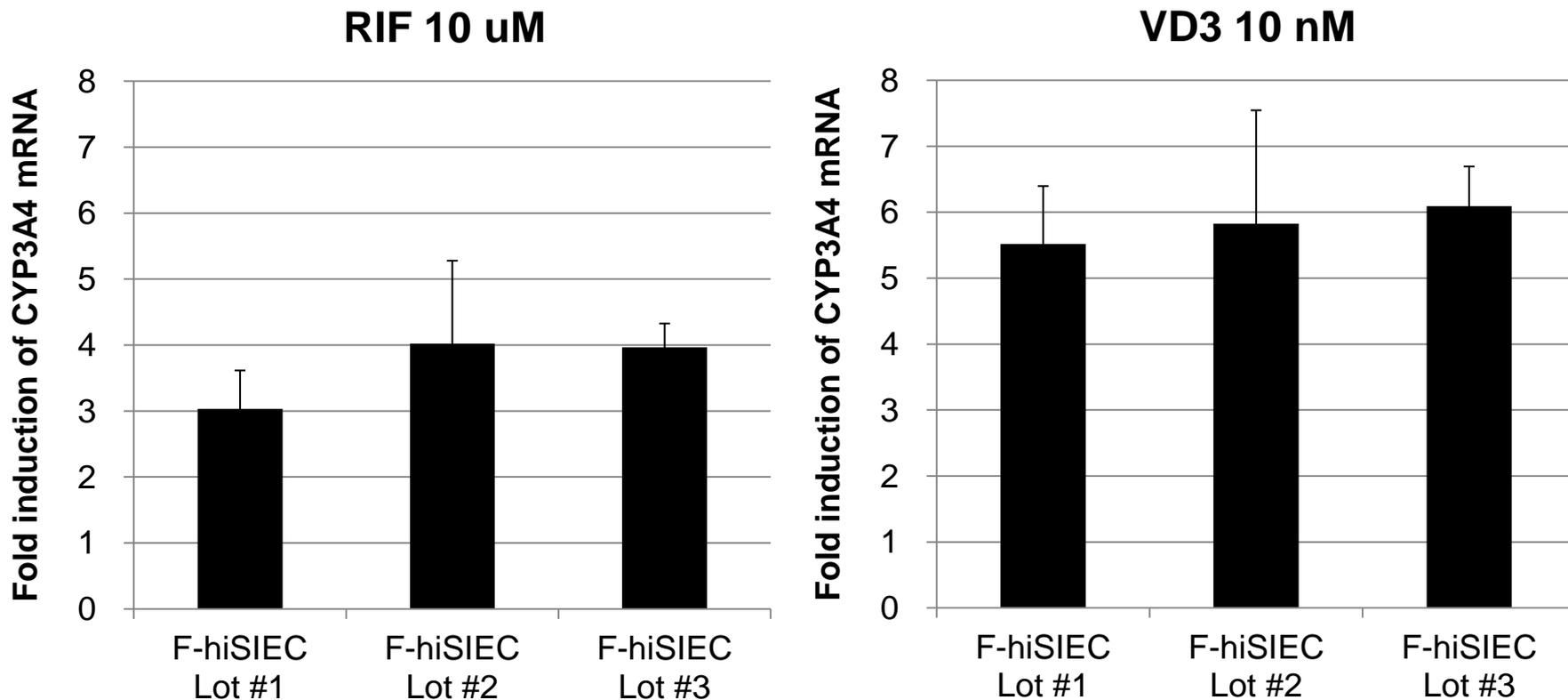
ヒトにRIFを経口投与

→ 3~6倍程度の上昇

F-hiSIECで見られたCYP3A4発現量の上昇率は、  
既報のヒト生体小腸の結果と同程度であった。

# 酵素誘導の評価 -ロット間差の比較-

Induction of CYP3A4 mRNA expression levels in F-hiSIEC on cell culture insert. Differentiated cells were treated with  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 (VD3) or rifampicin (RIF) for 48 hours at terminal differentiation.



**F-hiSIECのRIFとVD3によるCYP3A4の誘導はロット間で安定していた。**

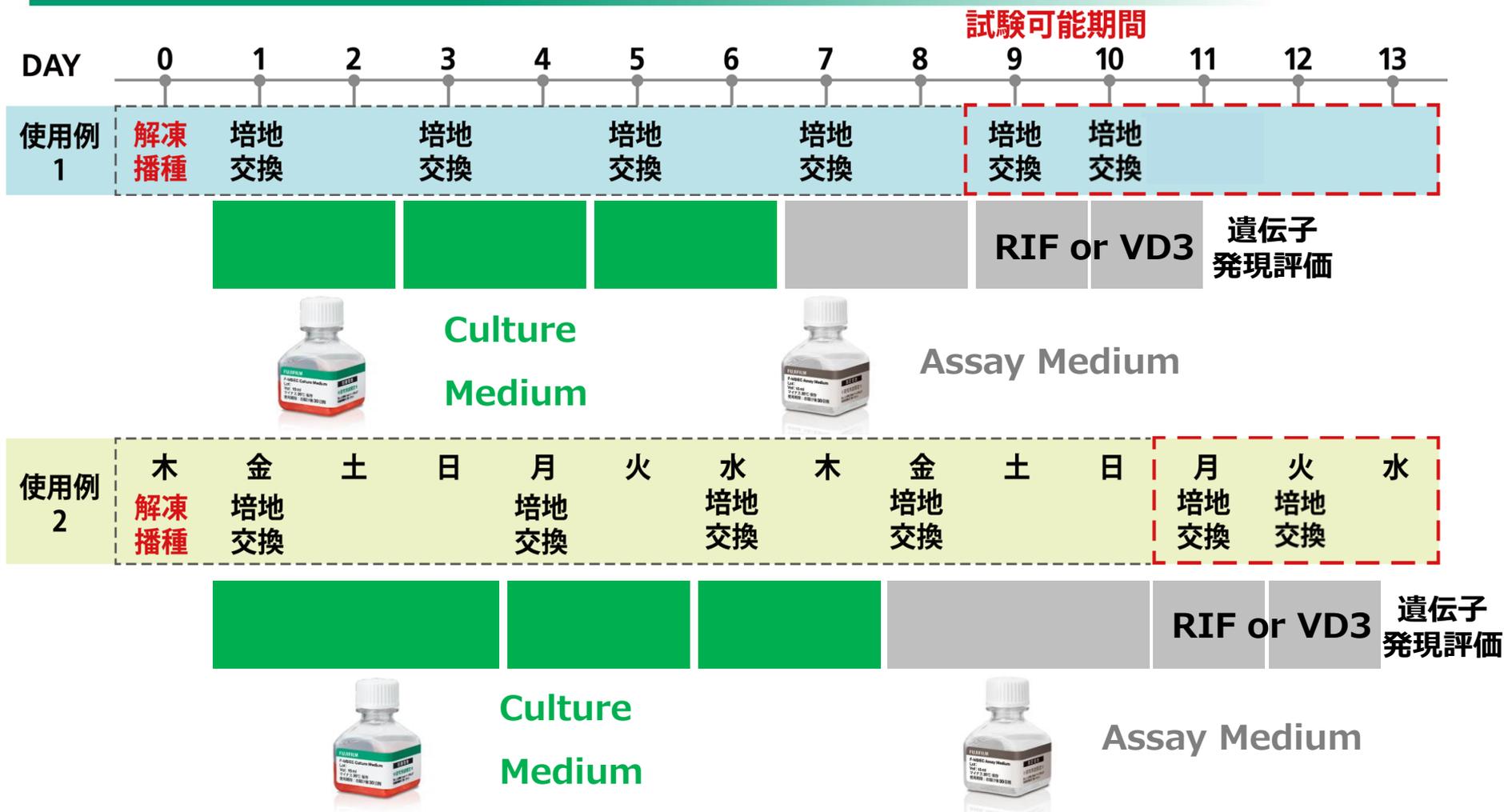
ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞

**F-hiSIEC™**

FUJIFILM human iPS-derived Small Intestine Epithelial like Cell



# 酵素誘導の評価 - プロトコル -



F-hiSIECの 使用例 1 の7日目 及び 使用例2の8日目 の培地交換は、通常はCulture mediumを使うが、今回の評価ではAssay mediumに交換した。使用例1/2いずれのプロトコルでも酵素誘導を評価できた。

✓RIF, VD3によるCYP3A4の誘導を評価できるプロトコルを確立した。

✓F-hiSIECで見られたCYP3A4遺伝子発現の上昇率は、  
ヒト生体小腸と同程度であった。

✓F-hiSIECを用いたCYP3A4遺伝子発現の上昇率は、ロット間で  
安定していることが示された。

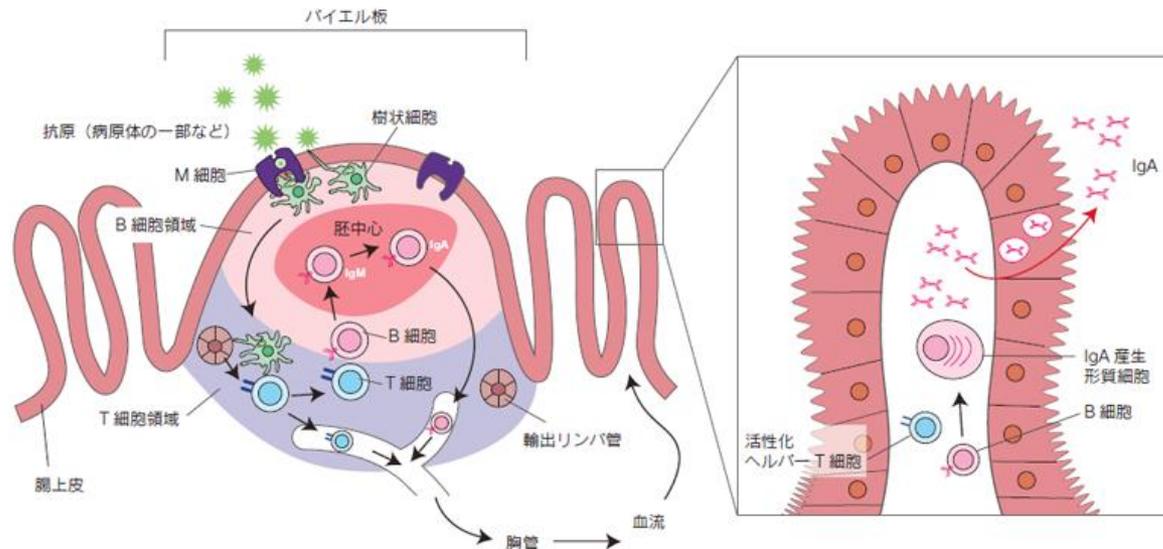


- 薬物間相互作用（酵素誘導）評価系
- **腸管免疫評価系**
- 腸管ウイルス培養系の可能性

- 小腸は体外と体内の境界となる臓器
- 体内最大の免疫器官であり、有害な因子は排除するが、無害な抗原には応答しない（免疫寛容） 高度な免疫システムを獲得（腸管免疫）
- 全身のおよそ70%の免疫担当細胞が小腸に集まっている

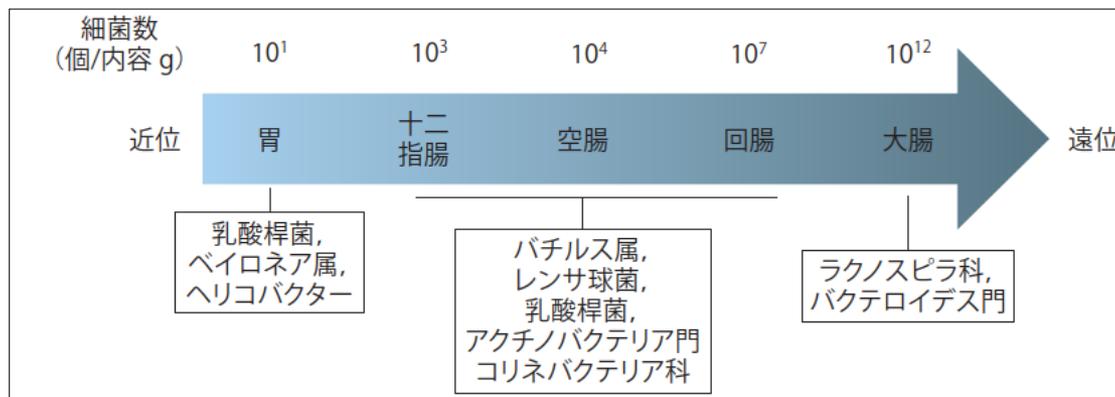
## 【パイエル板】

- 小腸に局在する免疫組織。
- M細胞から腸管内の抗原を取り込み、粘膜免疫を調節している。



<https://ruo.mbl.co.jp/bio/product/allergy-Immunology/article/gut-immunity.html>

## 【腸管に存在する腸内細菌の分布】



日本内科学会雑誌 104: 29~34, 2015 安藤 朗ら

- ・腸内細菌数は大腸が最大
- ・胃から離れた空腸、回腸では乳酸桿菌などの細菌が分布している

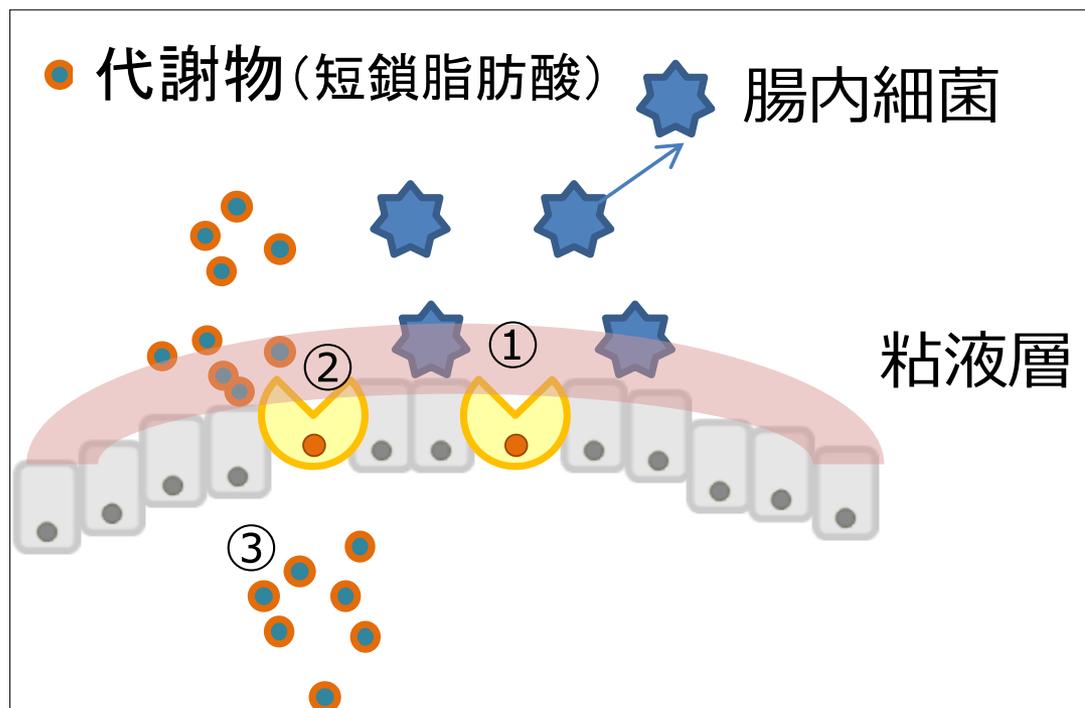
## 小腸にも多様な腸内細菌が存在している

### 【腸管免疫と腸内細菌の関係】

- ・腸内細菌が存在しない無菌マウスではパイエル板の数が減少する
- ・無菌マウスでは免疫寛容が成立しない

腸内細菌は腸管免疫に重要な役割を果たしている

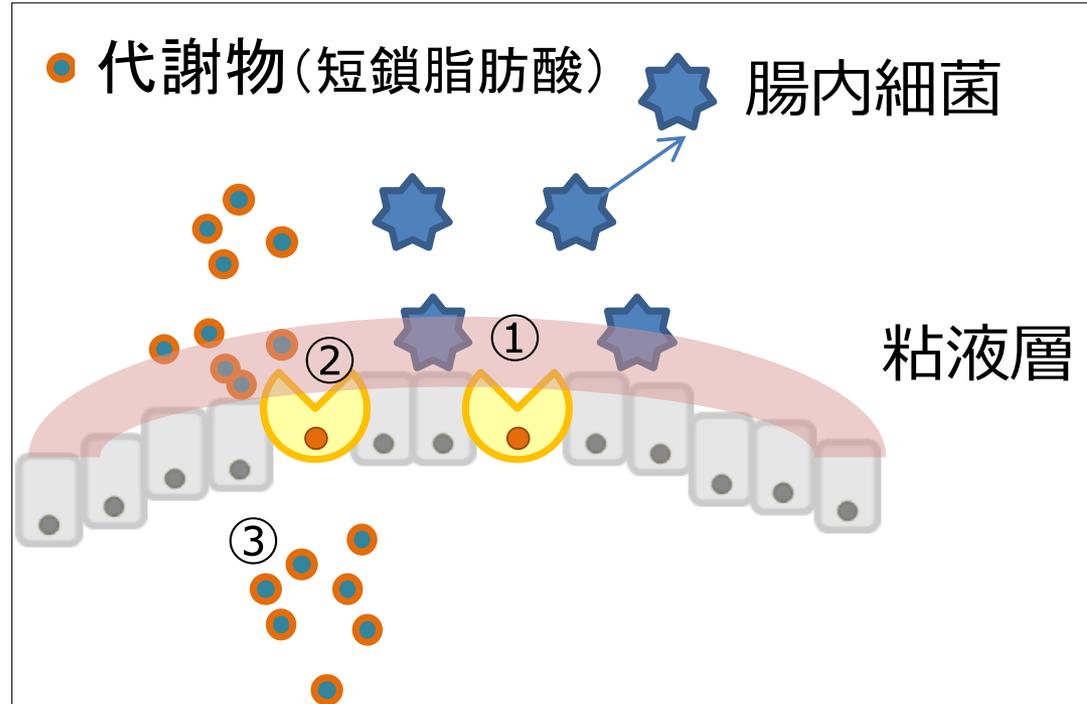
F-hiSIECは腸内細菌と相互作用可能かどうか検証した



## 【腸内細菌と生体小腸が相互作用する経路】

- ① 腸内細菌が直接上皮細胞に接触する
- ② 腸内細菌が産生する代謝物（短鎖脂肪酸）が上皮細胞に作用する
- ③ 短鎖脂肪酸が上皮から取り込まれ、局所・全身性に作用する

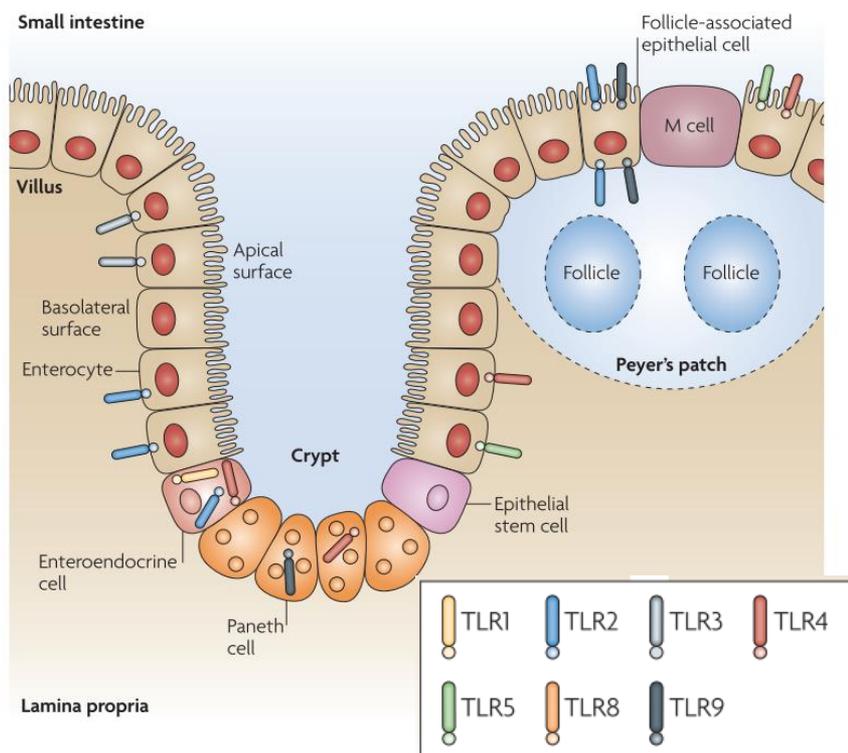
それぞれの経路についてF-hiSIECの応答性を評価した。



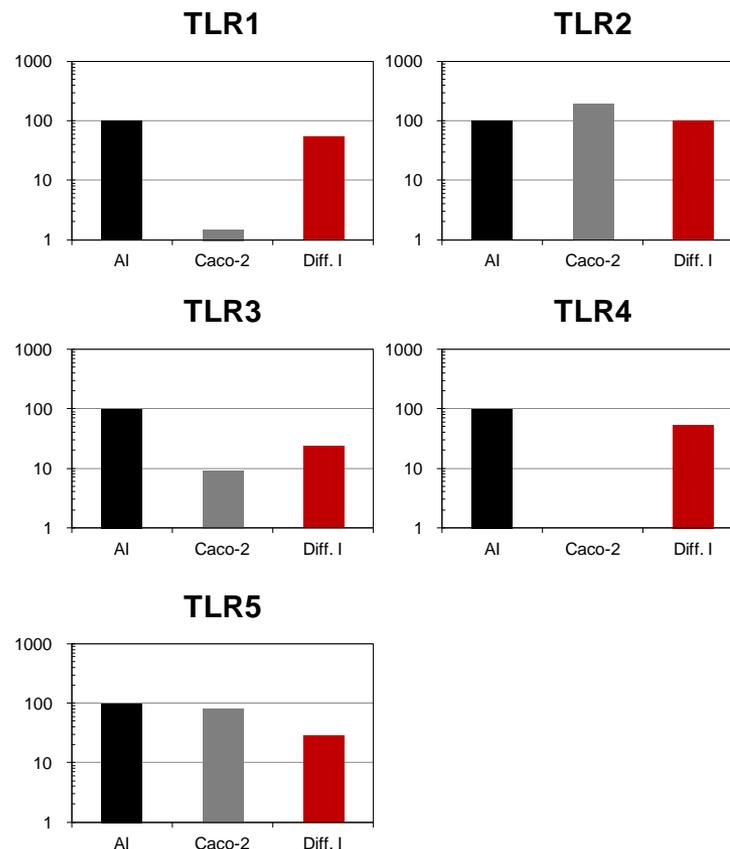
## 【腸内細菌と生体小腸が相互作用する経路】

- ① **腸内細菌が直接上皮細胞に接触する**
- ② 腸内細菌が産生する代謝物（短鎖脂肪酸）が上皮細胞に作用する
- ③ 短鎖脂肪酸が上皮から取り込まれ、局所・全身性に作用する

## パターン認識受容体 : Toll Like Receptors (TLRs)細菌、ウイルス由来成分を認識し、自然免疫を担う

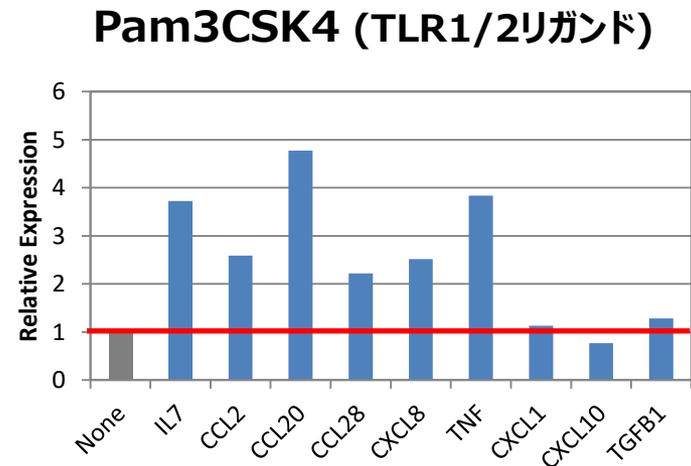
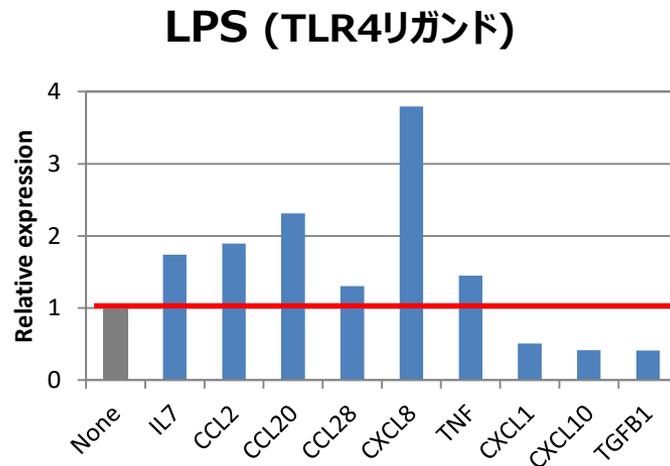


Nat Rev Immunol.,2010. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2707>

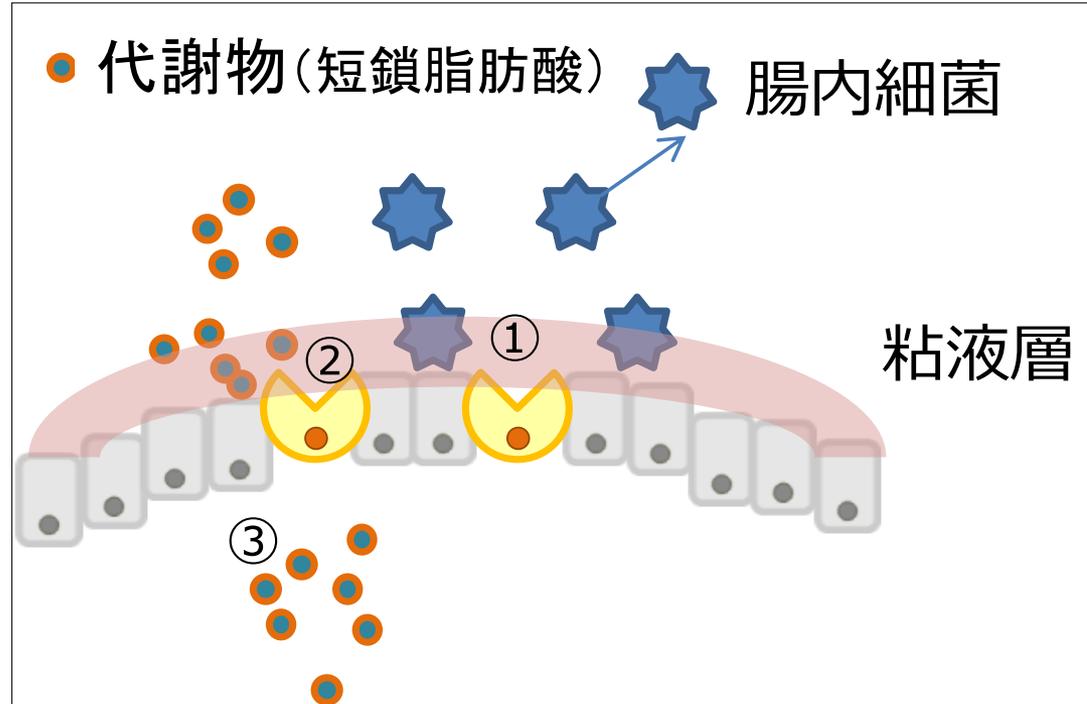


**F-hiSIECの主要なパターン認識受容体(TLRs)は、ヒト生体小腸と同程度の遺伝子発現を示した。**

LPS:100ng/mL、Pam3csk4:50ug/mLをそれぞれF-hiSIECに添加し、24h後のサイトカイン遺伝子発現をqPCRにて計測した。



**LPS (TLR4リガンド) およびPam (TRL1/2リガンド) 添加によって、F-hiSIECの炎症を促進させるサイトカインの発現量が上昇した。**



## 【腸内細菌と生体小腸が相互作用する経路】

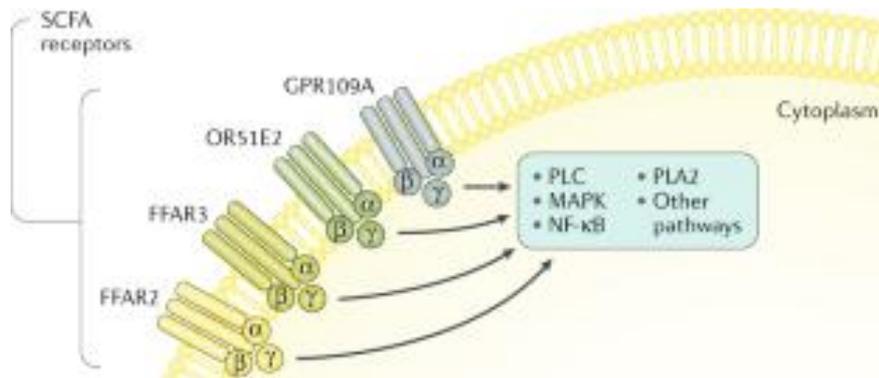
- ① 腸内細菌が直接上皮細胞に接触する
- ② 腸内細菌が産生する代謝物（短鎖脂肪酸）が上皮細胞に作用する
- ③ 短鎖脂肪酸が上皮から取り込まれ、局所・全身性に作用する

# F-hiSIECにおける短鎖脂肪酸受容体の発現

腸内細菌代謝物の影響

- 短鎖脂肪酸は免疫抑制性に作用
- 長鎖脂肪酸はバリア機能を向上

## 短鎖脂肪酸 (SCFA) の受容体

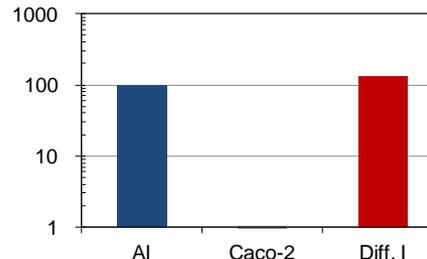


<https://www.nature.com/articles/s41575-019-0157-3>

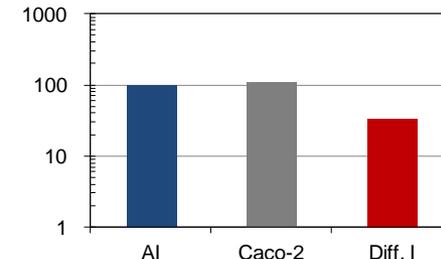
Receptor		SCFA substrate
FFAR2	GPR43	Ac, Pro
FFAR3	GPR41	Ac, Pro, Bu
HCAR2	GPR109A	Bu
OR51E1	GPR164	Bu
OR51E2	Olf78	Ac, Pro
GPR42		Pro

### 短鎖脂肪酸受容体

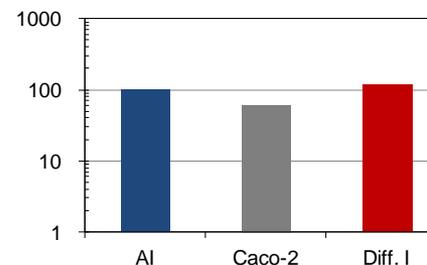
#### FFAR2 / GPR43



#### FFAR3 / GPR41

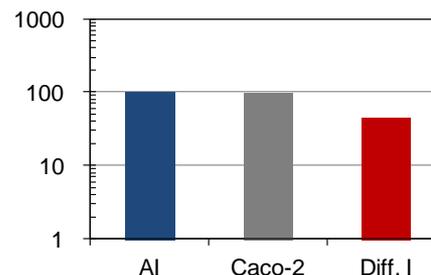


#### GPR109a

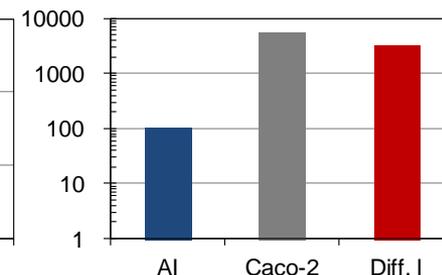


### 長鎖脂肪酸受容体

#### FFAR1 / GPR40



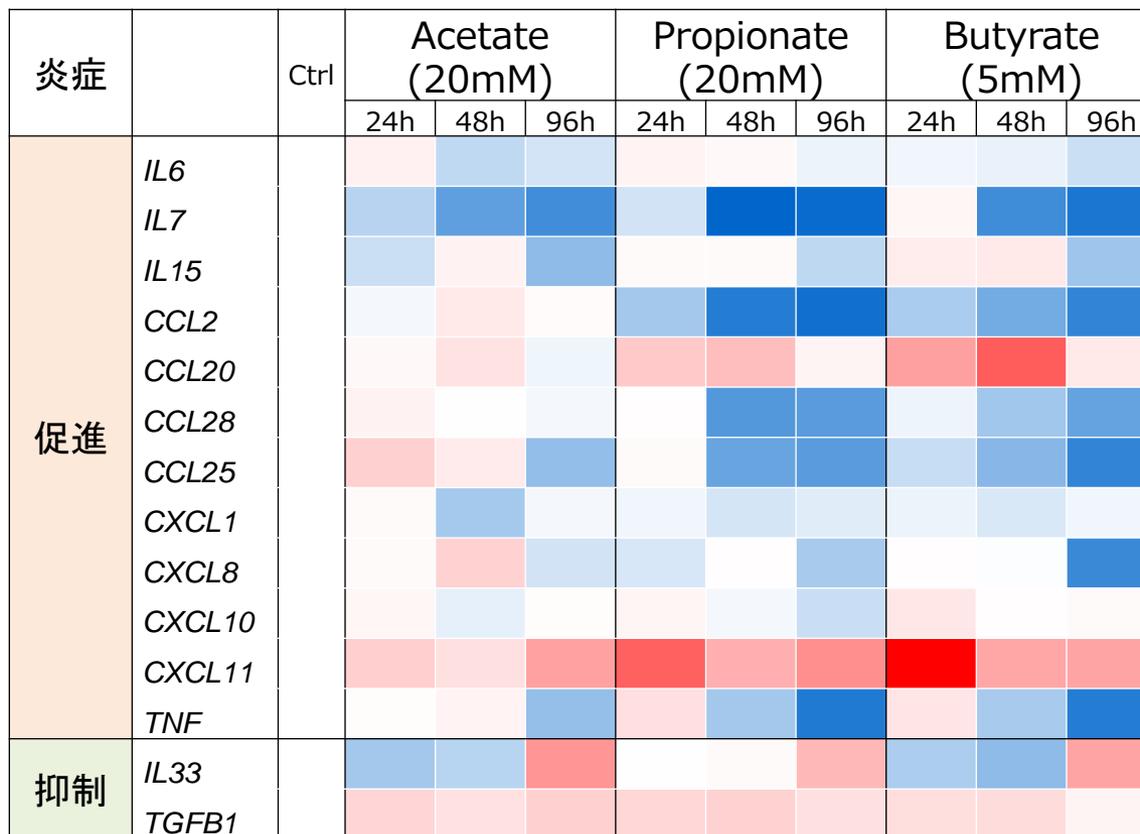
#### FFAR4 / GPR120



F-hiSIECの主要な脂肪酸受容体は、生体小腸と同程度の発現量を示した。

# 短鎖脂肪酸添加後の14遺伝子の発現変動

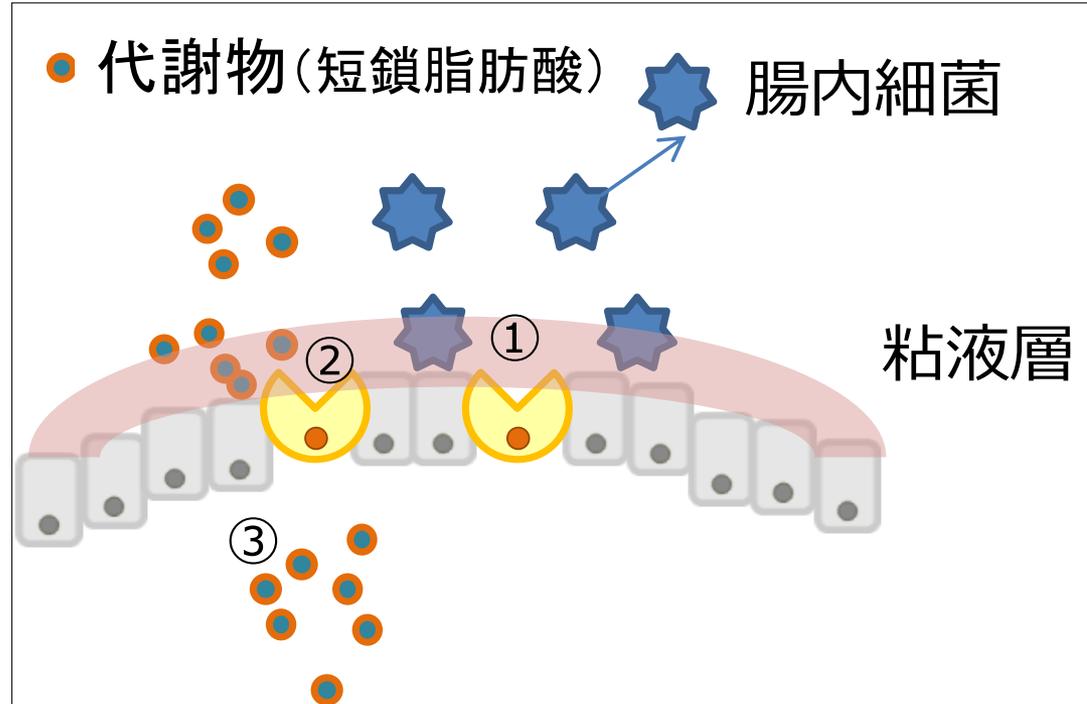
代表的な短鎖脂肪酸 (Acetate, Propionate, Butyrate) をF-hiSIECに添加し、経時でのサイトカイン・ケモカイン14遺伝子の発現をqPCRにて測定した。



遺伝子発現量  
Ctrlに比べて



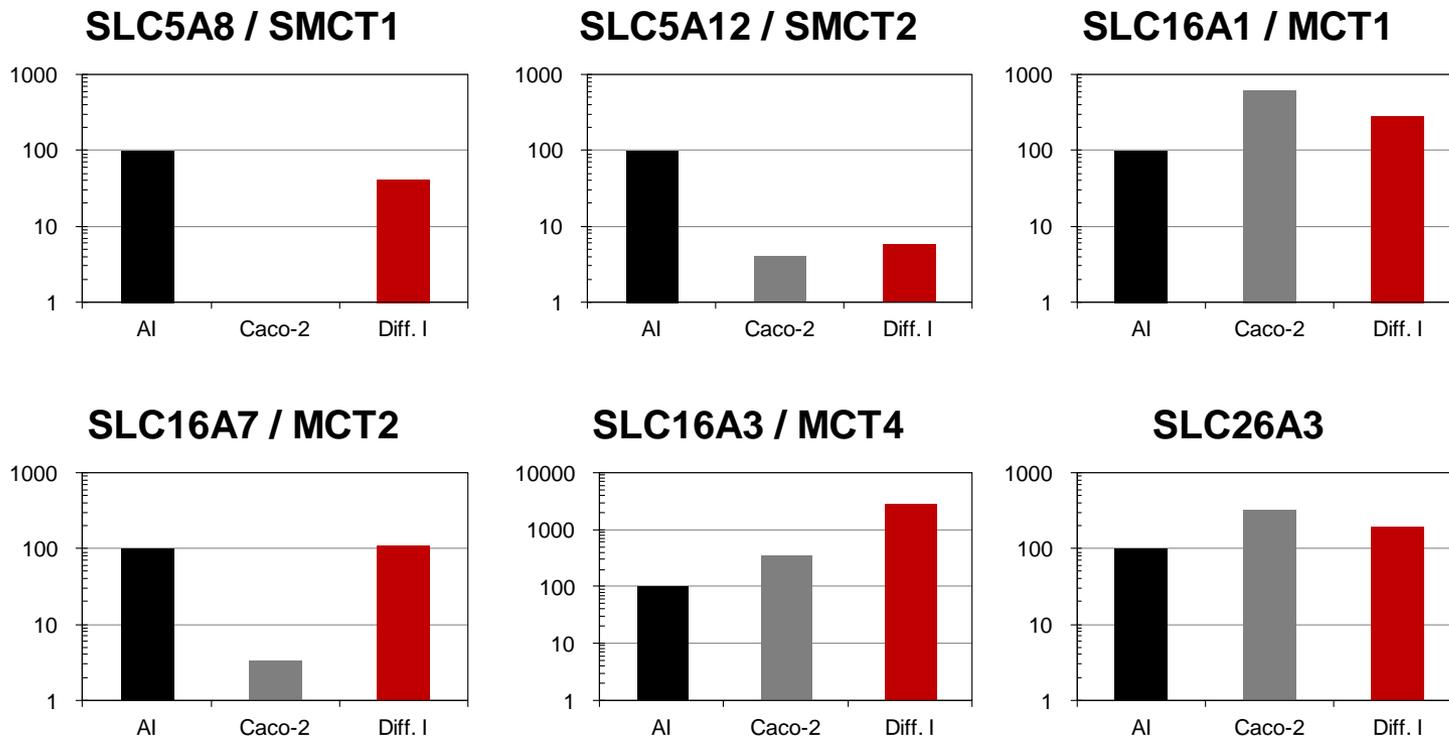
短鎖脂肪酸を添加すると経時的に炎症促進系の遺伝子発現が低下し、抑制系の発現が上昇した。



## 【腸内細菌と生体小腸が相互作用する経路】

- ① 腸内細菌が直接上皮細胞に接触する
- ② 腸内細菌が産生する代謝物（短鎖脂肪酸）が上皮細胞に作用する
- ③ 短鎖脂肪酸が上皮から取り込まれ、局所・全身性に作用する

## 短鎖脂肪酸トランスポーター



F-hiSIECの短鎖脂肪酸トランスポーターの発現量はヒト生体小腸と同程度であった。

✓F-hiSIECは腸内細菌由来因子を認識するパターン認識受容体（TRL1~5）を発現していた。

また、リガンドに応答して種々のサイトカインの発現が亢進した。

✓F-hiSIECは腸内細菌代謝物（短鎖脂肪酸）のレセプターを発現していた。

また、短鎖脂肪酸添加によって経時的に炎症促進系の遺伝子発現が低下し、抑制系の発現が上昇した。

✓F-hiSIECは短鎖脂肪酸トランスポーターをヒト生体小腸同程度に発現していた。

**F-hiSIECは腸管免疫評価モデルとしての応用が期待できる。**

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞

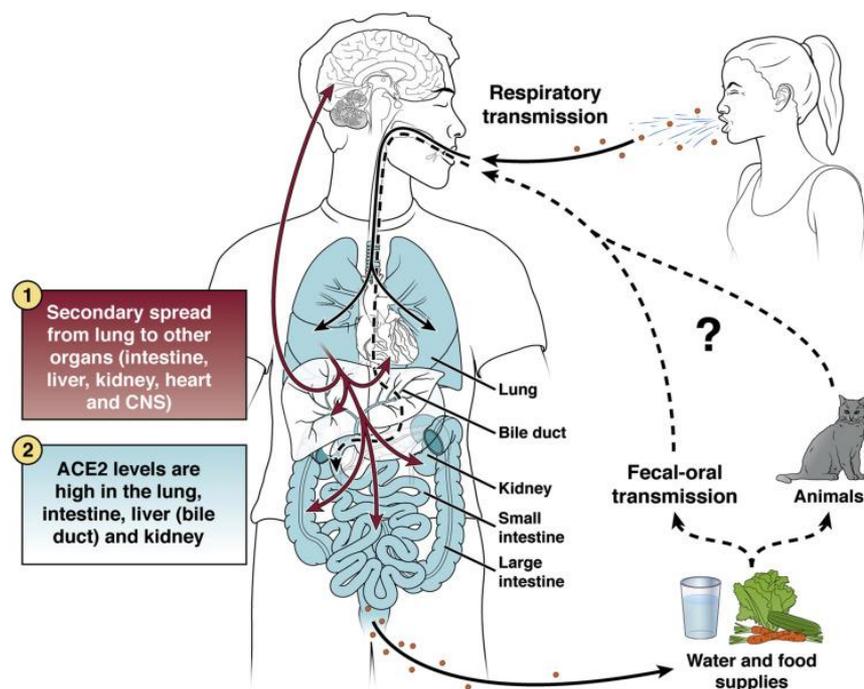
**F-hiSIEC™**

FUJIFILM human iPS-derived Small Intestine Epithelial like Cell



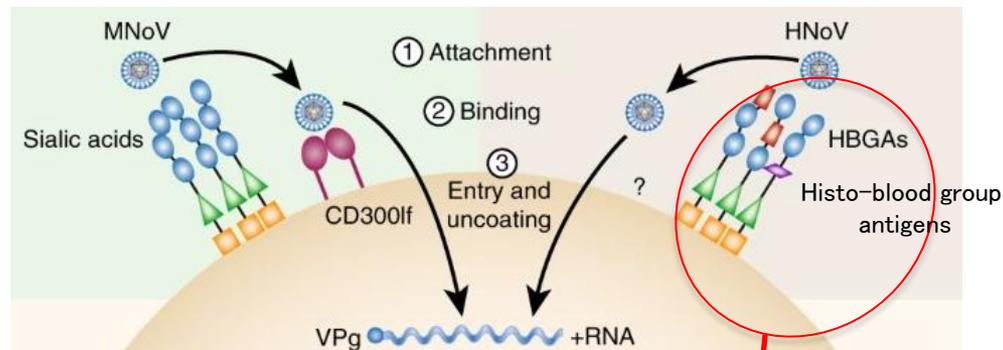
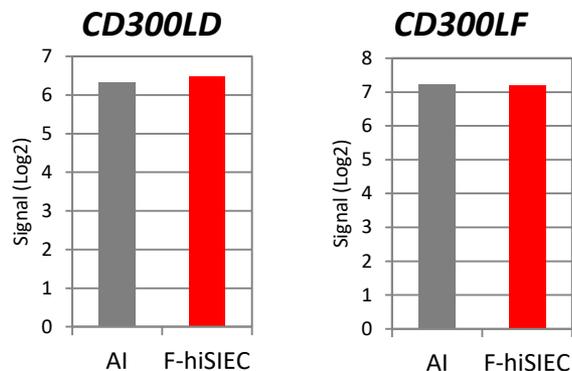
- 薬物間相互作用（酵素誘導）評価系
- 腸管免疫評価系
- 腸管ウイルス培養系の可能性

- ・小腸はノロウイルス、ロタウイルス、アデノウイルスなどの標的臓器として知られており、急性胃腸炎の原因となる。ノロウイルスはヒト小腸細胞でしか増殖しない。
- ・コロナウイルスも小腸に感染し、症状重篤化や、ふん便を介した経口感染で感染拡大を起こすとして注目されている。



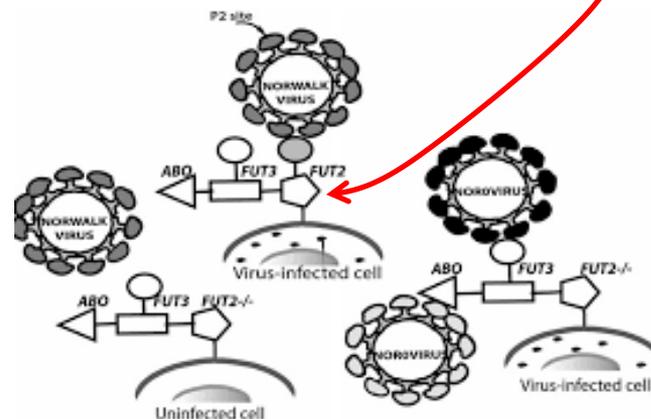
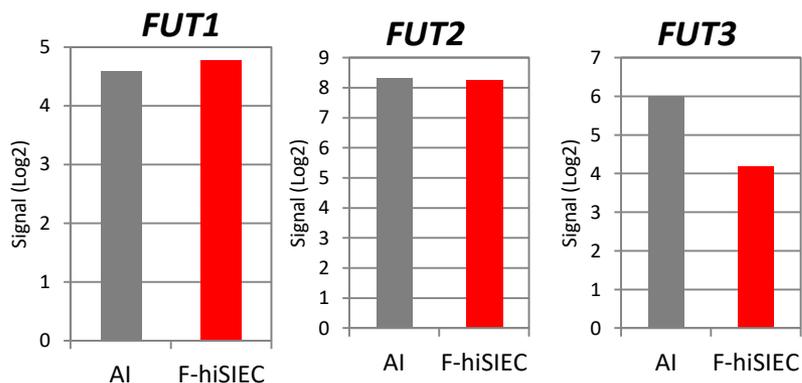
F-hiSIECにノロウイルス、コロナウイルス感染に必要な膜蛋白質が発現してるか検討を行った。

## ノロウイルス受容体（候補）



[Mucosal Immunology](#) volume 12, pages1259-1267(2019)

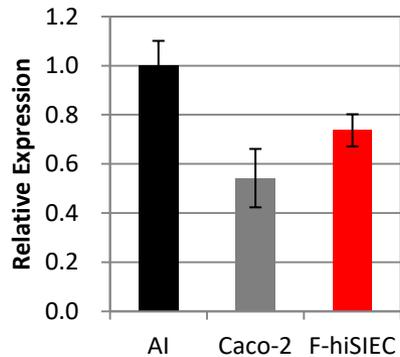
## フォース転移酵素



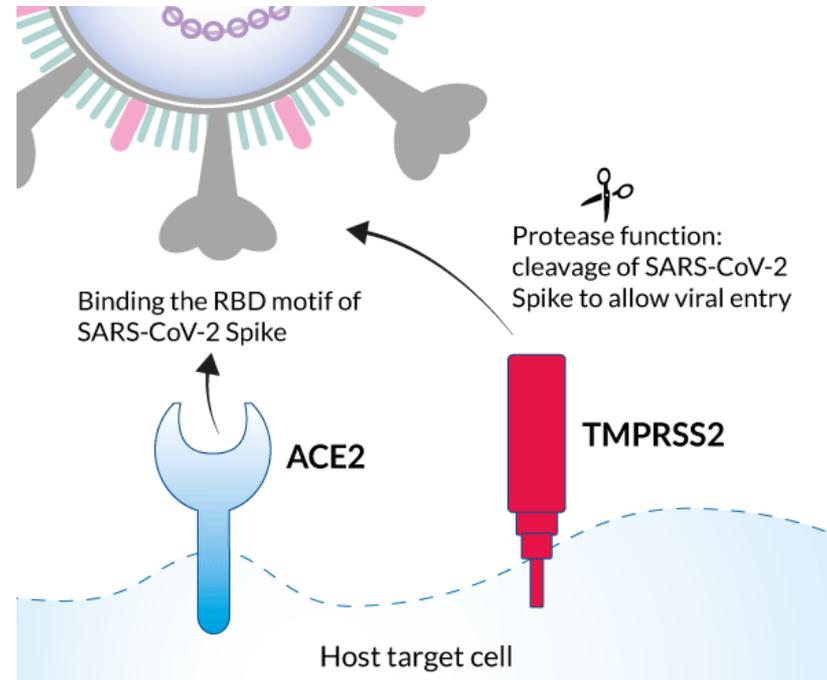
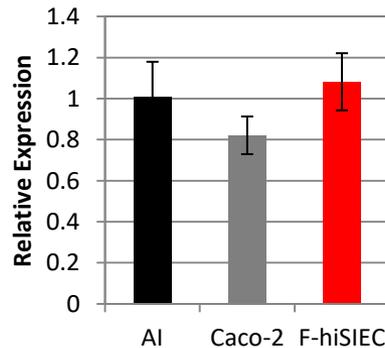
血液型抗原の合成に関与するフォース転移酵素 FUT1, FUT2(Se), FUT3

**F-hiSIECはノロウイルスの感染に必要とされる  
蛋白質を発現していた。**

## ACE2



## TMPRSS2



**F-hiSIECはコロナウイルスの感染に必要とされる膜蛋白質を発現していた。**

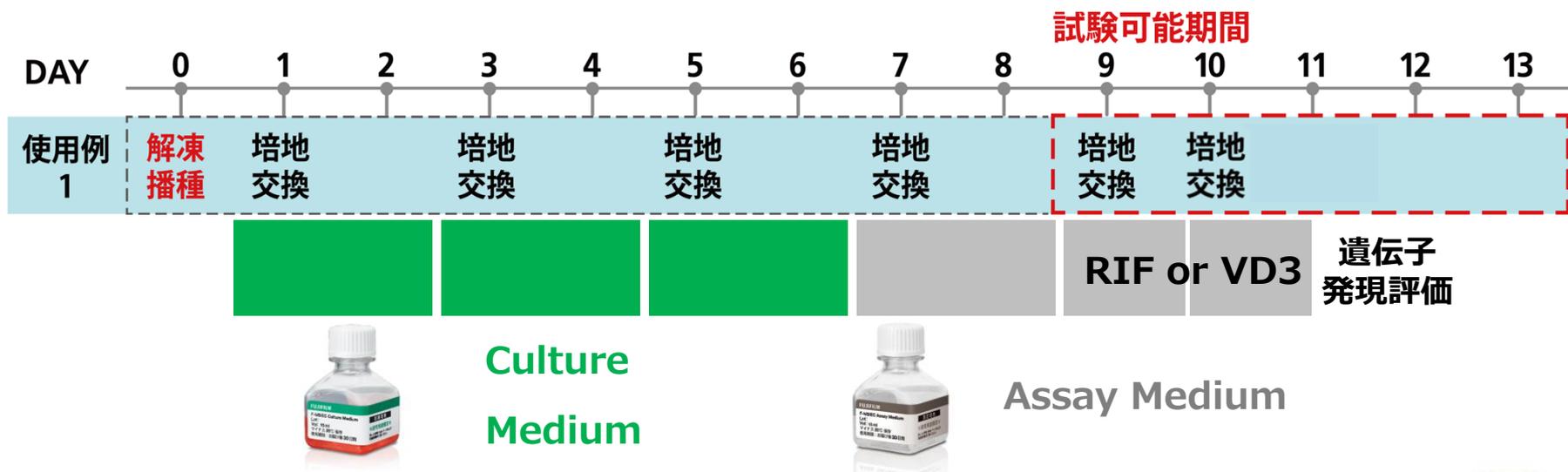
✓F-hiSIECはノロウイルス、コロナウイルスの感染に必要とされているCD300LD、  
CD300LF、FUT1-3並びにACE2、TMPRSS2を生体小腸同程度に発現していた。

**F-hiSIECは腸管ウイルス感染モデルとして応用が期待できる。**

# Appendix

## 使用例 1 の場合 :

- ① 既定のプロトコルに従い、セルカルチャーインサートにてDay7まで培養する。
- ② Day7、Assay Mediumにて培地交換する。
- ③ Day9、Assay MediumにDMSO(Vehicle), RIF, VD3を溶解して培地交換する。
- ④ Day10(誘導24hr後)、Day9と同様の培地を調製し、培地交換する。
- ⑤ Day11(誘導48hr後)、培地を吸引除去し、以降の解析を行う。
- ⑥ CYP3A4のmRNA発現量をVehicleと比較する。



## 使用例 2 の場合 :

- ① 既定のプロトコルに従い、セルカルチャーインサートにてDay8まで培養する。
- ② Day8、Assay Mediumにて培地交換する。
- ③ Day11、Assay MediumにDMSO(Vehicle), RIF, VD3を溶解して培地交換する。
- ④ Day12(誘導24hr後)、Day9と同様の培地を調製し、培地交換する。
- ⑤ Day13(誘導48hr後)、培地を吸引除去し、以降の解析を行う。
- ⑥ CYP3A4のmRNA発現量をVehicleと比較する。

