

薬物動態評価系としての ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の可能性

大阪大学 大学院薬学研究科 分子生物学分野^{*1)}・大阪大学 国際医工情報センター^{*2)}・

大阪大学 先導的学際研究機構 生命医科学融合フロンティア研究部門^{*3)}・国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 肝細胞分化誘導プロジェクト^{*4)}

山下智起^{*1)}・横田純平^{*1)}・乾 達也^{*1)}・水口裕之^{*1,2,3,4)}

Potential of human iPS cell-derived intestinal epithelial cells as a tool for pharmacokinetic assessment

The efficient development of safe, orally administered drugs requires accurate prediction of pharmacokinetics in the patient's intestine at the preclinical stage. However, the current *in vitro* intestinal pharmacokinetic assay systems have several drawbacks, including species differences and low (or no) expression of drug-metabolizing enzymes and transporters. Therefore, it is expected that intestinal epithelial cells generated from human iPS cells (human iPS cell-derived intestinal epithelial cells) will be used to evaluate the pharmacokinetics of drugs in the human intestinal tract. There are two main methods for generating human iPS cell-derived intestinal epithelial cells: those involving three-dimensional culture (intestinal organoids) and those involving consistent two-dimensional culture. In this review, we discuss the pharmacokinetic applications of human iPS cell-derived intestinal epithelial cells generated by each method.

安全な経口投与医薬品の効率的な開発のためには、前臨床段階で生体のヒト腸管における薬物動態を正確に予測することが必要である。しかしながら、現状の *in vitro* 腸管薬物動態評価系には、種差や、薬物代謝酵素・トランスポーターの発現が低い(無い)などの課題がある。そこで、ヒト iPS 細胞から作製した腸管上皮細胞(ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞)に期待が寄せられている。ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の作製法には大きく分けて2つの手法がある。すなわち、三次元的な培養(腸管オルガノイド)を介するものと、一貫して二次元的な培養を行うものである。本総説では、それぞれの手法で作製されたヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の薬物動態学的应用について論じる。

Tomoki Yamashita^{*1)}, Jumpei Yokota^{*1)}, Tatsuya Inui^{*1)}, Hiroyuki Mizuguchi^{*1,2,3,4)}

Keywords: human iPS cells, intestinal organoids, intestinal epithelial cells, differentiation, pharmacokinetic study

1. 経口投与医薬品の腸管薬物動態評価系の課題

医薬品の投与経路として最も広く用いられているのは経口投与である。米国においてはFDA承認済の医療用およびOTC医薬品のうち68.6%¹⁾、日本においては厚生労働省薬価収載医薬品のうち61.1%²⁾が経口投与医薬品として使用されている

(図1)。経口投与は患者自身で容易に投薬を行うことができるため汎用されている投与経路であるが、医薬品が消化管を通ることによる制約を生じる。その制約として代表的なものが腸管における初回通過効果である。経口投与された医薬品は腸管において初回通過効果を受け、そのバイオアベイラビリティ(BA)に大きな影響を生じ得る^{3,4)}。こうした影響は、腸管上皮における吸収・代謝・排泄に関連する多数の因子が複合的に絡み合った結果であるため、開発医薬品のBAを前臨床の段階で正確に予測することは非常に困難である。これらのことから、ヒト腸管における医薬品のふるまいを高精度に予測可能な *in vitro* 薬物動態評価系の開発は、安全な経口投与

^{*1)} Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

^{*2)} Global Center for Medical Engineering and Informatics, Osaka University

^{*3)} Integrated Frontier Research for Medical Science Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University

^{*4)} Laboratory of Hepatocyte Regulation, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition

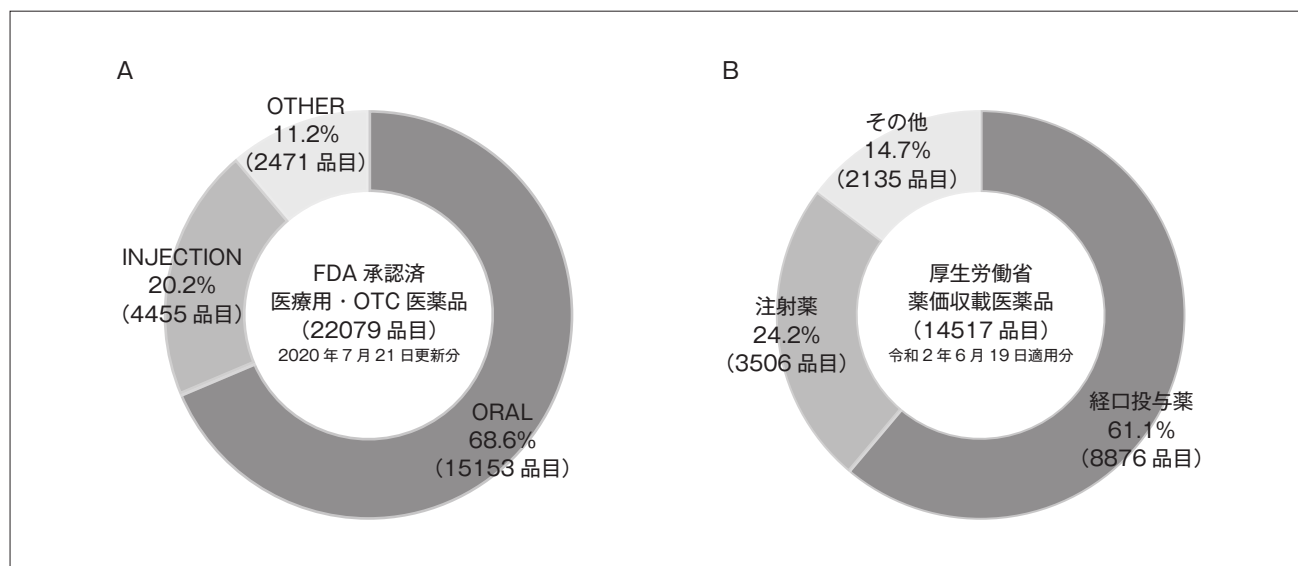


図1 現在販売中の医療用医薬品に占める経口投与医薬品の割合

(A) FDA承認済医療用医薬品に占める各投与経路の割合を示したものの。

Web ページ「Drugs@FDA Data Files」(<https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/drugsfda-data-files>)よりデータを取得し、販売が終了している品目に関しては除外して解析を行った。投与経路について複数の記述がある医薬品に関しては1番目の記載を採用した。“OTHER”カテゴリには INHALATION、INTRAVENOUS、ENDOCERVICAL、ENTERAL、IMPLANTATION、INTRA-ANAL、INTRACAVITARY、INTRAVENOUS、INTRAVESICAL、INTRATRACHEAL、INTRAUTERINE、URETERAL、IRRIGATION、URETHRAL、NASAL、OPHTHALMIC、OTIC、PERFUSION、CARDIAC、PYELOCALYCEAL、RECTAL、VAGINAL、TOPICAL、TRANSDERMAL、TRANSMUCOSAL、SUBLINGUAL、BUCCAL、DENTAL、PERIODONTAL が含まれる。

(B) 厚生労働省薬価収載医薬品に占める各投与経路の割合を示したものの。

Web ページ「薬価基準収載品目リスト及び後発医薬品に関する情報について(令和2年6月19日適用)」(<https://www.mhlw.go.jp/topics/2020/04/tp20200401-01.html>)よりデータを取得した。元データ中の区分「内用薬(口から飲み込むお薬)」からパッカ錠と舌下錠を除いたものを“経口投与薬”とした。“その他”カテゴリには外用薬、歯科用薬剤、舌下錠、パッカ錠が含まれる。なお、“外用薬”には軟膏、坐薬、吸入薬、うがい薬などが含まれる。

医薬品の効率的な開発を可能とするために必須の課題である。

既存の *in vitro* 腸管薬物動態評価系には、人工脂質膜を用いた Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) 等の透過性試験、実験動物由来腸管組織を用いた反転腸管法や Ussing chamber 法による試験、およびヒト結腸がん由来細胞株 (Caco-2 細胞等) の単層培養系を用いた輸送試験等があるが、それぞれに課題とされる点がある。人工脂質膜を用いた試験は、培養を必要とせず短時間で多数のアッセイを行うことができる一方で、実際の細胞膜・細胞質に発現している薬物トランスポーター・薬物代謝酵素による影響を評価することができない⁵⁾。反転腸管法および Ussing chamber 法は、ラット等の腸管組織を使用するため生体を模した評価を行うことが可能であるが、種差が報告されている薬物輸送・代謝関連分子種についてヒトへの外挿性に懸念がある^{6,7)}。ヒト結腸がん由来細胞株の単層培養系は、*in vitro* 薬物輸送試験で得ら

れる見かけの膜透過係数 (P_{app}) と臨床における消化管における吸収率 (F_a) がよく相関する一方で、腸管に発現する主要な薬物代謝酵素である cytochrome P450 (CYP) 3A4 の発現が著しく低いこと等が問題となっている⁸⁾。こうした背景の下、ヒトの正常な腸管上皮を生理学的に再現し、経口投与医薬品の腸管における動態を予測し得るシステムが求められている。

2. ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の新規 *in vitro* 薬物動態評価系への応用

2-1. 研究分野の概観と細胞作製手法の分類

従来の *in vitro* 薬物動態評価系が抱える課題を解決し得る、新たなプラットフォームとして期待されているのが、ヒト iPS 細胞から作製した腸管上皮細胞 (ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞) である。筆者らの知る限り、世界初のヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞

胞作製の報告は2011年の Spence らによるものである⁹⁾。(この直後にその作製法を詳細にまとめた論文も発表されている¹⁰⁾。)この報告から現在までの間、ヒト iPS細胞由来腸管上皮細胞を用いた薬物動態学的研究が数多く行われてきたが、そのほとんどが日本のグループによるものであることは特筆すべき事項である(表1)。また、本分野全体を概観すると、ヒト iPS細胞由来腸管上皮細胞の作製法は、「三次元的な培養(腸管オルガノイド)を介するもの」と「一貫して二次元的な培養を行うもの」の2つに大別されることが分かる(図2)。

2-2. 三次元的な培養(腸管オルガノイド)を介するもの

上述のとおり、Spence らは、世界で初めてヒト iPS細胞から腸管上皮細胞(を含む腸管組織；腸管オルガノイド)を作製することに成功した^{9,10)}。本法は、まず未分化ヒト iPS細胞に activin A を3日間作用させることにより胚体内胚葉(definitive endoderm)を、そこから Wnt-3a と fibroblast

growth factor(FGF)4を4日間作用させることにより後腸(hindgut)を順次分化誘導する。次に、この時点で出現する隆起構造(および培地中に遊離した細胞塊)を Matrigel 中に包埋し、epidermal growth factor(EGF)、Noggin、R-spondin 1を含む培地を用いて三次元培養することにより腸管オルガノイドを作製するという手法である。

ヒト iPS細胞由来腸管オルガノイドは、上皮細胞に加え間葉系細胞など複数種の細胞から構成されており、ヒトの生理を反映した三次元構造と機能を有しているため、腸内細菌との相互作用の理解^{11,12)}、腸におけるウイルス感染メカニズムの解明¹³⁾、疾患の病態基礎研究^{14~16)}、および移植医療への応用など¹⁷⁾、さまざまな分野で応用されてきた。その一方で、ヒト iPS細胞由来腸管オルガノイドが薬物動態学的研究に応用された例は比較的最近になってから報告され始めており、他の分野と比較してその報告数は少ない。この要因として、吸収・代謝・排泄を担う上皮細胞以外の細胞が含まれること、継代・維持が技術的に煩雑で困難であること、頂端膜(管腔)

表1 ヒト iPS細胞由来腸管上皮細胞を用いた薬物動態学的研究

Year	Journal	Author	Method	Ref.
2014	Drug Metab Pharmacokinet	Iwao <i>et al.</i>	2D	32
2015	Sci Rep	Ozawa <i>et al.</i>	2D	44
2015	Sci Rep	Ogaki <i>et al.</i>	2D	43
2015	Drug Metab Dispos	Iwao <i>et al.</i>	2D	33
2016	Biochem Biophys Res Commun	Negoro <i>et al.</i>	2D	38
2016	Drug Metab Dispos	Kodama <i>et al.</i>	2D	35
2016	Drug Metab Pharmacokinet	Kodama <i>et al.</i>	2D	34
2017	Biochem Biophys Res Commun	Kabeya <i>et al.</i>	2D	36
2018	Drug Metab Dispos	Kabeya <i>et al.</i>	2D	37
2018	Stem Cell Reports	Negoro <i>et al.</i>	2D	39
2018	Drug Metab Dispos	Onozato <i>et al.</i>	3D/organoid	18
2018	Drug Metab Dispos	Akazawa <i>et al.</i>	3D/organoid	19
2019	Cell Mol Gastroenterol Hepatol	Takayama <i>et al.</i>	2D	40
2019	Mol Ther Methods Clin Dev	Kawai <i>et al.</i>	2D	41
2020	Biol Open	Kondo <i>et al.</i>	2D	45
2020	Drug Metab Pharmacokinet	Kabeya <i>et al.</i>	2D	46
2020	Sci Rep	Yoshida <i>et al.</i>	3D/organoid	20

ヒト iPS細胞由来腸管上皮細胞を用いた薬物の代謝・吸収・排泄について検討を行っている文献を一覧にした。
(作製法の分類の表記：3D/organoid；三次元的な培養(腸管オルガノイド)を介するもの、2D；一貫して二次元的な培養を行うもの。)

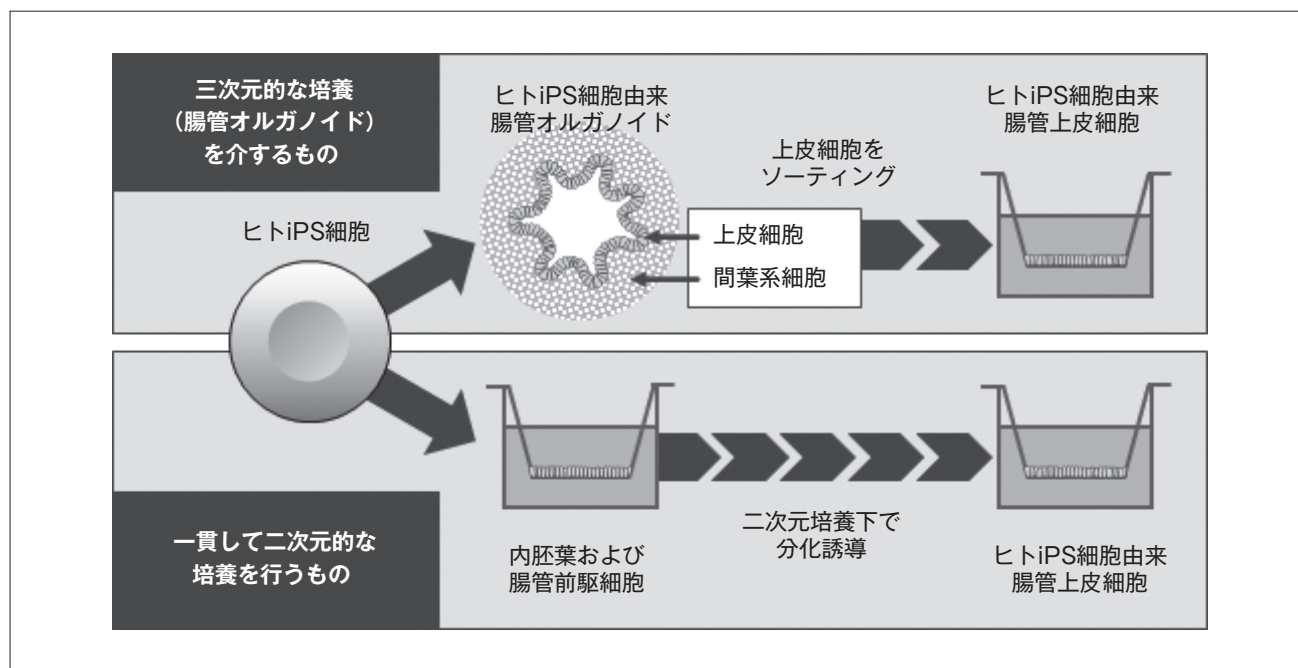


図2 ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞作製法の分類

ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の作製法は「三次元的な培養(腸管オルガノイド)を介するもの」と「一貫して二次元的な培養を行うもの」の2つに大別される。

側が内を向いた三次元構造が薬物動態学的な各種の試験に向かないこと等が考えられる。

Onozato らは2018年に、このヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドを薬物動態学的研究に応用した¹⁸⁾。なお、彼らはヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドを三次元培養状態のまま各種の試験に供している。P-glycoprotein(P-gp/ABCB1)と breast cancer resistance protein(BCRP/ABCG2)の排出輸送活性を、それぞれの蛍光基質である rhodamine123と hoechst33342を使用して評価した結果、いずれの基質もヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドの内腔側に排出され、蓄積している様子が観察された。さらに、rifampicin および1 α ,25-dihydroxyvitamin D3のいずれの作用によっても、CYP3 A4の mRNA 発現と酵素活性が1.5~4倍程度誘導された。これらのことから、ヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドは三次元状態でも複数の薬物動態学的な評価に応用できることが示唆されている。

Akazawa らは、ヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドから上皮細胞を単離し、薬物動態学的評価に応用可能なヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞単層膜を作製することに成功している¹⁹⁾。具体的には、磁気ビーズを用いた手法により、ヒト iPS 細胞由来腸

管オルガノイドに含まれる epithelial cell adhesion molecule(EpCAM/CD326) 陽性細胞をソーティングし、laminin 511-E8(laminin 511活性部位の調整品)でコーティングしたセルカルチャーインサート上に播種した後、21日間培養することにより作製される。³H]digoxin、sulfasalazine、および¹⁴C]glycylsarcosine を用いた輸送試験の結果、作製した単層膜は P-gp、BCRP、および peptide transporter 1(PEPT1)の輸送活性を有していた。また、midazolam、temocapril、および irinotecan を用いた代謝試験の結果、作製した単層膜は CYP3 A4、carboxylesterase(CES)1、CES2の代謝活性を有していることが明らかとなった。さらに彼らは、6種のエステルプロドラッグをヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞単層膜に添加する実験により各薬物の固有クリアランス(CL_{int})を算出し、同じ薬物をラットに投与する実験により最高血中濃度(C_{max})、血中薬物濃度-時間曲線下面積(AUC)、および BA を算出した。そして、*in vitro*(ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞単層膜)と *in vivo*(ラット)のそれぞれで得られた各パラメータの相関性を評価した結果、それぞれ高い相関係数(R)が算出され(CL_{int} - C_{max} ; 0.840、 CL_{int} -AUC ; 0.815、 CL_{int} -BA ; 0.815)、

強い相関性を示すことが明らかとなった。以上の知見は、腸管オルガノイドを介して作製されるヒト iPS細胞由来腸管上皮細胞単層膜が、生体における薬物代謝・吸収を予測するための有用なツールであることを示唆しており、今後、実際の臨床データとの相関性評価が期待される。

Yoshida らは、Akazawa らの報告¹⁹⁾と同様の手法でヒト iPS細胞由来腸管上皮細胞を作製し、その詳細な性状評価と長期培養を試みている²⁰⁾。まず、彼らの作製したヒト iPS細胞由来腸管オルガノイド中に含まれる EpCAM陽性細胞の割合は 59.6%であった。この EpCAM陽性細胞の薬物代謝酵素(CYP2J2および CYP3A)活性はソーティング前の約 1.4~2.5倍と理論値に近い値であり、EpCAM陰性細胞の酵素活性はほとんど検出限界に近い値であった。さらに、EpCAM陰性細胞が含まれている場合、単層膜バリア機能の指標である transepithelial electrical resistance (TEER; 経上皮膜抵抗)値が上昇せず、傍細胞輸送のマーカー基質である lucifer yellow の P_{app} も高い値を示していたことから、EpCAM陽性細胞ソーティングの重要性が示唆されている。懸念点として、作製したヒト iPS細胞由来腸管上皮細胞では CYP2J2が CYP3Aよりも高発現・高活性であり、生体の発現プロファイル²¹⁾とは逆の結果となっていることが述べられている。また、刷子縁膜マーカーである Villin が細胞質中に発現しており、同様の特徴が胚発生初期の腸細胞にもみられる²²⁾ことから、作製された細胞が未成熟である可能性についても記述されている。長期培養の検討として、ソーティングした EpCAM陽性細胞を再度 Matrigel に包埋し 8週間培養した結果、興味深いことに包埋前の EpCAM陽性細胞と同程度かそれ以上の薬物代謝酵素活性を有した腸管オルガノイドが作出されている。今後、この再形成腸管オルガノイドに関する詳細な知見が待たれるところである。

ヒト iPS細胞由来腸管オルガノイドの作製・培養法の改良に関する検討も複数報告されている。Watson らは、ヒト iPS細胞由来腸管オルガノイドをマウスの腎皮膜下に移植し、その成熟化に成功している²³⁾。移植されたヒト iPS細胞由来腸管オル

ガノイドはマウスの血管網によって栄養されており、上皮および間葉の顕著な拡大が見られたことに加え、単なる *in vitro* 培養状態のものと比較して形態学的・機能的に成熟化された。Jung らは、interleukin (IL)-2の作用により *in vitro* におけるヒト iPS細胞由来腸管オルガノイドの成熟化に成功し、*ABCB1*の遺伝子発現レベルが従来法と比較して上昇することを示している²⁴⁾。また、その効果が STAT3シグナルの活性化によるものであることを報告しており、腸管上皮の成熟化機構の一端を解明している²⁵⁾。さらに Takahashi らは、未分化ヒト iPS細胞から胚体内胚葉を分化誘導する際に Wnt3A と FGF2を、三次元培養の際に hepatocyte growth factor (HGF) と IL-22を添加することにより、ヒト iPS細胞由来腸管オルガノイドの分化が促進され、増殖性が高まることを見出している²⁶⁾。また同論文内において、Matrigel の代替となる培養基質についても検討しており、各種の応用が加速する基盤を整備している。以上の知見により、高機能なヒト iPS細胞由来腸管オルガノイドの維持・増殖を低コストで迅速に行うことが可能となることが予想され、今後の薬物動態学的应用に期待が持てる。

従来、ヒト iPS細胞由来腸管オルガノイドは小腸様の性質を有していることが知られており、大腸を模した評価を行う際の障壁となっていた²⁷⁾。Múnera らは、bone morphogenetic protein (BMP) 2の作用により、ヒト iPS細胞由来腸管オルガノイドに大腸様の性質を獲得させることに成功した²⁸⁾。医薬品の代謝は主に小腸で行われるが、大腸はタンパク質分解酵素の活性が小腸と比して低いため、ペプチド薬物の吸収部位として適用可能であることや、非病原性の細菌が豊富に存在し医薬品の代謝・吸収に影響を与えること、小腸と比較して吸収促進剤の効果がより期待できること、直腸下部から吸収された薬物は直接体循環血中に運ばれるため肝臓における初回通過効果を回避できることなど、多くの薬物動態学的特徴を有している^{29,30)}。そのため、大腸における種々の薬物動態学的評価についても行われるべきであり、こうしたヒト iPS細胞由来腸管オルガノイドの部位ごとのつくり分けはその一助となることが予想される。

昨年、Mithal らによって間葉系細胞を含まないヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドの作製法が報告された³¹⁾。作製法として、まず未分化ヒト iPS 細胞から作製した胚体内胚葉に dorsomorphin と SB431542 を3日間作用させることにより腸管前駆細胞(gut tube progenitor)を、そこから CHIR99021、BMP4、および retinoic acid を9日間作用させることによりヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイド前駆細胞を分化誘導する。次に、その細胞に含まれる CD47^{lo}/CD26^{hi} サブセットを Matrigel に包埋するという手法である。こうして作製されたヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドは99.2% が EpCAM 陽性であり、そのほとんどすべてが上皮細胞で構成されていると考えられる。医薬品の吸収・代謝・排泄は上皮細胞で行われるため、本法は薬物動態試験応用に適したヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドの作製法になると期待される。

2-3. 一貫して二次元的な培養を行うもの

上述のとおり、腸管オルガノイドを介したヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の作製法では、上皮細胞以外の細胞を含んだ三次元構造が生じるため、薬物動態学的応用の際には、ソーティングを伴う単層膜化のプロセスが必要となる。こうした操作は比較的煩雑であり、大規模かつ均質な系が求められる *in vitro* 薬物動態評価系としての応用には一定の課題を残しているといえる。そこで Iwao らは、一貫して二次元的な培養を行うことによりヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞を作製する手法を開発した³²⁾。本法は、まず70% コンフルエントに達した未分化ヒト iPS 細胞に activin A を3日間作用させることにより胚体内胚葉を、そこから FGF2 を4日間作用させることにより腸幹細胞様細胞(intestinal stem cell-like cells)を順次分化誘導する。次にその細胞を、Matrigel コーティングを施したプレートに継代播種した後、EGF を含む培地で19日間培養することによりヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞を作製するという手法である。

上記 Iwao らの論文が発表された2014年から今日に至るまで、コンスタントに(二次元培養による)ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の作製法改良および

その薬物動態試験応用についての報告がなされている(表1)。本分野でよく用いられる評価項目としては、マーカー遺伝子の発現レベル、マーカータンパク質の発現・局在、薬物トランスポーターの活性・輸送方向性、および薬物代謝酵素の活性・誘導能などがあげられ、評価の際の比較対象としてはヒト成人小腸(ヒト初代培養小腸上皮細胞)や Caco-2 細胞、臨床データ等が使用される場合が多い。

これまでに報告された二次元培養によるヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の作製法のうち主なものを一覧表とした(表2)。まずすべての報告に共通することとして、未分化ヒト iPS 細胞から、胚体内胚葉、腸管前駆細胞、腸管上皮細胞と、発生学的知見に基づいて順次分化誘導を行っており、分化転換等は行っていない。そのため、比較的発生学的知見が多い胚体内胚葉分化に関しては使用する液性因子のばらつきが少ない一方で、分化誘導期間の後半になるにつれてさまざまな液性因子が使用されている。また、分化誘導期間は平均で26~30日程度と、決して短いとはいえない。このように長期にわたって分化誘導を行っているヒト iPS 細胞が三次元的な隆起構造を形成し、輸送試験に適した単層膜とならないことがある。そのため、複数の報告において分化誘導期間の中期に継代操作を実施していると予想される^{32~37)}。筆者らのグループにおいても、Matrigel の重層³⁸⁾、液性因子の最適化³⁹⁾、およびアデノウイルスベクターによる発生に重要な遺伝子の過剰発現など⁴⁰⁾、独自の手法でヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の作製を行ってきた。最近では CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集技術との組み合わせにより、特定のトランスポーターの機能をノックアウトしたヒト iPS 細胞(由来腸管上皮細胞)の樹立(作製)を報告している^{41,42)}。

薬物動態評価は継続的に多くの細胞を必要とするため、細胞を作製する際の金銭的・時間的コストが非常に重要となってくる。Ogaki らは、未分化ヒト iPS 細胞から胚体内胚葉への分化の際、DMSO を添加することによって activin A を従来の16分の1にしても同等かそれ以上の分化効果を得られることを報告している⁴³⁾。また、Iwao らは、分化誘導後期において3つの低分子化合物(PD98059、

5-aza-2'-deoxycytidine、A-83-01)を使用してヒト iPS細胞由来腸管上皮細胞を作製している³³⁾。また、複数の報告において、単一もしくは複数の液性因子を産生する細胞の conditioned medium (CM ; 馴化培地、条件培地)を用いている^{38~42, 44)}。これらは、高価な液性因子の使用量を抑える・代替する手段として有力であり、比較的安価にヒト iPS細胞由来腸管上皮細胞を作製することができる。また、時間的コストを削減する戦略として Kondo らは、ヒト iPS細胞から分化誘導した腸管幹細胞を13種類のサプリメントを含む培地を使用することによって、少なくとも7継代は維持することが可能であり、そこから腸管上皮細胞に分化誘導可能であることを報告している⁴⁵⁾。本法は腸管幹細胞までの分化誘導期間(7日間)を短縮する手法として期待が寄せられるが、継代を経るごとに増殖能や薬物代謝酵素・トランスポーターの発現が低下していくことが示唆されており、今後の応用・改良が待たれる。

分野全体に共通する認識として、ヒト iPS細胞由来腸管上皮細胞はヒト成人小腸と比較して未熟な表現型を示すため^{23, 27)}、正確な *in vitro* 薬物動態評価のために生体に近いレベルの機能を有した細胞を作製する必要がある、その目的を達成するためにさまざまな検討が重ねられてきた。Kabeya らは、cAMP³⁷⁾、および forskolin⁴⁶⁾を作用させることによりヒト iPS細胞由来腸管上皮細胞の機能が向上することを報告しているが、開発医薬品の F_a および消化管における代謝の回避率(F_g)の予測系として用いるためには、さらなる改良が必要であるとの見方を示している。

3. おわりに

本総説で述べたように、ヒト iPS細胞由来腸管上皮細胞について数々の報告がなされてきたが、ある特定のパラメータの改善や限定された用途で応用可能であることを主張するものがほとんどである。すなわち、ヒト腸管における吸収・代謝・排泄を同時に評価可能なすべての機能を兼ね備えた細胞系は未だ確立されていない。今後は従来の手法に捉われることなく、さまざまな研究手法・モダリティを駆使して細胞の高機能化を進める検討を行うと同時に、(従来の *in vitro* 薬物動態評価系を含めて)これまで確立されてきた系それぞれの特性を活かした使い分けを考えていく段階にあると思われる。近い将来、真の *in vitro* 薬物動態評価系が確立され、安全な医薬品の効率的な開発が実現することを願う。

謝辞

医薬品情報収集にあたりご助言いただいた、大阪大学薬学部医療薬学分野 大野 心 学士に感謝申し上げます。また、図の作成にあたりご協力いただいた、大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野 鳥羽由希子 修士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。

表2 一貫して二次元的な培養を行うヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の分化誘導プロトコル

2014. Iwao <i>et al.</i> Drug Metab Pharmacokinet	Total 26 days	2 days	1 day	4 days
	Basal Medium	RPMI 1640	RPMI 1640	DMEM/F12
	Supplements /Method	0.5% FBS, 2mM GlutaMAX 100 units/mL P, 100 µg/mL S 100 ng/mL activin A	2% FBS, 2mM GlutaMAX 100 units/mL P, 100 µg/mL S 100 ng/mL activin A	2% FBS, 2mM GlutaMAX 250 ng/mL FGF2
2015. Ozawa <i>et al.</i> Sci Rep	Total 34 days	4 days	15 days	15 days
	Basal Medium	L-Wnt3A-expressing cell-conditioned RPMI1640	DMEM-High Glucose	L-Wnt3A-expressing cell-conditioned DMEM-High Glucose
	Supplements /Method	0.2~0.5% FBS, 4mM L-Gln 1 × B-27 100ng/mL activin A	10% KSR, 2mM L-Gln, P, S 1% NEAA, 100 µM BME 5 µM BIO, 10 µM DAPT	10% KSR, 2 mM L-Gln, P, S 1% NEAA, 100 µM BME 5 µM BIO, 10 µM DAPT 10 µM SB431542, 250 ng/mL EGF
2015. Ogaki <i>et al.</i> Sci Rep	Total 8-15 days	4 days	4-11 days	
	Basal Medium	4500 mg/L glucose DMEM	DMEM	
	Supplements /Method	L-Gln, P, S 2% B-27, NEAA, BME 0.8% DMSO 6.25 ng/mL activin A	2000 mg/mL glucose 10% KSR, L-Gln, P, S NEAA, BME 5 µM BIO, 10 µM DAPT	
2015. Iwao <i>et al.</i> Drug Metab Dispos 2016. Kodama <i>et al.</i> Drug Metab Dispos 2017. Kabeya <i>et al.</i> Biochem Biophys Res Commun	Total 26 days	2 days	1 day	4 days
	Basal Medium	RPMI 1640	RPMI 1640	DMEM/F12
	Supplements /Method	0.5% FBS, 2 mM GlutaMAX 100 units/mL P, 100 µg/mL S 100 ng/mL activin A	2% FBS, 2 mM GlutaMAX 100 units/mL P, 100 µg/mL S 100 ng/mL activin A	2% FBS, 2 mM GlutaMAX 250 ng/mL FGF2
2016. Negoro <i>et al.</i> Biochem Biophys Res Commun	Total 30 days	4 days	4 days	12 days
	Basal Medium	L-Wnt-3A-expressing cell-conditioned RPMI1640	intestinal differentiation medium ^A	intestinal differentiation medium ^A
	Supplements /Method	0.2% FBS, 1 × GlutaMAX 1 × B-27 100 ng/mL activin A	(A:DMEM-High Glucose containing 10% KSR, 1 × GlutaMAX, P, S 1% NEAA, 100 µM BME) 5 µM BIO, 10 µM DAPT	1 µM BIO, 2.5 µM DAPT
2016. Kodama <i>et al.</i> Drug Metab Pharmacokinet	Total 26 days	2 days	1 day	4 days
	Basal Medium	RPMI 1640	RPMI 1640	DMEM/F12
	Supplements /Method	0.5% FBS, 2 mM GlutaMAX 100 units/mL P, 100 mg/mL S 100 ng/mL activin A	2% FBS, 2 mM GlutaMAX 100 units/mL P, 100 mg/mL S 100 ng/mL activin A	2% FBS, 2 mM GlutaMAX 250 ng/mL FGF2
2018. Kabeya <i>et al.</i> Drug Metab Dispos	Total 26 days	2 days	1 day	4 days
	Basal Medium	RPMI 1640	RPMI 1640	DMEM/F12
	Supplements /Method	0.5% FBS, 2 mM GlutaMAX 100 units/mL P, 100 µg/mL S 100 ng/mL activin A	2% FBS, 2 mM GlutaMAX 100 units/mL P, 100 µg/mL S 100 ng/mL activin A	2% FBS, 2 mM GlutaMAX 250 ng/mL FGF2
2018. Negoro <i>et al.</i> Stem Cell Reports	Total 28 days	4 days	4 days	20 days
	Basal Medium	L-Wnt-3A-expressing cell-conditioned RPMI1640	intestinal differentiation medium ^B	L-WRN cell-conditioned intestinal differentiation medium ^B
	Supplements /Method	0.2% FBS, 1 × GlutaMAX, 1 × B-27 100 ng/mL activin A	(B:DMEM-High Glucose containing 10% KSR, 1 × GlutaMAX, P, S 1% NEAA) 20 nM LY2090314	10 µM SB202190, 1 µM DEX 50 ng/mL EGF, 20 ng/mL IGF-1
2019. Takayama <i>et al.</i> Cell Mol Gastroenterol Hepatol	Total 34 days	4 days	(At day 2)	4 days
	Basal Medium	RPMI1640		intestinal differentiation medium ^A
	Supplements /Method	1 × GlutaMAX, P, S 1 × B-27 100 ng/mL activin A	Transduced 3000 VPs/cell of Ad-FOXA2 for 1.5 hours	5 µM BIO, 10 µM DAPT
2020. Kawai <i>et al.</i> Mol Ther Methods Clin Dev	Total 27 days	1 day	2 days	4 days
	Basal Medium	RPMI 1640	RPMI 1640	intestinal differentiation medium ^B
	Supplements /Method	1 × GlutaMAX, P, S, 1 × B-27 1 µM CHIR99021 100 ng/mL activin A	1 × GlutaMAX, P, S, 1 × B-27 100 ng/mL activin A	20 nM LY2090314

二次元培養によるヒト iPS細胞由来腸管上皮細胞の作製法のうち主なものを一覧表とした。Supplements内の太字は分化誘導に寄与する主要な液性因子を示す。

(略語：P；penicillin, S；streptomycin, B-27；B-27 Supplement Minus Vitamin A, N-2；N-2 Supplement, FGF；fibroblast growth factor, NEAA；MEM Non-Essential Amino Acids Solution, EGF；epidermal growth factor, BME；β-mercaptoethanol, BIO；6-bromindirubin-30-oxime, DAPT；N-[(3,5-difluorophenyl) acetyl]-L-alanyl-2-phenyl-1, 1-dimethylethyl ester-glycine, KSR；KnockOut Serum Replacement, DEX；dexamethasone, IGF-1；insulin-like growth factor 1, FOXA2；forkhead box A2, CDX2；caudal-related homeobox transcription factor 2)

(At day 7)	19 days		
	DMEM/F12		
10 μ M Y-27632 for 1 hr ↓ Passaged on Matrigel-coated 24-well plates	2% FBS, 2mM L-Gln 100 units/mL P, 100 μ g/mL S 2% B-27, 1% N-2, 1% NEAA 20 ng/mL EGF (10 μ M Y-27632 during the initial 24 h)		Ref. 32
			Ref. 44
			Ref. 43
(At day 7)	7 days	12 days	
	DMEM/F12	DMEM/F12	
10 μ M Y-27632 for 1 hr ↓ Passaged on Matrigel-coated 24-well plates	2% FBS, 2 mM L-Gln, 100 units/mL P 100 μ g/mL S, 2% B-27, 1% N-2, 1% NEAA 20 ng/mL EGF (10 μ M Y-27632 during the initial 24 h)	2% FBS, 2 mM L-Gln, 100 units/mL P 100 μ g/mL S, 2% B-27, 1% N-2, 1% NEAA 20 ng/mL EGF, 20 μ M PD98059 5 μ M 5-aza-2'-deoxycytidine, 0.5 μ M A-83-01	Ref. 33, 35, 36
5 days	(At day 25)	5 days	
L-Wnt-3A-expressing cell-conditioned intestinal differentiation medium ^A		intestinal differentiation medium ^A	
0.1 μ M BIO, 1 μ M DAPT 2 μ M SB431542, 250 ng/mL EGF	Overlaid with thin Matrigel (50 mg/cm ²)	250 ng/mL EGF	Ref. 38
(At day 7)	19 days		
	DMEM/F12		
10 μ M Y-27632 for 1 hr ↓ Passaged on Matrigel-coated 24-well plates	2% FBS, 2 mM L-Gln, 100 units/mL P 100 μ g/mL S, 2% B-27, 1% N-2, 1% NEAA 20 ng/mL EGF MEKi, DNMTi, TGF-bi (10 μ M Y-27632 during the initial 24 h)		Ref. 34
(At day 7)	7 days	12 days	
	DMEM/F12	DMEM/F12	
10 μ M Y-27632 for 1 hr ↓ Passaged on Matrigel-coated 24-well plates	2% FBS, 2 mM L-Gln, 100 units/mL P 100 μ g/mL S, 2% B-27, 1% N-2, 1% NEAA 20 ng/mL EGF (10 μ M Y-27632 during the initial 24 h)	2% FBS, 2 mM L-Gln, 100 units/mL P 100 μ g/mL S, 2% B-27, 1% N-2, 1% NEAA 20 ng/mL EGF, 20 μ M PD98059 5 μ M 5-aza-2'-deoxycytidine, 0.5 μ M A-83-01 1 mM 8-Br-cAMP, 500 mM IBMX	Ref. 37
			Ref. 39
(At day 8)	11 days	15 days	
	intestinal differentiation medium ^A	Wnt-3A-conditioned intestinal differentiation medium ^A	
Transduced 3000 VPs/cell of Ad-CDX2 for 1.5 hours	1 μ M BIO, 2.5 μ M DAPT	0.1 μ M BIO, 1 μ M DAPT 250 ng/mL EGF, 10 μ M SB431542	Ref. 40
20 days			
L-WRN cell-conditioned intestinal differentiation medium ^B			
3 nM LY2090314 10 μ M SB202190, 1 μ M DEX 50 ng/mL EGF, 20 ng/mL IGF-1			Ref. 41

文献

- 1) Drugs@FDA Data Files, FDA, <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/drugsfda-data-files> (cited 21 July, 2020)
- 2) 薬価基準収載品目リスト及び後発医薬品に関する情報について(令和2年6月19日適用), 厚生労働省, <https://www.mhlw.go.jp/topics/2020/04/tp20200401-01.html> (cited 21 July, 2020)
- 3) Nauli A.M., *et al.*, *Curr. Clin. Pharmacol.*, **8**, 247-255 (2013)
- 4) Doherty M.M., *et al.*, *Clin. Pharmacokinet.*, **41**, 235-253 (2002)
- 5) Berben P., *et al.*, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **119**, 219-233 (2018)
- 6) Hu Y., *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **107**, 81-90 (2016)
- 7) Martignoni M., *et al.*, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **2**, 875-894 (2006)
- 8) Sun H., *et al.*, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **4**, 395-411 (2008)
- 9) Spence J.R., *et al.*, *Nature*, **470**, 105 (2011)
- 10) McCracken K.W., *et al.*, *Nat. Protoc.*, **6**, 1920-1928 (2011)
- 11) Forbester J.L., *et al.*, *Infect. Immun.*, **83**, 2926-2934 (2015)
- 12) Lees E.A., *et al.*, *J. Vis. Exp.*, **2019**, 59478 (2019)
- 13) Sato S., *et al.*, *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, **7**, 686-688.e5 (2019)
- 14) Crespo M., *et al.*, *Nat. Med.*, **23**, 878-884 (2017)
- 15) Sim H., *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 3455 (2020)
- 16) Takahashi Y., *et al.*, *EBioMedicine*, **23**, 34-45 (2017)
- 17) Kitano K., *et al.*, *Nat. Commun.*, **8**, 765 (2017)
- 18) Onozato D., *et al.*, *Drug Metab. Dispos.*, **46**, 1572-1580 (2018)
- 19) Akazawa T., *et al.*, *Drug Metab. Dispos.*, **46**, 1497-1506 (2018)
- 20) Yoshida S., *et al.*, *Sci. Rep.*, **10**, 5989 (2020)
- 21) Paine M.F., *et al.*, *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 880-886 (2006)
- 22) Shibayama T., *et al.*, *J. Cell Biol.*, **105**, 335-344 (1987)
- 23) Watson C.L., *et al.*, *Nat. Med.*, **20**, 1310-1314 (2014)
- 24) Jung K.B., *et al.*, *Nat. Commun.*, **9**, 3039 (2018)
- 25) Jung K.B. *et al.*, *J. Clin. Med.*, **8**, 976 (2019)
- 26) Takahashi Y., *et al.*, *Stem Cell Reports*, **10**, 314-328 (2017)
- 27) Finkbeiner S.R., *et al.*, *Stem Cell Reports*, **4**, 1140-1155 (2015)
- 28) Münner J.O., *et al.*, *Cell Stem Cell*, **21**, 51-64.e6 (2017)
- 29) Kimura T., *et al.*, *YAKUGAKU ZASSHI*, **129**, 911-923 (2009)
- 30) Zimmermann M., *et al.*, *Science*, **363**, eaat9931 (2019)
- 31) Mithal A., *et al.*, *Nat. Commun.*, **11**, 215 (2020)
- 32) Iwao T., *et al.*, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **29**, 44-51 (2014)
- 33) Iwao T., *et al.*, *Drug Metab. Dispos.*, **43**, 603-610 (2015)
- 34) Kodama N., *et al.*, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **31**, 193-200 (2016)
- 35) Kodama N., *et al.*, *Drug Metab. Dispos.*, **44**, 1662-1667 (2016)
- 36) Kabeya T., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **486**, 143-148 (2017)
- 37) Kabeya T., *et al.*, *Drug Metab. Dispos.*, **46**, 1411-1419 (2018)
- 38) Negoro R., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **472**, 631-636 (2016)
- 39) Negoro R., *et al.*, *Stem Cell Reports*, **11**, 1539-1550 (2018)
- 40) Takayama K., *et al.*, *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, **8**, 513-526 (2019)
- 41) Kawai K., *et al.*, *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, **17**, 49-57 (2020)
- 42) Negoro R., *et al.*, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **35**, 288-296 (2020)
- 43) Ogaki S., *et al.*, *Sci. Rep.*, **5**, 17297 (2015)
- 44) Ozawa T., *et al.*, *Sci. Rep.*, **5**, 16479 (2015)
- 45) Kondo S., *et al.*, *Biol. Open*, **9**, bio049064 (2020)
- 46) Kabeya T., *et al.*, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **35**, 374-382 (2020)