

15. 創薬応用のための iPS 細胞由来小腸上皮細胞の開発

水口 裕之

大阪大学 大学院薬学研究科 分子生物学分野

Key words : ヒト iPS 細胞, 小腸上皮細胞, 創薬研究, *in vitro* 評価系, 分化誘導

緒言

小腸上皮細胞は、様々な薬物代謝酵素や薬物トランスポーターを発現しているため、経口投与された薬物の吸収・排泄や代謝において重要な役割を担う。創薬研究において、医薬品候補化合物の小腸での吸収を評価するための *in vitro* 評価系としては、ラット等の小動物由来小腸組織を用いた反転腸管法やヒト大腸癌細胞株である Caco-2 細胞を用いた系が汎用されているが、種差や“代謝”を評価できないという問題がある。ヒト iPS 細胞から分化誘導した小腸上皮細胞は、これらの問題点の解決が可能であり、薬物の“吸収・排泄と代謝”を同時に評価可能になると期待される。我々はすでに、高効率ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞作製法を開発済みであるが [1~3]、ヒト iPS 細胞から小腸への分化誘導技術の開発はまだ黎明期であるのが実情であり、創薬研究に適した小腸上皮細胞への分化誘導技術の開発(改良)は極めて重要な研究課題である。

そこで本研究では、ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞へのより安定な高効率分化誘導法の開発を行った。まずは、ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化過程の細胞に、適切な分化関連遺伝子を遺伝子導入能に優れたアデノウイルス(Ad)ベクターを用いて一過性に導入することで、小腸上皮細胞への分化効率を飛躍的に高めることを試みた。その結果、ヒト iPS 細胞内胚葉細胞に *FOXA2* 遺伝子を、ヒト iPS 細胞腸管前駆細胞に *CDX2* 遺伝子を導入することで、小腸上皮細胞分化が飛躍的に向上し、薬物代謝酵素活性をはじめとする各種小腸上皮細胞機能が向上することを明らかにした。また、安定製造に重点を置きながら分化誘導法の改良にも取り組んだ。ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の機能を向上できる化合物を探索し、化合物 X を作用させることで、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞における薬物代謝活性を向上できることを見いだした。一方、我々が開発済みの高効率ゲノム編集技術 [4] を駆使して、消化管吸収・代謝に重要な薬物代謝酵素 (*CYP3A4*) 遺伝子をノックアウトしたヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を作製し、当該分子の薬物吸収や代謝・毒性への影響を分子レベルで検討可能なことを実証した。

方法

1. ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞を differentiation RPMI1640 培地 (100 ng/ml Activin A 等を含む) で培養し、4 日間培地交換を毎日行うことでヒト iPS 細胞を内胚葉細胞へ分化誘導した。ヒト iPS 細胞由来内胚葉細胞から小腸様細胞に分化させる際には、内胚葉細胞を differentiation DMEM-high Glucose 培地 (BIO, DAPT 等を含む) にて培養を行い、培養 24 日目まで小腸様細胞へと分化誘導させた。

Ad ベクターを用いた遺伝子導入によりヒト iPS 細胞から内胚葉系細胞への分化誘導を行う場合は、*FOXA2* 発現 Ad ベクターを 3,000 vector particles (VP) /cell の濃度で中内胚葉系細胞に、*CDX2* 発現 Ad ベクターを 3,000 VP/cell の濃度で腸管前駆細胞に作用させた。Ad ベクターは、我々が開発したファイバー領域にポリリジンペプチドを挿入し、ヒト iPS 細胞から分化誘導した細胞への遺伝子導入能に優れたファイバー改変 Ad ベクターを用いた。

ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の機能を向上できる化合物の探索においては、小腸上皮細胞で高発現している MDR1 (P-gp) の基質や誘導能が報告されている候補化合物 10 種類を、分化誘導の day17 から 10 日間作用させて小腸上皮細胞へと分化誘導を行い、day27 において細胞を回収し、小腸上皮細胞機能を評価した。

2. 小腸上皮細胞機能の解析

小腸上皮細胞機能は、小腸関連遺伝子やタンパク質の定量的リアルタイム PCR 解析、フローサイトメトリー解析、免疫組織染色、細胞生存率測定、電気膜抵抗値 (TEER) 測定、CYP3A4 活性等で評価した。

3. 薬物代謝酵素 CYP3A4 のノックアウト

未分化 iPS 細胞で転写活性が低い遺伝子 (CYP3A4 遺伝子を含む) は、ゲノム編集効率 (相同組換え効率) が 2% 以下と低いことが課題だった。そこでバルプロ酸と RAD51 を用いた独自開発のゲノム編集法 (Crispr-Cas9 系を利用) [4] を用いて、CYP3A4 ノックアウト (CYP3A4-KO) iPS 細胞を作製した。

結 果

1. 遺伝子導入技術を用いた高機能なヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の作製

我々は以前、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導において、肝細胞分化に関連する転写因子の遺伝子 (FOXA2、HNF1 α 遺伝子) をファイバー改変 Ad ベクターで導入することで高機能なヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製に成功した [5]。そこで、小腸上皮細胞への分化について、本技術を応用することを試みた。内胚葉への分化誘導については FOXA2 遺伝子を導入し、腸管前駆細胞へ遺伝子導入することで小腸上皮細胞分化に優れた転写遺伝子のスクリーニングを行った (図 1A)。FOXA2、SOX17、CDX1、CDX2、KLF5、SOX9 遺伝子を腸管前駆細胞 (分化誘導 8 日目) へ導入し、分化誘導 20 日後に villin、SI (sucrase-isomaltase) の遺伝子発現を検討したところ、CDX2 遺伝子導入によりコントロールの LacZ 遺伝子導入群と比べ大幅に遺伝子発現レベルが向上することが判明した。フローサイトメーターで Villin 陽性細胞の割合を測定したところ、96%にも達した (図 1B)。CYP3A4 代謝活性も LacZ 導入群と比べ約 7 倍向上し、ビタミン D3 とリファンピシンによる CYP3A4 発現の誘導も観察された。また、適度な TEER 値を示し、単層膜はきれいなタイトジャンクションを形成していた。さらに、ヒト腸管の医薬品吸収・代謝を再現できること、即ち Fa (腸管吸収率) および Fg (腸管上皮細胞での代謝回避率) 予測に応用できる可能性を実証し、高機能なヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の作製に成功した。

2. 化合物スクリーニングによるヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の機能向上

ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化誘導の後期に 10 種類の候補化合物をそれぞれ 10 日間作用させてヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞を作製したところ、化合物 X 作用群において、腸管上皮細胞マーカーである villin、SI、IFABP、薬物代謝酵素マーカーである CYP3A4、トランスポーターマーカーである MDR1、BCRP、PEPT1 の発現量がいずれも有意に上昇した。CYP3A4 のタンパク質発現と活性の向上も認められた。また、化合物 X 処理によって、TEER、および傍細胞透過性基質である Lucifer Yellow の膜透過係数に影響が生じないことが確認できた。よって、化合物 X はタイトジャンクションの形成に影響を与えることなく、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の薬物代謝活性等を向上できることが示唆された。現在、化合物 X によるヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞機能向上のメカニズムについても検討している。

3. CYP3A4 をノックアウトしたヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞

我々が独自開発したゲノム編集方法 [4] により、CYP3A4-KO iPS 細胞の樹立に成功した。CYP3A4-KO iPS 細胞は、野生型 iPS 細胞と同等の未分化能及び小腸上皮細胞への分化能を有していることを遺伝子発現解析および免疫染色により確認した。CYP3A4 の代謝活性を調べたところ、CYP3A4-KO 小腸上皮細胞では代謝活性を消失していた。さらに、CYP3A4 によって代謝されることにより反応性代謝物が生じる Acetaminophen などの薬物を小腸上皮細胞に作用させたところ、CYP3A4 の消失により細胞毒性レベルが軽減した。したがって、CYP3A4-KO 小腸上皮細胞では、CYP3A4 を介した医薬品の毒性を評価できることが示唆され、ヒト iPS 細胞とゲノム編集技術を用いて CYP3A4 による代謝と毒性を高精度に予測できる新規 *in vitro* 評価系の構築に成功した。

考 察

ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の分化誘導技術の開発がはじまってから 5~6 年が経過したが、その間の分化誘導技術開発のスピードは目覚ましいものがあり、従来の腸管モデルでは不可能であった『薬物の吸収・排泄と代謝を同時に評価できる新規 *in vitro* 評価系』を実現できる可能性を強く示唆する成果が得られつつある。しかしながら、P-gp (P-glycoprotein) を介した薬物輸送を確認できない、あるいは低い、等の課題もあり、さらなる分化誘導技術の改良が必要である。今後より優れた分化誘導法が確立され、本技術が完成すれば、『薬物の代謝・排泄と吸収を同時に評価できる新規 *in vitro* 評価系』が初めて構築され、経口投与薬の創薬プロセスの一新が期待できる。さらに、我々が独自に開発/改良したヒト iPS 細胞におけるゲノム編集技術 [4] を用いれば、任意の遺伝子座における高効率のゲノム編集が可能となり、将来的には遺伝子のノックアウトだけでなく、一塩基置換を導入する際にも応用可能な基盤技術になると期待される。これにより、より精密な消化管吸収・排泄・代謝が予測可能な *in vitro* 評価系が構築可能になると期待される。我々はヒト iPS 細胞由来肝細胞の開発も先駆的に進めており、『ヒト小腸/肝臓複合 *in vitro* 評価モデル』の構築も可能になる。これらは iPS 細胞技術を用いることで初めて可能になる技術であり、本邦初の画期的発明を活かした独創性の高い創薬技術開発研究である。また、高機能なヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞は、腸を感染源とするウイルス感染症 (ノロウイルス等) や炎症性腸疾患、腸内細菌と腸との関連等、様々な基礎研究の発展にも大きな貢献が期待できる。

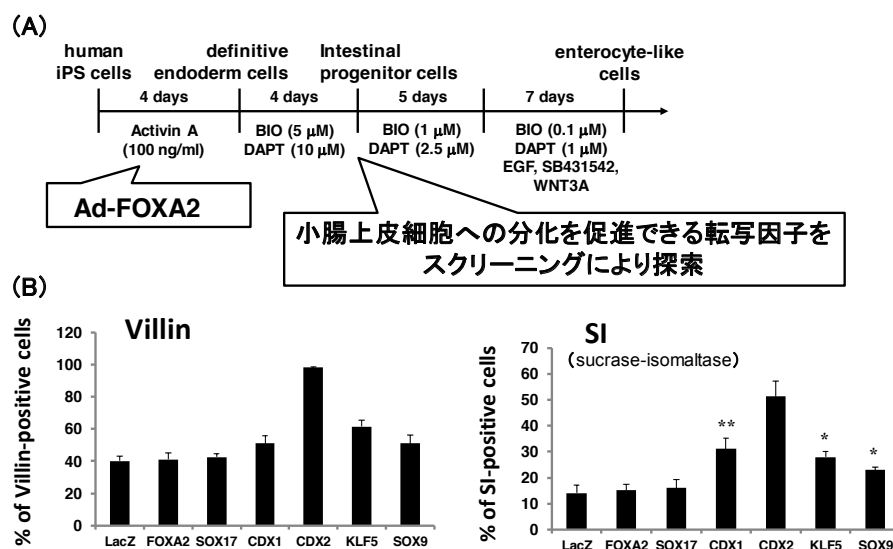


図 1. ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化を促進できる遺伝子の探索

- A) ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化誘導プロトコール
 B) 分化誘導 8 日目に各遺伝子を Ad ベクターで導入し、分化誘導 20 日目に villin, SI 陽性細胞の割合をフローサイトメーターで調べた。

(All data are shown as the mean \pm SE of three independent differentiation experiments.)

共同研究者・謝辞

本研究は、大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野の教員・実験補助員・学生をはじめとする多くの共同研究者の協力のもとになされたものであり、彼らに深謝いたします。

文 献

- 1) Ozawa T, Takayama K, Okamoto R, Negoro R, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Mizuguchi H. Generation of enterocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells for drug absorption and metabolism studies in human small intestine. *Sci Rep*. 2015 Nov 12;5:16479. PMID: 4642303 DOI: 10.1038/srep16479.
- 2) Negoro R, Takayama K, Nagamoto Y, Sakurai F, Tachibana M, Mizuguchi H. Modeling of drug-mediated CYP3A4 induction by using human iPS cell-derived enterocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Apr 15;472(4):631-6. PMID: 26966071 DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.03.012.
- 3) Negoro R, Takayama K, Kawai K, Harada K, Sakurai F, Hirata K, Mizuguchi H. Efficient generation of small intestinal epithelial-like cells from human iPS cells for drug absorption and metabolism studies. *Stem Cell Reports*. 2018 Dec 11;11(6):1539-1550. PMID: 6294172 DOI: 10.1016/j.stemcr.2018.10.019.
- 4) Takayama K, Igai K, Hagihara Y, Hashimoto R, Hanawa M, Sakuma T, Tachibana M, Sakurai F, Yamamoto T, Mizuguchi H. Highly efficient biallelic genome editing of human ES/iPS cells using a CRISPR/Cas9 or TALEN system. *Nuc. Acids Res*. 2017 May 19;45(9):5198-5207. PMID: 28334759 DOI: 10.1093/nar/gkx130.
- 5) Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Sugawara M, Kikuchi K, Higuchi M, Nagamoto Y, Watanabe H, Tashiro K, Sakurai F, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 α transduction. *J Hepatol*. 2012 Sep;57(3):628-36. PMID: 22659344 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.04.038.