第35回日本薬物動態学会年会

# ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞（F-hiSIEC™）の特性と吸収予測精度改善の検討


2020年12月1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™

FUJIFILM human iPS-derived Small Intestine Epithelial like Cell



### 凍結バイアル品の使用方法

試験可能期間

| DAY | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 使用例1 | 解凍播種 | 培地交換 | | 培地交換 | | 培地交換 | | 培地交換 | | 培地交換 | | 培地交換※ | | |
| 使用例2 | 木<br>解凍播種 | 金<br>培地交換 | 土 | 日 | 月<br>培地交換 | 火 | 水<br>培地交換 | 木 | 金<br>培地交換 | 土 | 日 | 月<br>培地交換 | 火 | 水 |

- 名古屋市立大学松永教授との共同研究で腸管上皮細胞分化プロトコルを検討
- ヒトiPS細胞から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

# F-hiSIECの特徴 –CYPs活性-



| | 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 |

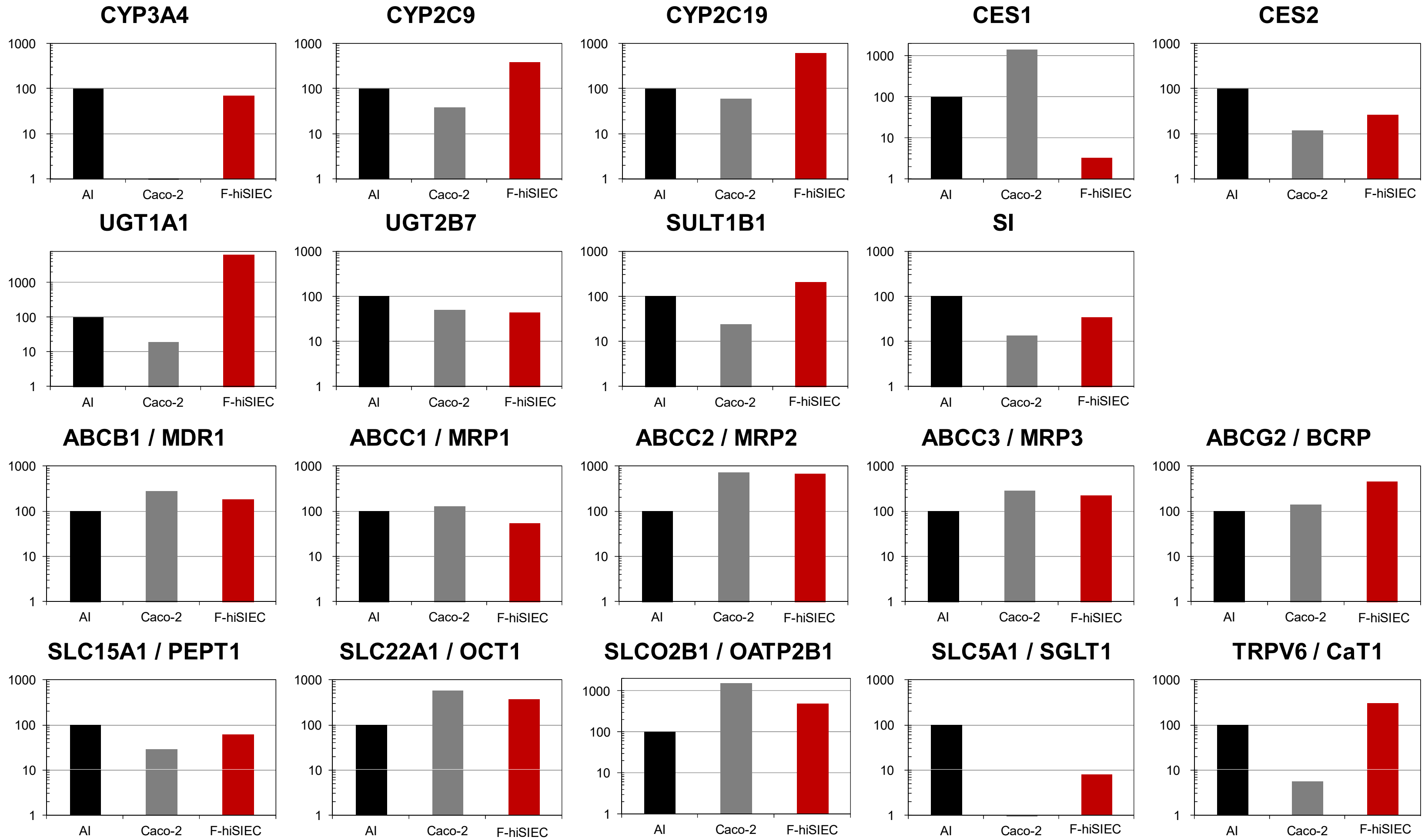
Each cells were incubated with 5 μM midazolam, 5 μM diclofenac, 45.7 μM (S)-mephenytoin, 5 μM bufuralol, 40 μM phenacetin for 2 h at 37℃. *CYP3A4/5 in F-hiSIEC was measure with F-hiSIEC assay medium. The supernatants were collected and the metabolites were measured by UPLC–MS/MS. All data are presented 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はヒト生体小腸と類似のCYPs活性を示した**

FUJIFILM
Value from Innovation

# F-hiSIECの特徴 –遺伝子発現-

NEVER STOP




・F-hiSIECは薬物動態予測に必要な主要な代謝酵素・トランスポーターを生体小腸同程度に発現していた。

（その他、排出トランスポーターのEfflux ratio、ロット間での安定性などは弊社HPをご参照ください）

# Agenda



- 薬物間相互作用(酵素誘導)評価系
- 動態予測精度改善検討

# Agenda



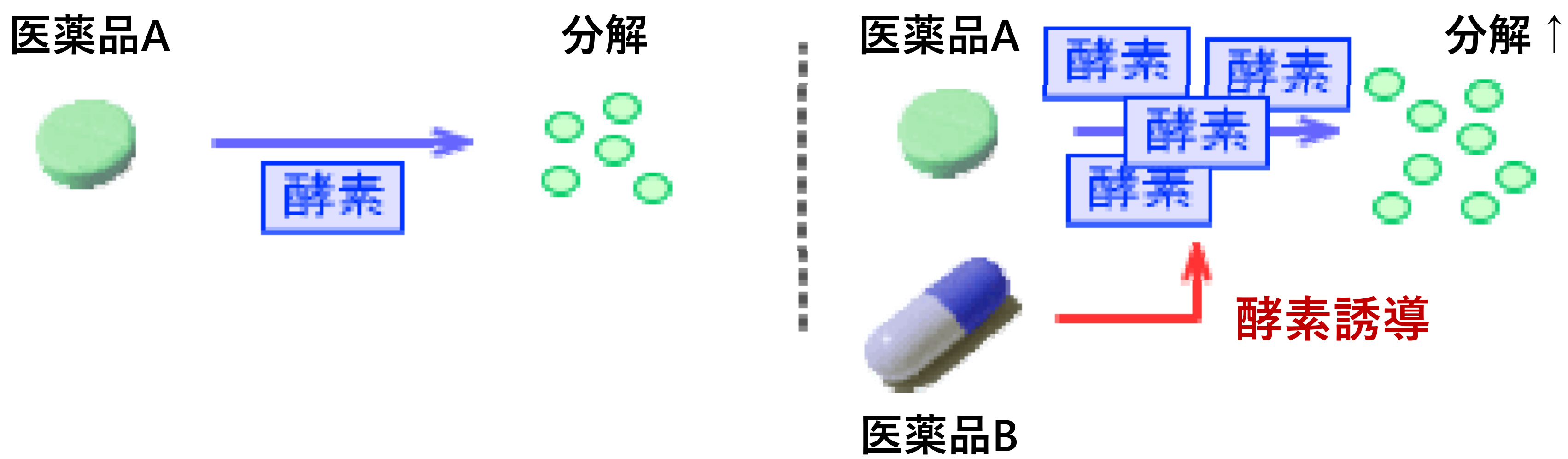
- **<u>薬物間相互作用(酵素誘導)評価系</u>**

- 動態予測精度改善検討

# 薬物間相互作用（酵素誘導）の評価 –背景–

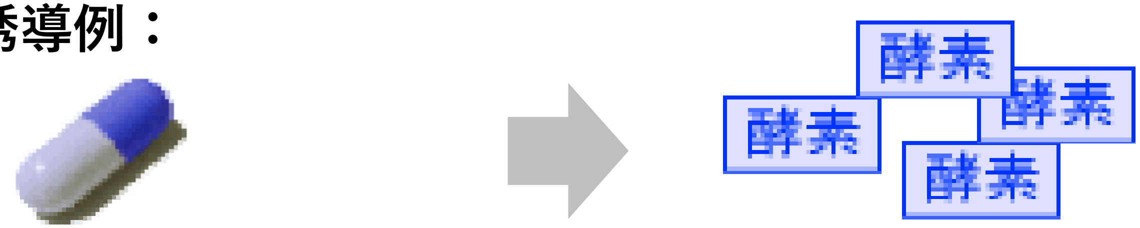
FUJIFILM
Value from Innovation

**通常時**　　　　　　　　**酵素誘導時**




**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：**



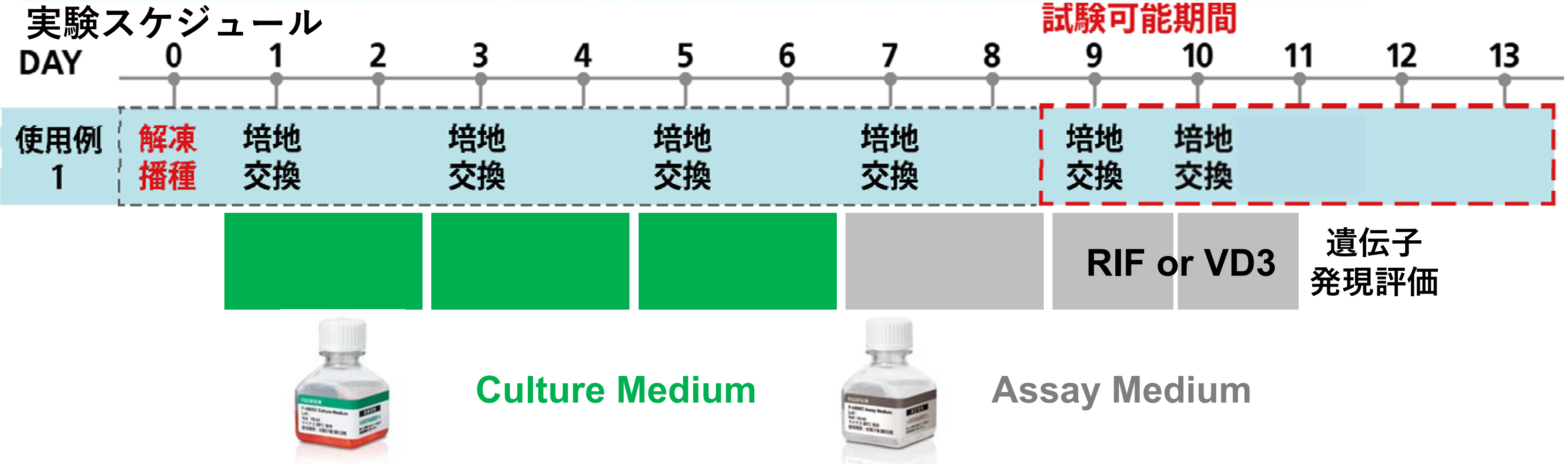

Rifampicin, Vitamin D3等の暴露　　　CYP3A4発現量の上昇

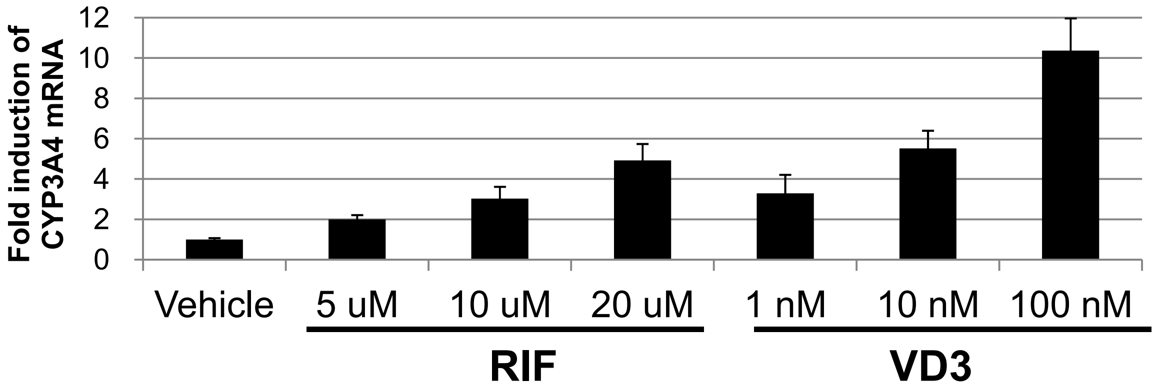
**F-hiSIECを用いた酵素誘導の評価系を検討した**

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞
F-hiSIEC™
FUJIFILM human iPS-derived Small Intestine Epithelial like Cell

NEVER STOP

# 酵素誘導の評価 –スケジュールと結果–




・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

→ CYP3A4の誘導を評価できるプロトコルを確立した

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞

F-hiSIEC™

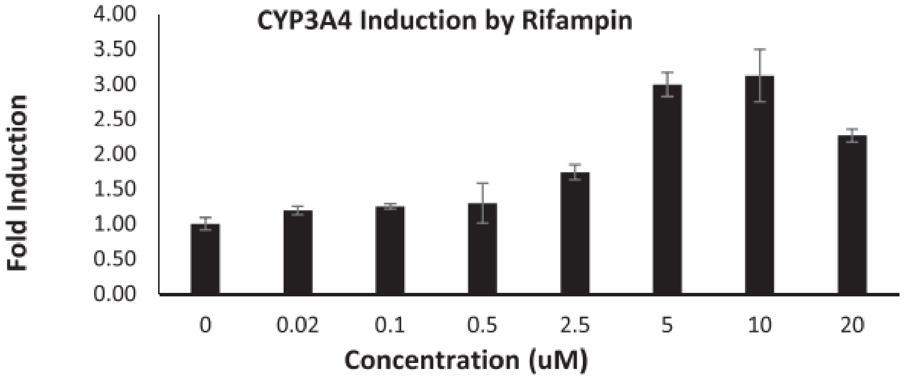
FUJIFILM human iPS-derived Small Intestine Epithelial like Cell

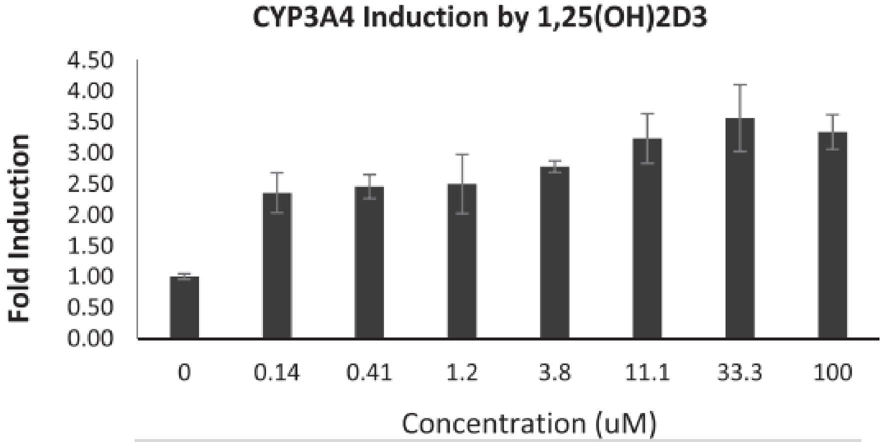
Induction of CYP3A4 mRNA expression levels in F-hiSIEC on cell culture insert. Differentiated cells were treated with 1α,25-dihydroxyvitamin D3 (VD3) or rifampicin (RIF) for 48 hours at terminal differentiation.

# 酵素誘導の評価 –ヒト生体小腸との比較–

FUJIFILM
Value from Innovation

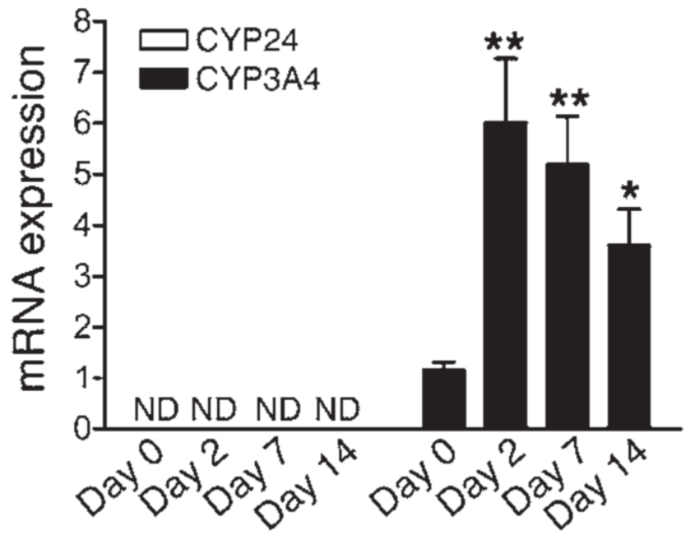
*Drug Metab. Dispos.* **46**, 1562 (2018).




ヒト浮遊小腸細胞にRIF, VD3を暴露
→ 2~3倍程度の上昇

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



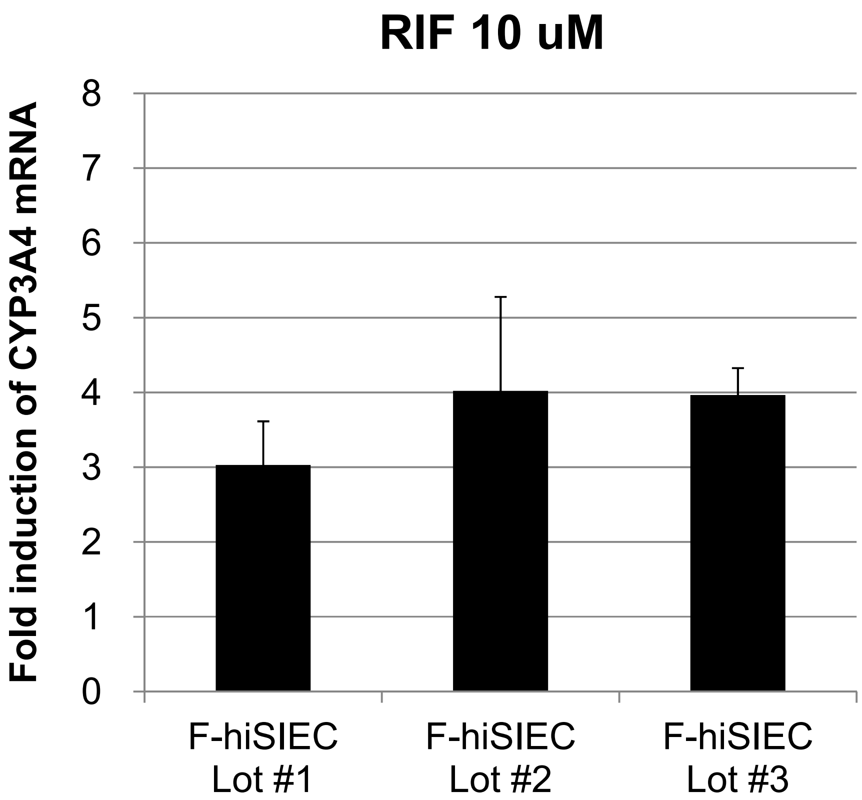

ヒトにRIFを経口投与
→ 3~6倍程度の上昇

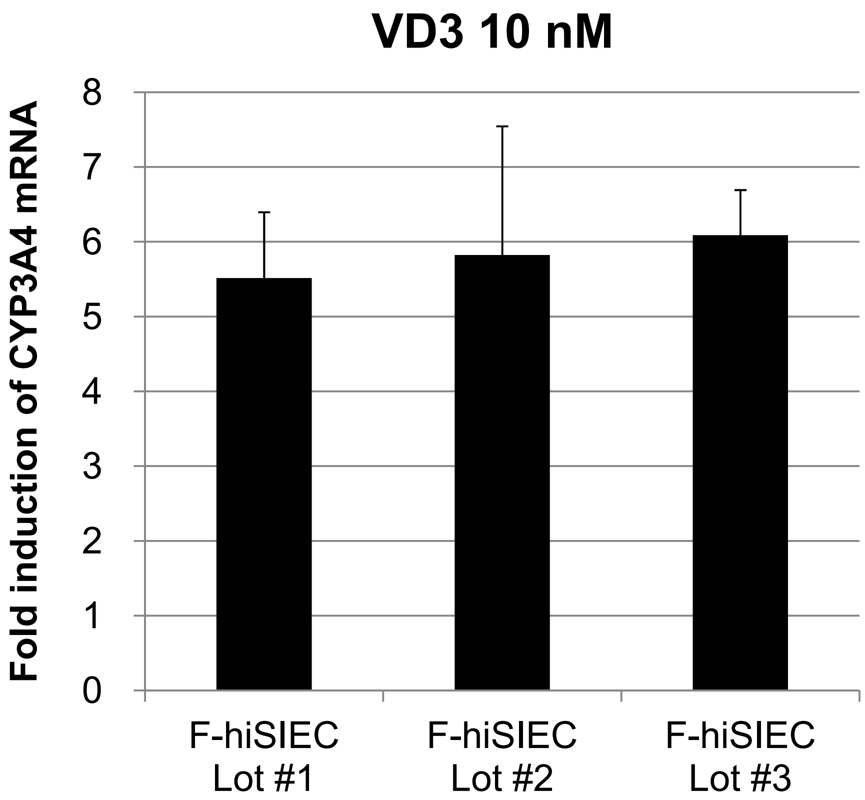
**F-hiSIECで見られたCYP3A4発現量の上昇率は、既報のヒト生体小腸の結果と同程度であった**

# 酵素誘導の評価 –ロット間差の比較–

FUJIFILM
Value from Innovation

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




**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

NEVER STOP

# 酵素誘導の評価 –まとめ–

FUJIFILM
Value from Innovation

✔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、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

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞
F-hiSIEC™
FUJIFILM human iPS-derived Small Intestine Epithelial like Cell

NEVER STOP

# Agenda



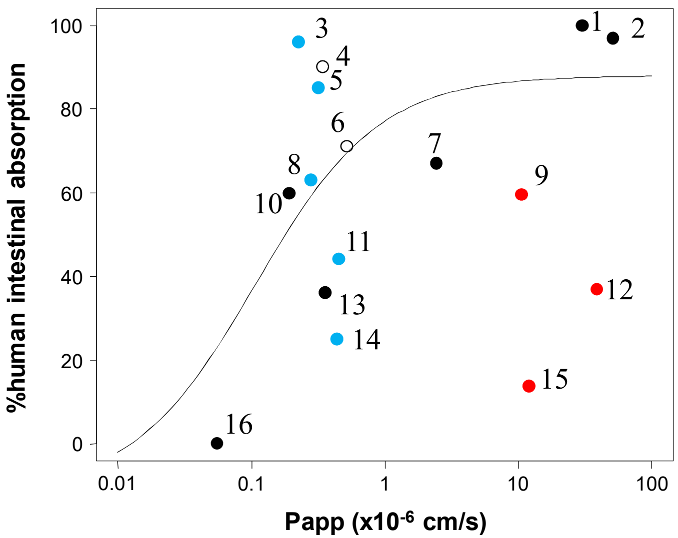
・薬物間相互作用（酵素誘導）評価系

**・動態予測精度改善検討**

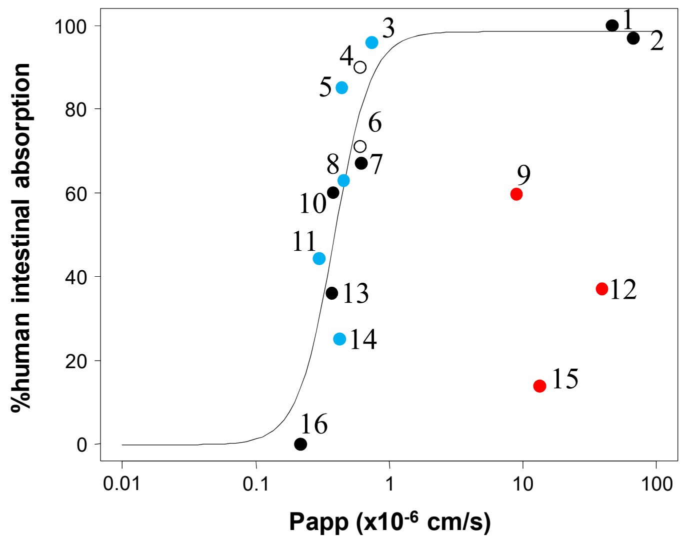
# F-hiSIECを用いた薬物透過性試験

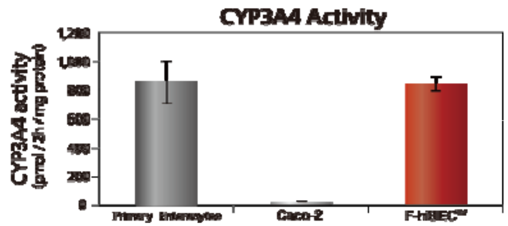
FUJIFILM Value from Innovation

**Caco-2 ($R^2$ = 0.37*)**




**F-hiSIEC ($R^2$ = 0.76*)**




● Standard ● Transporter ● CYP3A4 ○ Others

1.Antipyrine , 2.Caffeine, 3.Cephalexin, 4.Acebutolol, 5.Ribavirin, 6.Metformin, 7.Hydrochlorothiazide, 8.Indinavir, 9.Verapamil, 10.Enalapril, 11.Erythromycin, 12.Midazolam, 13.Sulpiride, 14.Lisinopril, 15.Tacrolimus, 16.Lucifer yellow.

*$R^2$ scores were determined exclude CYP3A4 substrates (9, 12 and 15).

**・F-hiSIECを用いた吸収評価モデルでは、標準化合物やトランスポーターの基質となる薬物の透過係数はFaとの相関が高かった。**

**・細胞あたりのCYP3A4活性は生体小腸同様にもかかわらず、CYP3A4の基質の予測精度は低かった。**

ヒトiPS 細胞由来腸管上皮細胞

F-hiSIEC™

FUJIFILM human iPS-derived Small Intestine Epithelial like Cell

NEVER STOP

# 生体小腸とF-hiSIECの違い

FUJIFILM
Value from Innovation

## F-hiSIECの病理切片


細胞は扁平で面積あたりの蛋白質量（代謝酵素量）が少ない

≠

## 生体小腸の模式図

円柱上皮細胞が密集し並んでいる

*仮説：F-hiSIECでは酵素量が少ないため、代謝酵素活性の寄与分がPappに反映していない？*

→F-hiSIECの分化誘導プロトコルを改良し、細胞の分化度（質）は変えずに、細胞密度を高めるような検討を行った。



大半の細胞が円柱上皮様となる培養プロトコルの開発に成功した。

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞
F-hiSIEC™
FUJIFILM human iPS-derived Small Intestine Epithelial like Cell

NEVER STOP

# 改良品の特徴

FUJIFILM
Value from Innovation

| | F-hiSIEC | 改良品 |
|---|---|---|
| 蛋白質量(μg)# | 74±8 | 292±16 |
| 代謝物(水酸化ミダゾラム(pmol)) | 11.7±0.1 | 90.2±3.7 |
| ミダゾラムPapp | 43.0±2.3 | 30.8±2.6 |
| ミダゾラムPapp ＋ケトコナゾール | 45.3±2.0 | 35.2±1.3 |

n.s.　　＊ P<0.05

#セルカルチャーインサート上の総タンパク質量

実験条件　ミダゾラム濃度:10μM、時間:1h、培地:HBSS、ケトコナゾール濃度:20μM

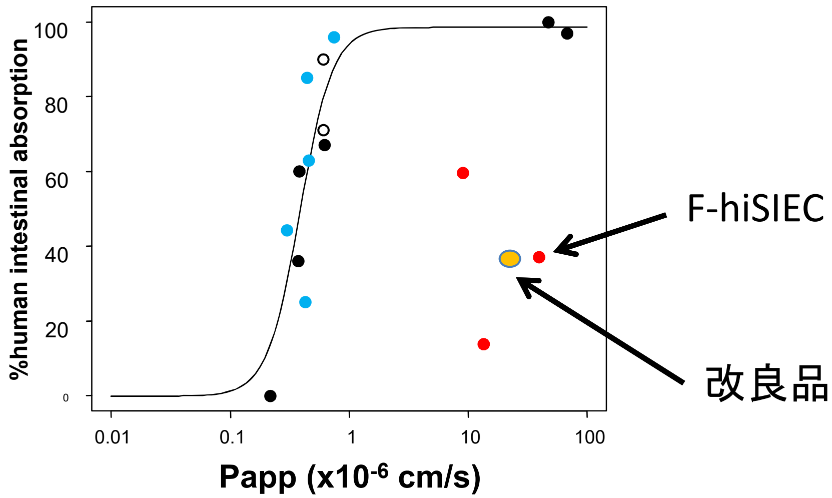
・改良品において、蛋白質量は4倍、代謝物（水酸化ミダゾラム）量は8倍に増加した。

・F-hiSIECではケトコナゾール（CYP3A4阻害剤）処理でPappに有意な差は見られなかったが、改良品ではケトコナゾール処理によってのPappが有意に増加した。

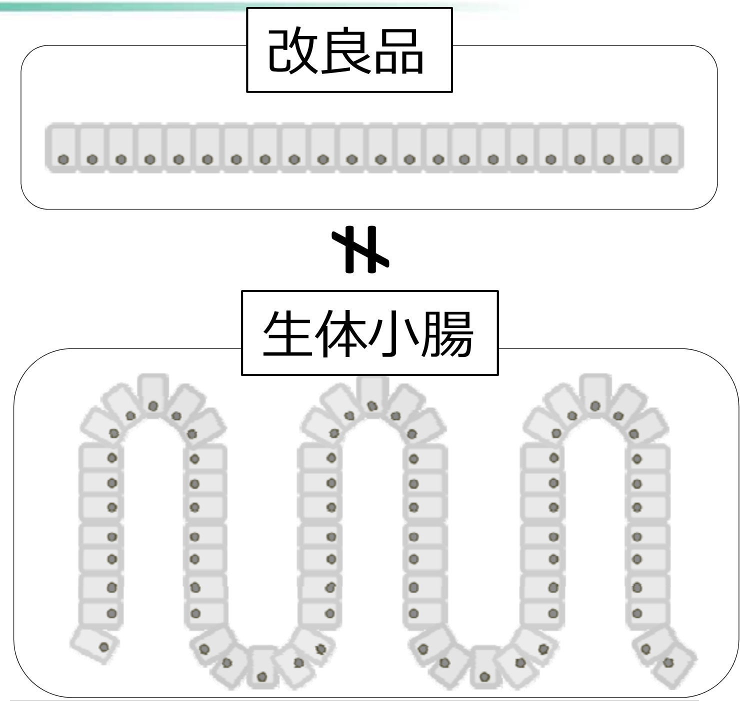
ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞
F-hiSIEC™
FUJIFILM human iPS-derived Small Intestine Epithelial like Cell

NEVER STOP

# まとめと今後の検討




今回の改善でもまだ相関曲線とは乖離




生体小腸では腸絨毛で更に細胞の集積率を高めている。

・改良品では細胞組織としての代謝活性は向上したが、Pappに与える影響は限定的であった。

・予測精度の高い動態モデルを構築するためには、細胞一つ一つの特性に加えて、組織構造も再現したい組織に近づけて行くことが重要。引き続き検討を継続する。

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞
F-hiSIEC™
FUJIFILM human iPS-derived Small Intestine Epithelial like Cell