ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞を用いた新規薬物動態評価系の開発

岩尾 岳 洋

Development of an *In Vitro* System for Evaluating Intestinal Drug Disposition Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Intestinal Epithelial Cells

Takahiro Iwao

Department of Clinical Pharmacy, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University; 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan.

(Received May 29, 2018)

Tissues of the small intestine are crucial to understanding drug disposition because these tissues regulate the bioavailability of drugs. However, no evaluation system is currently available for precise and comprehensive analysis of intestinal pharmacokinetics. To address this, functional intestinal epithelial cells were generated from human induced pluripotent stem (iPS) cells for use in pharmacokinetic studies. An improved intestinal differentiation method was established by screening a variety of small molecule compounds against cells during differentiation. The mRNA expression levels of intestinal markers, drug transporters, and CYP3A4 were found to increase following treatment with compounds that act as inhibitors of mitogen-activated protein kinase, DNA methyltransferase, and transforming growth factor- β . Therefore, we inferred that these compounds enhanced differentiation into intestinal epithelial cells. The differentiated intestinal epithelial cells in the presence of these compounds possessed drug-metabolizing enzyme activities, such as those of CYPs, UDP-glucuronosyltransferase, and sulfotransferase. In addition, these cells had the ability to induce CYP3A4 in the presence of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 . The differentiated intestinal epithelial cells seeded on cell culture inserts formed loose-tight junctions, similar to those in the human small intestine, rather than Caco-2 cells. The cells exhibited polarity, such as apical and basal sides. We also demonstrated that the uptake and efflux transport activities in the cells occurred *via* peptide transporter and breast cancer resistance protein, respectively. Taken together, it was suggested that human iPS cell-derived intestinal epithelial cells are pharmacokinetically functional, and represent a promising model system for pharmacokinetic studies of drug candidates.

Key words—intestinal epithelial cell; drug disposition; induced pluripotent stem cell; human; *in vitro* model

1. はじめに

現在、多くの医薬品は簡便さと低侵襲性の観点から経口投与製剤として開発・使用されている。経口投与された医薬品の多くは、第一の障壁である小腸を通過した後、門脈に入り、肝臓を通過して全身循環に移行する。また、医薬品の効果や副作用は全身循環に入った量に依存するため、医薬品の開発段階ではバイオアベイラビリティの評価が極めて重要になってくる。医薬品のバイオアベイラビリティ (F) は、小腸からの吸収率 (F_a)、小腸における代謝の回避率 (F_g) 及び肝臓における代謝の回避率 (F_h)

の積によって算出されることから ($F = F_a \times F_g \times F_h$)、バイオアベイラビリティに対する小腸の寄与の重要性がわかる。さらに、小腸には多くの薬物トランスポーターや薬物代謝酵素が発現しており、これらも薬物の消化管からの吸収に関与する。¹⁻⁵⁾したがって、小腸における薬物動態は、これらの薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの寄与も含めて評価することが重要である。現在、*in vitro* 系としては、Caco-2 細胞 (結腸がん由来の細胞株) やマイクロソームが薬物の消化管吸収や代謝の評価に広く用いられている。しかしながら、Caco-2 細胞はヒト正常小腸と比較して薬物トランスポーターの発現パターンが異なることや、小腸における主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 の発現が極めて低いことが知られていることから、正確な評価が難しい。また、マイクロソームは CYP や UDP-glucuronosyltrans-

名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野
(〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1)

e-mail: tiwao@phar.nagoya-cu.ac.jp

本総説は、平成 29 年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

ferase (UGT) などによる代謝の評価は可能であるものの, carboxylesterase (CES) や sulfotransferase (SULT) など, サイトゾール画分に含まれる酵素による代謝の評価はできない. さらに, 薬物の吸収と代謝はこれらのような別々の系を用いて評価されている. そのため, 吸収と代謝を総合的に評価するためにはヒト初代小腸上皮細胞の利用が望ましいが, 実際に創薬研究で使用することは難しい. したがって, ヒト人工多能性幹細胞 [induced pluripotent stem (iPS) 細胞] から小腸上皮細胞を作製することで, これらの問題を解決することができると考えられる.

現在, ヒト iPS 細胞若しくは胚性幹細胞 [embryonic stem (ES) 細胞] から小腸への分化法に関する報告は, 他の組織細胞と比べて非常に少ない.⁶⁻⁸⁾ また, これらの薬物動態学的な機能に関しても十分な解析は行われていない. 筆者らの研究グループではこれまでに, 薬物動態試験への応用を目指して, ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞の分化誘導に関する研究を進めてきている. そこで本総説では, 筆者がこれまでに確立したヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞への分化誘導法と, この小腸上皮細胞が有する薬物動態学的機能について概説する.

2. ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化誘導法の開発

小腸は内胚葉由来の臓器である. そこで筆者は, ヒト iPS 細胞から内胚葉を経由して, 小腸幹細胞から小腸上皮細胞へと, 発生の過程を模倣して分化誘導を行った. これまでの筆者の研究により, 小腸幹細胞の段階から epidermal growth factor (EGF) を添加することで, 小腸上皮細胞への分化が可能であることが明らかとなっていた.⁹⁾ この細胞は, 小腸のマーカー遺伝子や, 薬物代謝酵素及び薬物トランスポーターを発現していた. また, 小腸上皮細胞のマーカーである sucrase-isomaltase を発現している細胞はペプチドトランスポーターである peptide transporter 1 (PEPT1) を介したジペプチドの輸送能を有することが示唆されていた. しかしながら, その分化誘導効率は十分ではなかった. そこで, 細胞内シグナルの制御に関与する様々な低分子化合物を中心にスクリーニングを行い, 小腸上皮細胞への分化の段階で用いることで, より効率的な分化誘導法の確立が可能かどうか試みた. その結果,

mitogen-activated protein kinase (MEK) 阻害剤である PD98059, DNA methyltransferase (DNMT) 阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine 及び transforming growth factor- β (TGF- β) 阻害剤である A-83-01 を添加することで, sucrase-isomaltase, PEPT1, breast cancer resistance protein (BCRP) 及び multidrug resistance 1 (MDR1)/P-glycoprotein (P-gp) の発現が有意に上昇した (Fig. 1).¹⁰⁾ この効果については, 他の MEK, DNMT 及び TGF- β 阻害剤でも確認されており, これらの作用を有する低分子化合物によりヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化誘導が促進されることが示唆された.¹¹⁾

3. ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞における薬物の代謝特性

現在, 薬物の膜透過性の評価に用いられている Caco-2 細胞は, 微絨毛を有し, タイトジャンクションや極性を持った単層膜を形成するなど, 形態学的にはヒト小腸上皮細胞と類似した性質を有する. しかしながら, ヒト小腸と比較して強固なタイトジャンクションを形成することや, pregnane X receptor (PXR) を介した薬物代謝酵素の誘導がみられないこと,^{12,13)} また前述したように, 薬物代謝酵素の発現が極めて低いことや薬物トランスポーターの発現パターンが異なることなど, 機能的にはヒト小腸とは大きく異なる. そのため, ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞には, ヒト小腸と類似した機能を有していることが望まれる. そこで, ヒト iPS 細胞から作製した小腸上皮細胞における薬物代謝酵素活性の解析を行ったところ, 小腸上皮細胞に発現している CYP, UGT 及び SULT による代謝活性が認められた [Figs. 2(A)-(F)].¹⁰⁾ 特に, 第 II 相酵素である UGT と SULT による代謝活性は CYP による代謝活性と比較して, 非常に高かった. また, 3 種類の低分子化合物を用いて分化させることで CYP3A4 の発現及び活性の上昇が認められた [Figs. 2(G) and (H)]. さらに, 1 α ,25-dihydroxy-

岩尾 岳洋

名古屋市立大学大学院薬学研究科准教授, 博士 (薬学). 2005 年名古屋市立大学大学院薬学研究科博士後期課程修了後, 福井大学医学科附属病院薬剤部に勤務. 2010 年名古屋市立大学大学院薬学研究科助教. その後, 同講師を経て, 2015 年より現職.

Fig. 1. mRNA Expression of Intestinal Markers and Drug Transporters in the Human iPS Cell-Derived Intestinal Epithelial Cells¹⁰⁾

GSKI/BMPi/PD/5-aza-dC/A: GSK-3 inhibitor XV and dorsomorphin were added from day 8 to 14, subsequently, PD98059, 5-aza-2'-deoxycytidine, and A-83-01 were added from day 14 to 26. PD/5-aza-dC/A: PD98059, 5-aza-2'-deoxycytidine, and A-83-01 were added from day 8 to 26 or from day 14 to 26. Data were represented as the mean $\pm$ S.D., $n=3$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. non-treatment group.

vitamin D₃ による vitamin D receptor (VDR) を介した誘導が mRNA 発現と代謝活性のいずれにおいても認められた。このことから、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞は、薬物の代謝だけでなく、代謝酵素の誘導の評価も可能であることが示唆された。プロドラッグの加水分解反応などに関与する CES 分子種に関して、小腸では CES2A1 の発現が、Caco-2 細胞では CES1A の発現が高いことが知られている。³⁾ 筆者の作製したヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞では、CES2A1 による代謝活性を有していたが、CES1A による活性はほとんど認められなかったこ

とから、この細胞における CES による代謝はヒト小腸に近い代謝活性パターンを示すことも明らかにしている。¹⁴⁾

4. ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞における薬物の輸送特性

ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞は薬物代謝酵素活性及び薬物応答性を有していることが明らかとなったことから、筆者は薬物の輸送特性についても解析を行った。ヒト小腸に発現する代表的なトランスポーターの 1 つである PEPT1 による輸送機能の解析を行ったところ、基質薬物の取り込み活性が認

Fig. 2. Drug-Metabolizing Enzyme Activities and CYP3A4 Inducibility in the Human iPS Cell-Derived Intestinal Epithelial Cells¹⁰⁾
GSKi/BMPi/PD/5-aza-dC/A: GSK-3 inhibitor XV and dorsomorphin were added from day 8 to 14; subsequently, PD98059, 5-aza-2'-deoxycytidine, and A-83-01 were added from day 14 to 26. PD/5-aza-dC/A: PD98059, 5-aza-2'-deoxycytidine, and A-83-01 were added from day 8 to 26 or from day 14 to 26. White and black bars show vehicle groups, and gray bars show 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-treatment groups. Data were represented as the mean $\pm$ S.D., $n=3$; N.D., not detected. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. non-treatment group; † $p<0.05$, †† $p<0.01$ vs. vehicle group.

Fig. 3. Drug Transport Characteristics in the Human iPS Cell-Derived Intestinal Epithelial Cells¹⁵⁾

(A) Uptake transport activity of glycylsarcosine via PEPT1. $n=4$, $*p<0.05$ vs. control group. (B) Time-dependent changes of TEER values. $n=22$. (C) Bi-directional transport of Hoechst 33342 via BCRP. P_{app} , apparent permeability coefficient; ER, efflux ratio. $n=4$, $*p<0.05$, $**p<0.01$ vs. same directional transport in the absence of Ko143; $^{\dagger}p<0.01$ vs. each apical-to-basal transport. (D) Relationship between F_a values and P_{app} . $n=4$. Data were represented as the mean $\pm$ S.D.

められ、この活性は阻害剤であるイブプロフェンの添加及び4°C条件下で有意に抑制された [Fig. 3(A)].¹⁵⁾ 薬物の消化管からの吸収率 (F_a) を評価するためには、セルカルチャーインサート上で培養した細胞の単層膜を用いて膜透過性を解析する必要がある。そこで、小腸上皮細胞への分化の途中でセルカルチャーインサート上に細胞を播種して分化誘導を行った。その結果、タイトジャンクションの頑強性の指標である経上皮電気膜抵抗 (transepithelial electrical resistance; TEER) 値は経時的に上昇し、セルカルチャーインサート上に播種後、10日目あたりでプラトーに達した [Fig. 3(B)]. そのときの TEER 値は約 $100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ であった。この値は、ヒト小腸組織やヒト小腸幹細胞から分化させた細胞の TEER 値に近く、^{12,16)} Caco-2 細胞よりもルーズなタイトジャンクションを形成することが示唆された。平成 29 年に厚生労働省から公表された「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドラ

イン (案)」の中では、吸収過程における排出トランスポーターを介した輸送の評価に関して記載されており、これに関与する重要な薬物トランスポーターとして、MDR1/P-gp 及び BCRP が挙げられている。そこで、この 1 つである BCRP を介した双方向の経細胞輸送実験を行ったところ、排出方向優位な輸送が認められ、その輸送は阻害剤である Ko143 の添加により抑制された [Fig. 3(C)]. また、BCRP の免疫染色を行ったところ、頂側膜側での発現が観察された。したがって、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞はセルカルチャーインサート上に播種することで、極性細胞としての性質を有することが示唆され、排出トランスポーターの評価が可能であることも明らかとなった。さらに、 F_a が既知の薬物を用いた膜透過試験において、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞において算出された見かけの膜透過係数 (P_{app}) と F_a との間に良好な相関関係が認められた [$p<0.01$, $R=0.99$; Fig. 3(D)]. 今後さ

らに薬物の数を増やして検討する必要はあるが、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を用いて消化管からの吸収率を予測できる可能性が示唆された。

5. おわりに

これまでに行ってきた一連の研究を通して、筆者はヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化誘導法を確立し、その分化に有用な低分子化合物を見出すことができた。また、機能解析の結果から、筆者の作製したヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞は、小腸における薬物の代謝や吸収、薬物代謝酵素の誘導及び薬物相互作用などを総合的に解析可能な新規評価系として利用できる可能性が示された。さらに、現在筆者らは、今回の研究で見い出された低分子化合物とは別の化合物がヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化誘導の促進及び薬物動態学的機能の獲得に有用である可能性を示唆する知見を得ており、より高い機能を持った小腸上皮細胞の作製が可能になることが期待できる。また、筆者らの研究グループは医薬品のバイオアベイラビリティや安全性の評価を目指した Organ-on-a-chip に関する研究も展開しており、このチップに搭載可能なヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞としての開発も進めている。ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞が創薬研究の分野における評価系の 1 つとして応用されることが望まれるとともに、今後 Organ-on-a-chip 研究がより進むことによって、小腸での吸収過程における薬物動態の評価だけでなく、医薬品のバイオアベイラビリティの予測も可能な *in vitro* モデル系となり得ることが期待される。

謝辞 本研究は名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野で行われたものである。本研究を遂行するにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました松永民秀教授に心より深謝申し上げます。また、ご協力を頂いた共同研究者の先生方を始め、臨床薬学分野及び臨床薬学教育研究センターの関係者の方々に感謝申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Giacomini K. M., Huang S.-M., Tweedie D. J., Benet L. Z., Brouwer K. L. R., Chu X.,

- Dahlin A., Evers R., Fischer V., Hillgren K. M., Hoffmaster K. A., Ishikawa T., Keppler D., Kim R. B., Lee C. A., Niemi M., Polli J. W., Sugiyama Y., Swaan P. W., Ware J. A., Wright S. H., Wah Yee S., Zamek-Gliszczyński M. J., Zhang L., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **9**, 215–236 (2010).
- 2) Paine M. F., Hart H. L., Ludington S. S., Haining R. L., Rettie A. E., Zeldin D. C., *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 880–886 (2006).
- 3) Imai T., Imoto M., Sakamoto H., Hashimoto M., *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 1185–1190 (2005).
- 4) Yamanaka H., Nakajima M., Katoh M., Yokoi T., *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 1642–1648 (2007).
- 5) Riches Z., Stanley E. L., Bloomer J. C., Coughtrie M. W. H., *Drug Metab. Dispos.*, **37**, 2255–2261 (2009).
- 6) Spence J. R., Mayhew C. N., Rankin S. A., Kuhar M. F., Vallance J. E., Tolle K., Hoskins E. E., Kalinichenko V. V., Wells S. I., Zorn A. M., Shroyer N. F., Wells J. M., *Nature*, **470**, 105–109 (2011).
- 7) Ogaki S., Shiraki N., Kume K., Kume S., *Stem Cells*, **31**, 1086–1096 (2013).
- 8) Ozawa T., Takayama K., Okamoto R., Negoro R., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Mizuguchi H., *Sci. Rep.*, **5**, 16479 (2015).
- 9) Iwao T., Toyota M., Miyagawa Y., Okita H., Kiyokawa N., Akutsu H., Umezawa A., Nagata K., Matsunaga T., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **29**, 44–51 (2014).
- 10) Iwao T., Kodama N., Kondo Y., Kabeya T., Nakamura K., Horikawa T., Niwa T., Kurose K., Matsunaga T., *Drug Metab. Dispos.*, **43**, 603–610 (2015).
- 11) Kodama N., Iwao T., Kabeya T., Horikawa T., Niwa T., Kondo Y., Nakamura K., Matsunaga T., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **31**, 193–200 (2016).
- 12) Takenaka T., Harada N., Kuze J., Chiba M., Iwao T., Matsunaga T., *Drug Metab. Dispos.*, **42**, 1947–1954 (2014).
- 13) Schmiedlin-Ren P., Thummel K. E., Fisher J. M., Paine M. F., Watkins P. B., *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 1446–1453 (2001).
- 14) Kabeya T., Matsumura W., Iwao T., Hosoka-

-
- wa M., Matsunaga T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **486**, 143–148 (2017).
- 15) Kodama N., Iwao T., Katano T., Ohta K., Yuasa H., Matsunaga T., *Drug Metab. Dispos.*, **44**, 1662–1667 (2016).
- 16) Sjöberg Å., Lutz M., Tannergren C., Wingolf C., Borde A., Ungell A.-L., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **48**, 166–180 (2013).