

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞(FUJIFILM human iPS cell-derived Small Intestinal Epithelial Cell; F-hiSIEC™)の特性と腸管吸収評価モデルとしての有用性

小椋 泉¹, 美馬 伸治¹, 今倉 悠貴¹, 後藤 俊¹, 柿沼 千早¹, 岩尾 岳洋², 松永 民秀², 山田 忠範¹, 島 賢一郎¹
¹富士フイルム株式会社 バイオサイエンス&エンジニアリング研究所, ²名古屋市立大学 大学院薬学研究所 臨床薬学分野

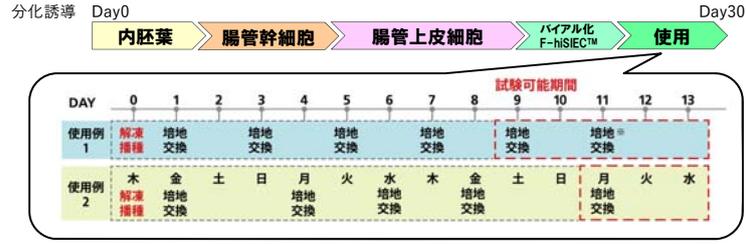
目的

経口剤の開発において腸管吸収を評価することは、薬物の有効性及び毒性を予測する上で重要である。現在、その評価系としてCaco-2細胞を使った*in vitro*試験や、マウス/ラットなどの動物を用いた動物試験が行われているが、代謝酵素/トランスポーターの発現量の違いや種差などによって、いずれもヒトの吸収を十分に予測することができていない。そこで我々は、ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞を分化誘導し、より動態予測精度の高いモデルの開発を試みた。

方法

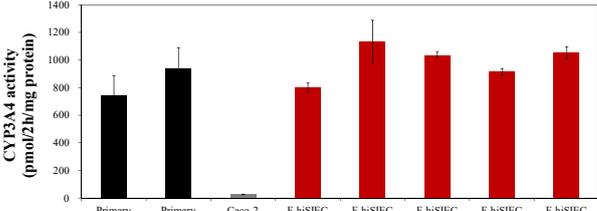
既報(Iwao, T. *et al. Drug Metab. Dispos.* **43**, 603-610 (2015))を基に新規の低分子化合物を加え、ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞へ分化誘導を行い、その細胞を製品化した(F-hiSIEC™)。この細胞をプレートや多孔膜上で培養し、ヒト小腸やCaco-2細胞との性能を比較した。

【分化誘導方法/F-hiSIECの使用法】



結果 -F-hiSIECの特性-

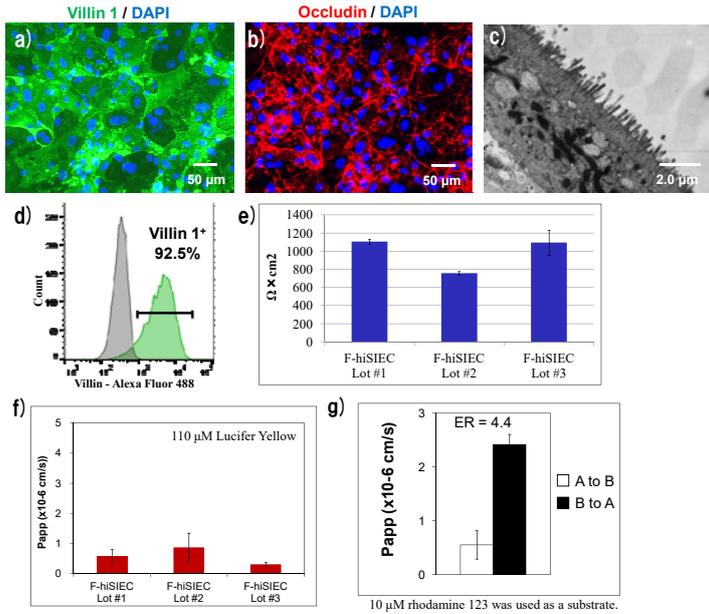
CYP3A4 活性



At terminal differentiation, the differentiated cells were incubated with intestinal differentiation medium containing 5 μM midazolam for 2 hours at 37 °C. Human Enterocytes (purchased from In Vitro ADMET Laboratories, Inc.) were used as primary small intestinal cells.

F-hiSIEC™のCYP3A4活性は、全てのLotでヒト初代腸管細胞と同程度を示した。

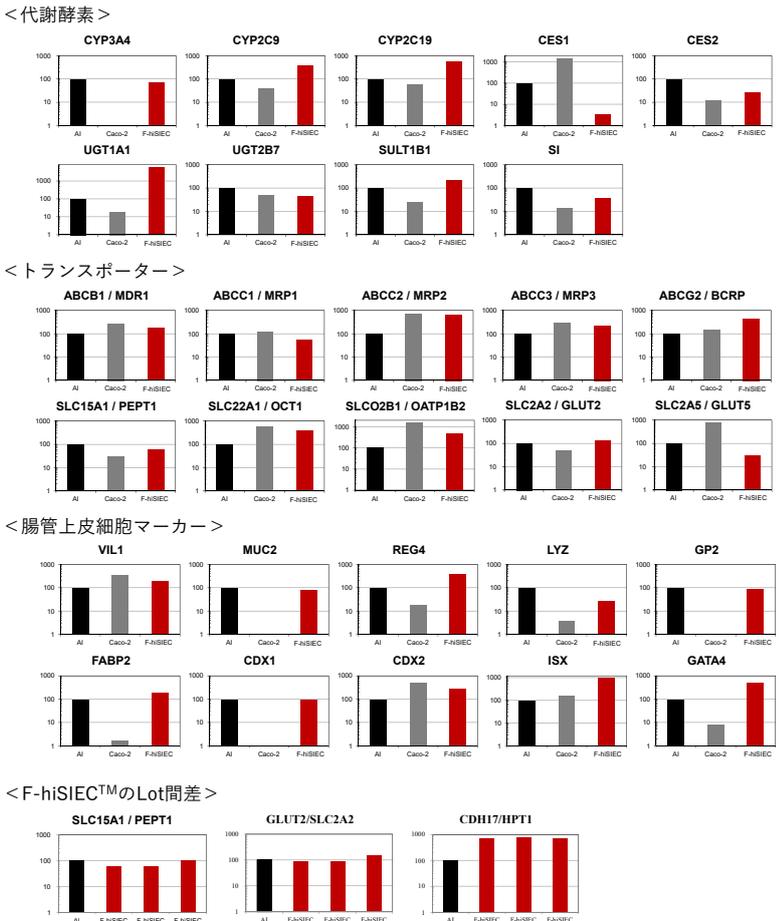
免疫染色、電子顕微鏡、FACS、バリア機能、トランスポーター活性



- Villin1 (上皮細胞マーカー) の発現が見られた (Fig. a)。
- Occludin (タイトジャンクション関連タンパク) が細胞間隙に局在していることを確認し、バリア機能 (TEER) も認めた (Fig. b, e)。また、Lucifer Yellowの透過も抑制した (Fig. f)。
- Villin1陽性細胞が90%以上の細胞集団であることを示した (Fig. d)。
- Apical側への微絨毛構造を確認した (Fig. c)。また、ER=4.4となり、極性を持つことを示した (Fig. g)。

遺伝子発現解析

Various gene expression of F-hiSIEC™ were measured by RT-PCR and compared with Adult Intestine (AI) and Caco-2. (Y-axis: relative mRNA expression)



- 種々の薬物代謝酵素(CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CES2, SULT1B1, Sucrase Isomaltase)はヒト小腸細胞 (AI)同等の発現量を示した。
- 薬物トランスポーター (ABCB1, ABCB2, ABCB3, ABCG2, SLC15A, SLC22A1, SLC22B1)の発現を示した。
- 様々な腸管上皮細胞のマーカー (MUC2; 杯細胞、REG4; 腸内分泌細胞、LYZ; パネート細胞、GP2; M細胞、villin 1; 上皮細胞) の発現を示した。
- Caco-2で株間差が報告されているPEPT1, HPT1, GLUT2の発現が、F-hiSIEC™では安定していることを示した。

まとめ

- F-hiSIEC™は、①ヒトPrimary同等のCYP3A4活性を有する事、②種々の代謝酵素/トランスポーター/腸管上皮細胞マーカーを発現していること、③微絨毛構造やバリア機能を持つことから、ヒト小腸細胞に近い性質をもつことが分かった。
- ヒトと動物/Caco-2には、代謝酵素、トランスポーターに表のような違いが報告されている。それに対し、F-hiSIEC™はヒトに近いことが示された。また、F-hiSIEC™はLot間差もCaco-2と比較し小さいことが示され、再現よく使用できる*in vitro*の評価系として期待できる。



	ヒト	動物	Caco-2	F-hiSIEC™
CYP3A4	活性あり	活性著しく高い (サル) 活性低い (ラット)	活性なし	活性あり
CES1/ CES2	CES2: 小腸 CES1: 肝臓 で主に発現	CES1, CES2共に発現 (サル) 発現無し (イヌ) 血液中にCES1あり (マウス、ラット)	発現量が CES1>CES2	発現量はCES1<CES2となりヒト生体と類似
UGT	各種発現	相関無し (ラット)	UGT1A1の発現低い	UGT1A1, UGT2B7共に発現
P-gp	活性あり	活性著しく高い (サル)	活性著しく高い	発現はヒト小腸同等で活性あり
PEPT1	活性あり	活性低い (マウス)	発現量低い	発現はヒト小腸同等で活性あり
個体、株間差		代謝酵素、トランスポーターなどの活性に個体差あり (マウス、ラット、イヌ、サル)	PEPT1, HPT1, GLUT2の発現量に差あり	代謝酵素、トランスポーターの発現量にLot間差なし

引用文献: Furukawa T *et al.*, *Xenobiotica*, **44**, 209(2014), Akahane T *et al.*, *Drug Metab Dispos.* **38**, 308(2010), Komura H *et al.*, *Drug Metab Rev.* **43**, 476(2011), 小村弘 薬物動態, *Xenobiot Metabol. And Dispos.* **15**, 159(2000), Hayashi R *et al.*, *Eur J Pharm Sci.* **18**, 35, 383(2008), Behrens I *et al.*, *J Pharm Sci.* **93**, 1743(2004), Yongjun Hu *et al.*, *Biochem Pharmacol.* **107**, 81(2016)