P-42

ご質問ございます方、ポスターPDFを
ご希望の方は、下記にご連絡ください。
yuki.imakura@fujifilm.com

FUJIFILM

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の特性と代替モデルとしての有用性

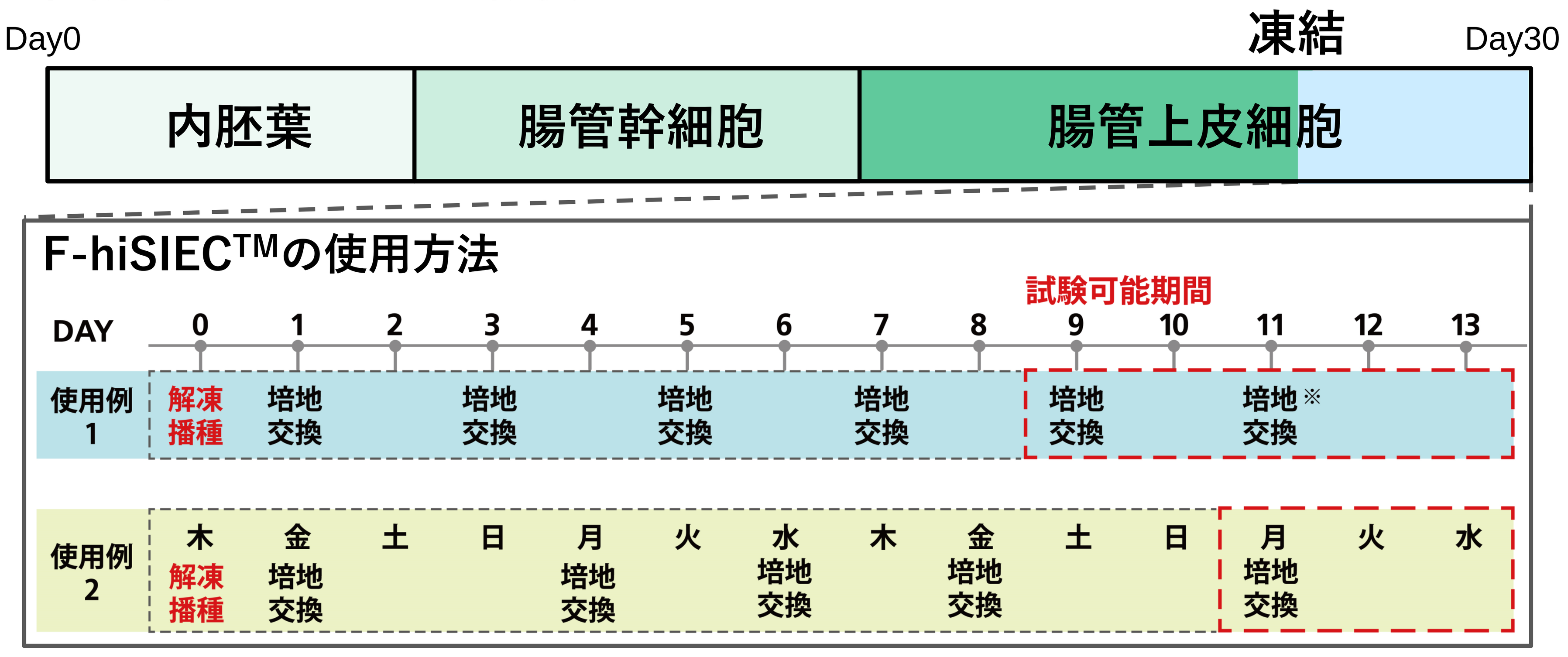
〇今倉 悠貴[1]、美馬 伸治[1]、山﨑 奈穂[1]、岩尾 岳洋[2]、松永 民秀[2]、永田 幸三[1]、谷口 雅彦[1]
([1]富士フイルム株式会社 R&D統括本部 バイオサイエンス&エンジニアリング研究所、[2]名古屋市立大学 大学院薬学研究科 臨床薬学分野)

要旨

【背景・目的】小腸は、食品や医薬品の吸収・代謝を担う消化器官としての役割に加え、人体最大の免疫器官として、また各種ウイルス感染症の標的臓器としても知られている。現在、ヒト小腸の代替モデルとして、Caco-2細胞や実験動物が用いられているが、ヒト生体との乖離が問題となっている。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、ヒト生体に近い性質を有する*in vitro*モデルの構築を試みた。
【方法】既報(Iwao, 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の分化誘導法を確立し、F-hiSIEC™を開発した。本製品(ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞)について、種々の性能を評価した。
【結果】1)腸管上皮細胞のマーカー、代謝酵素及びトランスポーターのmRNA発現がヒト生体小腸とほぼ同等であった。2)複数ロット間で安定した代謝酵素活性やトランスポーター活性を示した。3)薬物による代謝酵素の発現誘導が観察され、薬物間相互作用の評価に用いられることが示された。4)薬物の腸管吸収性をCaco-2細胞よりも高い精度で予測できることが示された。5)杯細胞、M細胞等の小腸上皮に存在する6種の細胞が含まれていた。6)Toll様受容体を介した免疫応答を評価できることが示された。7)ノロウイルスや新型コロナウイルスの感染に関わる膜蛋白質について、ヒト生体小腸同等のmRNA発現を示した。
【結語】 本細胞はヒト生体に近い性質を有し、動態や毒性、免疫応答、あるいはウイルスの影響を評価するヒト小腸代替*in vitro*モデルとして、有用なツールとなることが期待される。

方法

分化誘導プロトコルの概要

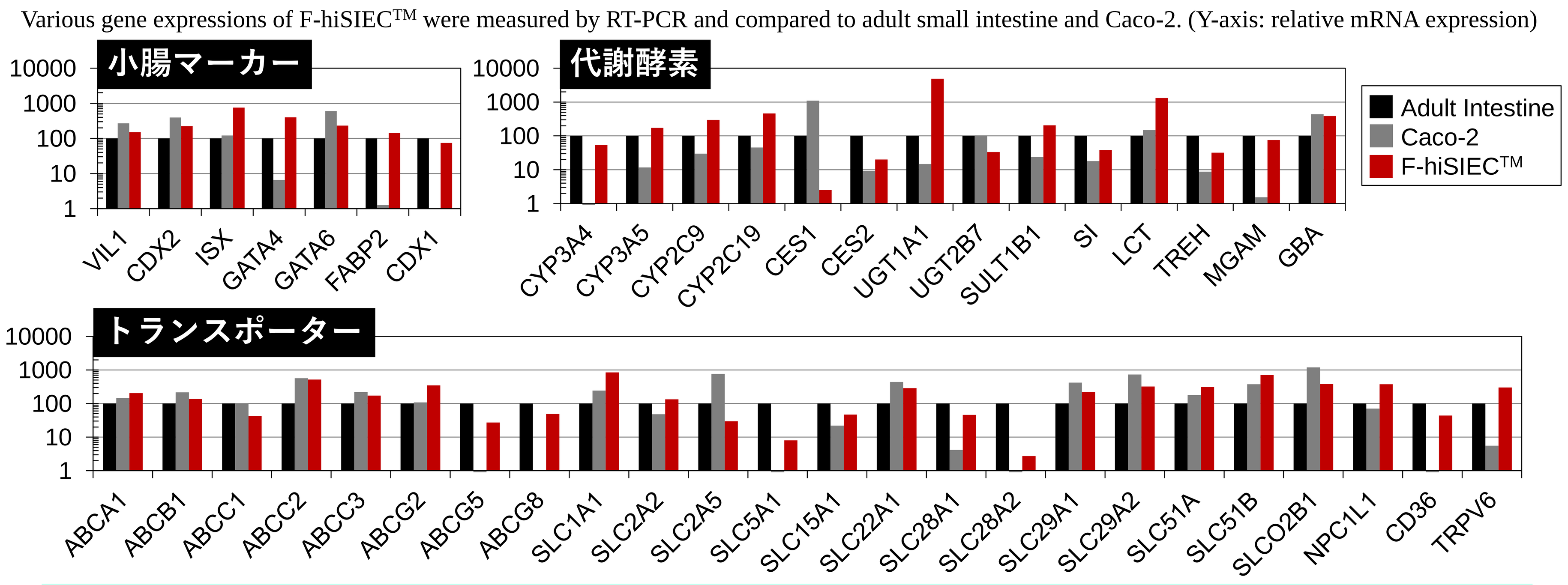


凍結保存可能なヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞(F-hiSIEC™)を開発し、特性を評価した。

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の特性と薬物動態評価への応用

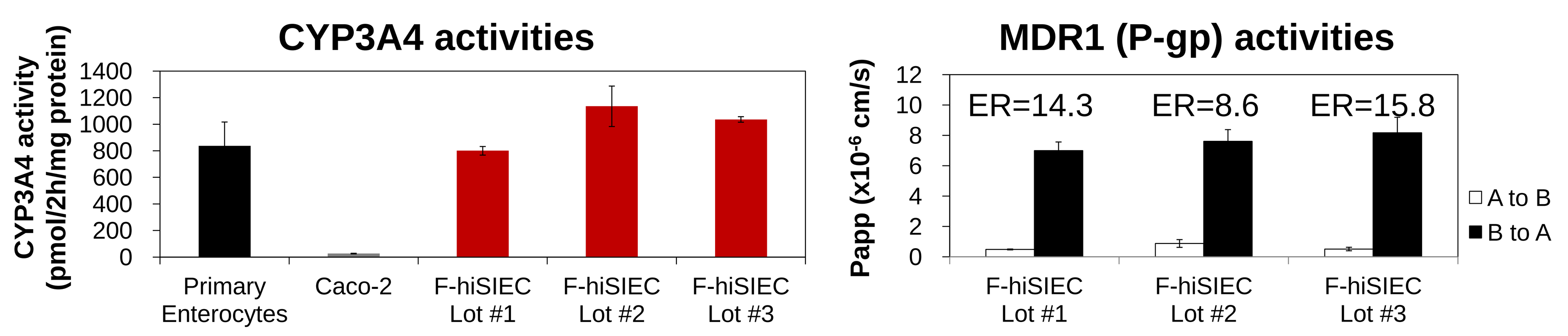
小腸マーカー・代謝酵素・トランスポーターの遺伝子発現

Various gene expressions of F-hiSIEC™ were measured by RT-PCR and compared to adult small intestine and Caco-2. (Y-axis: relative mRNA expression)



開発したヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞は、ヒト生体小腸同等の遺伝子発現を示した。

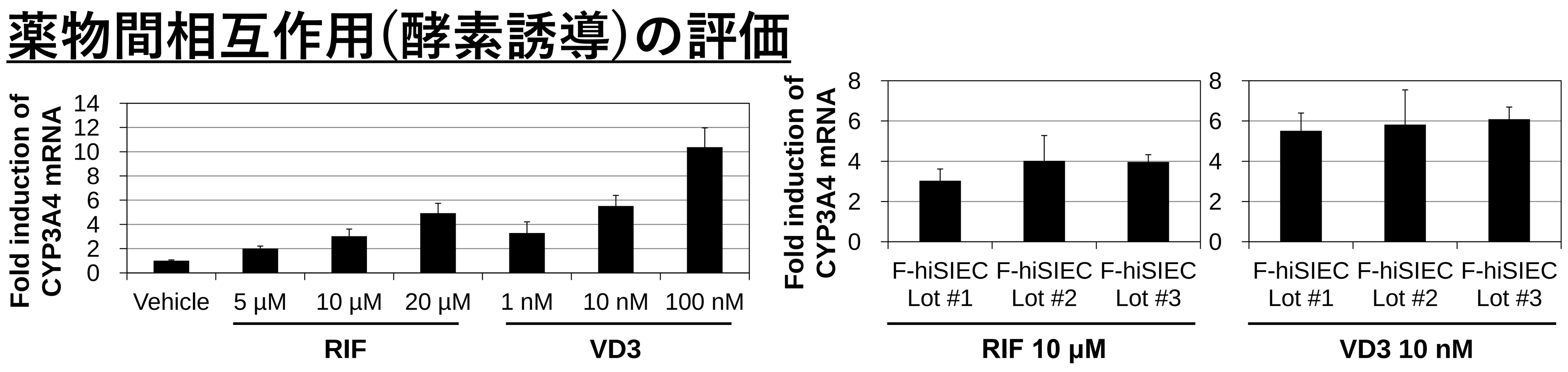
代謝酵素活性・トランスポーター活性とロット間差



Each cells were incubated with 5 μM midazolam for 2h at 37 °C. CYP3A4 in F-hiSIEC™ was measured with F-hiSIEC™ Assay Medium.
Human Enterocytes (purchased from In Vitro ADMET Laboratories, Inc.) were used as primary small intestinal cells.
10 μM digoxin was used as a substrate . Additionally, HBSS containing 10 mM HEPES (pH 7.4) was used as a transport buffer. After the preincubation, the transport buffer containing the substrate was added to the apical or basal chambers, and the cells were incubated at 37°C for 60 min.

ヒト初代培養腸管上皮細胞と同等のCYP3A4活性を示した。
またCYP3A4活性とP-gp活性について、ロット間で性能が安定していることが示された。

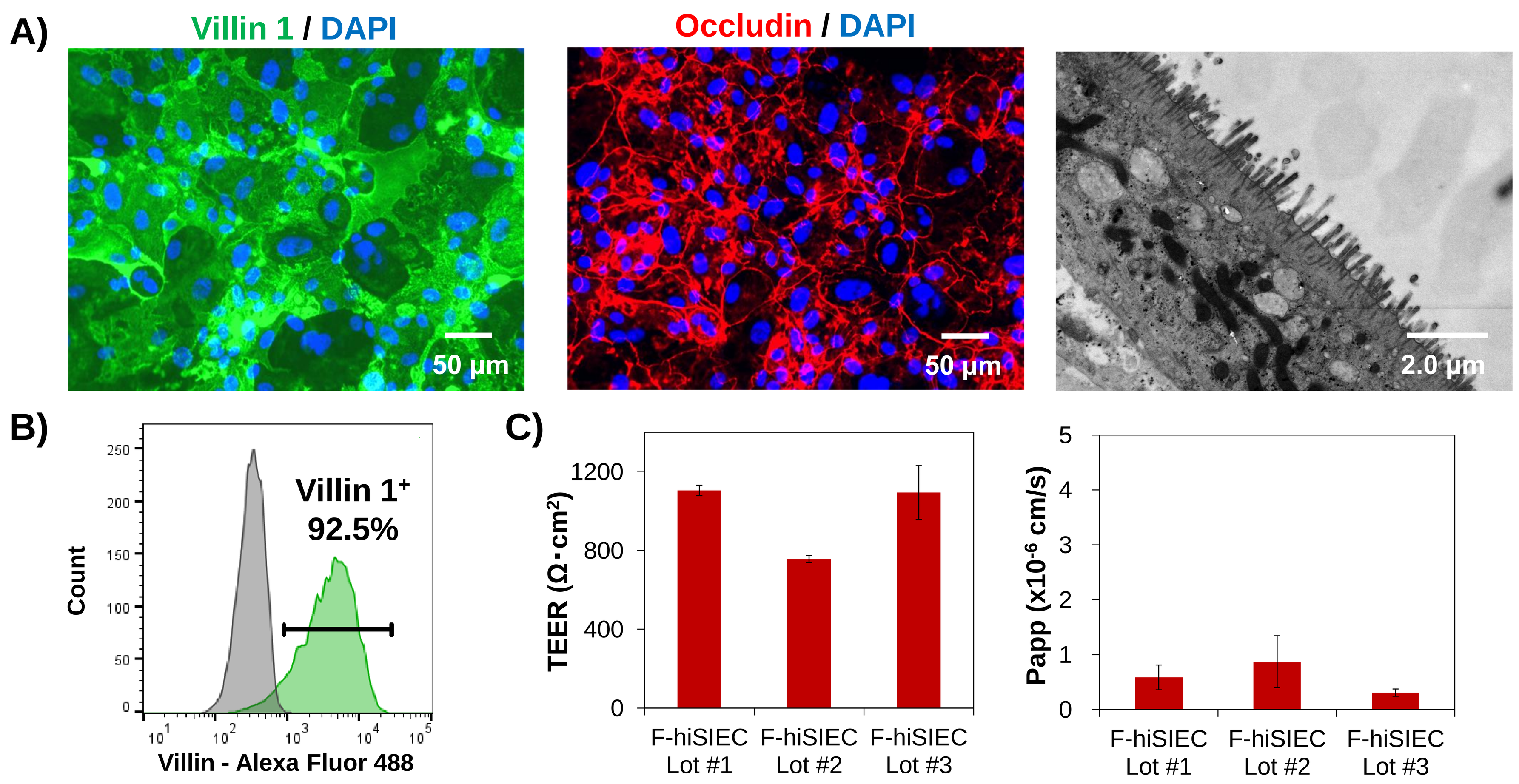
薬物間相互作用(酵素誘導)の評価



Induction of CYP3A4 mRNA expression levels in F-hiSIEC on cell culture insert. F-hiSIEC™ Assay Medium was used as the preculture medium(Day7-9).
Differentiated cells were treated with rifampicin (RIF) or 1α,25-dihydroxyvitamin D3 (VD3) in F-hiSIEC™ Assay Medium for 48 hours (Day9-11).

生体小腸同等の酵素(CYP3A4)誘導が見られ、薬物間相互作用の評価に使えることが示された。

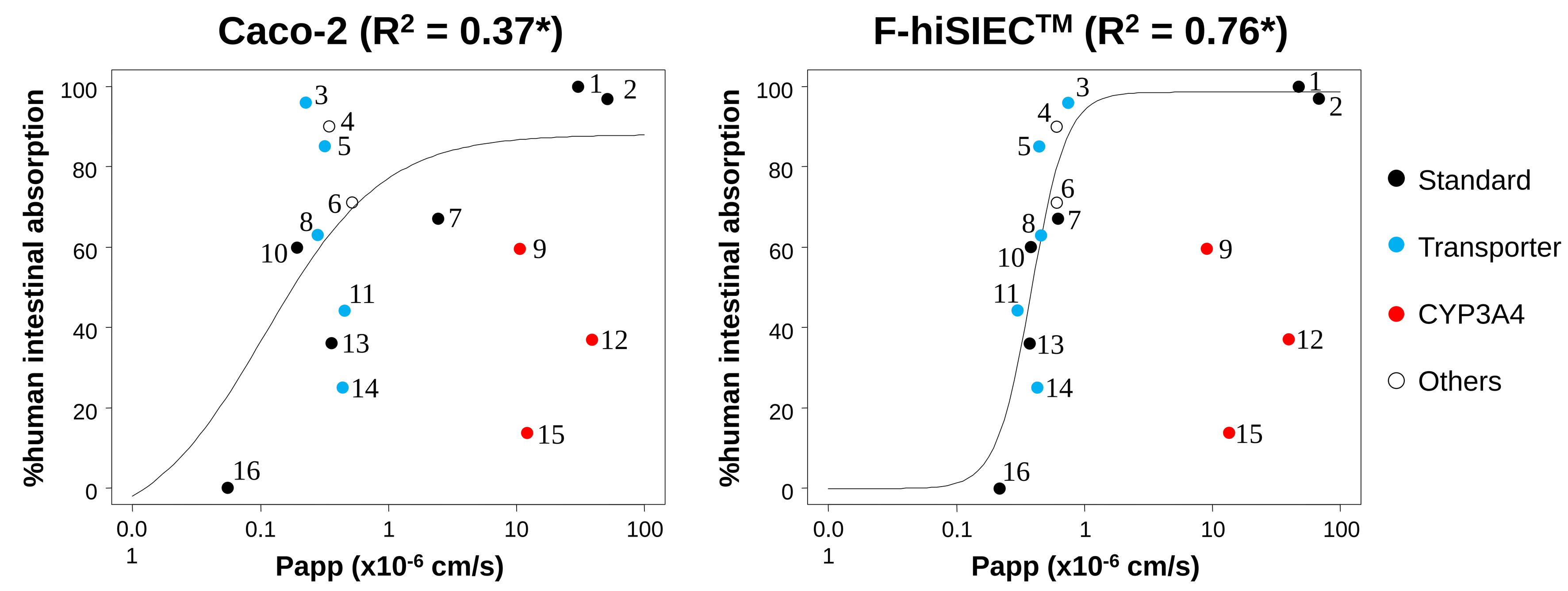
細胞形態とバリア機能



A) Cells were stained with villin 1 (green) and occuludin (red). Transmission electron microscopy images of microvilli. B) Ratio of villin 1 positive cells was determind with FACS analysis. C) Barrier funtion of cell sheet on cell culture insert by TEER and Papp of 110 μM lucifer yellow.

腸管上皮細胞の特徴として、微絨毛の形成やバリア機能が確認された。

薬物吸収性予測性能の評価

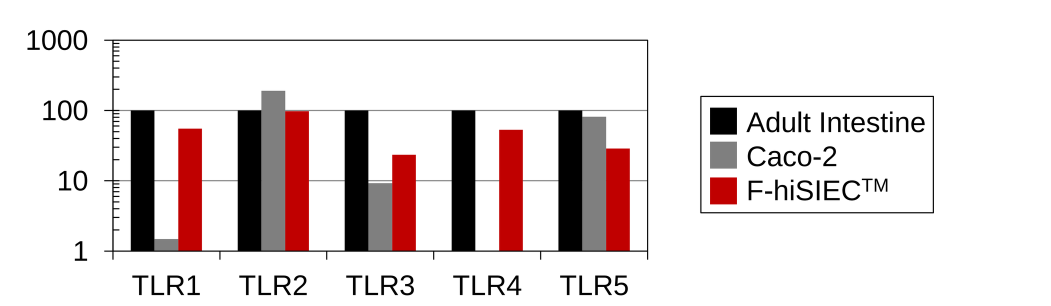


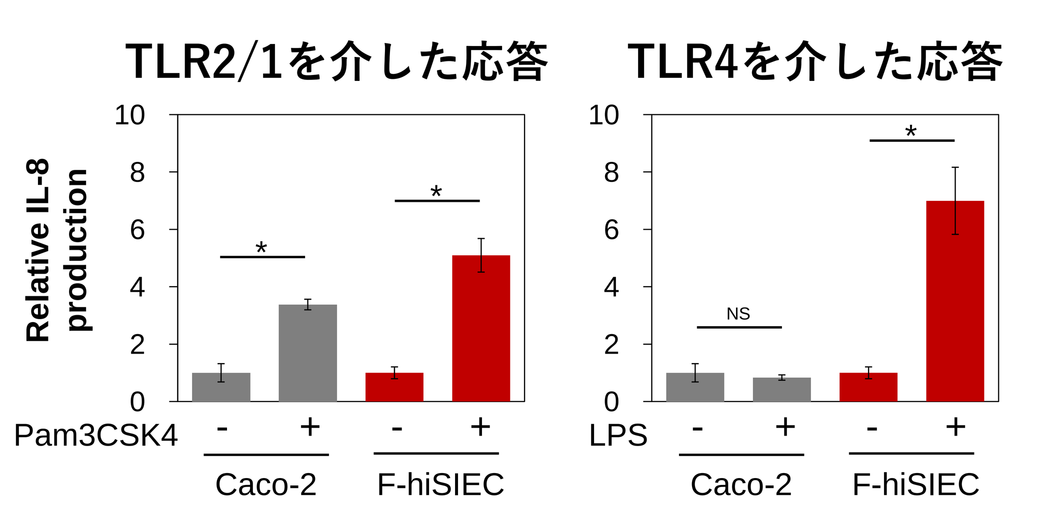
1.Antipyrine , 2.Caffeine, 3.Cephalexin, 4.Acebutolol, 5.Ribavirin, 6.Metformin, 7.Hydrochlorothiazide, 8.Indinavir, 9.Verapamil, 10.Enalapril, 11.Erythromycin, 12.Midazolam, 13.Sulpiride, 14.Lisinopril, 15.Tacrolimus, 16.Lucifer yellow.
*R^2 scores were determined exclude CYP3A4 substrates (9, 12 and 15).

薬物の透過係数(Papp)とヒト腸管吸収率に相関が見られ、
腸管吸収を予測するための、代替モデルとしての有用性が示された。

腸管免疫評価・ウイルス評価への応用

Toll様受容体(TLR)の発現と応答

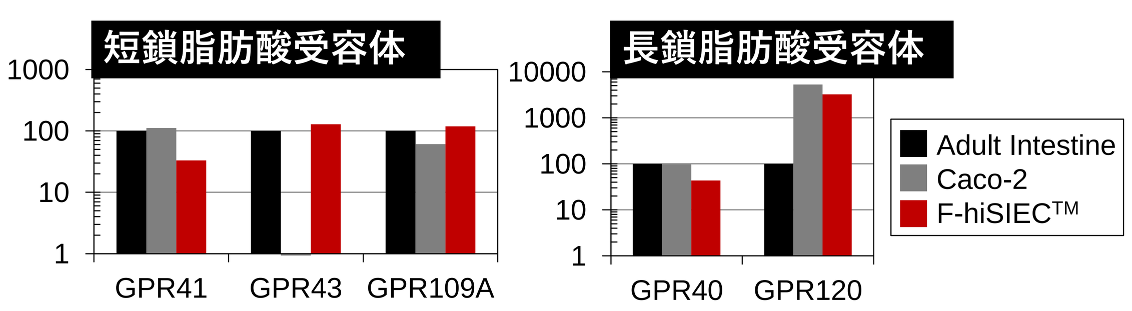


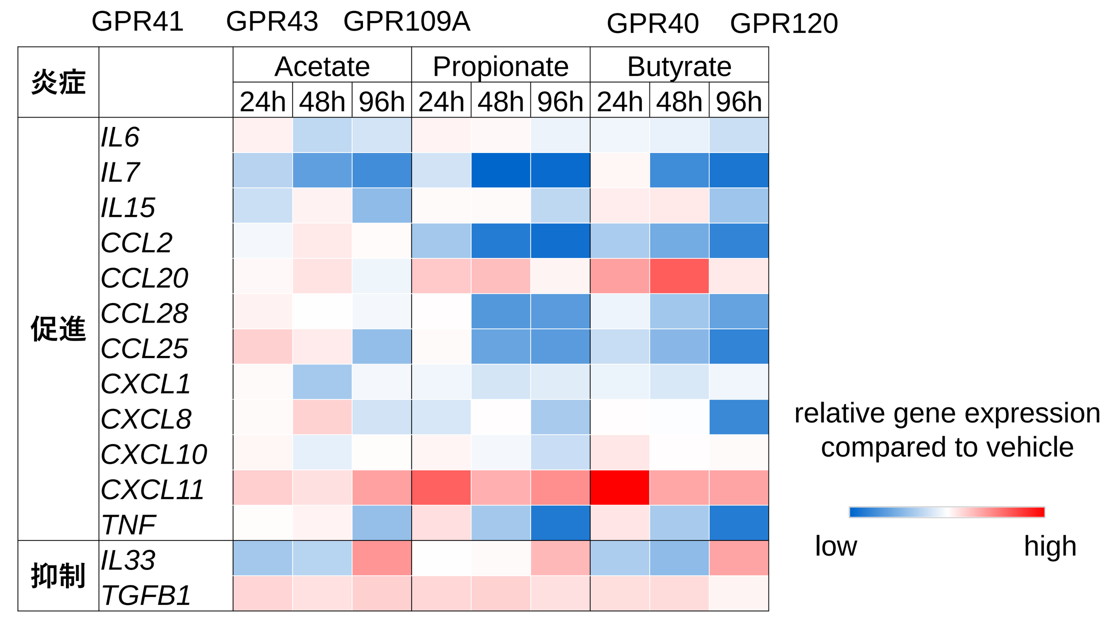


Caco-2 or F-hiSIEC were incubated with medium alone or medium containing 50 μg/mL Pam3CSK4 or 100 ng/mL LPS for 24 h. Supernatants were assayed for IL-8 secretion.
Data are expressed as relative production as compared with control. *$P < 0.05$.

腸管上皮細胞の免疫応答として、Toll様受容体を
介した応答を評価できることが示された。

脂肪酸受容体の発現と応答

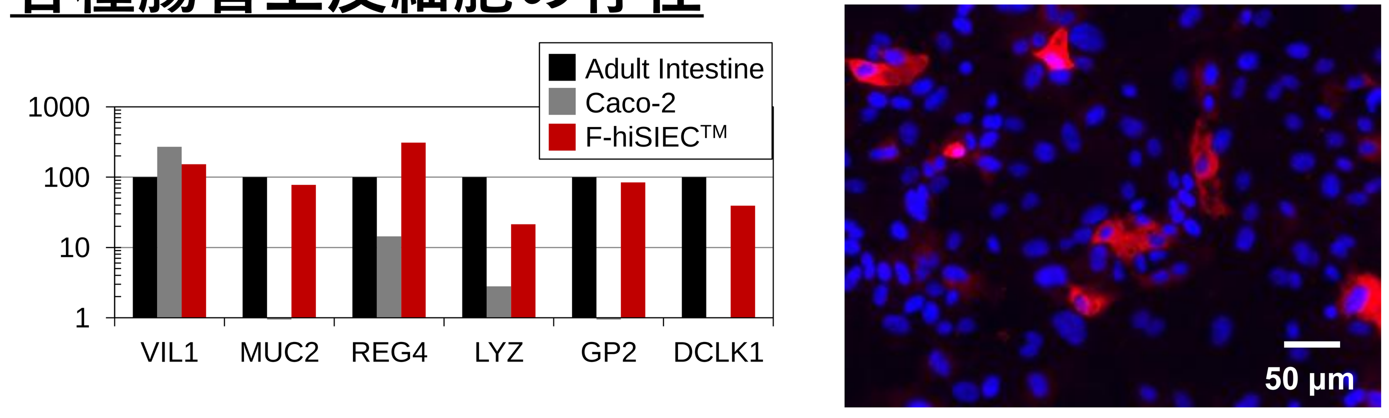




F-hiSIEC were incubated with medium alone or medium containing 20 mM acetate or 20 mM propionate or 5 mM butyrate for 96 h. Relative gene expressions were analyzed.

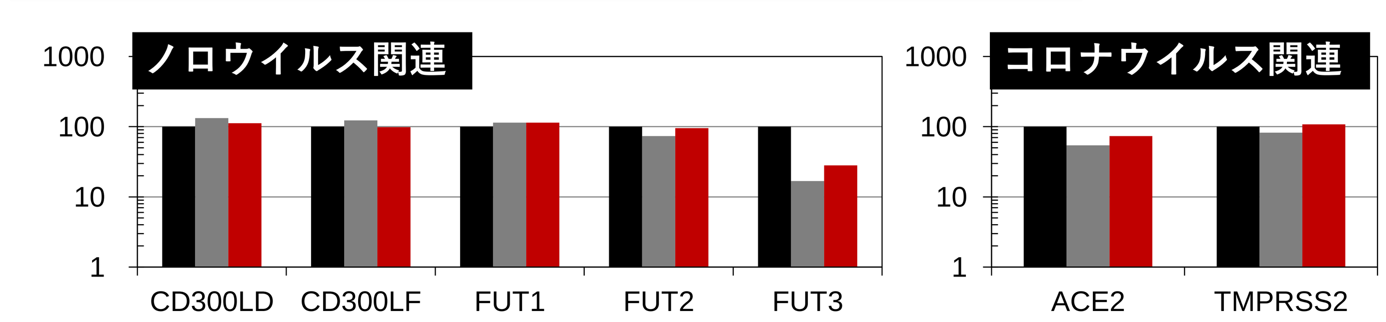
短鎖脂肪酸の添加により、経時的に炎症促進系の遺伝子
発現は低下し、炎症抑制系の遺伝子発現が上昇した。

各種腸管上皮細胞の存在



腸管免疫に関わる、杯細胞(MUC2)、内分泌細胞(REG4)、パネート細胞(LYZ)、M細胞(GP2)、タフト細胞(DCLK1)の存在が示された。

腸管感染性ウイルス関連遺伝子の発現



ウイルスの感染に関わる膜蛋白質等について遺伝子発現が示され、
ウイルスを培養・評価できる可能性が示された。

結論：本細胞はヒト生体小腸に近い性質を有し、動態や毒性、免疫応答、あるいはウイルスの影響を評価する代替モデルとしての活用が期待される。