



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬科学）
報告番号	乙 第1878号
学位記番号	論 第 196 号
氏 名	武中 徹
授与年月日	平成 29年 2月 28日
学位論文の題名	腸管における薬物吸収及び代謝の予測モデルの構築
論文審査担当者	主査： 湯浅 博昭 副査： 松永 民秀, 牧野 利明, 林 秀敏

名古屋市立大学学位論文

腸管における薬物吸収及び代謝の
予測モデルの構築

平成 28 年度（2017 年 2 月）

大鵬薬品工業株式会社

武中 徹

1. 本論文は、2017年2月に名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 湯浅 博昭 教授

副査 松永 民秀 教授

副査 牧野 利明 教授

副査 林 秀敏 教授

2. 本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

1) Toru Takenaka, Naomoto Harada, Jiro Kuze, Masato Chiba, Takahiro Iwao, and Tamihide Matsunaga

Human Small Intestinal Epithelial Cells Differentiated from Adult Intestinal Stem Cells as a Novel System for Predicting Oral Drug Absorption in Humans
Drug Metab. Dispos., **42**, 1947-1954 (2014).

2) Toru Takenaka, Naomoto Harada, Jiro Kuze, Masato Chiba, Takahiro Iwao, and Tamihide Matsunaga

Application of a Human Intestinal Epithelial Cell Monolayer to the Prediction of Oral Drug Absorption in Humans as a Superior Alternative to the Caco-2 Cell Monolayer
J. Pharm. Sci., **105**, 915-924 (2016).

3) Toru Takenaka, Kanako Kazuki, Naomoto Harada, Jiro Kuze, Masato Chiba, Takahiro Iwao, Tamihide Matsunaga, Satoshi Abe, Mitsuo Oshimura, and Yasuhiro Kazuki

Development of Caco-2 cells co-expressing CYP3A4 and NADPH-cytochrome P450 reductase using a human artificial chromosome for the prediction of intestinal extraction ratio of CYP3A4 substrates
Drug Metab. Pharmacokinet., in press, DOI: 10.1016/j.dmpk.2016.08.004.

3. 本論文の基礎となる研究は、大鵬薬品工業株式会社 薬物動態研究所において、千葉雅人 博士の指導の下に行われた。

略語一覽

ABT	1-aminobenzotriazole
ASBT	apical sodium-dependent bile acid transporter
BCRP	breast cancer resistance protein
BrdU	bromodeoxyuridine
CL _{int}	intrinsic clearance
CNT	concentrative nucleoside transporter
CYP	cytochrome P450
CPR	NADPH-cytochrome P450 reductase
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMEM/F12	DMEM mixed 1:1 with Ham's F-12
<i>E_g</i>	intestinal extraction ratio in humans
EGF	epidermal growth factor
ENT	equilibrative nucleoside transporter
ER	extraction ratio
ESI	electrospray ionization
<i>F_a</i>	fraction absorbed in humans
<i>F_g</i>	intestinal availability in humans
<i>F_h</i>	hepatic availability in humans
FBS	fetal bovine serum
FD-4	fluorescein isothiocyanate-dextran with an average molecular weight of 4000
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
HAC	human artificial chromosome
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HIEC	human small intestinal epithelial cell
IFABP	intestinal fatty acid-binding protein
IS	internal standard
iPS	induced pluripotent stem
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LGR5	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5
MCT1	monocarboxylate transporter 1
MRM	multiple-reaction monitoring
MRP	multidrug resistance protein

NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
OATP2B1	organic anion-transporting polypeptide 2B1
OCT1	organic cation transporter 1
P_{app}	apparent permeability coefficient
P-gp	P-glycoprotein
PAMPA	parallel artificial membrane permeability assay
PEG	polyethylene glycol
PPIA	peptidylprolyl isomerase A
RMSE	root mean square error
SI	sucrase-isomaltase
TEER	transepithelial electrical resistance
TM	transport medium
UGT	UDP-glucuronosyltransferase

目次

第一章	序論.....	1
第二章	HIEC に含まれる小腸幹細胞の enterocyte への分化及びその機能評価..	4
2.1	緒言.....	4
2.2	実験方法.....	4
2.2.1	試薬及び細胞.....	4
2.2.2	細胞の培養.....	5
2.2.3	細胞増殖能の評価.....	6
2.2.4	RNA 抽出及び逆転写反応.....	6
2.2.5	Real-time RT-PCR.....	6
2.2.6	マルチプレックス mRNA 発現量測定.....	7
2.2.7	透過型電子顕微鏡観察.....	8
2.2.8	Paracellular pore のサイズ及び間隙率の測定.....	8
2.2.9	P-gp 及び BCRP の輸送機能評価.....	10
2.2.10	化合物濃度測定.....	10
2.3	結果.....	12
2.3.1	小腸幹細胞の維持及び enterocyte への分化.....	12
2.3.2	HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜の経上皮電気抵抗値.....	13
2.3.3	HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜における paracellular pore の特性評価.....	14
2.3.4	トランスポーターの mRNA 発現量測定並びに P-gp 及び BCRP の機能評価.....	17
2.3.5	薬物代謝酵素の mRNA 発現量測定.....	18
2.4	考察.....	19
2.5	小括.....	21
第三章	HIEC を用いた薬物吸収の予測モデルの評価.....	22
3.1	緒言.....	22
3.2	実験方法.....	22
3.2.1	試薬及び細胞.....	22
3.2.2	細胞の培養.....	23
3.2.3	輸送試験及び PAMPA 透過性試験.....	23
3.2.4	化合物濃度測定.....	24

3.2.5	HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜における P_{app} 値及び F_a 値の相関性の評価.....	27
3.2.6	統計解析.....	27
3.2.7	吸収性クラスのカテゴリ化の評価.....	27
3.3	結果.....	28
3.3.1	HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜並びに PAMPA における透過性.....	28
3.3.2	P_{app} 値及び F_a 値の相関性並びに吸収性クラスのカテゴリ化の比較.....	29
3.3.3	Paracellular route を介して透過する薬剤における吸収性の予測性比較.....	32
3.4	考察.....	34
3.5	小括.....	36
第四章	CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 cells を用いた腸管代謝の予測モデルの構築及び評価.....	37
4.1	緒言.....	37
4.2	実験方法.....	38
4.2.1	試薬及び細胞.....	38
4.2.2	細胞の培養.....	39
4.2.3	RNA 抽出及び逆転写反応.....	39
4.2.4	Real-time RT-PCR.....	39
4.2.5	CPR 活性及び CYP3A4 による代謝活性の評価.....	39
4.2.6	輸送/代謝試験.....	40
4.2.7	化合物濃度測定.....	42
4.2.8	抽出率の算出.....	44
4.3	結果.....	45
4.3.1	CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞における CPR 及び CYP3A4 の発現及び活性の評価.....	45
4.3.2	CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞における CYP3A4 代謝活性の継代後の安定性評価.....	47
4.3.3	CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞の単層膜の形成.....	48
4.3.4	CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 cells を用いた CYP3A4 基質薬の抽出率の算出.....	49
4.4	考察.....	51
4.5	小括.....	53

総括	54
謝辞	55
引用文献	56

第一章 序論

薬剤の経口投与は、非侵襲的かつ利便性に優れた投与経路であり、薬物を全身循環や標的臓器に送達するために最も汎用される投与方法の一つである。経口投与された薬剤が全身循環に至る割合であるバイオアベイラビリティは、消化管における吸収率 (F_a)、吸収上皮細胞 (enterocyte) 内における代謝の回避率 (F_g)、肝臓における代謝の回避率 (F_h) の積で表される。したがって、開発候補化合物の優先順位付けやヒトにおける薬物動態を予測する際には、これら腸管及び肝臓における初回通過効果を正確に予測することが重要である。

薬物の腸管吸収のメカニズムは、受動輸送と能動輸送に大別される。主な受動輸送の経路としては、頂端膜から enterocyte 細胞内を経由して側底膜に透過する細胞内経路 (transcellular route) と、enterocyte と enterocyte の間に形成される密着結合 (tight junction) の細孔を介して透過する細胞間隙経路 (paracellular route) がある。またトランスポーターが介在する能動輸送においては、ペプチドトランスポーターや核酸トランスポーター、organic anion-transporting polypeptide (OATP) といった、腸管内腔から細胞内へと吸収方向に働くトランスポーターと、P-glycoprotein (P-gp) や breast cancer resistance protein (BCRP), multidrug resistance protein (MRP) 2 といった、細胞内から腸管内腔への排泄方向に働くトランスポーターが、薬物の吸収過程を制御することが知られている¹⁾。

ヒト F_a の予測や、膜透過性の評価、トランスポーターの機能評価には、ヒト結腸がん由来細胞株である Caco-2 細胞が汎用されてきた²⁻⁴⁾。しかしながら、Caco-2 細胞はがん由来の細胞株であるためか、ヒトの正常な *in vivo* の enterocyte に比較して、一部のトランスポーターの発現量が大きく異なっていることや⁵⁻⁷⁾、Caco-2 細胞が細胞間に非常に強固なタイトジャンクションを形成することから、paracellular route を介した透過が非常に低いといった差異^{8,9)}が報告されている。これらの *in vivo* の enterocyte との乖離の結果、候補化合物の F_a を誤って評価し、結果的に化合物の合成展開や開発候補化合物の優先順位付けをミスリードしてしまうことが懸念される。

正常なヒト enterocyte を代用すれば、上記の乖離を埋めることが期待されるものの、初代培養の enterocyte は一般的に入手が困難であることに加え、増殖性に乏しいこともあり¹⁰⁾、初代培養 enterocyte を用いて薬物動態学的な評価に用いた報告は限られており¹¹⁻¹³⁾、また F_a 予測モデルとして応用した例は報告されていない。一方、腸管上皮の陰窩底部に存在している小腸幹細胞は、高い増殖能と enterocyte への分化能を有することが知られており^{14,15)}、著者らのグループにおいても、小腸幹細胞を含む市販の初代培養のヒト小腸上皮細胞 (human small intestinal epithelial cell, HIEC) を培養し、コロニーを単離することで、拡大培養可能な HIEC が得られたことを報告している¹⁶⁾。

そこで本論文の前半では、小腸幹細胞を *enterocyte* へと分化させた HIEC の単層膜を用いて新規 *Fa* 評価系を構築し、得られた知見について論ずる。

一方、腸管代謝については、腸管に発現する cytochrome P450 (CYP) 分子種のうち、約 80% が CYP3A4 とされており¹⁷⁾、また医薬品の約 50% が CYP3A4 によって代謝を受けることから¹⁸⁾、CYP3A4 が薬物の腸管代謝において中心的な役割を担っていると考えられている。CYP3A4 は *enterocyte* の細胞内に発現していることから、腸管における代謝を定量的に予測する際には、細胞膜の透過過程と細胞内における代謝の過程を統合的に評価する必要があると考えられている^{19,20)}。

膜透過性と代謝安定性を個別に評価し、速度論的なモデルによって *Fg* を予測する評価系としては、Yang らが、*in vitro* 試験より得られた膜透過性と肝ミクロソームによる CL_{int} から CYP3A 基質薬の *Fg* を予測できる Q_{Gut} モデルを提唱しており²¹⁾、同様に、Nishimuta らは人工脂質膜である parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) の透過性と肝及び小腸ミクロソームから得られた CL_{int} の値を用いて、CYP3A 基質薬のみならず、UGT 基質薬における *Fg* を予測する方法を報告している²²⁾。また、膜透過性の高い CYP3A 基質薬に限定して、小腸ミクロソームを用いて得られた CL_{int} のみから *Fg* を予測できる SIA モデルも報告されている²³⁾。

こうした速度論的なモデルとは異なるアプローチとして、CYP3A4 を発現した上皮細胞単層膜を用いた経細胞輸送試験における代謝抽出率から、膜透過と代謝の過程を同時に評価する方法も報告されている。現在までに、CYP3A4 発現量が著しく低いことが知られている Caco-2 細胞や、イヌ又はブタの腎臓由来細胞である MDCKII 細胞又は LLC-PK1 細胞といった、経口吸収性に汎用されている上皮細胞株に、プラスミドベクター²⁴⁾やウイルスベクター^{25,26)}を用いた CYP3A4 の強制発現、あるいは 1,25-dihydroxyvitamin-D₃²⁷⁾を用いた CYP3A4 誘導により、CYP3A4 基質薬の細胞単層膜透過時における代謝抽出率を評価した研究が複数報告されている。これらの CYP3A4 発現上皮細胞は、ある程度の CYP3A4 活性を有することが報告されてはいるものの、ヒト *Fg* の予測性を評価した報告は未だなされていない。これらの発現細胞における代謝活性が不十分であること^{26,28)}、細胞の継代によって代謝活性が低下すること^{24,25,29)}が報告されており、これらの点が CYP3A4 発現細胞を用いたヒト腸管代謝の定量的予測が行われなかった一因として推察される。

一方、ヒト人工染色体 (human artificial chromosome, HAC) ベクターは、宿主細胞のゲノムに取り込まれず、独立して維持されるエピソームベクターであり、従来のプラスミドベクターやウイルスベクターに比較して、長期にわたって安定的に搭載遺伝子を発現できることが特長の一つである^{30,31)}。

そこで本論文の後半では、CYP3A4 遺伝子に加えて、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) から CYP3A4 に電子を伝達する、NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR) の遺伝子を、HAC ベクターを用いて導入した Caco-2 細胞を用い、上記の課題を克服した腸管代謝の新規評価系について検討を行い、得られた知見について論ずる。

第二章 HIEC に含まれる小腸幹細胞の enterocyte への分化及びその機能評価

2.1 緒言

腸管上皮における細胞更新のサイクルは非常に早く、数日でほぼすべての細胞が入れ替わるとされている。この非常に活発な新陳代謝において最も重要な役割を担っているのが、成体幹細胞の一つである、小腸幹細胞である。成体幹細胞は長期にわたる増殖能と複数の系統の細胞への分化能を有することが知られており、腸管をはじめ、多くの臓器において見出されている。

腸管においては、小腸幹細胞は陰窩底部に局在しており、増殖を繰り返しながら、分化しつつ絨毛側へと移動し、最終的に enterocyte に分化した後、絨毛先端にてアポトーシスを起こして脱落する³²⁾。

2010年に Suzuki らは、市販の HIEC に小腸幹細胞が含まれていること、この小腸幹細胞が増殖能を有していること、また、自発的に enterocyte を含む、複数の系統の細胞に分化したことを報告している¹⁴⁾。我々の研究グループでも、同じ細胞を購入し、培養を行うことで増殖性の高いコロニーを単離することに成功したことを報告している¹⁶⁾。

Caco-2 細胞はカルチャーインサート上で約 3 週間培養することで、極性を持った単層膜を形成し、その頂端膜側にはタイトジャンクションや微絨毛も観察され、またスクラーゼやペプチダーゼなどの消化酵素も発現することから、ヒトの腸管上皮細胞のモデルとして、薬物動態学の分野だけでなく、栄養学や免疫学など、様々な分野において汎用されている。一方で、ヒトの正常な *in vivo* の enterocyte に比較して、CYP3A4 などの薬物代謝酵素や、concentrative nucleoside transporters (CNTs) などの一部のトランスポーターの発現量が低いこと⁵⁻⁷⁾、paracellular route を介した透過性が非常に低い^{8,9)}といった差異が知られている。こうした乖離が起こる原因は、現時点で明らかになってはいないが、考えられる可能性として、Caco-2 細胞がヒト結腸がん由来の細胞株であることが挙げられる。

そこで本章では、単離した HIEC 中に含まれる小腸幹細胞を enterocyte に分化させることで、正常な enterocyte による新規吸収評価モデルを構築すること、また、構築した新規モデルと Caco-2 細胞との機能面における特徴を比較することを目的に、種々の検討を行った。

2.2 実験方法

2.2.1 試薬及び細胞

小腸幹細胞を含むことが報告されている、白人女性 (19 歳) の空腸由来の初代培養の HIEC (ACBRI519) は Cell Systems (Kirkland, WA) より購入した¹⁴⁾。初代 HIEC を培養し、単離されたコロニーを拡大培養して得られた HIEC を、大

鵬薬品工業(株)原田直幹博士より供与頂いた。Caco-2 細胞 (HTB-37) は American Type Culture Collection (Rockville, VA) より購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), DMEM mixed 1:1 with Ham's F-12 (DMEM/F12), 0.25% trypsin-EDTA, Hanks' balanced salt solution (HBSS), nonessential amino acids, penicillin-streptomycin, GlutaMAX, PureLink RNA Mini Kit は Life Technologies (Carlsbad, CA) より購入した。Bovine pituitary extract は Kohjin Bio (Saitama, Japan) より購入した。Fetal bovine serum (FBS) は SAFC Biosciences (Lenexa, KS) より購入した。Recombinant human insulin, epidermal growth factor (EGF), digoxin, mitoxantrone, verapamil 及び propranolol は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より購入した。Fibrillar collagen-coated 24-well inserts は BD Gentest (Woburn, MA) より購入した。Twelve-well transwell membrane inserts は Corning (Corning, NY) より購入した。Colorimetric bromodeoxyuridine (BrdU) cell proliferation assay kit は Millipore (Billerica, MA) より購入した。Cell Counting Kit-8 は Dojindo (Kumamoto, Japan) より購入した。Human small intestinal total RNA (由来となる小腸の部位は不明, mucosa 以外の粘膜下層及び筋層を含む) は BioChain Institute (Newark, CA) より購入した。PrimeScript RT reagent kit は Takara (Shiga, Japan) より購入した。FAST SYBR Green Master Mix, TaqMan fast universal PCR master mix, TaqMan Gene Expression Assay は Applied Biosystems (Foster City, CA) より購入した。QuantiGene Sample Processing Kit 及び QuantiGene Plex 2.0 Assay Kit は Affymetrix (Santa Clara, CA) より購入した。Polyethylene glycol (PEG) 200 及び PEG400 は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) より購入した。PEG600 及び PEG1000 は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) より購入した。Ko143 は Tocris Bioscience (Bristol, UK) より購入した。Fluvastatin は LKT Laboratories (St. Paul, MN) より購入した。その他の試薬は全て市販の高速液体クロマトグラフ用, 分析用もしくは特級品を用いた。

2.2.2 細胞の培養

HIEC は, 10% FBS, 1% GlutaMAX, 10 mM dexamethasone, 1 mg/mL insulin, 20 ng/mL EGF, 50 mM 2-mercaptoethanol, 50 U/mL penicillin 及び 50 µg/mL streptomycin を含む DMEM/F-12 を用いて, タイプ I コラーゲンでコートされた culture dishes (100 mm) 上で培養した。Caco-2 細胞は, 10% FBS, 1% nonessential amino acids, 1% GlutaMAX, 50 U/mL penicillin 及び 50 µg/mL streptomycin を含む DMEM (4.5 g/l glucose) を用いて, 細胞培養用フラスコ上 (75 cm²) で培養した。両細胞は 5% CO₂ / 95% air 条件下, CO₂ インキュベーター中で 37°C にて培養した。4~5 日毎に HICE 及び Caco-2 細胞を 0.25% trypsin-EDTA にて剥離し, 1:4 の継代比率で継代を行った。カルチャーインサートに播種する際は, HIEC は

24-well fibrillar collagen-coated inserts 上に 1×10^5 cells/well にて, Caco-2 細胞は 12-well noncoated membrane inserts 上に 6.3×10^4 cells/well にて播種した. HIEC は播種後, 上記の拡大培養用の培地に 50 mg/mL bovine pituitary extract を添加した分化用培地を用いて, 3 日毎に培地交換を行い, 8~9 日間培養した. Caco-2 細胞は, 播種後 1 週間は 1 回, 2 週目以降は 2 日毎に上記の拡大培養用培地を用いて培地交換を行い, 18~20 日間培養した. 経上皮電気抵抗値 (TEER) は Millicell-ERS (Millipore) を用いて測定した.

2.2.3 細胞増殖能の評価

タイプ I コラーゲンでコートされた 96-well プレートに, 5×10^3 cells/well の密度で HIEC を播種し, その 48 時間後に colorimetric BrdU cell proliferation assay kit を用いて細胞増殖能を測定した. 細胞増殖能を生細胞数で補正するため, Cell Counting Kit-8 を用いて, 播種 48 時間後の生細胞数を測定した. 細胞増殖能及び生細胞数の評価は, キット添付のプロトコールに従って実施し, 450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (SpectraMax Gemini; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を用いて測定した. DNA 中への BrdU 取り込みアッセイによる吸光度を, 生細胞数測定アッセイによる吸光度で割ることで, 細胞増殖能を補正した.

2.2.4 RNA 抽出及び逆転写反応

HIEC 及び Caco-2 細胞をカルチャーインサートに播種後, それぞれ 8 及び 20 日間培養した後, PureLink RNA Mini Kit を用いて total RNA を抽出した. 分化前の HIEC の total RNA として, 拡大培養時にコンフルエントに到達する前の total RNA を同様に抽出した. 得られた total RNA 及び購入したヒト小腸 total RNA (5 ドナー由来) から, PrimeScript RT reagent kit を用いて cDNA を調製した. RNA 抽出及び逆転写反応は, それぞれ用いたキットに添付のプロトコールに従って実施した.

2.2.5 Real-time RT-PCR

使用したプライマー配列及び TaqMan Gene Expression Assay は, それぞれ Table 1 及び Table 2 に示した.

Intestinal fatty acid-binding protein (IFABP), apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT), monocarboxylate transporter 1 (MCT1) 及び MRP3 の mRNA 発現量の測定は, SYBR Green 法により行った. 25 ng の total RNA 当量の cDNA, $1 \times$ FAST SYBR Green Master Mix 及び 0.2 mM primer pairs を混合し, 20 μ L の最終容量となるように dH₂O を添加した.

Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5),

sucrase-isomaltase (SI), CNT1, CNT2, CNT3, equilibrative nucleoside transporter (ENT) 1, ENT2, ENT3 及び glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA 発現量の測定は, TaqMan probe 法により行った. 25 ng の total RNA 当量の cDNA, 1×TaqMan fast universal PCR master mix 及び TaqMan Gene Expression Assay を混合し, 20 μ L の最終容量となるように dH₂O を添加した.

反応は, 7500 FAST Real-Time PCR system (Applied Biosystems) を用い, 初期変性を 95°C にて 20 秒間行った後, 熱変性を 95°C にて 3 秒間, アニーリング及び伸長反応を 60°C にて 30 秒間, サイクル数 40 にて行った. 内在性コントロールとして GAPDH を用い, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法により相対発現量を算出した. なお, Ct 値が 35 以上となった場合は, その遺伝子は発現していないと判断した.

Table 1. Sequences of primers for mRNA quantification

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
IFABP	ACAATCTAGCAGACGGA ACT	TTGGCTTCTACTCCTTCATA
ASBT	TGGCCCCAAAAGCAAA	AACCGTTCGGCACCTGTAC
MCT1	CCGCGCATATAACGATATTT	ATCCA ACTGGACCTCCAA
MRP3	GTCCGCAGAATGGACTTGAT	TCACCACTTGGGGATCATT

Table 2. List of TaqMan Gene Expression Assays used

Gene	Assay ID
LGR5	Hs00173664_m1
SI	Hs00356112_m1
CNT1	Hs00984403_m1
CNT2	Hs00188407_m1
CNT3	Hs00910439_m1
ENT1	Hs01085704_g1
ENT2	Hs00155426_m1
ENT3	Hs00217911_m1
GAPDH	Hs02758991_g1

2.2.6 マルチプレックス mRNA 発現量測定

Organic cation transporter 1 (OCT1), organic anion-transporting peptide 2B1 (OATP2B1), P-gp, BCRP, MRP1, MRP2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6 及び UGT2B7 の mRNA 発現量の測定には QuantiGene Plex 2.0 Assay Kit を用いた.

HIEC 及び Caco-2 細胞をカルチャーインサートに播種後, それぞれ 8 及び 20 日間培養した後, QuantiGene Sample Processing Kit を用いて細胞を溶解し, サンプルは Bio-Plex 200 suspension array system (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて測

定した. 内在性コントロールとして hypoxanthine phosphoribosyltransferase を用い, 相対発現量を算出した.

2.2.7 透過型電子顕微鏡観察

HIEC をカルチャーインサートに播種後, 8 日間培養した後, 2% paraformaldehyde 及び 2% glutaraldehyde を含む 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) を用いて細胞を固定し, 4°C にてインキュベートした. さらに 2% glutaraldehyde を含む 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) を用いて 4°C にて一晚インキュベートした. 0.1 M phosphate buffer にて 3 回リンスした後, 2% の四酸化オスミウムを含む 0.1 M phosphate buffer を用いて 4°C にて 90 分間インキュベートし, 後固定した. 50~100% エタノールを用いて脱水したサンプルを樹脂に包埋し, 超薄切片を 2% 酢酸ウランと鉛染色液で染色した. 透過型電子顕微鏡観察は, JEM-1200 EX (JEOL, Tokyo, Japan) を用いて行った.

2.2.8 Paracellular pore のサイズ及び間隙率の測定

HIEC 及び Caco-2 細胞の単層膜における paracellular pore のサイズ及び間隙率 (ϵ) を測定するため, effusion-based theory に基づいた以下の Eq. 1 を用いた解析を行った³³⁻³⁵.

$$P_{app} = \frac{RT\epsilon}{12\pi\eta N_A \lambda} \cdot \frac{1}{r_s} = [slope] \cdot \frac{1}{r_s} \quad \text{Eq. 1}$$

ここで, P_{app} は見かけの膜透過係数, R はガス定数, T は絶対温度, η は水の粘度 (37°C において 0.6915 mPa·s), N_A はアボガドロ数, λ はジャンプ距離 (3.1 Å) 及び r_s は透過する化合物の分子半径とした. また, 間隙率 (ϵ) は細胞単層膜の表面積に対する, paracellular pore の表面積の比率で定義される. Eq. 1 より, paracellular pore を介した見かけの膜透過係数は, 透過化合物の r_s に反比例すると考えられる. つまり, paracellular pore のみを介して透過する様々なサイズの透過化合物の P_{app} 値を測定し, 縦軸に P_{app} 値を, 横軸に各化合物の r_s の逆数をプロットした際に得られる回帰直線の傾きから, paracellular pore の間隙率が算出できる. さらに, その回帰直線を外挿し, 得られる横軸切片 ($P_{app} = 0$) の逆数は, pore を介して透過可能な最大の分子半径であり, その値が pore のサイズと見積もることができる.

上記の式を用いて, HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜における paracellular pore の半径及び ϵ を算出するため, paracellular route によって透過する事が知られている, PEG のオリゴマー (Table 3) における吸収方向 (apical 側から basal 側) への P_{app} 値を測定した.

Table 3. Molecular weights and radii of PEG oligomers

PEG oligomer	Molecular weight	r_s (Å)
PEG ₁₉₄	194	4.13
PEG ₂₃₈	238	4.51
PEG ₂₈₂	282	4.87
PEG ₃₂₆	326	5.15
PEG ₃₇₀	370	5.47
PEG ₄₁₄	414	5.78
PEG ₄₅₈	458	6.03
PEG ₅₀₂	502	6.27
PEG ₅₄₆	546	6.55
PEG ₅₉₀	590	6.77
PEG ₆₃₄	634	7.03
PEG ₆₇₈	678	7.24
PEG ₇₂₂	722	7.45
PEG ₇₆₆	766	7.69
PEG ₈₁₀	810	7.89
PEG ₈₅₄	854	8.09
PEG ₈₉₈	898	8.27

HBSS に 4.2 mM NaHCO₃, 20 mM glucose 及び 10 mM MES 又は 10 mM HEPES となるように添加し, pH を 6.5 又は 7.4 に調整したものを, それぞれ transport medium (TM, pH 6.5) 又は TM (pH 7.4) とした.

HIEC 及び Caco-2 細胞をカルチャーインサートに播種後, それぞれ 8~9 日及び 18~20 日間培養した後, 培地を除去し, TM (pH 7.4) で 2 回リンスした. TM (pH 6.5) 及び TM (pH 7.4) を, それぞれ apical 側及び basal 側のチャンバーに添加し, 37°C にて 30 分間プレインキュベートした. Donor 側溶液として, PEG200, PEG400, PEG600 及び PEG1000 を, 終濃度 100 µM となるように TM (pH 6.5) に溶解して調製した. Acceptor 側溶液として, HBSS に 4.2 mM NaHCO₃, 20 mM glucose, 10 mM HEPES 及び 4.5% w/v ウシ血清アルブミンとなるように添加し, pH を 7.4 に調整したものをを用いた. 輸送試験開始 60, 120 及び 240 分後に, acceptor 側のチャンバーから一定量の TM をサンプリングした. サンプルは 2 倍量の methanol/acetonitrile (2 : 1, v/v) を添加した後, 10,000×g にて 15 分間遠心し, 上清を liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) を用いて 2.2.10 項に示した分析条件にて測定した. 算出された化合物の透過量の値を用いて P_{app} 値を算出した. P_{app} 値の算出には以下の Eq. 2 を用いた.

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0} \quad \text{Eq. 2}$$

ここで、 dQ/dt は単位時間当たりの receiver 側への透過量、 A はカルチャーインサートのメンブレンの表面積、 C_0 は donor 側溶液における化合物の初濃度とした。

2.2.9 P-gp 及び BCRP の輸送機能評価

P-gp の機能評価のための基質薬として $10 \mu\text{M}$ digoxin を、BCRP の機能評価のための基質薬として $20 \mu\text{M}$ mitoxantrone を用い、吸収方向 (apical 側から basal 側への透過) 及び排泄方向 (basal 側から apical 側への透過) の経細胞輸送試験を行った。P-gp 及び BCRP の選択的な阻害剤として、それぞれ $10 \mu\text{M}$ の verapamil 及び $5 \mu\text{M}$ の Ko143 を用いた。

経細胞輸送試験は、2.2.8 項の手法を一部改変して行った。HIEC 及び Caco-2 細胞をカルチャーインサートに播種後、それぞれ 8~9 日及び 18~20 日間培養した後、培地を除去し、TM (pH 7.4) で 2 回リンスした。各トランスポーターの阻害剤又は溶媒のみを含む TM (pH 7.4) を、apical 側及び basal 側のチャンバーに添加し、 37°C にて 30 分間プレインキュベートした。Acceptor 側のチャンバーに、阻害剤又は溶媒のみを含む TM (pH 7.4) を添加した後、donor 側のチャンバーに基質薬及び阻害剤又は溶媒を含む TM (pH 7.4) を添加して輸送試験を開始した。開始 30、60 及び 120 分後に、acceptor 側のチャンバーから一定量の TM をサンプリングした。サンプルは 2 倍量の methanol/acetonitrile (2 : 1, v/v) を添加した後、 $10,000\times g$ にて 15 分間遠心し、上清を LC-MS/MS を用いて 2.2.10 項に示した分析条件にて測定した。

測定の結果、算出された化合物の透過量の値を用いて、2.2.8 項の Eq. 2 により、 P_{app} 値を算出した。また、排泄方向の透過係数と吸収方向の P_{app} 値の比を efflux ratio とした。

2.2.10 化合物濃度測定

LC-MS/MS を用いた化合物濃度測定には、Waters Quattro Micro Mass Spectrometer (Milford, MA) 及び Waters Alliance 2795 HT (Milford, MA) を用いた。MS/MS 分析は electrospray ionization (ESI) ポジティブモード又はネガティブモードでイオン化し、Table 4 に示した multiple-reaction monitoring (MRM) 条件にてイオンを検出した。Digoxin 濃度測定の内部標準物質 (internal standard, IS) として fluvastatin を、それ以外の化合物の濃度測定の IS として propranolol を用いた。

PEG オリゴマーの濃度測定には、分析カラムとして XTerra MS C18 column (100 mm, 2.1 mm i.d., Waters) を用い、カラム温度は 40°C とした。移動相として、A 液 (10 mM 酢酸アンモニウム水溶液) 及び B 液 (アセトニトリル) を用い、

流速を 0.2 mL/min とした. グラジエント条件を以下に示す (括弧内の数値は B 液の%を示す). 0 min (2%), 2.5 min (2%), 3.5 min (95%), 4 min (95%), 4.1 min (2%), 8.5 min (2%). インジェクション量は 10 μ L とした.

Digoxin 及び mitoxantrone の濃度測定には, 分析カラムとして Cosmosil 5C18 AR-II column (50 mm, 4.6 mm i.d., Nacalai Tesque) を用い, カラム温度は 40°C とした. 移動相として, A 液 (0.1% ギ酸水溶液) 及び B 液 (アセトニトリル) を用い, 流速を 0.2 mL/min とした. グラジエント条件を以下に示す (括弧内の数値は B 液の%を示す). 0 min (2%), 1.5 min (95%), 4 min (95%), 4.1 min (2%), 8.5 min (2%). インジェクション量は 5 μ L とした.

すべての化合物の濃度値の算出には Waters QuanLynx software (Milford, MA) を用いた. 各化合物の保持時間, 定量範囲及び検量線の r^2 値を Table 4 に示した.

Table 4. Summary of ion transitions for the multiple-reaction monitoring quantification, retention time, quantification range, and r^2 value

Compound	Mass transition	Retention time (min)	Quantification range	r^2 value
PEG ₁₉₄	195.3 > 88.8	7.3	300 nM to 10 μ M	0.9988
PEG ₂₃₈	239.3 > 89.2	7.3	100 nM to 10 μ M	0.9958
PEG ₂₈₂	283.3 > 89.2	7.3	100 nM to 10 μ M	0.9953
PEG ₃₂₆	327.3 > 89.2	7.3	30 nM to 10 μ M	0.9932
PEG ₃₇₀	371.3 > 89.2	7.3	30 nM to 10 μ M	0.9947
PEG ₄₁₄	415.3 > 89.2	7.3	30 nM to 10 μ M	0.9935
PEG ₄₅₈	459.3 > 89.2	7.3	30 nM to 10 μ M	0.9948
PEG ₅₀₂	503.3 > 89.2	7.3	30 nM to 10 μ M	0.9956
PEG ₅₄₆	547.3 > 89.2	7.3	30 nM to 10 μ M	0.9948
PEG ₅₉₀	591.3 > 89.2	7.3	30 nM to 10 μ M	0.9966
PEG ₆₃₄	635.3 > 89.2	7.3	30 nM to 10 μ M	0.9968
PEG ₆₇₈	679.3 > 89.2	7.3	30 nM to 10 μ M	0.9958
PEG ₇₂₂	723.3 > 89.2	7.3	30 nM to 10 μ M	0.9967
PEG ₇₆₆	767.3 > 89.2	7.3	30 nM to 10 μ M	0.9951
PEG ₈₁₀	811.3 > 89.2	7.3	30 nM to 10 μ M	0.9966
PEG ₈₅₄	855.3 > 89.2	7.3	30 nM to 10 μ M	0.9945
PEG ₈₉₈	899.3 > 89.2	7.3	30 nM to 10 μ M	0.9975
Digoxin	779.1 > 649.2	5.3	3 nM to 10 μ M	0.9992
Mitoxantrone	445.3 > 88.0	4.1	10 nM to 10 μ M	0.9988
Propranolol (IS)	260.2 > 116.1	7.6	—	—
Fluvastatin (IS)	409.8 > 348.0	5.9	—	—

2.3 結果

2.3.1 小腸幹細胞の維持及び enterocyte への分化

Figure 1 に示すように、分化前の HIEC における、小腸幹細胞のマーカー遺伝子である LGR5³⁶⁾ の mRNA 発現量は 8~25 継代までほぼ一定であり、また、分化による発現量の変化に明確な傾向は認められなかった。また、細胞増殖能の指標として、BrdU の DNA への取り込み³⁷⁾ を評価したところ、8~25 継代までの間で、増殖能に減少傾向は認められなかった (Figure 2)。

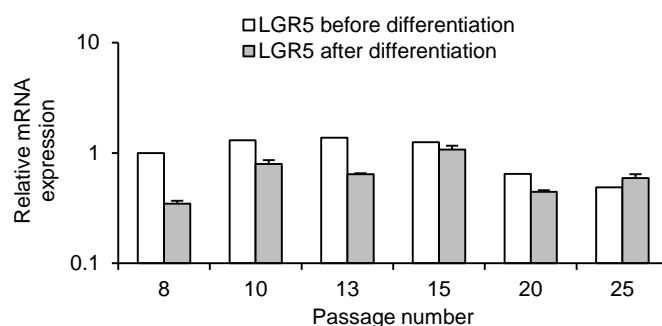


Figure 1. Effects of the passage number and differentiation on the relative expression levels of LGR5

Data represent the mean \pm S.D. (n = 3), except for the data before differentiation.

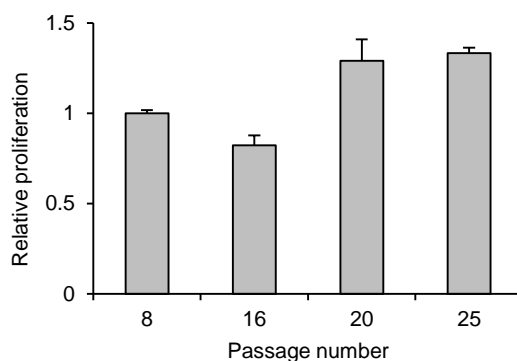


Figure 2. Effect of the passage number on the relative cell proliferation activity

Data were represented as relative value to that at passage number 8. Data represent the mean \pm S.D. (n = 6).

次に、小腸幹細胞から enterocyte への分化能を評価するため、enterocyte のマーカー遺伝子である IFABP³⁸⁾ 及び SI¹⁴⁾ の mRNA 発現量を、分化の前後で測定した。その結果、分化によってこれらのマーカー遺伝子の発現量は、IFABP で 110~650 倍、SI で 20~110 倍増加し、これらの増加傾向は継代数を重ねても維持された (Figure 3)。

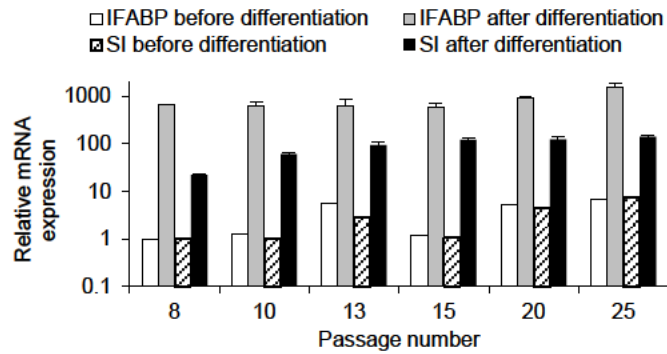


Figure 3. Effects of the passage number and differentiation on the relative expression levels of IFABP and SI
Data represent the mean \pm S.D. (n = 3), except for the data before differentiation.

また、分化後の HIEC を透過型電子顕微鏡で観察したところ、Figure 4A に示したように、円柱状の細胞による単層膜が認められ、また、頂端膜側をさらに拡大した Figure 4B では、分化した enterocyte に特有の微細構造である、微絨毛やタイトジャンクションが認められた。

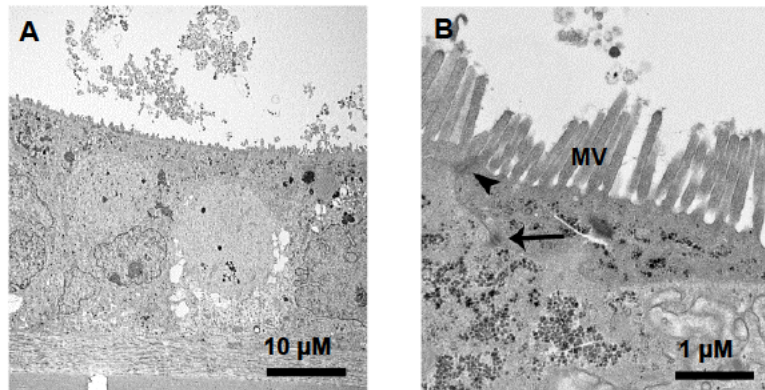


Figure 4. Transmission electron microscopy of HIEC grown on culture insert
Arrowhead, tight junction; arrow, desmosome; MV, microvilli

2.3.2 HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜の経上皮電気抵抗値

HIEC をカルチャーインサートに播種後、分化過程における TEER を経時的に測定したところ、播種から約 5 日後にプラトー ($98.9 \Omega \times \text{cm}^2$) に達し、この値は Caco-2 細胞の播種後 20 日における TEER ($900 \Omega \times \text{cm}^2$) よりも低い値であった (Figure 5).

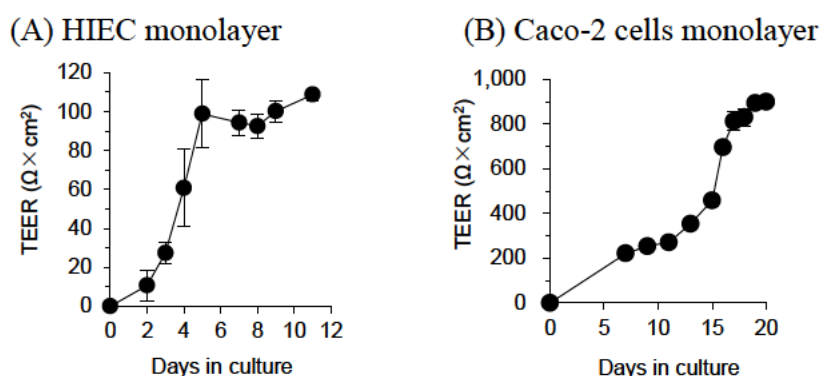


Figure 5. TEER values versus days in culture in HIEC and Caco-2 cells monolayers. TEER measurements were conducted in the culture medium. Data represent the mean \pm S.D. (n = 3)

次に、HIEC 単層膜の integrity に対する継代の影響を評価するため、HIEC をカルチャーインサートに播種後、8 日目に TEER を継代数ごとに測定した。その結果、Figure 6 に示したように、播種後 8 日目における TEER 値はほぼ一定であり、HIEC 単層膜は継代を重ねた後もほぼ同質の単層膜を形成することが示唆された。

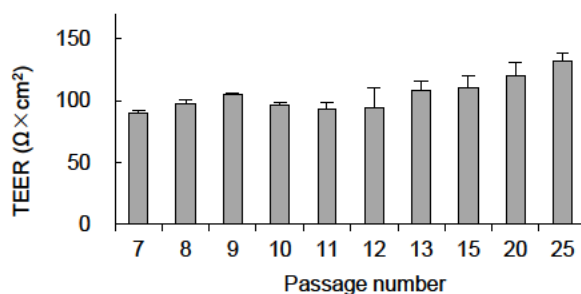


Figure 6. Effect of the passage number on TEER values in HIEC monolayers. TEER measurements were conducted in the culture medium on day 8 after seeding. Data represent the mean \pm S.D. (n = 3).

2.3.3 HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜における paracellular pore の特性評価

分化後の HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜における、各 PEG オリゴマーの分子量 (194~898) と P_{app} 値の相関を Figure 7 に示した。評価したすべての PEG オリゴマーにおいて、Caco-2 細胞に比較して HIEC の方が高い P_{app} 値を示したことから、paracellular route を介した透過性は全体的に HIEC 単層膜の方が高いことが示唆された。

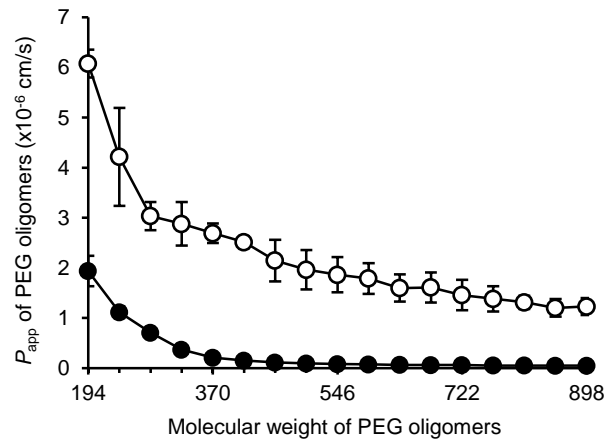


Figure 7. The relationship between the permeability and MW of PEG oligomers in monolayers.

Open and closed circles represent the mean values with SD of 3 independent experiments in HIEC and Caco-2 cell monolayers, respectively.

また、Figure 8 に示すように、HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜における、各 PEG オリゴマーの r_s の逆数と P_{app} 値 (open circles and squares) の関係は 2 相性を示したことから、HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜は、ともに 2 つの異なるサイズの細孔 (small pores 及び large pores) を有することが示唆された。つまり、 r_s の大きいオリゴマーは large pores のみを介して透過し (open circles)、 r_s の小さいオリゴマーは small pores と large pores の両方を介して透過する (open squares) と考えられた。そこで、 r_s の小さいオリゴマーにおける、2 つの異なるサイズの細孔による透過を分離して評価するため、curve stripping を行った。具体的には、large pores のみを介した透過 (open circles) と PEG オリゴマーの r_s の逆数との回帰直線 (実線) から外挿して得られる large pore による透過を、トータル (large pore 及び small pore) の透過 (open squares) から差し引くことで、small pores のみを介した透過 (closed squares) を算出した。

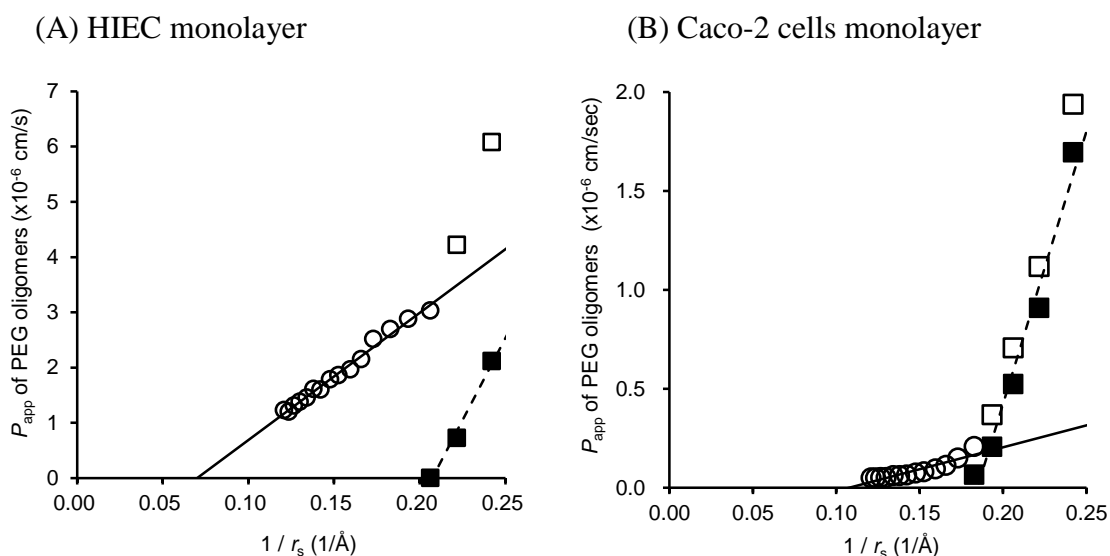


Figure 8. The relationship between permeability and the reciprocal radius of PEG oligomers in HIEC (A) and Caco-2 cells (B) monolayer

Open squares represent the observed permeability through small and large pores, whereas open circles only represent permeability through large pores. Closed squares represent the calculated permeability through small pores. Porosity was calculated from the slope of the regression line (solid line: large pores; dashed line: small pores) according to the effusion-based theory (Eq. 1). Pore size was calculated by extrapolating the corresponding regression line to zero permeability.

Figure 8 における, large pores 又は small pores のみを介した透過と, PEG オリゴマーの r_s の逆数との回帰直線 (それぞれ実線及び点線) の傾き及び横軸切片から, それぞれ算出した, 間隙率及び細孔サイズを Table 5 に示した. また, 同様の手法を用いて算出された, 摘出ヒト空腸における報告値³³⁾も併記した. 算出された細孔の半径は HIEC 単層膜, Caco-2 細胞単層膜及び摘出ヒト空腸の間で, 明確な差は認められず, large pores は $9.3 \sim 14.3 \text{ \AA}$, small pores は $4.8 \sim 6.6 \text{ \AA}$ であった. 一方, large pores 及び small pores における間隙率 ε に関しては, Caco-2 細胞単層膜に比較して, HIEC 単層膜で高い値が算出された. また, 摘出ヒト空腸における ε の報告値は, large pores, small pores とともに Caco-2 細胞単層膜よりも HIEC 単層膜に近い値であった.

Table 5. Pore radius and porosity (ϵ) in HIEC and Caco-2 cell monolayers and the human jejunum

	HIEC monolayer	Caco-2 cell monolayer	Human jejunum ^a
Radius (Å)			
Large pores	14.3	9.3	10.1
Small pores	4.8	5.4	6.6
Porosity ($\times 10^{-8}$)			
Large pores	44	4	89
Small pores	109	52	442

^a Values in the human jejunum were obtained from published data.³³⁾

2.3.4 トランスポーターの mRNA 発現量測定並びに P-gp 及び BCRP の機能評価

分化後の HIEC 及び Caco-2 細胞における、各種のトランスポーターの mRNA 発現量を、ヒト小腸に対する相対発現量として算出した結果を Figure 9 に示す。測定したトランスポーターのうち、CNT2 については、分化後の HIEC 及び Caco-2 細胞において、ともに Ct 値が 35 以上であったことから、両細胞において CNT2 は発現していないと判断した。OCT1, OATP2B1, MCT1, ENT1, ENT2, ENT3, P-gp, BCRP, MRP1, MRP2, MRP3 については、HIEC と Caco-2 細胞における発現量比が 5 倍以内であり、またこれらの発現量はヒト小腸と近い発現レベルであった。一方で、CNT1 の発現量は HIEC 及び Caco-2 細胞でともに低く、CNT3 の発現量は Caco-2 細胞に比較して HIEC で発現が 17 倍高い結果であった。

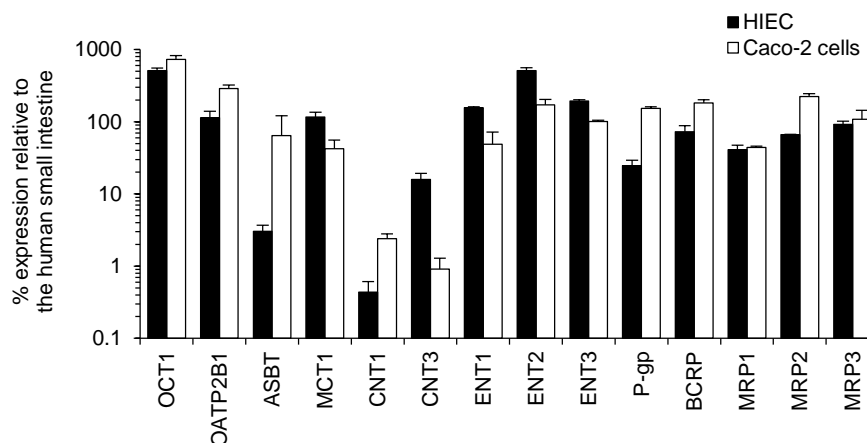


Figure 9. Relative mRNA expression levels of transporters in HIEC and Caco-2 cells. Expression levels were normalized to those of GAPDH or hypoxanthine phosphoribosyltransferase, and are represented as relative values (%) to the human small intestine. Data represent the mean \pm S.D. (n = 3).

次に、分化後の HIEC 及び Caco-2 細胞の単層膜において mRNA レベルでの発現が認められた、P-gp 及び BCRP による輸送機能を確認するため、それぞれの基質である、digoxin 及び mitoxantrone の経細胞輸送を評価した。Figure 10 に示

すように、HIEC 及び Caco-2 細胞の単層膜において、digoxin 及び mitoxantrone の efflux ratio は 2 以上を示した。加えて、それぞれの特異的な阻害剤である verapamil 及び Ko143 を添加したところ、efflux ratio は低下した。

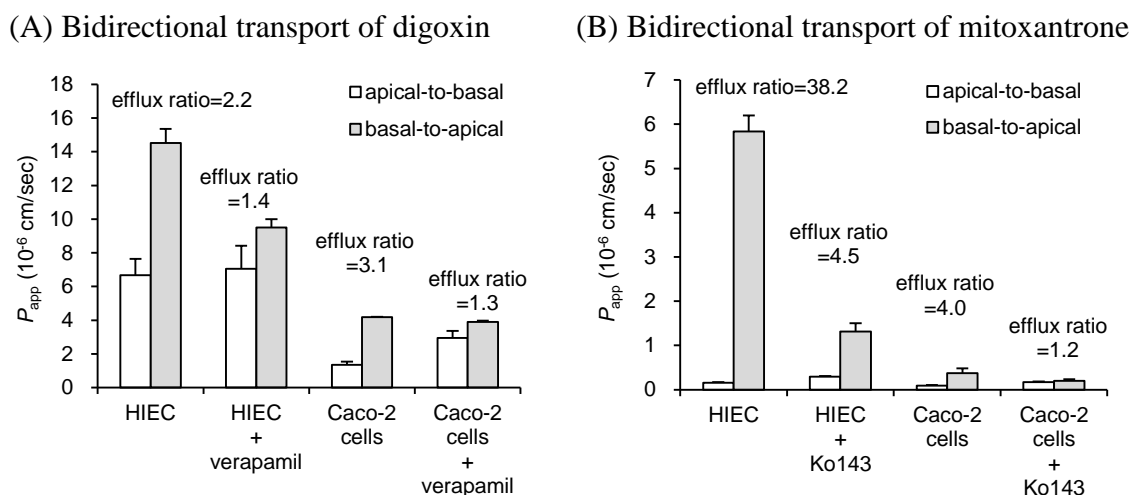


Figure 10. Bidirectional permeability for digoxin and mitoxantrone across HIEC and Caco-2 cell monolayers in the presence or absence of inhibitors (A) Efflux transport of digoxin (a P-gp substrate) in the presence or absence of verapamil. (B) Efflux transport of mitoxantrone (a BCRP substrate) in the presence or absence of Ko143. Data represent the mean \pm S.D. (n = 3).

2.3.5 薬物代謝酵素の mRNA 発現量測定

分化後の HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜における、薬物代謝酵素の mRNA 発現量を、ヒト小腸に対する相対発現量として算出した結果を Figure 11 に示す。測定した薬物代謝酵素のうち、HIEC における UGT1A6 の発現量は、Caco-2 細胞の約 6 倍高かったが、CYP2C9、CYP2C19 及び UGT2B7 については、Caco-2 細胞の方が 17 倍以上高い発現量を示した。また、腸管での薬物代謝において重要な役割を果たしている CYP3A4 の発現量は、HIEC 及び Caco-2 細胞ともに、ヒト小腸の 6% 以下と低い結果であった。

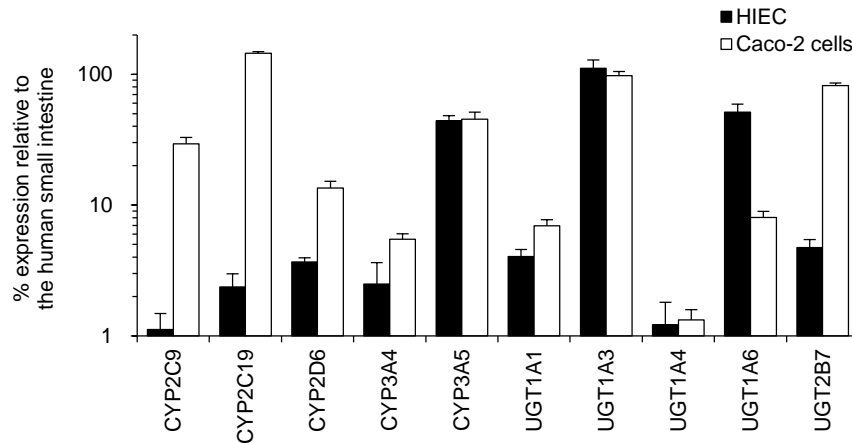


Figure 11. Relative mRNA expression levels of drug-metabolizing enzymes in HIEC and Caco-2 cells

Expression levels were normalized to those of GAPDH or hypoxanthine phosphoribosyltransferase, and are represented as relative values (%) to the human small intestine. Data represent the mean \pm S.D. (n = 3).

2.4 考察

本章では、単離した HIEC を用いた新規な吸収評価モデルの構築及びその機能評価を行い、薬物の吸収評価に汎用されている Caco-2 細胞との比較を行なった。

分化前の HIEC における、小腸幹細胞のマーカー遺伝子である LGR5³⁶⁾ の mRNA 発現量が、8~25 継代までほぼ一定であったことから、継代を繰り返しても、HIEC 中に小腸幹細胞が維持されていることが示唆された。また、細胞増殖能の指標である、BrdU の DNA への取り込み³⁷⁾ を評価したところ、8~25 継代までの間で、増殖能に低下傾向は認められず、小腸幹細胞の存在によって HIEC の増殖能が維持されていると考えられた。

次に、小腸幹細胞から enterocyte への分化能を評価するため、enterocyte のマーカー遺伝子である IFABP³⁸⁾ 及び SI¹⁴⁾ の mRNA 発現量について、分化の前後で測定した。その結果、分化によってこれらのマーカー遺伝子の発現量は増加し、その増加傾向は継代数を重ねても維持されていた。また、分化後の HIEC を透過型電子顕微鏡で観察したところ、分化した enterocyte に特有の微細構造を有していることが確認できた。これらの結果より、HIEC に含まれる小腸幹細胞が有する分化能によって、HIEC は enterocyte へ分化することが確認できた。

分化した HIEC 単層膜の特性を評価するため、カルチャーインサートに播種後の TEER を経時的に測定したところ、定常状態における TEER 値は、 $98.9 \Omega \times \text{cm}^2$ となり、Caco-2 細胞 ($900 \Omega \times \text{cm}^2$) の約 9 分の 1 の値であった。またこの HIEC の TEER 値は、既報の摘出ヒト小腸上皮における TEER (約 $40 \Omega \times \text{cm}^2$)³⁹⁾ に近い値であったことから、分化後の HIEC は *in vivo* ヒト小腸上皮に近い、ルーズな単層膜を形成していることが明らかとなった。

このヒト小腸上皮に近い TEER の値から、分化した HIEC 単層膜では、形成されるタイトジャンクションの paracellular pore の特性が、ヒト小腸上皮に近いことが推察された。そこでこの特徴をさらに精査するため、effusion-based theory³³⁻³⁵⁾を用いた方法により、paracellular pore のサイズ及び間隙率を測定した。その結果、分化した HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜には、2 種類のサイズの pore が存在することが明らかとなり、また、それぞれの pore のサイズには、分化後の HIEC 単層膜、Caco-2 細胞単層膜および摘出ヒト空腸の文献値³³⁾の間で、明確な差は認められなかった。一方、間隙率については、分化後の HIEC 単層膜では Caco-2 細胞単層膜よりも高い間隙率を示し、摘出ヒト空腸³³⁾により近い値であった。特に、large pore でより明確な差が認められ、分化後の HIEC 単層膜の large pore による間隙率は、Caco-2 細胞単層膜の約 11 倍であった。過去の報告において、large pore は陰窩側に、small pore は絨毛側に局在するという仮説が提唱されている⁴⁰⁻⁴²⁾。この仮説に基づいて考察すると、生体内では陰窩に局在している小腸幹細胞のマーカー遺伝子である LGR5 の発現量が分化後の HIEC 単層膜でもある程度維持されていたことから、小腸幹細胞の性質も保持していると考えられ、この性質が HIEC における large pore の高い間隙率に寄与している可能性が推察される。

分化後の HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜における各種トランスポーターの mRNA 発現量を評価したところ、多くの取り込み型トランスポーター及び排泄型トランスポーターについて、分化後の HIEC は Caco-2 細胞やヒト小腸と近い発現レベルを示した。一方、Caco-2 細胞において CNTs の発現量が低い結果は、過去の複数の報告と一致した結果であったが^{5,6)}、分化後の HIEC においては、CNT3 の mRNA 発現量が Caco-2 細胞よりも高く、ヒト小腸により近い結果であった。

CYP3A4 の mRNA 発現量については、Caco-2 細胞と同様に、ヒト小腸に比較して低い発現レベルであり、現時点での分化条件を用いた HIEC 単層膜による腸管代謝の評価は不可能と考えられた。

CNT3 のように、Caco-2 細胞に比較して、より *in vivo* ヒト小腸に近い発現量を持つ遺伝子も認められたものの、CYP3A4 をはじめとする薬物代謝酵素や一部のトランスポーターでは、依然として、*in vivo* ヒト小腸との乖離が認められた。その原因として、今回用いた培養方法では、enterocyte への分化が不十分であった可能性が考えられる。Iwao ら及び Kodama らは、ヒト induced pluripotent stem (iPS) 細胞を用いて、内胚葉から腸管幹細胞を経由して、ヒト iPS 細胞由来 enterocyte を分化誘導する方法を報告している^{43,44)}。その報告の中で、mitogen-activated protein kinase kinase 阻害剤、DNA メチル化阻害剤及び transforming growth factor- β 阻害剤を添加することで、enterocyte への分化が促進

され、enterocyte のマーカー遺伝子だけでなく、CYP3A4 などの薬物代謝酵素やペプチドトランスポーターなどのトランスポーターの発現量が上昇することを報告している^{43,44)}。本研究においても、同様の手法を用い、enterocyte への分化誘導の条件を精査することで、さらなる機能改善が期待される。

本章において、分化後の HIEC 単層膜における TEER 値は、継代による影響を受けないことが確認できた。したがって、transcellular route 及び paracellular route によって透過する薬剤においては、継代を重ねても同様の評価が可能であると考えられる。一方、薬物代謝酵素やトランスポーターの発現量に対する細胞継代の影響は不明であり、さらなる検討が必要であろう。

2.5 小括

HIEC 中に維持される小腸幹細胞の有する増殖能及び分化能によって、長期にわたって安定的に使用可能な enterocyte 培養系が構築できた。また、構築した enterocyte 培養系の特長として、paracellular pore の間隙率が、Caco-2 細胞に比較して高く、*in vivo* ヒト小腸により近い値であること、Caco-2 細胞と同様に efflux transporter の輸送活性が認められることが確認できた。加えて、CNT3 の mRNA 発現量が Caco-2 細胞に比較して高い結果が得られた一方で、CYP3A4 をはじめとした薬物代謝酵素の mRNA 発現量は *in vivo* ヒト小腸に比較して低い結果であった。

第三章 HIEC を用いた薬物吸収の予測モデルの評価

3.1 緒言

第二章において、HIEC に含まれる小腸幹細胞を *enterocyte* に分化させた吸収評価系を構築し、Caco-2 細胞との機能面での比較を行なった。

本章では、まず、第二章で確認された分化後の HIEC の特長である、ヒト *in vivo* 小腸に近い *paracellular pore* の間隙率ならびに P-gp や BCRP といった *efflux transporter* 及び CNT3 の発現が、実際に化合物の膜透過に寄与するか否かを検証することを目的として検討を行った。具体的には、HIEC に加えて、*transcellular route* を介した透過のみを評価可能な PAMPA¹⁾ならびに *transcellular route* を介した透過及び P-gp や BCRP の機能は評価可能であるが、CNTs の発現が非常に低く、*paracellular route* を介した透過性が低いことが知られている Caco-2 細胞^{5,6,8,9)}を用いて、それぞれの経路によって透過又は輸送される化合物の透過性を比較し、各モデルにおける輸送経路の特徴と一致するか否かを検証した。

上記の *in vitro* 評価系によって算出された膜透過性の指標である P_{app} 値は、医薬品の創薬及び開発段階において、様々な用途で活用されている。例えば、 P_{app} 値を用いて定性的に吸収性のクラスを分類することで、創薬初期におけるリード化合物の最適化に活用することや⁴⁵⁾、製剤変更時の生物学的同等性試験の免除を目的とした、Biopharmaceutics Classification System 分類に適用されている^{46,47)}。また、創薬の後期段階においては、複数の化合物群の P_{app} 値から吸収性を順位付けすることで、開発候補化合物の選択や優先順位付けのデータとしても用いられる^{45,48)}。あるいは、Caco-2 細胞や MDCK 細胞を用いて得られた P_{app} 値がヒト Fa 値と相関することが知られていることから^{2,48)}、この相関関係を用いて Fa 値を定量的に予測し、ヒトの薬物動態や薬物相互作用を予測することにも活用されている¹⁾。そこで本章の二つ目の目的として、*enterocyte* に分化させた HIEC 単層膜を用いた薬物吸収の評価モデルの有用性を評価するため、種々の検討を行った。吸収性評価能の指標として、上記の吸収性クラス分類、吸収性の順位付けならびに P_{app} 値と Fa 値との相関性を評価し、Caco-2 細胞との比較を行なった。

3.2 実験方法

3.2.1 試薬及び細胞

Fluorescein isothiocyanate-dextran with an average molecular weight of 4000 (FD-4), vinblastine, topotecan, atenolol, terbutaline, doxifluridine, sulfasalazine, nadolol, pravastatin, sulpiride, etoposide, ranitidine, norfloxacin, cimetidine, indinavir, hydrochlorothiazide, metformin, procainamide, timolol, metoprolol, antipyrine 及び imipramine は Sigma-Aldrich より購入した。Didanosine, pindolol, midazolam,

methotrexate, carbamazepine, cephalexin 及び mizoribine は Wako Pure Chemical Industries より購入した。Ribavirin 及び acyclovir は Tokyo Kasei Kogyo (Tokyo, Japan) より購入した。Famotidine は LKT Laboratories より購入した。Imatinib は BioVision (Milpitas, CA) より購入した。PAMPA plate system は BD Gentest より購入した。Trifluridine は大鵬薬品工業において合成されたものを使用した。その他の試薬及び細胞は 2.2.1 項に示したもの、もしくは市販の高速液体クロマトグラフ用、分析用、特級品を用いた。

3.2.2 細胞の培養

HIEC 及び Caco-2 細胞の培養は 2.2.2 項に示した方法に従って行った。

3.2.3 輸送試験及び PAMPA 透過性試験

様々な化合物における、分化後の HIEC 単層膜を介した P_{app} 値を、Caco-2 細胞単層膜又は PAMPA を介した P_{app} と比較するため、Table 6 に示した化合物の吸収方向 (apical 側から basal 側への透過) の輸送試験を行った。化合物セット A は HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜並びに PAMPA を用いた評価を行い、化合物セット B については HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜を用いた評価を実施した。

Table 6. List of tested compounds

Compound sets	Tested compounds	Tested membranes
A	FD-4, vinblastine, toptotecan, didanosine, atenolol, terbutaline, ribavirin, doxifluridine, pindolol, and midazolam	HIEC monolayer, Caco-2 cell monolayer, and PAMPA
B	Sulfasalazine, acyclovir, methotrexate, nadolol, pravastatin, sulphiride, famotidine, etoposide, ranitidine, norfloxacin, cimetidine, indinavir, hydrochlorothiazide, metformin, digoxin, procainamide, timolol, propranolol, metoprolol, antipyrine, imatinib, carbamazepine, and imipramine	HIEC monolayer and Caco-2 cell monolayer

3.2.3.1 HIEC 及び Caco-2 細胞を用いた輸送試験

TM (pH 6.5) 及び TM (pH 7.4) は 2.2.8 項に示した方法で調製した。

HIEC 及び Caco-2 細胞をカルチャーインサートに播種後、それぞれ 8~9 日及び 18~20 日間培養した後、培地を除去し、TM (pH 7.4) で 2 回リンスした。TM (pH 6.5) 及び TM (pH 7.4) を、それぞれ apical 側及び basal 側のチャンバーに添加し、37°C にて 30 分間プレインキュベートした。Donor 側溶液として、各化合物を TM (pH 6.5) に溶解して調製した。Donor 側溶液の化合物の最終濃度は、didanosine, ribavirin 及び doxifluridine は 100 μM とし、FD-4 は 500 $\mu\text{g/mL}$ とした

が、それ以外の化合物は 50 μM とした。Acceptor 側溶液として、HBSS に 4.2 mM NaHCO_3 , 20 mM glucose, 10 mM HEPES 及び 4.5% w/v ウシ血清アルブミンとなるように添加し、pH を 7.4 に調整したものをを用いた。輸送試験開始 30, 60 及び 120 分後に、acceptor 側のチャンバーから一定量の TM をサンプリングした。Topotecan 及び FD-4 以外のサンプルは、2 倍量の methanol/acetonitrile (2 : 1, v/v) を添加した後、10,000 $\times g$ にて 15 分間遠心し、上清を LC-MS/MS を用いて 3.2.4 項に示した分析条件にて測定した。Topotecan に関しては、topotecan のラクトン体及びカルボン酸体の総量を定量するため、2 倍量の methanol/7% perchloric acid (1 : 1, v/v) を添加した後、10,000 $\times g$ にて 15 分間遠心し、上清を LC-MS/MS を用いて 3.2.4 項に示した分析条件にて測定した。FD-4 に関しては、acceptor 側のチャンバーからサンプリングした TM を、蛍光マイクロプレートリーダー (SpectraMax Gemini, Molecular Devices) を用いて、励起波長 490 nm 及び蛍光波長 520 nm を測定することにより定量した。

算出された化合物の透過量の値を用いて P_{app} 値を算出した。 P_{app} 値の算出には 2.2.8 項の Eq. 2 を用いた。

3.2.3.2 PAMPA 透過性試験

PAMPA 透過性試験は用いたキットに添付のプロトコールに従って実施した。Donor 側溶液として、pH 6.5 に調整した PBS に、各化合物を溶解して調製した。Donor 側溶液の化合物の最終濃度は、3.2.3.1 項に示した、HIEC 及び Caco-2 細胞を用いた輸送試験と同一の濃度とした。Acceptor 側溶液として、pH 7.4 に調整した PBS を用いた。37 $^{\circ}\text{C}$ にてインキュベートし、透過試験開始から 240 分後に、donor 側及び acceptor 側のチャンバーから一定量の PBS をサンプリングした。サンプルは 2 倍量の methanol/acetonitrile (2 : 1, v/v) を添加した後、10,000 $\times g$ にて 15 分間遠心し、上清を LC-MS/MS を用いて 3.2.4 項に示した分析条件にて測定した。

算出された化合物の透過量の値を用いて P_{app} 値を算出した。 P_{app} 値の算出には以下の Eq. 3 を用いた。

$$P_{\text{app}} = -\ln\left(1 - C_A \times \frac{V_D + V_A}{C_D \times V_D + C_A \times V_A}\right) \div \left[A \times \left(\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_A}\right) \times t\right] \quad \text{Eq. 3}$$

ここで、 C_D 及び C_A はそれぞれ donor 側及び acceptor 側のチャンバーにおける透過試験後の化合物濃度、 V_D 及び V_A はそれぞれ donor 側及び acceptor 側溶液の容量、 A は well の表面積 (0.3 cm^2) とし、 t はインキュベーション時間とした。

3.2.4 化合物濃度測定

LC-MS/MS を用いた化合物濃度測定には、2.2.10 項に示した機器を使用した。

MS/MS 分析は ESI ポジティブモード又はネガティブモードでイオン化し, Table 7 に示した MRM 条件にてイオンを検出した. Atenolol, nadolol, propranolol, metoprolol 濃度測定 of IS として antipyrine を, pravastatin, etoposide, hydrochlorothiazide, digoxin 濃度測定 of IS として fluvastatin を, ranitidine, cimetidine 濃度測定 of IS として midazolam を, didanosine 濃度測定 of IS として cephalexin を, terbutaline 濃度測定 of IS として procainamide を, ribavirin 濃度測定 of IS として mizoribine を, doxifluridine 濃度測定 of IS として trifluridine を, procainamide 濃度測定 of IS として terbutaline を用い, それ以外の化合物の濃度測定 of IS として propranolol を用いた.

Vinblastine, topotecan, atenolol, terbutaline, pindolol, midazolam, methotrexate, nadolol, pravastatin, ranitidine, etoposide, cimetidine, indinavir, hydrochlorothiazide, digoxin, propranolol, metoprolol, antipyrine, imatinib, carbamazepine 及び imipramine の濃度測定には, 分析カラムとして Cosmosil 5C18 AR-II column (50 mm, 4.6 mm i.d., Nacalai Tesque) を用いた. Didanosine, ribavirin, doxifluridine, acyclovir, norfloxacin, metformin, procainamide 及び timolol の濃度測定には, 分析カラムとして Capcellpak C18 AQ column (150 mm, 4.6 mm i.d., Shiseido, Tokyo, Japan) を用いた. Sulfasalazine, sulpiride 及び famotidine の濃度測定には, 分析カラムとして X-bridge C18 column (100 mm, 4.6 mm i.d., Waters) を用いた. カラム温度は 40°C とした. Vinblastine, topotecan, didanosine, terbutaline, ribavirin, doxifluridine, pindolol, midazolam, sulfasalazine, acyclovir, methotrexate, pravastatin, etoposide, norfloxacin, indinavir, hydrochlorothiazide, metformin, digoxin, timolol, propranolol, metoprolol, antipyrine, imatinib, carbamazepine 及び imipramine の測定には, 移動相として, A 液 (0.1% ギ酸水溶液) 及び B 液 (アセトニトリル) を用い, 流速を 0.2 mL/min とした. グラジエント条件を以下に示す (括弧内の数値は B 液の%を示す). 0 min (2%), 1.5 min (95%), 4 min (95%), 4.1 min (2%), 8.5 min (2%). Atenolol, nadolol, sulpiride, famotidine, ranitidine, cimetidine 及び procainamide の測定には, 移動相として, A 液 (10 mM 酢酸アンモニウム水溶液) 及び B 液 (メタノール) を用い, 流速を 0.2 mL/min とした. グラジエント条件を以下に示す (括弧内の数値は B 液の%を示す). 0 min (5%), 1.5 min (80%), 3 min (80%), 3.1 min (5%), 8.5 min (5%). インジェクション量は 5 μ L とした.

すべての化合物の濃度値の算出には Waters QuanLynx software を用いた. 各化合物の保持時間, 定量範囲及び検量線の r^2 値を Table 7 に示した.

Table 7. Summary of ion transitions for the multiple-reaction monitoring quantification, retention time, quantification range, and r^2 value

Compound	Mass transition	Retention time (min)	Quantification range	r^2 value
Vinblastine	811.3 > 224.1	4.4	1 nM to 3 μ M	0.9993
Topotecan	422.0 > 171.0	4.1	1 nM to 3 μ M	0.9991
Didanosine	237.1 > 137.0	5.6	3 nM to 10 μ M	0.9986
Atenolol	267.2 > 145.0	4.1	3 nM to 3 μ M	0.9942
Terbutaline	226.2 > 152.0	5.7	3 nM to 3 μ M	0.9949
Ribavirin	245.0 > 112.9	5.4	3 nM to 10 μ M	0.9941
Doxifluridine	245.0 > 171.0	5.5	30 nM to 30 μ M	0.9985
Pindolol	249.2 > 116.0	4.1	10 nM to 10 μ M	0.9963
Midazolam	326.0 > 222.7	4.4	3 nM to 3 μ M	0.9996
Sulfasalazine	398.9 > 381.0	5.4	1 nM to 3 μ M	0.9994
Acyclovir	226.0 > 152.0	4.6	10 nM to 3 μ M	0.9960
Methotrexate	455.3 > 308.1	4.1	1 nM to 3 μ M	0.9985
Nadolol	188.8 > 143.9	4.4	3 nM to 3 μ M	0.9995
Pravastatin	423.1 > 320.9	4.7	1 nM to 3 μ M	0.9774
Sulpiride	342.1 > 112.0	4.8	1 nM to 3 μ M	0.9995
Famotidine	337.8 > 189.0	4.9	1 nM to 3 μ M	0.9888
Etoposide	587.0 > 380.9	4.8	3 nM to 10 μ M	0.9998
Ranitidine	315.1 > 176.0	5.2	1 nM to 3 μ M	0.9949
Norfloxacin	320.1 > 301.8	5.6	10 nM to 10 μ M	0.9984
Cimetidine	253.0 > 94.9	5.2	10 nM to 3 μ M	0.9993
Indinavir	614.2 > 421.1	4.4	10 nM to 10 μ M	0.9922
Hydrochlorothiazide	295.8 > 268.7	4.1	10 nM to 3 μ M	0.9969
Metformin	129.7 > 59.7	2.2	30 nM to 10 μ M	0.9992
Digoxin	779.1 > 649.2	5.4	10 nM to 3 μ M	0.9994
Procainamide	236.2 > 163.0	5.8	10 nM to 3 μ M	0.9995
Timolol	317.1 > 261.1	5.6	3 nM to 3 μ M	0.9997
Propranolol	260.2 > 116.1	4.3	3 nM to 3 μ M	0.9945
Metoprolol	268.2 > 116.1	4.2	3 nM to 3 μ M	0.9883
Antipyrine	188.8 > 143.9	4.4	10 nM to 10 μ M	0.9918
Imatinib	494.1 > 393.9	4.3	10 nM to 10 μ M	0.9964
Carbamazepine	237.0 > 194.0	4.8	10 nM to 10 μ M	0.9994
Imipramine	281.0 > 85.9	5.0	10 nM to 10 μ M	0.9989
Cephalexin (IS)	347.8 > 158	5.6	–	–
Fluvastatin (IS)	409.8 > 348.0	5.9	–	–
Trifluridine (IS)	294.9 > 252	5.6	–	–
Mizoribine (IS)	258.2 > 126.1	5.3	–	–

3.2.5 HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜における P_{app} 値及び Fa 値の相関性の評価

化合物セット B の 23 化合物の P_{app} 及びヒト Fa 値との相関性を、以下の Eq.4 を用いて非線形最小二乗法にて解析した。

$$Fa = 100 \times [1 - \exp(-a \times P_{app})] \quad \text{Eq. 4}$$

ここで、 a はスケーリングファクターとした。非線形回帰分析には XLfit (IDBS, Guilford, UK) を用いた。ここで用いたヒト Fa 値は、①静脈内投与及び経口投与後における未変化体及び代謝物の尿中排泄量比、②静脈内投与及び経口投与後における未変化体の尿中排泄量比、③経口投与後における尿中への未変化体及び代謝物の排泄率、④経口投与後における 1 - 糞中への未変化体排泄率、⑤静脈内投与及び経口投与後における血漿中濃度推移及び未変化体尿中排泄率から算出した $Fa \times Fg$ より、 Fg を 1 と仮定して算出する方法などによって求められた文献値^{4,39,49-52)}の平均値を用いた。

HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜における P_{app} 値とヒト Fa 値との相関の程度を評価するため、決定係数 (r^2 値) を算出した。

3.2.6 統計解析

測定された P_{app} 値とヒト Fa 値との相関から、3.2.5 項の Eq. 4 により得られた回帰曲線を用いて予測される Fa 値の精度を評価するため、以下の Eq. 5 を用いて root mean square error (RMSE) を算出した。

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum (\text{observed } Fa - \text{predicted } Fa)^2}{n}} \quad \text{Eq. 5}$$

ここで、 n は評価した化合物数とした。

加えて、HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜における P_{app} 値とヒト Fa 値との順位相関性を評価するため、以下の Eq. 6 を用いて、スピアマンの順位相関係数 (ρ) を算出した。

$$\rho = 1 - (6 \sum d^2) / (n^3 - n) \quad \text{Eq. 6}$$

ここで、 d は各化合物における P_{app} 値とヒト Fa 値の順位の差とし、 n は評価した化合物数とした。 ρ は -1 ~ +1 の値をとり、 ρ の値が +1 となる時、 P_{app} 値の順位とヒト Fa 値の順位に完全な正の相関が認められ、両者の順位が完全に一致することを意味する。

3.2.7 吸収性クラスのカテゴリ分類能の評価

化合物セット B の 23 化合物のデータを用いて、吸収性クラスのカテゴリ分類能を評価した。吸収性クラスのカテゴリ基準は高吸収性 ($Fa > 80\%$)、中程度の吸収性 (40%

< $Fa < 80\%$), 低吸収性 ($Fa < 40\%$) とし, 3.2.5 項の Eq. 4 により得られた回帰曲線から計算される各クラス間の境界における P_{app} の値で囲まれる領域内外にプロットされる化合物数を計数した. 吸収性クラス分類の正誤を confusion matrix (混同行列) にまとめ, クラス分類の sensitivity (感度), precision (精度) 及び accuracy (正確度) を HIEC 単層膜と Caco-2 細胞単層膜の間で比較した. ここで, sensitivity は実際の吸収性クラスを正しく分類できた割合, precision は予測された吸収性クラスが実際のクラスと一致した割合, accuracy はすべてのクラスを通じて正しく分類できた割合とした.

3.3 結果

3.3.1 HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜並びに PAMPA における透過性

HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜並びに PAMPA 透過性試験の結果, 得られた各化合物の P_{app} 値及びヒト Fa 値を Table 8 に示す^{16,53)}. また, 各化合物の吸収メカニズム及びトランスポーターの基質性についても併記した.

全体として, paracellular route を透過する化合物に比較して, transcellular route を透過する化合物は, 報告されているヒト Fa 値が高く, 評価モデルに関わらず, 得られた *in vitro* の P_{app} 値も高い傾向を示した. また, 化合物セット A 及び B とともに, paracellular route を透過するすべての化合物の P_{app} 値は, HIEC 単層膜 > Caco-2 細胞単層膜 (>PAMPA) の順であった一方, transcellular route を透過する化合物の P_{app} 値においては, 明確な差は認められなかった.

化合物セット A における efflux transporter 基質である vinblastine 及び topotecan については HIEC 単層膜及び Caco-2 細胞単層膜に比較して, PAMPA で高い P_{app} 値を示した. 化合物セット A における核酸トランスポーター基質である didanosine, ribavirin 及び doxifluridine については, Caco-2 細胞単層膜及び PAMPA に比較して, HIEC 単層膜において高い P_{app} 値を示した.

Table 8. P_{app} values across cell monolayers (HIEC and Caco-2 cells) and PAMPA

Compound sets	Compounds	F_a (%)	P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/sec) ^a			Pathway for absorption/transporter susceptibility	Ref. ^b
			HIEC	Caco-2 cells	PAMPA		
A	FD-4	0	0.56 ± 0.01	0.035 ± 0.009	0.0046 ± 0.0017	Paracellular	54)
	Vinblastine	25	2.6 ± 0.1	0.57 ± 0.02	4.1 ± 0.8	Transcellular/P-gp	39)
	Topotecan	30	0.78 ± 0.14	0.35 ± 0.06	1.5 ± 0.1	Transcellular/BCRP	4)
	Didanosine	42	0.62 ± 0.12	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.01	Nucleoside transporters	50)
	Atenolol	50	0.68 ± 0.09	0.34 ± 0.05	0.022 ± 0.005	Paracellular	49)
	Terbutaline	62	0.70 ± 0.05	0.069 ± 0.006	0.014 ± 0.001	Paracellular	51)
	Ribavirin	85	4.1 ± 0.3	0.092 ± 0.003	0.030 ± 0.002	Nucleoside transporters	55)
	Doxifluridine	90	4.7 ± 0.6	0.20 ± 0.03	0.14 ± 0.03	Nucleoside transporters	56)
	Pindolol	90	7.9 ± 0.7	3.6 ± 0.3	2.2 ± 0.1	Transcellular	51)
	Midazolam	100	30 ± 3	170 ± 7	40 ± 4	Transcellular	39)
B	Sulfasalazine	13	0.40 ± 0.04	0.029 ± 0.000	N/A	Transcellular/BCRP, MRP2	49)
	Acyclovir	18	0.77 ± 0.05	0.11 ± 0.03	N/A	Paracellular	50,51)
	Methotrexate	20	0.51 ± 0.06	0.094 ± 0.019	N/A	Transcellular/BCRP, MRP2	49)
	Nadolol	33	0.82 ± 0.26	0.30 ± 0.04	N/A	Paracellular	49,50)
	Pravastatin	34	0.98 ± 0.08	0.11 ± 0.01	N/A	Paracellular/OATP2B1	49)
	Sulpiride	36	0.89 ± 0.07	0.17 ± 0.02	N/A	Paracellular	50)
	Famotidine	38	0.98 ± 0.03	0.31 ± 0.03	N/A	Paracellular/P-gp	51)
	Etoposide	50	1.9 ± 0.2	0.41 ± 0.04	N/A	Transcellular/P-gp	49)
	Ranitidine	50	0.89 ± 0.13	0.31 ± 0.02	N/A	Paracellular/P-gp	49)
	Norfloxacin	56	2.5 ± 0.1	0.17 ± 0.03	N/A	Paracellular/BCRP	4,49)
	Cimetidine	62	1.4 ± 0.9	0.29 ± 0.03	N/A	Paracellular/P-gp, BCRP	49,51)
	Indinavir	63	5.6 ± 0.5	4.3 ± 0.3	N/A	Transcellular/P-gp	4)
	Hydrochlorothiazide	67	3.3 ± 0.7	0.17 ± 0.04	N/A	Paracellular	49)
	Metformin	71	3.0 ± 0.7	0.24 ± 0.02	N/A	Paracellular	49,50)
	Digoxin	75	3.5 ± 0.2	0.96 ± 0.03	N/A	Transcellular/P-gp	4,49)
	Procainamide	85	5.9 ± 0.3	3.0 ± 0.3	N/A	Transcellular	51)
	Timolol	90	13 ± 1	8.5 ± 0.4	N/A	Transcellular	49)
	Propranolol	93	22 ± 2	41 ± 3	N/A	Transcellular	39,49)
	Metoprolol	95	16 ± 2	22 ± 1	N/A	Transcellular	49)
	Antipyrine	97	33 ± 2	44 ± 0	N/A	Transcellular	51)
Imatinib	98	20 ± 1	16 ± 1	N/A	Transcellular/BCRP, P-gp	52)	
Carbamazepin	100	62 ± 2	110 ± 0	N/A	Transcellular	49)	
Imipramine	100	26 ± 1	48 ± 1	N/A	Transcellular	49)	

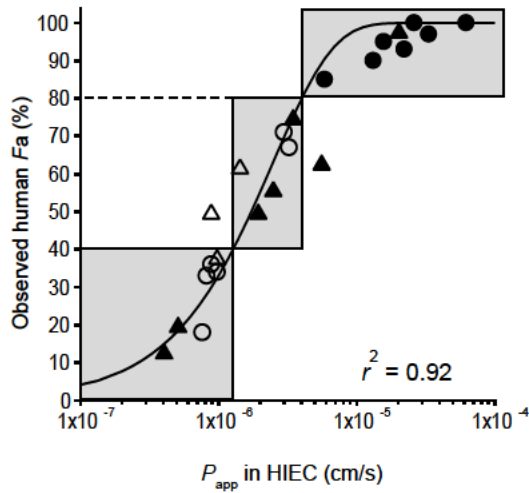
^a P_{app} values represent the mean \pm S.D. (n = 3).

^b When F_a values were obtained from >1 reference, the mean values were used.

3.3.2 P_{app} 値及び F_a 値の相関性並びに吸収性クラスの分類能の比較

HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜における，化合物セット B の 23 化合物の P_{app} 値及びヒト F_a 値とのそれぞれの相関性を，Eq.4 を用いて非線形最小二乗法にて解析した．その結果，Figure 12 に示す回帰曲線が得られ，回帰曲線における決定係数 (r^2 値) は HIEC 単層膜で 0.92，Caco-2 細胞単層膜で 0.78 であった．

(A) HIEC monolayer



(B) Caco-2 cell monolayer

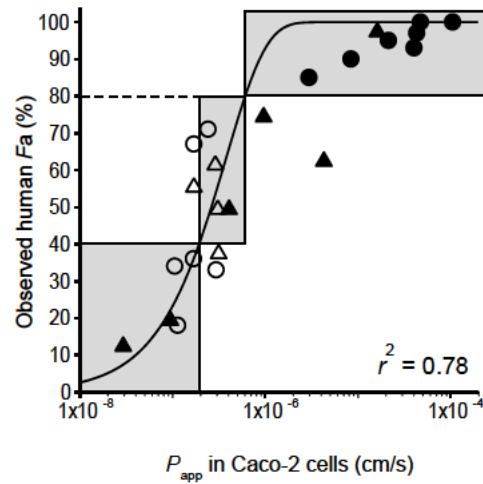
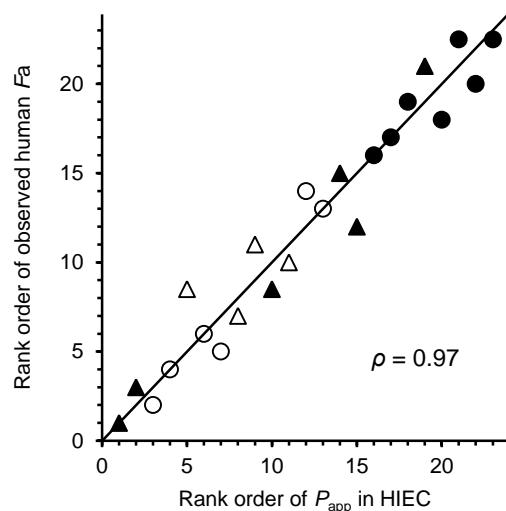


Figure 12. Relationships between F_a and P_{app} values of 23 drugs in HIEC and Caco-2 cell monolayers.

The shaded areas represent poorly absorbed ($F_a < 40\%$), intermediately absorbed (40%-80%), and highly absorbed ($> 80\%$) drugs after their oral administration to humans. Open and closed symbols represent drugs absorbed mainly through paracellular and transcellular routes, respectively. Triangles and circles represent the substrates and nonsubstrates of efflux transporters, respectively. The 2 curves represent the best fit to Eq. 4 with the following scaling factors: $a = 400100$ for the HIEC monolayer; $a = 2645980$ for the Caco-2 cell monolayer. Each point represents the mean of 3 independent experiments.

次に、HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜において、化合物セット B の 23 化合物の P_{app} 値及びヒト F_a 値との間で順位相関解析を実施し、両単層膜間でスピアマンの順位相関係数 (ρ) を比較した。その結果、Figure 13 に示すように、HIEC (0.97) は Caco-2 細胞 (0.89) よりも高い ρ を示し、また、Caco-2 細胞において認められた外れ値の多くが、paracellular route を介して透過する薬剤 (open symbols) であった。

(A) HIEC monolayer



(B) Caco-2 cell monolayer

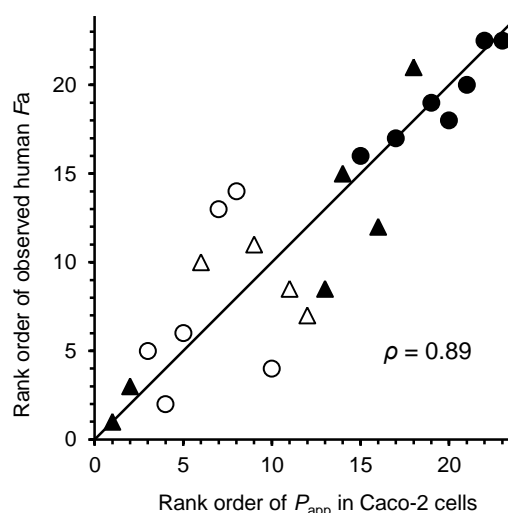


Figure 13. Rank correlation analysis between rank orders of F_a for 23 paracellularly and transcellularly absorbed drugs and their P_{app} values in HIEC and Caco-2 cells. Open and closed symbols denote drugs that permeate through paracellular and transcellular route, respectively. Triangles and circles represent the substrates and nonsubstrates of efflux transporters, respectively. Spearman rank coefficients (ρ) were calculated by Eq. 6.

次に、HIEC 及び Caco-2 細胞単層膜における吸収性クラスの分類能の比較のため、23 化合物を高吸収性、中程度の吸収性及び低吸収性にクラス分類し、Figure 12 の各クラスにおける、正しくクラス分類した（網掛け部分にプロットされた）化合物数及び誤ってクラス分類した（網掛け部分以外にプロットされた）化合物数をカウントし、作成した confusion matrix を Figure 14 に示した。中程度の吸収性のクラス及び低吸収性のクラスにおいては、sensitivity 及び precision は Caco-2 細胞よりも HIEC の方が高い値を示した。一方で、高吸収性のクラスにおいては、HIEC と Caco-2 細胞はともに、高い sensitivity 及び precision を示した。それらの結果、accuracy としては、Caco-2 細胞（74%）よりも HIEC（91%）が高い値を示した。

(A) HIEC

		Predicted class			Actual total	Sensitivity
		High	Intermediate	Poor		
Actual class	High	8	0	0	8	100%
	Intermediate	1	6	1	8	75%
	Poor	0	0	7	7	100%
Predicted total		9	6	8	23	
Precision		89%	100%	88%		Accuracy: 91%

(B) Caco-2 cells

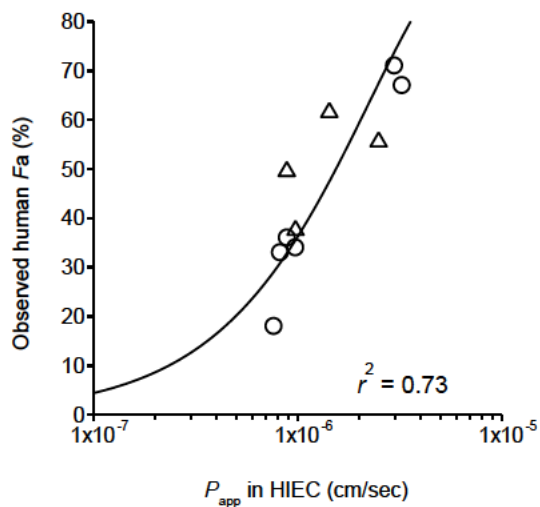
		Predicted class			Actual total	Sensitivity
		High	Intermediate	Poor		
Actual class	High	8	0	0	8	100%
	Intermediate	2	4	2	8	50%
	Poor	0	2	5	7	71%
Predicted total		10	6	7	23	
Precision		80	67%	71%		Accuracy: 74%

Figure 14. Confusion matrices of classification into highly (F_a : 80%-100%), intermediately (F_a : 40%-80%), and poorly (F_a : 0%-40%) absorbed drugs based on P_{app} values determined in HIEC and Caco-2 cell monolayers

3.3.3 Paracellular route を介して透過する薬剤における吸収性の予測性比較

Figure 13 における順位相関解析において、Caco-2 細胞単層膜では paracellular route を介して透過する薬剤が理論直線から乖離する傾向が認められた一方で、HIEC 単層膜においてはこうした傾向が認められなかったことから、HIEC 単層膜では、paracellular route を介して透過する薬剤の吸収性の予測精度が高い可能性が考えられた。この可能性を検討するため、化合物セット B のうち、paracellular route を介して透過する 10 化合物を抽出し、Eq.4 を用いて非線形最小二乗法にて再解析した。その結果、Figure 15 に示す回帰曲線が得られ、回帰曲線における r^2 値は HIEC 単層膜で 0.73、Caco-2 細胞単層膜で 0.11 であった。

(A) HIEC monolayer



(B) Caco-2 cell monolayer

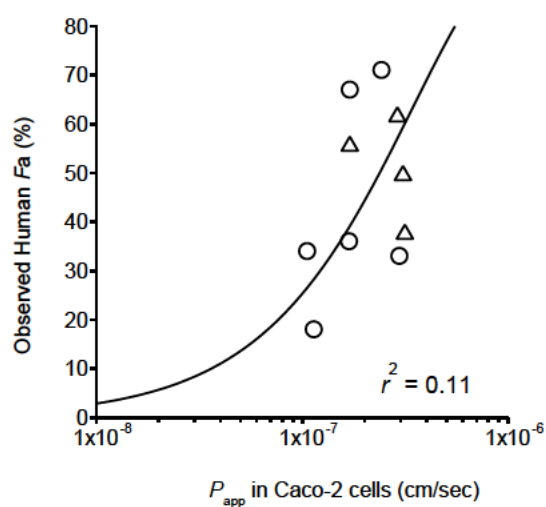
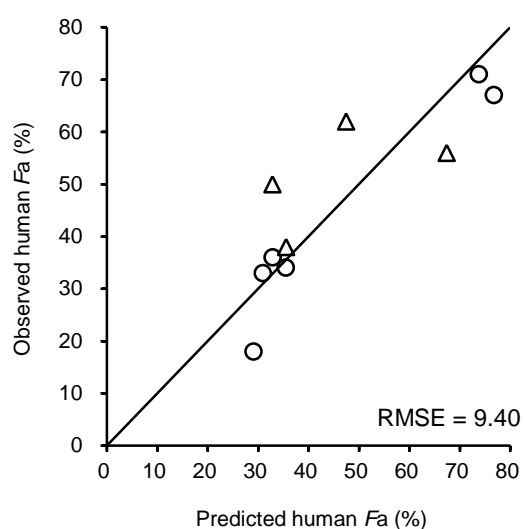


Figure 15. The relationship between F_a and P_{app} values of 10 paracellularly absorbed drugs in HIEC and Caco-2 cell monolayers

Triangles and circles represent the substrates and nonsubstrates of efflux transporters, respectively. The 2 curves represent the best fit to Eq. 4 with the following scaling factors: $a = 449376$ for the HIEC monolayer; $a = 2924730$ for the Caco-2 cell monolayer. Each point represents the mean of 3 independent experiments.

次に、paracellular route を介して透過する、これらの 10 化合物における回帰曲線 (Figure 15) と、測定された P_{app} 値から、ヒト F_a 値を予測し、実測の F_a 値に対する予測精度を評価したところ、Figure 16 に示すように、Caco-2 細胞単層膜 (RMSE = 16.9) に比較して、HIEC 単層膜 (RMSE = 9.40) の方が高い予測精度を示した。

(A) HIEC monolayer



(B) Caco-2 cell monolayer

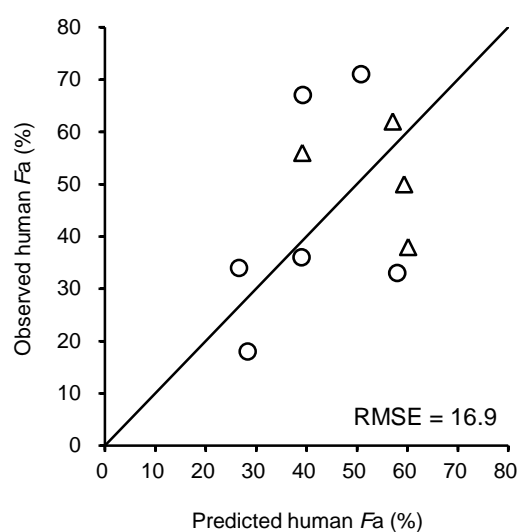


Figure 16. Correlation between the observed and predicted F_a by HIEC and Caco-2 cell monolayers

The predicted F_a values were obtained from the corresponding best-fitted Eq. 4 with the following parameters: $a = 449376$, $r^2 = 0.73$ for the HIEC monolayer; $a = 2924730$, $r^2 = 0.11$ for the Caco-2 cell monolayer. The precision of P_{app} for the prediction of observed F_a was compared between HIEC and Caco-2 cell monolayers using the RMSE according to Eq. 5. Triangles and circles represent the substrates and nonsubstrates of efflux transporters, respectively. Each point represents the mean of predictions from 3 independent experiments.

3.4 考察

本章では、まず、分化後の HIEC, Caco-2 細胞および PAMPA を用いて、主に transcellular route によって吸収される薬剤, paracellular route によって吸収される薬剤, P-gp や BCRP といった efflux transporter の基質となる薬剤および CNTs の基質となる薬剤の P_{app} 値を算出した。

その結果、上記 3 つのいずれのモデルでも評価可能な transcellular route によって透過する薬剤の P_{app} 値は、モデル間でほぼ同等な値であった。一方で、paracellular route によって透過する薬剤の P_{app} 値は、HIEC 単層膜 > Caco-2 細胞単層膜 > PAMPA の順となり、PAMPA は人工的な脂質膜であるために paracellular route が存在しないこと、また、Caco-2 細胞単層膜では HIEC 単層膜に比較して paracellular pore の間隙率が低いという第二章で得られた知見と一致する結果であった。

加えて、efflux transporter 基質薬の P_{app} 値が、HIEC や Caco-2 細胞単層膜に比較して、PAMPA で高かったことから、両細胞単層膜においては、efflux transporter が機能しており、基質薬の吸収方向の輸送を制限していると考察される。

また、核酸トランスポーター基質薬においては、HIEC 単層膜が Caco-2 細胞単層膜や PAMPA に比較して高い P_{app} 値を示した。核酸トランスポーターである

CNTs はヒト enterocyte の apical 側に、ENTs は basolateral 側に発現していることが報告されている⁵⁷⁾。核酸トランスポーターの基質となり得る、抗がん剤や抗ウイルス薬といった核酸アナログは、一般的に脂溶性が低いため、transcellular route による膜透過性は低いと考えられており、これらの核酸トランスポーターがその吸収に寄与しているものと考えられている⁵⁸⁻⁶⁰⁾。したがって、分化後の HIEC 単層膜において核酸トランスポーター基質薬が高い P_{app} 値を示したことは、第二章において認められた CNT3 の mRNA 発現量が Caco-2 細胞よりも高く、ヒト小腸により近いというデータを裏付ける結果であり、また、分化後の HIEC 単層膜において、核酸トランスポーターによる基質薬の吸収方向の輸送を示唆する結果であると考えられる。一方で、分化後の HIEC やヒト腸管における各核酸トランスポーター分子種のタンパクレベルでの発現量、ならびに分化後の HIEC における各分子種の細胞内の局在は明らかにはなっていないため、今後さらなる詳細な検討が必要と考えられる。

したがって、第二章で認められた分化後の HIEC の特性と一致した、化合物の膜透過性のモデル間での違いが認められたことより、これらの分化後の HIEC の特徴が実際に化合物の膜透過に寄与しているものと考察された。

次に、23 化合物の P_{app} 値の測定結果を用いて、 P_{app} 値とヒト Fa 値の相関性ならびに吸収性クラスのカテゴリ分けについて、分化後の HIEC 単層膜と Caco-2 細胞単層膜との間で比較を行なった。

Eq.4 によるシグモイド曲線へのフィッティングを評価したところ、どちらの細胞単層膜においても、良好な相関性が認められたが、決定係数は分化後の HIEC 単層膜の方が高値を示した (HIEC, 0.92 ; Caco-2 細胞, 0.78)。また、 P_{app} 値とヒト Fa 値の順位相関を解析した結果、スピアマンの順位相関係数 ρ は、分化後の HIEC (0.97) の方が Caco-2 細胞 (0.89) よりも高い値を示し、また、Caco-2 細胞において理論直線から外れた薬剤の多くが、paracellular route を介して透過する薬剤であった。この結果は、分化後の HIEC 単層膜や *in vivo* ヒト小腸と比較して、Caco-2 細胞単層膜における paracellular pore の間隙率が低いという第二章の知見と整合する結果であった。

さらに、化合物セット B から、paracellular route によって吸収される 10 化合物を抽出して、 P_{app} 値とヒト Fa 値との相関性を再解析したところ、分化後の HIEC 及び Caco-2 細胞の決定係数はそれぞれ、0.73 及び 0.11 となり、両細胞間における相関性の違いがより明確となった。加えて、Figure 15 で得られた回帰曲線を用いて、これらの化合物のヒト Fa 値を予測した結果、分化後の HIEC の RMSE が Caco-2 細胞と比較して低い値であったことも、分化後の HIEC 単層膜における paracellular route の特性と一致する結果であると考えられる。

一般的に、主に paracellular route によって吸収される薬剤の Fa は高くないこ

とが知られており⁷⁾、実際、化合物セット B のうち、**paracellular route** によって吸収される薬剤は、いずれも中程度～低吸収性の薬剤であった。吸収性クラスのカテゴリ分けについては、高吸収性化合物のカテゴリ分けは、両細胞間で明確な差は認められなかった一方、中程度の吸収性および低吸収性の化合物のカテゴリ分けは、分化後の HIEC 単層膜の方が Caco-2 細胞単層膜よりも高い **sensitivity** 及び **precision** を示した。Figure 12 の Caco-2 細胞単層膜の結果において、誤ってクラス分類した 6 化合物中、4 化合物が主に **paracellular route** によって吸収される薬剤であった一方、HIEC 単層膜においては **paracellular route** によって吸収される薬剤を誤ってクラス分類した例は 1 化合物のみであったことから、中程度～低吸収性薬剤のカテゴリ分けにおける HIEC 単層膜の優位性についても、**paracellular pore** の間隙率の差が要因であると考察される。

本章においては、19 歳の白人女性由来の HIEC を分化させた細胞単層膜を用いた *Fa* 予測モデルについて評価を行った。Nasrallah らは、胎児由来の小腸上皮細胞に小腸幹細胞が含まれていること、本研究と同様に、細胞増殖や **enterocyte** への分化、**P-gp** の輸送機能が確認できたことを報告している⁶¹⁾。本研究において構築した分化後の HIEC 単層膜や Nasrallah らのモデルは、ドナー由来の遺伝情報を維持していると考えられることから、トランスポーターや薬物代謝酵素などの遺伝子多型による機能や発現量の個体差といったドナーの背景を反映している可能性が考えられる。また、もしドナーの年齢や疾病の有無などによる発現量の変化も反映しているのであれば、薬物吸収に対するそれら因子の影響も評価できる可能性があると考えられることから、今後の研究では他のドナー由来の HIEC を用いたモデル構築についても検討する必要があるだろう。

3.5 小括

第二章において認められた分化後の HIEC の特徴である、ヒト *in vivo* 小腸に近い **paracellular pore** の間隙率ならびに **P-gp** や **BCRP** といった **efflux transporter** 及び **CNT3** の発現は、分化後の HIEC 単層膜において、上記の輸送経路によって吸収される化合物の膜透過に寄与していることが明らかになった。

分化後の HIEC 単層膜を用いて得られた 23 種の薬剤の P_{app} 値は、各薬剤のヒト *Fa* 値と高い相関性を示し、**transcellular route** や **paracellular route** によって透過する薬剤、**P-gp** や **BCRP** といった **efflux transporter** の基質薬のヒト *Fa* 値を、既存の Caco-2 細胞単層膜よりも精度よく予測できることが示唆された。また、 P_{app} 値と *Fa* 値との順位予測性や、吸収性クラスのカテゴリ分けにおいても、Caco-2 細胞に対して、分化後の HIEC は優位性を示した。

第四章 CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 cells を用いた腸管代謝の予測モデルの構築及び評価

4.1 緒言

薬物の消失過程において、重要な寄与を果たしている肝臓での代謝については、ヒト肝マイクロソームやヒト肝細胞を用いた種々の *in vitro* 試験によって比較的精度よく予測できることが多数報告されており^{62,63)}、創薬の初期段階からスクリーニング試験として評価されることが一般的となっている。一方で、同様に初回通過効果に大きく寄与している腸管代謝については、様々なヒト予測方法が報告されているが^{21-23,64-66)}、現状では広く確立された手法は存在しない。そこで本章では、CYP3A4 遺伝子及び CPR 遺伝子を導入した Caco-2 細胞を用いた、腸管代謝の新規評価系について検討を行った。

本章前半では、まず、HAC ベクターによって CYP3A4 遺伝子及び CPR 遺伝子を導入した CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞を用いて、その機能解析を行なった。

Caco-2 細胞はカルチャーインサートに播種後、約 3 週間培養した後に経細胞輸送試験に供するのが一般的である。そこで、まず CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞をカルチャーインサート上で 25 日間培養した際の CPR 及び CYP3A4 発現の経時変化を評価した。

また、既報の CYP3A4 発現上皮細胞において、細胞継代による CYP3A4 発現の低下現象が報告されている^{24,25,29)}。CYP3A4 基質となる化合物の腸管代謝の予測モデルとして、長期間、安定的に使用できることは必須の条件であると考えられることから、本 CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞における、継代による CYP3A4 発現への影響を評価するため、複数の継代数において CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞のホモジネートを調製し、CYP3A4 活性を評価した。

加えて、腸管における *Fg* 値には、enterocyte 内での代謝安定性だけでなく、膜透過性も影響すると考えられていることから^{19,20)}、親株の Caco-2 細胞及び CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞の単層膜を用いて、TEER 測定及び非 CYP3A4 基質薬の膜透過性を評価し、CYP3A4-CPR-HAC 導入による膜透過への影響を評価した。

本章後半では、CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞単層膜を用いて、ヒト腸管代謝の予測を行い、モデルの評価を行った。CYP3A4 発現細胞単層膜を用いた経細胞輸送時における代謝の評価パラメータとして、Cummins らによって抽出率 (extraction ratio, ER) が提唱されている⁶⁷⁾。このパラメータは、apical 側チャンバーに CYP3A4 基質薬を添加して一定時間の経細胞輸送試験を行ない、その間に細胞内に入った化合物量に対する、生成した代謝物量の比として表され、以下の Eq. 7 により算出される。

$$ER = \frac{\sum \text{metabolite}_{(\text{donor} + \text{receiver} + \text{intracellular})}}{\text{parent}_{(\text{receiver} + \text{intracellular})} + \sum \text{metabolite}_{(\text{donor} + \text{receiver} + \text{intracellular})}} \quad \text{Eq. 7}$$

ここで、 $\sum \text{metabolite}_{(\text{donor} + \text{receiver} + \text{intracellular})}$ は輸送/代謝試験終了時における、すべてのコンパートメント内の代謝物の総量とし、 $\text{parent}_{(\text{receiver} + \text{intracellular})}$ は輸送/代謝試験終了時におけるレシーバーチャンバー及び細胞内の未変化体の総量とした。Eq. 7において、生成した代謝物量を算出するには、代謝物標品を用いた定量が必要となる。本論文内で評価した CYP3A4 基質薬の中には、代謝物標品が市販されていない薬剤も存在し、また通常、創薬の初期段階においては代謝物標品が合成されていないケースが多い。そこで代謝物標品が入手不可能な場合の別法として、P450 阻害剤である 1-aminobenzotriazole (ABT) を用いた方法により、ER の算出を行った。最終的に得られた ER 値と、ヒト *Fg* 値から求めた、腸管代謝率 (*Eg*, $Eg = 1 - Fg$) との相関性を評価し、CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞の腸管代謝予測モデルとしての有用性について検討した。

4.2 実験方法

4.2.1 試薬及び細胞

ヒト初代肝細胞及び HepG2 細胞よりクローニングした CYP3A4 遺伝子及び CPR 遺伝子を含むプラスミドは、大鵬薬品工業 (株) 原田直幹博士より供与頂いた。Cre/loxP システムを用いて、CYP3A4 遺伝子及び CPR 遺伝子を CHO 細胞内の HAC ベクターに挿入した後、微小核細胞融合法により、CYP3A4-CPR-HAC ベクターを Caco-2 細胞に移入し構築した CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 cells は、鳥取大学大学院医学系研究科の香月康宏准教授より御供与頂いた。

HEPES 及び sodium pyruvate は Life Technologies より購入した。Blasticidin S は Kaken Pharmaceutical (Tokyo, Japan) より購入した。24-multiwell inserts 及び NADPH-generation system は Corning より購入した。BCA protein assay kit は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) より購入した。Protease inhibitor cocktail, cytochrome *c*, simvastatine, nicardipine, felodipine, cyclosporin, sildenafil, terfenadine, nifedipine, repaglinide, quinidine, 1'-hydroxymidazolam, dehydronifedipine, 1'-hydroxyalprazolam, carbamazepine epoxide 及び ABT は Sigma-Aldrich より購入した。Nisoldipine, triazolam 及び trazodone は Wako Pure Chemical Industries より購入した。Tacrolimus は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI) より購入した。Cisapride は Tocris Bioscience より購入した。Dehydronisoldipine, dehydronicardipine, dehydrofelodipine, 4-hydroxymidazolam, 3-hydroxyquinidine 及び elacridar は Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada) より購入した。Terfenadine alcohol metabolite は Ultrafine Chemicals (Manchester, UK) より購入した。Fexofenadine 及び

azacyclonol は Tokyo Kasei Kogyo より購入した。1'-hydroxytriazolam, 4-hydroxytriazolam 及び 4-hydroxyalprazolam は Biomol (Hamburg, Germany) より購入した。その他の試薬は 2.2.1 項に示したもの、もしくは市販の高速液体クロマトグラフ用、分析用、特級品を用いた。

4.2.2 細胞の培養

親株の Caco-2 細胞は、10% FBS, 1% nonessential amino acids, 1% GlutaMAX, 50 U/mL penicillin 及び 50 µg/mL streptomycin を含む DMEM (4.5 g/l glucose) を用いて、細胞培養用フラスコ (75 cm²) 上で培養した。CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞は、2 µg/mL blasticidin S を添加した上記の培地を用いて、細胞培養用フラスコ (75 cm²) 上で培養した。両細胞は 5% CO₂ / 95% air 条件下、CO₂ インキュベーター中で 37°C にて培養した。コンフルエントに到達する前に両細胞を 0.25% trypsin-EDTA にて剥離し、1:3 の継代比率で継代を行った。カルチャーインサートに播種する際は、24-multiwell inserts 上に 2.5×10⁴ cells/well にて播種し、播種後 1 週間は 1 回、2 週目以降は 2 日毎に培地交換を行った。TEER は Millicell-ERS (Millipore) を用いて測定した。

4.2.3 RNA 抽出及び逆転写反応

親株の Caco-2 細胞及び CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞からの total RNA 抽出及び逆転写反応による cDNA 調製は 2.2.4 項に示した方法に従って実施した。

4.2.4 Real-time RT-PCR

CYP3A4, CPR 及び peptidylprolyl isomerase A (PPIA) の mRNA 発現量の測定は、SYBR Green 法により行った。反応は 2.2.5 項に示した条件に従って実施した。使用したプライマー配列は、Table 9 に示した。

内在性コントロールとして PPIA を用い、2^{-ΔΔCt} 法により相対発現量を算出した。

Table 9. Sequences of primers for mRNA quantification

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
CYP3A4	CTGTGTGTTTCCAAGAGAAGTTAC	TGCATCAATTTCTCCTGCAG
CPR	ATGTTCGTGCGCAAGTCCCAGTTC	GCAGCCGTAGTACAGCAGCGTCTC
PPIA	ATGCTGGACCCAACACAAAT	TCTTTCACTTTGCCAAACACC

4.2.5 CPR 活性及び CYP3A4 による代謝活性の評価

カルチャーインサート上の細胞をメンブレンごと切り出し、1% protease

inhibitor cocktail を加えたホモジネートバッファー (10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl 及び 1.5 mM MgCl₂, pH 7.4) を氷上で 100 µL 加えた. プローブチップ型のソニケータを用いて, 氷上で細胞を破砕し, ホモジネートを調製した.

細胞ホモジネートにおける CPR の還元活性は, cytochrome *c* の還元活性を測定することにより評価した. 50 µM cytochrome *c* 及び 1 mM KCN を含む 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 160 µL に, 細胞ホモジネートを 10 µL を添加した. 5 分間プレインキュベートした後, 10 mM の NADPH を 10 µL 添加して反応を開始し, 37°C にてインキュベートしながら, 550 nm における吸光度を 30 秒毎に測定した. 還元型の cytochrome *c* のモル吸光係数として, 0.021 µM⁻¹ cm⁻¹ を用い, CPR の還元活性を算出した.

CYP3A4 代謝活性は, 典型的な CYP3A4 基質である midazolam の 1'-水酸化活性の測定により評価した. 3 mM MgCl₂ を含む 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) に, midazolam 及び細胞ホモジネートをそれぞれ 0.2 µM 及び 0.2 mg protein/mL となるように添加した. 5 分間プレインキュベートした後, NADPH-generation system を添加して反応を開始し, 37°C にて, 0, 10, 30 分間インキュベートした. 2 倍量の methanol:acetonitrile (2:1, v/v) を添加して代謝反応を停止させ, 混合液を遠心分離 (15 min, 10000×g) し上清を得た. 生成した 1'-hydroxy midazolam は LC-MS/MS を用いて 4.2.7 項に示した分析条件にて測定した. midazolam の 1'-水酸化反応の固有クリアランス (CL_{int}) は, 1'-hydroxy midazolam の生成速度と midazolam の初濃度の比から算出した.

細胞ホモジネートのタンパク濃度は, BCA protein assay kit を用いて, ウシ血清アルブミンをスタンダードとして測定した.

4.2.6 輸送/代謝試験

輸送/代謝試験は, CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞単層膜を用いた, 吸収方向 (apical 側から basal 側への透過) の細胞輸送試験時における CYP3A 基質薬の代謝を評価することにより行った.

TM (pH 6.5) 及び TM (pH 7.4) は 2.2.8 項に示した方法で調製した.

親株の Caco-2 細胞及び CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞を播種したカルチャーインサートから, 培地を除去し, TM (pH 7.4) で 2 回リンスした. TM (pH 6.5) 及び TM (pH 7.4) を, それぞれ apical 側及び basal 側のチャンバーに添加し, 37°C にて 30 分間プレインキュベートした. Donor 側溶液として, 評価化合物を Table 10 に示す終濃度となるように TM (pH 6.5) に溶解して調製した. Acceptor 側溶液として, HBSS に 4.2 mM NaHCO₃, 20 mM glucose, 10 mM HEPES 及び 4.5% w/v ウシ血清アルブミンとなるように添加し, pH を 7.4 に調整したものをを用いた. 輸送/代謝試験の開始から Table 10 に示す時間の経過後に, acceptor 側のチャンバ

一から一定量の TM をサンプリングした。輸送/代謝試験の間、シンク条件を維持するため、サンプリング時間は、acceptor 側に透過した薬剂量が、donor 側に添加した薬剂量の 20% 以内となる時間を設定した。サンプルは 2 倍量の methanol/acetonitrile (2 : 1, v/v) を添加した後、10,000×g にて 15 分間遠心し、上清を LC-MS/MS を用いて 4.2.7 項に示した分析条件にて測定した。測定対象とした化合物及びその代謝物の名称は Table 11 に示した。なお、CYP3A4 又は P-gp を阻害下での試験の実施時には、プレインキュベーション及び輸送/代謝試験で用いた apical 側及び basal 側の溶液に、それぞれの阻害剤として、1 mM ABT 又は 0.5 μM elacridar を添加した。

Sulpiride, procainamide, propranolol 又は digoxin を用いた透過試験により得られた透過量の値を用いて P_{app} 値を算出した。 P_{app} 値の算出には 2.2.8 項の Eq. 2 を用いた。

Table 10. Assay conditions of 18 tested compounds

Test compounds	Donor concentration (μM)	Incubation time (min)
Sulpiride	50	120
Procainamide	50	120
Propranolol	50	60
Digoxin	5	120
Nisoldipine	1	45
Simvastatin	3	90
Tacrolimus	3	240
Nicardipine	1	45
Felodipine	1	60
Cyclosporin	1	180
Sildenafil	3	45
Terfenadine	1	60
Cisapride	3	45
Midazolam	3	30
Triazolam	3	30
Nifedipine	3	45
Trazodone	3	45
Repaglinide	1	30
Quinidine	10	180
Alprazolam	3	45
Carbamazepine	3	30

Table 11. List of measured parent compounds and their metabolites

Measured parent compounds	Measured metabolites	Descriptions of parent compounds
Digoxin	–	Non-CYP3A4 substrate, P-gp substrate
Nisoldipine	Dehydronisoldipine	CYP3A4 substrate
Simvastatin	–	CYP3A4 substrate
Tacrolimus	–	CYP3A4 and P-gp substrate
Nicardipine	Dehydronicardipine	CYP3A4 and P-gp substrate
Felodipine	Dehydrofelodipine	CYP3A4 substrate
Cyclosporin	–	CYP3A4 and P-gp substrate
Sildenafil	–	CYP3A4 and P-gp substrate
Terfenadine	Terfenadine alcohol, fexofenadine, and azacyclonol	CYP3A4 and P-gp substrate
Cisapride	–	CYP3A4 substrate
Midazolam	1'-Hydroxymidazolam and 4-hydroxymidazolam	CYP3A4 substrate
Triazolam	1'-Hydroxytriazolam and 4-hydroxytriazolam	CYP3A4 substrate
Nifedipine	Dehydronifedipine	CYP3A4 substrate
Trazodone	–	CYP3A4 substrate
Repaglinide	–	CYP3A4 substrate
Quinidine	3-Hydroxyquinidine	CYP3A4 and P-gp substrate
Alprazolam	1'-Hydroxyalprazolam and 4-hydroxyalprazolam	CYP3A4 substrate
Carbamazepine	Carbamazepine epoxide	CYP3A4 substrate

4.2.7 化合物濃度測定

LC-MS/MS を用いた化合物濃度測定には、2.2.10 項に示した機器を使用した。MS/MS 分析は ESI ポジティブモード又はネガティブモードでイオン化し、Table 12 に示した MRM 条件にてイオンを検出した。Digoxin, tacrolimus 濃度測定の IS として fluvastatin を、procainamide 濃度測定の IS として terbutaline を、propranolol 濃度測定の IS として antipyrine を用い、それ以外の化合物の濃度測定の IS として propranolol を用いた。

分析カラムとして Cosmosil 5C18 AR-II column (50 mm, 4.6 mm i.d., Nacalai Tesque) を用い、カラム温度は 40°C とした。Tacrolimus, quinidine 及び 3-hydroxyquinidine 以外の化合物の測定には、移動相として、A 液 (0.1% ギ酸水溶液) 及び B 液 (アセトニトリル) を用い、流速を 0.2 mL/min とした。グラジエント条件を以下に示す (括弧内の数値は B 液の%を示す)。0 min (2%), 1.5 min (95%), 4 min (95%), 4.1 min (2%), 8.5 min (2%)。Tacrolimus, quinidine 及

び 3-hydroxyquinidine の測定には、移動相として、A 液 (10 mM 酢酸アンモニウム水溶液) 及び B 液 (メタノール) を用い、流速を 0.2 mL/min とした。グラジエント条件を以下に示す (括弧内の数値は B 液の%を示す)。0 min (5%), 1.5 min (80%), 3 min (80%), 3.1 min (5%), 8.5 min (5%)。インジェクション量は 5 μ L とした。

すべての化合物の濃度値の算出には Waters QuanLynx software を用いた。各化合物の保持時間、定量範囲及び検量線の r^2 値を Table 12 に示した。

Table 12. Summary of ion transitions for the multiple-reaction monitoring quantification, retention time, quantification range, and r^2 value

Compound	Mass transition	Retention time (min)	Quantification range	r^2 value
Sulpiride	342.1 > 112.0	4.8	1 nM to 3 μ M	0.9999
Procainamide	236.2 > 163.0	5.6	10 nM to 3 μ M	0.9994
Propranolol	260.2 > 116.1	4.4	10 nM to 10 μ M	0.9986
Digoxin	779.1 > 649.2	5.3	1 nM to 10 μ M	0.9996
Nisoldipine	389.2 > 315.0	5.4	0.3 nM to 3 μ M	0.9999
Dehydronisoldipine	387.2 > 331.0	5.4	0.3 nM to 3 μ M	1.0000
Simvastatin	419.4 > 285.2	5.8	1 nM to 1 μ M	0.9993
Tacrolimus	821.2 > 768.1	6.7	30 nM to 3 μ M	0.9989
Nicardipine	480.0 > 314.9	4.4	1 nM to 1 μ M	0.9973
Dehydronicardipine	477.9 > 90.9	4.4	1 nM to 0.3 μ M	0.9969
Felodipine	384.2 > 338.0	5.5	1 nM to 3 μ M	0.9961
Dehydrofelodipine	382.2 > 354.0	5.5	0.3 nM to 3 μ M	0.9997
Cyclosporin	1202.5 > 1184.8	5.7	10 nM to 3 μ M	0.9952
Sildenafil	474.9 > 57.7	4.4	10 nM to 10 μ M	0.9985
Terfenadine	472.3 > 436.6	4.6	10 nM to 3 μ M	0.9991
Terfenadine alcohol	488.4 > 452.3	4.5	0.1 nM to 0.1 μ M	0.9987
Fexofenadine	502.1 > 466.2	4.5	0.3 nM to 3 μ M	0.9996
Azacyclonol	268.2 > 250.2	4.4	0.1 nM to 0.1 μ M	0.9988
Cisapride	466.3 > 184.0	4.4	10 nM to 3 μ M	0.9800
Midazolam	326.0 > 222.7	5.1	3 nM to 10 μ M	0.9998
1'-Hydroxymidazolam	341.9 > 323.9	5.1	1 nM to 1 μ M	0.9999
4-Hydroxymidazolam	342.0 > 324.9	5.0	0.3 nM to 10 μ M	1.0000
Triazolam	342.4 > 307.8	4.9	0.3 nM to 3 μ M	0.9950
1'-Hydroxytriazolam	359.1 > 176.1	4.8	0.3 nM to 3 μ M	0.9951
4-Hydroxytriazolam	359.1 > 314.0	4.7	0.3 nM to 3 μ M	0.9953
Nifedipine	347.2 > 315.1	5.0	0.3 nM to 3 μ M	1.0000
Dehydronifedipine	345.3 > 284.1	5.0	0.3 nM to 3 μ M	0.9999

Table 12. Summary of ion transitions for the multiple-reaction monitoring quantification, retention time, quantification range, and r^2 value (continued)

Compound	Mass transition	Retention time (min)	Quantification range	r^2 value
Trazodone	372.3 > 176.1	4.3	1 nM to 10 μ M	0.9931
Repaglinide	453.1 > 230.1	4.9	3 nM to 10 μ M	0.9990
Quinidine	325.2 > 307.0	5.1	10 nM to 30 μ M	0.9995
3-Hydroxyquinidine	341.3 > 172.2	4.7	1 nM to 0.1 μ M	0.9988
Alprazolam	308.5 > 204.9	4.9	0.3 nM to 10 μ M	0.9993
1'-Hydroxyalprazolam	325.2 > 297.1	4.8	0.3 nM to 10 μ M	0.9995
4-Hydroxyalprazolam	325.2 > 280.1	4.7	0.3 nM to 10 μ M	0.9997
Carbamazepine	237.0 > 194.0	4.8	30 nM to 3 μ M	0.9994
Carbamazepine epoxide	252.9 > 179.9	4.6	0.3 nM to 3 μ M	0.9919
Terbutaline (IS)	226.2 > 152.0	4.9	–	–
Antipyrine (IS)	188.8 > 143.9	4.5	–	–
Fluvastatin (IS)	409.8 > 348.0	5.3	–	–

4.2.8 抽出率の算出

抽出率 ER は, 4.1 項に示した Eq. 7 に従って算出した. 代謝物標品が入手できなかった場合は, 別法として, P450 阻害剤である ABT を用いて以下に示す方法を用いて ER を算出した. 1 mM ABT の添加によって, CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞による CYP3A4 代謝活性は完全に阻害されたことから (data not shown), ABT 非存在下及び存在下における評価化合物の物質収支はそれぞれ以下の Eq. 8 及び Eq. 9 となる.

$$\text{parent}_{(\text{initial})} = \text{parent}_{(\text{donor})} + \text{parent}_{(\text{receiver} + \text{intracellular})} + \sum \text{metabolite}_{(\text{donor} + \text{receiver} + \text{intracellular})} \quad \text{Eq. 8}$$

$$\text{parent}_{(\text{initial})} = \text{parent}_{\text{ABT}+, (\text{donor})} + \text{parent}_{\text{ABT}+, (\text{receiver} + \text{intracellular})} \quad \text{Eq. 9}$$

ここで, $\text{parent}_{(\text{initial})}$ は輸送/代謝試験開始時における donor チャンバー内の未変化体量とし, $\text{parent}_{(\text{donor})}$ は輸送/代謝試験終了時における donor チャンバー内の未変化体量とし, $\text{parent}_{(\text{receiver} + \text{intracellular})}$ は輸送/代謝試験終了時における receiver チャンバー及び細胞内の未変化体の総量とした. また, $\text{parent}_{\text{ABT}+, (\text{donor})}$ は ABT 存在下の輸送/代謝試験終了時における donor チャンバー内の未変化体量とし, $\text{parent}_{\text{ABT}+, (\text{receiver} + \text{intracellular})}$ は ABT 存在下の輸送/代謝試験終了時における receiver チャンバー及び細胞内の未変化体の総量とした. Eq. 8 及び Eq. 9 において, ABT の添加によって, 未変化体の透過が影響を受けないと仮定すると, $\text{parent}_{(\text{donor})}$ 及び $\text{parent}_{\text{ABT}+, (\text{donor})}$ は等しくなると考えられるため, Eq. 8 及び Eq. 9 から次の Eq. 10 が導かれる.

$$\sum \text{metabolite}_{(\text{donor} + \text{receiver} + \text{intracellular})} = \text{parent}_{\text{ABT}^+, (\text{receiver} + \text{intracellular})} - \text{parent}_{(\text{receiver} + \text{intracellular})} \quad \text{Eq. 10}$$

Eq. 10 を Eq. 7 に代入すると、最終的に以下の Eq. 11 が得られる。

$$\text{ER} = \frac{\text{parent}_{\text{ABT}^+, (\text{receiver} + \text{intracellular})} - \text{parent}_{(\text{receiver} + \text{intracellular})}}{\text{parent}_{\text{ABT}^+, (\text{receiver} + \text{intracellular})}} \quad \text{Eq. 11}$$

代謝物標品が入手できなかった CYP3A4 基質においては、ABT 存在下及び非存在下での輸送/代謝試験を実施し、Eq. 11 を用いて ER を算出した。

Eq. 7 又は Eq. 11 を用いて、17 種の CYP3A4 基質薬の ER 値を算出し、得られた ER 値と、臨床におけるヒト F_g の報告値から求めた E_g との相関性を検討した。ここで用いたヒト F_g の値は、①CYP3A4 基質薬を経口投与及び静脈内投与後における血漿中濃度推移及び未変化体尿中排泄率から算出された $F_a \times F_g$ より、 F_a の報告値を用いて、又は F_a を 1 と仮定して算出された値、②腸管の CYP3A4 のみを阻害するとされているグレープフルーツジュースによる臨床相互作用試験の結果から算出された文献値^{22,66)}の平均値を用いた。

4.2.9 統計解析

3 群間の比較は、JMP 9.0.2® (SAS Institute Inc.) を用いて一元配置分散分析後に Dunnett 検定を行った。有意水準は 5% とした。

4.3 結果

4.3.1 CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞における CPR 及び CYP3A4 の発現及び活性の評価

HAC ベクターに搭載された遺伝子の発現変動をモニターするため、CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞をカルチャーインサートに播種後 8、15 及び 21 日目に、HAC ベクター上に搭載された green fluorescent protein (GFP) による蛍光を蛍光顕微鏡を用いて観察した (Figure 17)。蛍光強度は経時的に増加し、播種後 21 日目においてはほぼすべての細胞で蛍光が観察された。

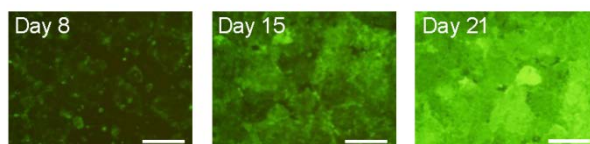


Figure 17. Culture time-dependent GFP expression in the CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 cells

Fluorescent microphotographs of CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 cells on the culture insert. Exposure time was 1 sec, and bars represent 500 μm .

次に、CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞における CPR 及び CYP3A4 遺伝子の mRNA 発現量をカルチャーインサートに播種後 9, 16 及び 23 日目に測定した (Figure 18). CYP3A4 の mRNA 発現量は 23 日目まで持続的に上昇したが, CPR の発現量は 16 日目までにほぼ定常に達した.

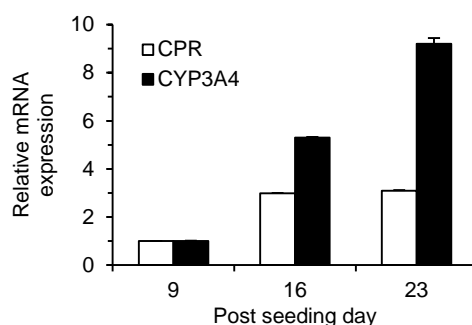


Figure 18. Culture time-dependent mRNA expression levels of CPR and CYP3A4 in the CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 cells

Expression levels were normalized to those of PPIA, and are represented as relative values to those on day 9. The data shown represent the mean \pm S.D. (n = 3).

CPR 及び CYP3A4 の発現上昇をタンパクレベルでも評価するため, 細胞ホモジネートにおける CPR の還元活性及び CYP3A4 の代謝活性を評価した. CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞の細胞タンパク量はカルチャーインサートに播種後 12 日目までにプラトーに到達した (Figure 19 (A)). Figure 19 (B)及び(C)に示すように, CPR 活性は 25 日目まで持続的に上昇し, 25 日目における cytochrome *c* の還元活性は 80.3 ± 9.2 nmol/min/mg protein であった一方で, midazolam の 1'-水酸化反応の CL_{int} は, 16 日目にプラトーに達し, その値は 0.0189 ± 0.0017 mL/min/mg protein であった. 一方で, 親株の Caco-2 細胞における CPR 活性及び midazolam 1'-水酸化 CL_{int} はそれぞれ, 40.2 ± 2.9 nmol/min/mg protein 及び 0.0005 mL/min/mg protein であった.

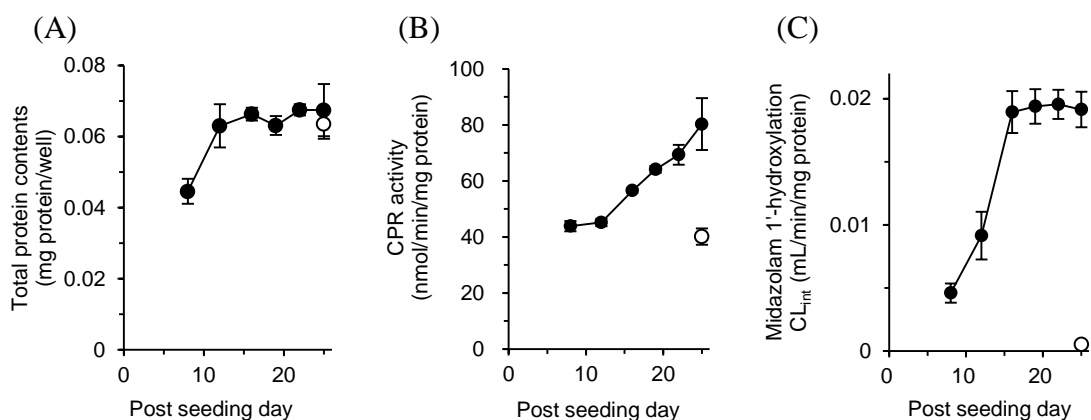


Figure 19. Culture time-dependent total cellular protein contents and activities of CPR and CYP3A4 in the CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 cells

(A) Total cellular protein contents in the homogenates of the parental Caco-2 (open circle) and the CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 cells (closed circle). (B) and (C) CPR activity and CL_{int} for midazolam 1'-hydroxylation, respectively, in the homogenates of the parental Caco-2 (open circle) and the CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 cells (closed circle).

The data shown represent the mean \pm S.D. (n = 3).

4.3.2 CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞における CYP3A4 代謝活性の継代後の安定性評価

CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞において、CYP3A4 活性の継代による安定性を評価するため、22~35 継代の CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞をカルチャーインサートに播種し、22~25 日後に細胞ホモジネートを調製して、midazolam の 1'-水酸化 CL_{int} を評価した。その結果、Figure 20 に示したように、継代によって CL_{int} 値の変化に明確な傾向は認められず、CYP3A4 代謝活性が継代後も安定して維持されることが示された。

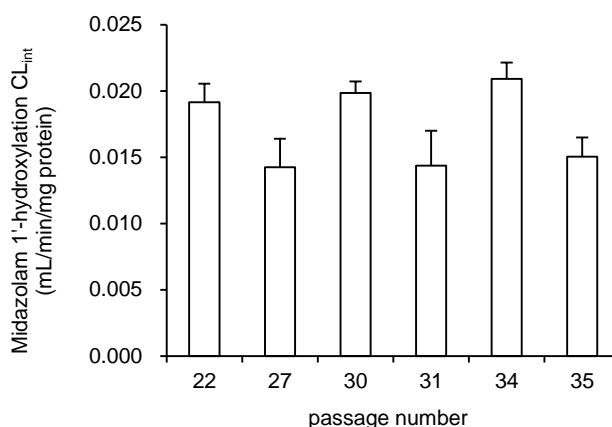


Figure 20. Stability of metabolic activity during serial passages in the CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 cells

The CL_{int} values for midazolam 1'-hydroxylation were determined in the homogenate of the CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 cells. Data represent the mean \pm S.D. (n = 3-4).

4.3.3 CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞の単層膜の形成

親株の Caco-2 細胞及び CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞はカルチャーインサートに播種後、単層膜を形成し、13~14 日目に TEER の値は約 300~400 $\Omega \times \text{cm}^2$ のプラトーに到達した (Figure 21). プラトーに到達した後の TEER 値は、親株の Caco-2 細胞に比較して、CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞でやや低い結果であった. 本測定結果並びに CPR 及び CYP3A4 活性の測定結果 (Figure 19) より、以降の試験はすべて播種後 22~25 日目に実施することとした.

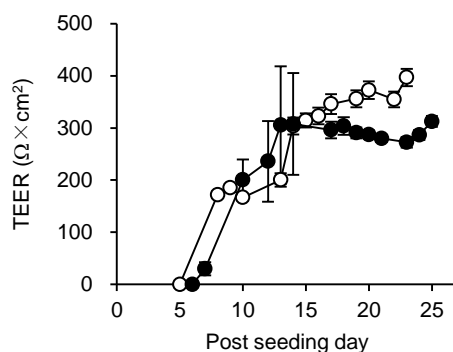


Figure 21. Culture time-dependent TEER values in the parental Caco-2 (open circle) and the CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 cells (closed circle) TEER measurements were conducted in the culture medium. The data shown represent the mean \pm S.D. (n = 3).

親株の Caco-2 細胞と CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞の単層膜における化合物の膜透過性をさらに比較するため、CYP3A4 の基質とならない 3 種類の化合物 (sulpiride, procainamide 及び propranolol) の P_{app} を測定した. Table 13 に示すように、3 化合物における P_{app} 値は、親株の Caco-2 細胞と CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞の間でほぼ同等であったことから、Caco-2 細胞単層膜における integrity や化合物の膜透過性は、CYP3A4-CPR-HAC ベクターの導入によってほとんど影響を受けないと考えられた.

Table 13. The permeability of non-CYP3A4 substrates across the parental Caco-2 and the CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 cell monolayers

	$P_{\text{app}} (\times 10^{-6} \text{ cm/sec})$	
	Parental Caco-2 cells	CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 cells
Sulpiride	0.17 ± 0.03	0.24 ± 0.02
Procainamide	1.1 ± 0.1	1.7 ± 0.0
Propranolol	17 ± 0	27 ± 1

Data represent the mean \pm S.D. (n = 3).

4.3.4 CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 cells を用いた CYP3A4 基質薬の抽出率の算出

代謝物標品が入手不可能であった CYP3A4 基質薬においては、P450 阻害剤である ABT が、評価薬剤の未変化体の透過性に影響を与えないという仮定のもと、Eq. 11 により ER を算出することとした。腸管において化合物の膜透過を制限している P-gp の基質認識性は、CYP3A4 の基質認識性とオーバーラップすることが広く知られていることから⁶⁸⁾、ABT が P-gp による輸送機能に影響しないことを確認することとした。P-gp 基質であるが CYP3A4 基質ではない digoxin を用いて、digoxin の CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞を介した透過性に対して、1 mM ABT が影響を与えるか否かを検討した。その結果、Figure 22 に示したように、P-gp 阻害剤である 0.5 μ M elacridar は digoxin の吸収方向の P_{app} 値を有意に増加させたものの、1 mM ABT は digoxin の P_{app} 値に有意な変化を与えなかった。この結果から、1 mM ABT は P-gp を阻害しないこと、また、評価化合物の P-gp 基質性に関わらず、Eq. 11 を用いて ER 値を算出できると考えられた。

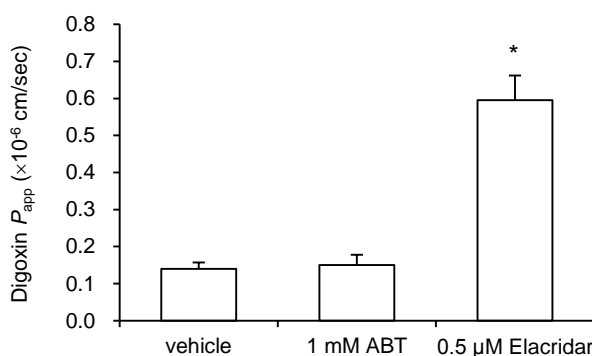


Figure 22. Effect of 1 mM ABT on the P-gp activity in the CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 cell monolayers

The P_{app} values for apical-to-basal direction across the CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 cells in the absence or presence of 1 mM ABT and 0.5 μ M elacridar. Data represent the mean \pm S.D. (n = 3-4).

* denotes $p < 0.05$ versus vehicle (one-way analysis of variance followed by Dunnett's test).

次に、CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞を用いた腸管代謝の予測性を評価するため、Table 14 に示す 17 種の CYP3A4 基質薬を評価化合物として選択した。17 化合物中、7 化合物 (simvastatin, tacrolimus, cyclosporin, sildenafil, cisapride, trazodone 及び repaglinide) においては代謝物標品が入手できなかったため、ABT 存在下及び非存在下における輸送/代謝試験を実施し、Eq. 11 を用いて ER 値を算出した。1 mM ABT の添加によって CYP3A4 活性が完全に阻害されることは、CYP3A4 によって非常に代謝され易い nisoldipine, nifedipine, felodipine 及び midazolam を用いて輸送/代謝試験を行なった際に、すべてのコンパートメントにおいて代謝物の生成が認められないことにより確認した (data not shown)。代謝物標品が入手可能であった残りの 10 化合物については、Table 11 に示した代謝物の生成

量を測定し、Eq. 7 を用いて ER 値を算出した。

Table 14 に示すように、算出された各 CYP3A4 基質薬の ER 値は、trazodone, alprazolam 及び carbamazepine の 0 から、simvastatin の 0.66 までの値をとった。さらに、Figure 23 に示すように、ヒト F_g 値の報告値から求めたヒト E_g 値と、*in vitro* より得られた ER 値との間に良好な相関関係が認められた ($r^2 = 0.84$)。

Table 14. Predictions of intestinal metabolism and permeability for 17 compounds

Compounds	Substrate for	Observed F_g^a	Human E_g^b	<i>in vitro</i> ER ^c
Nisoldipine	CYP3A4	0.11	0.89	0.65 ± 0.01
Simvastatin	CYP3A4	0.11	0.89	0.66 ^d
Tacrolimus	CYP3A4, P-gp	0.14	0.86	0.44 ^d
Nicardipine	CYP3A4, P-gp	0.33	0.67	0.45 ± 0.04
Felodipine	CYP3A4	0.36	0.64	0.32 ± 0.03
Cyclosporin	CYP3A4, P-gp	0.44	0.56	0.19 ^d
Sildenafil	CYP3A4, P-gp	0.54	0.46	0.12 ^d
Terfenadine	CYP3A4, P-gp	0.55	0.45	0.14 ± 0.02
Cisapride	CYP3A4	0.57	0.44	0.17 ^d
Midazolam	CYP3A4	0.62	0.38	0.26 ± 0.01
Triazolam	CYP3A4	0.79	0.22	0.05 ± 0.00
Nifedipine	CYP3A4	0.81	0.19	0.19 ± 0.03
Trazodone	CYP3A4	0.83	0.17	0 ^{d,e}
Repaglinide	CYP3A4	0.89	0.11	0.10 ^d
Quinidine	CYP3A4, P-gp	0.90	0.10	0.02 ± 0.00
Alprazolam	CYP3A4	0.94	0.06	0.00 ± 0.00
Carbamazepine	CYP3A4	1.00	0.00	0.00 ± 0.00

^a Observed F_g values were obtained from published data^{22,66}. When F_g values were obtained from multiple references, the mean values were used.

^b E_g values were calculated as follows: human $E_g = 1 - \text{observed } F_g$

^c Data represent the mean (± S.D., n = 3).

^d Due to unavailability of authentic metabolites, ER values were calculated using Eq. 11.

^e The calculated value was less than zero.

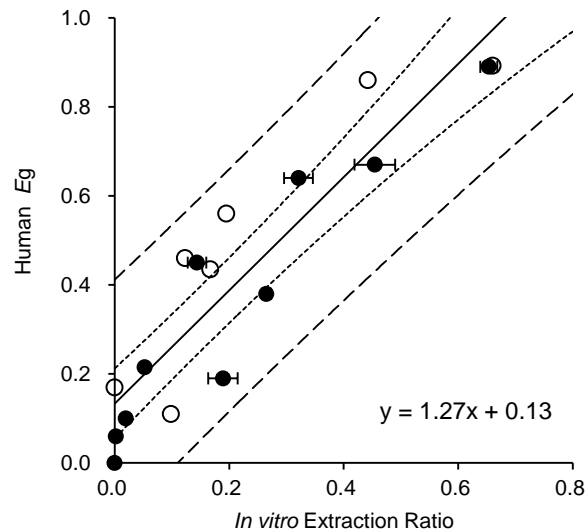


Figure 23. Comparisons of *in vitro* ER values obtained from the CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 cells and *in vivo* Eg calculated from reported Fg in humans. Closed and open circles represent the ER values calculated with Eq. 7 and 11, respectively. The solid, dotted, and dashed lines represent the linear regression line, 95% confidence interval, and 95% prediction interval, respectively. Error bars represent the S.D. (n = 3).

4.4 考察

本章では、CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞を用いた輸送/代謝試験により CYP3A 基質薬の ER 値を算出し、得られた ER 値とヒト Eg 値との間に良好な相関関係 ($r^2 = 0.84$) があることを明らかにした。したがって、CYP3A 基質となる新規化合物の ER 値を算出することにより、ここで得られた回帰直線を用いて、ヒト Eg 値及び Fg 値を精度よく予測できると考えられた。

CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞より調製した細胞ホモジネートにおける、CYP3A4 の活性を経時的に評価したところ、midazolam の 1'-水酸化 CL_{int} は播種後 22 日目に 0.020 mL/min/mg protein の最大値をとった。Lin らは、ヒト空腸 mucosa のホモジネートを用いて、midazolam (基質濃度, 8 μ M) の 1'-水酸化 CL_{int} を測定し、148 pmol/min/mg protein と報告しており⁶⁹⁾、この CL_{int} 値は 0.019 mL/min/mg protein と再計算される。また、Schmiedlin-Ren らは、ヒト十二指腸及び空腸ホモジネートにおける midazolam の 1'-水酸化 CL_{int} を、それぞれ 3.83 及び 3.67 mL/min/g of mucosa と報告している²⁷⁾。この報告の中で、十二指腸の mucosa における CYP3A 含量は 9.2 pmol/mg protein 及び 0.89 nmol/g of mucosa であったこと、また空腸の mucosa における CYP3A 含量は 8.4 pmol/mg protein 及び 0.91 nmol/g of mucosa であったことが報告されており、これらの値から、十二指腸及び空腸の mucosa におけるタンパク濃度は、96.7 及び 108.3 mg protein/g of mucosa と計算される。したがって、Schmiedlin-Ren らが報告した、十二指腸及び空腸の mucosa における midazolam の 1'-水酸化 CL_{int} はそれぞれ、0.040 及び 0.034

mL/min/mg protein と再計算される。これらの CL_{int} の再計算結果から考察すると、本研究において CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞のホモジネートにより得られた midazolam の 1'-水酸化 CL_{int} の値 (0.020 mL/min/mg protein) は、*in vivo* のヒト小腸とほぼ同等かやや低いと考えられる。実際、Figure 23 に示した、CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞による ER 値と、*in vivo* の E_g 値との回帰直線の傾き (1.27) が、1 よりもわずかに大きい結果であったことは本考察と一致する。

一方で、CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞は、これまでに複数報告されている、CYP3A4 発現 Caco-2 細胞よりも高い CYP3A4 活性を有していると考えられる。Fisher らは 1,25-dihydroxyvitamin-D₃ によって CYP3A4 を誘導した Caco-2 細胞を用いて、basal チャンバーの培地に 4% w/v のヒト血清アルブミンを加えた条件にて、本研究と同じ 3 μ M の midazolam を apical チャンバーに添加して経細胞輸送試験を行っており、その際の ER 値が 0.052 であったことを報告している⁷⁰⁾。本研究においては、basal チャンバーの培地には 4.5% w/v のウシ血清アルブミンを添加しており、試験条件に多少の相違点はあるものの、CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞においては 0.26 ± 0.01 の ER 値が得られており、Fisher らが報告した CYP3A4 誘導 Caco-2 細胞よりも高い活性を有していると推察される。また Brimer らは、アデノウイルスベクターを用いて CYP3A4 および CPR を導入した Caco-2 細胞を 35 mm のディッシュで培養し、4 μ M の midazolam を添加後、4 時間のインキュベーションによって、63~101 pmol の 1'-hydroxymidazolam が生成したことを報告している²⁵⁾。midazolam の 1'-水酸化反応が 4 時間まで線形であったと仮定すると、上記の生成量の値から、1'-hydroxymidazolam の生成速度は、 $0.29 \sim 0.46$ pmol/30 min/0.33 cm² と再計算される。また、Cummins らは、sodium butyrate と 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate を添加することで、CYP3A4 導入 Caco-2 細胞において CYP3A4 発現量がさらに増強されることを報告しており、この報告中で 3 μ M の midazolam を apical チャンバーに添加した際の、1'-hydroxymidazolam の生成量は 19 pmol/30 min/0.33 cm² と再計算される⁷¹⁾。一方で本研究において、3 μ M の midazolam を apical チャンバーに添加した後の 1'-hydroxymidazolam 生成量は、 27 ± 1 pmol/30 min/0.33 cm² であった。これらの比較結果を元に考察すると、本研究で得られた CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞による代謝活性は、既存の CYP3A4 発現 Caco-2 細胞よりも高く、またこの高い CYP3A4 活性によって代謝物をより検出しやすくなると考えられることから、CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞を用いることで、より高感度に腸管代謝の評価が可能となるものと考えられる。

また、エピソーマルベクターを用いて構築された CYP3A4 発現 Caco-2 細胞では、5 継代することによって CYP3A4 活性が約 20%にまで低下したことが報告されている^{24,29)}。同様にエピソーマルベクターを用いて、LLC-PK1 細胞に

CYP3A4 と CPR を共発現させた Brimer らの報告においても、選択用抗生物質の共存下、15 継代によって CYP3A4 発現の消失が認められている²⁵⁾。こうした CYP3A4 遺伝子の消失あるいはサイレンシングの原因は不明であるが、CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞においては、CYP3A4 活性に低下傾向は認められなかったことから、CYP3A 基質薬の腸管代謝の予測モデルとして、本細胞が安定的に使用可能であり、スクリーニング試験等にも有用であると考えられる。

4.5 小括

本研究では、HAC ベクターによって CYP3A4 遺伝子及び CPR 遺伝子が導入された、CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞を用いて、薬物の腸管代謝の定量的な予測モデルの構築を目的に検討を行った。CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞においては、細胞継代による CYP3A4 代謝活性の低下傾向は認められなかった。また、CYP3A4-CPR-HAC/Caco-2 細胞の単層膜を用いて得られた CYP3A4 基質薬の ER 値と、ヒト *Eg* 値がよく相関したことから、CYP3A4 によって代謝される新規薬剤における腸管代謝を精度よく予測できると考えられた。

総括

本研究では、腸管における薬物吸収及び代謝の予測モデルの構築について検討を行い、以下の知見を得た。

- 1) HIEC 中に維持される小腸幹細胞の有する増殖能及び分化能によって、長期にわたって安定的に使用可能な enterocyte 培養系を構築した。分化後の HIEC 単層膜では、paracellular pore の間隙率が Caco-2 細胞に比較して高く、*in vivo* ヒト小腸により近い値であることが示された。加えて、Caco-2 細胞と同様に efflux transporter の輸送活性が認められ、CNT3 の mRNA 発現量は Caco-2 細胞に比較して高い結果が得られた。またこれらの特徴が、分化後の HIEC 単層膜における化合物の膜透過に寄与していることも明らかになった。
- 2) 分化後の HIEC 単層膜を用いて得られた薬剤の P_{app} 値は、各薬剤の Fa 値と高い相関性を示したことから、ヒト Fa 値を、既存の Caco-2 細胞単層膜よりも精度よく予測できることが示唆された。また、 P_{app} 値と Fa 値との順位予測性や、吸収性クラスのカテゴリ分けにおいても、Caco-2 細胞に対して、分化後の HIEC は優位性を示した。
- 3) HAC ベクターによって CYP3A4 遺伝子及び CPR 遺伝子を導入した Caco-2 細胞を用いて、薬物の腸管代謝の定量的な予測モデルの構築した。既存の CYP3A4 発現上皮細胞とは異なり、本細胞では継代による CYP3A4 活性の低下は認められなかった。また、本細胞を用いて算出された ER 値と、ヒト Eg 値との間に良好な相関性が認められたことから、本細胞を用いて、CYP3A4 による腸管代謝を定量的に予測できると考えられた。

本研究において構築した、腸管における吸収及び代謝の定量的予測に関する両モデルを組み合わせて活用することにより、高いバイオアベイラビリティを示す開発候補化合物を選択すること、また、そのヒト体内動態を定量的に予測することが可能となり、医薬品開発の成功確率の向上に貢献するものと考えられる。

謝辞

本研究の遂行に際し、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜り、また本論文の御校閲を賜りました名古屋市立大学大学院 薬学研究科 臨床薬学分野 松永民秀教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の作成にあたり、御校閲、御指導を賜りました名古屋市立大学大学院 薬学研究科 湯浅博昭教授、牧野利明教授、林秀敏教授に深く感謝致します。

本研究の遂行に際し、親身なる御指導と御鞭撻を賜りました名古屋市立大学大学院 薬学研究科 臨床薬学分野 岩尾岳洋准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、CYP3A4-CPR-HAC ベクターを賜り、また有益な御指導と御助言を賜りました鳥取大学 染色体工学研究センター 押村光雄特任教授、同大学大学院 医学系研究科 香月康宏准教授、阿部智志助教、同大学 染色体工学研究センター 香月加奈子特命助教に謹んで御礼申し上げます。

本研究遂行の機会を与えて戴き、絶えざる御助言と御協力を賜りました大鵬薬品工業株式会社 薬物動態研究所所長 千葉雅人博士に心から感謝の意を表します。

本研究の遂行に際し、御指導、御協力を終始賜りました大鵬薬品工業株式会社 評価探索室 原田直幹博士、信頼性推進部 久世治朗博士に深く感謝致します。

本研究に関し、終始御助言と暖かい御激励を賜りました大鵬薬品工業株式会社 薬物動態研究所の吉末訓弘博士をはじめとする同研究所の皆様に深く感謝致します。

最後に、常に励ましてくれた家族に心から感謝致します。

引用文献

1. Sugano, K., Kansy, M., Artursson, P., Avdeef, A., Bendels, S., Di, L., Ecker, G.F., Faller, B., Fischer, H., Gerebtzoff, G., Lennernaes, H., and Senner, F. Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010;9:597-614.
2. Artursson, P. and Karlsson, J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991;175:880-85.
3. Hidalgo, I.J., Raub, T.J., and Borchardt, R.T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1989;96:736-49.
4. Lin, X., Skolnik, S., Chen, X., and Wang, J. Attenuation of intestinal absorption by major efflux transporters: quantitative tools and strategies using a Caco-2 model. *Drug Metab. Dispos.* 2011;39:265-74.
5. Ward, J.L. and Tse, C.M. Nucleoside transport in human colonic epithelial cell lines: evidence for two Na⁺-independent transport systems in T84 and Caco-2 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1999;1419:15-22.
6. Bourguin, J., Billaut-Laden, I., Happillon, M., Lo-Guidice, J.M., Maunoury, V., Imbenotte, M., and Broly, F. Gene expression profiling of systems involved in the metabolism and the disposition of xenobiotics: comparison between human intestinal biopsy samples and colon cell lines. *Drug Metab. Dispos.* 2012;40:694-705.
7. Larregieu, C.A. and Benet, L.Z. Drug discovery and regulatory considerations for improving in silico and in vitro predictions that use Caco-2 as a surrogate for human intestinal permeability measurements. *AAPS J* 2013;15:483-97.
8. Lennernäs, H., Palm, K., Fagerholm, U., and Artursson, P. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. *Int. J. Pharm.* 1996;127:103-07.
9. Saitoh, R., Sugano, K., Takata, N., Tachibana, T., Higashida, A., Nabuchi, Y., and Aso, Y. Correction of permeability with pore radius of tight junctions in Caco-2 monolayers improves the prediction of the dose fraction of hydrophilic drugs absorbed by humans. *Pharm. Res.* 2004;21:749-55.
10. Aldhous, M.C., Shmakov, A.N., Bode, J., and Ghosh, S. Characterization of conditions for the primary culture of human small intestinal epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2001;125:32-40.
11. Li, A.P., Loretz, C., Yang, Q., and Doshi, U. Isolation and cryopreservation of

- enterocytes for metabolism and uptake studies. *20th North American International Society for the Study of Xenobiotics Meeting*, Orlando, Florida, USA, October 2015.
12. Glaeser, H., Drescher, S., van der Kuip, H., Behrens, C., Geick, A., Burk, O., Dent, J., Somogyi, A., Von Richter, O., Griese, E.U., Eichelbaum, M., and Fromm, M.F. Shed human enterocytes as a tool for the study of expression and function of intestinal drug-metabolizing enzymes and transporters. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2002;71:131-40.
 13. von Richter, O., Burk, O., Fromm, M.F., Thon, K.P., Eichelbaum, M., and Kivisto, K.T. Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: a comparative analysis in paired tissue specimens. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2004;75:172-83.
 14. Suzuki, A., Sekiya, S., Gunshima, E., Fujii, S., and Taniguchi, H. EGF signaling activates proliferation and blocks apoptosis of mouse and human intestinal stem/progenitor cells in long-term monolayer cell culture. *Lab. Invest.* 2010;90:1425-36.
 15. Jung, P., Sato, T., Merlos-Suarez, A., Barriga, F.M., Iglesias, M., Rossell, D., Auer, H., Gallardo, M., Blasco, M.A., Sancho, E., Clevers, H., and Batlle, E. Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat. Med.* 2011;17:1225-7.
 16. Takenaka, T., Harada, N., Kuze, J., Chiba, M., Iwao, T., and Matsunaga, T. Human small intestinal epithelial cells differentiated from adult intestinal stem cells as a novel system for predicting oral drug absorption in humans. *Drug Metab. Dispos.* 2014;42:1947-54.
 17. Paine, M.F., Hart, H.L., Ludington, S.S., Haining, R.L., Rettie, A.E., and Zeldin, D.C. The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab. Dispos.* 2006;34:880-6.
 18. Guengerich, F.P. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999;39:1-17.
 19. Ito, K., Kusuhara, H., and Sugiyama, Y. Effects of Intestinal CYP3A4 and P-Glycoprotein on Oral Drug Absorption—Theoretical Approach. *Pharm. Res.* 1999;16:225-31.
 20. de Vries, M.H., Hofman, G.A., Koster, A.S., and Noordhoek, J. Absorption and presystemic glucuronidation of 1-naphthol in the vascularly fluorocarbon emulsion perfused rat small intestine: the influence of the luminal flow rate and intraluminal binding. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*

- 1989;340:583-7.
21. Yang, J., Jamei, M., Yeo, K.R., Tucker, G.T., and Rostami-Hodjegan, A. Prediction of intestinal first-pass drug metabolism. *Curr. Drug Metab.* 2007;8:676-84.
 22. Nishimuta, H., Sato, K., Yabuki, M., and Komuro, S. Prediction of the intestinal first-pass metabolism of CYP3A and UGT substrates in humans from in vitro data. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2011;26:592-601.
 23. Kadono, K., Akabane, T., Tabata, K., Gato, K., Terashita, S., and Teramura, T. Quantitative prediction of intestinal metabolism in humans from a simplified intestinal availability model and empirical scaling factor. *Drug Metab. Dispos.* 2010;38:1230-7.
 24. Crespi, C.L., Penman, B.W., and Hu, M. Development of Caco-2 cells expressing high levels of cDNA-derived cytochrome P4503A4. *Pharm. Res.* 1996;13:1635-41.
 25. Brimer, C., Dalton, J.T., Zhu, Z., Schuetz, J., Yasuda, K., Vanin, E., Relling, M.V., Lu, Y., and Schuetz, E.G. Creation of polarized cells coexpressing CYP3A4, NADPH cytochrome P450 reductase and MDR1/P-glycoprotein. *Pharm. Res.* 2000;17:803-10.
 26. Kataoka, M., Terashima, Y., Mizuno, K., Masaoka, Y., Sakuma, S., Yokoi, T., and Yamashita, S. Establishment of MDCKII Cell Monolayer with Metabolic Activity by CYP3A4 Transduced with Recombinant Adenovirus. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2013:125-31.
 27. Schmiedlin-Ren, P., Thummel, K.E., Fisher, J.M., Paine, M.F., Lown, K.S., and Watkins, P.B. Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Mol. Pharmacol.* 1997;51:741-54.
 28. Fisher, J.M., Wrighton, S.A., Watkins, P.B., Schmiedlin-Ren, P., Calamia, J.C., Shen, D.D., Kunze, K.L., and Thummel, K.E. First-pass midazolam metabolism catalyzed by 1 α ,25-dihydroxy vitamin D₃-modified Caco-2 cell monolayers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999;289:1134-42.
 29. Hu, M., Li, Y., Davitt, C.M., Huang, S.M., Thummel, K., Penman, B.W., and Crespi, C.L. Transport and metabolic characterization of Caco-2 cells expressing CYP3A4 and CYP3A4 plus oxidoreductase. *Pharm. Res.* 1999;16:1352-9.
 30. Kazuki, Y., Hoshiya, H., Takiguchi, M., Abe, S., Iida, Y., Osaki, M., Katoh, M., Hiratsuka, M., Shirayoshi, Y., Hiramatsu, K., Ueno, E., Kajitani, N., Yoshino, T., Kazuki, K., Ishihara, C., Takehara, S., Tsuji, S., Ejima, F., Toyoda, A., Sakaki, Y.,

- Larionov, V., Kouprina, N., and Oshimura, M. Refined human artificial chromosome vectors for gene therapy and animal transgenesis. *Gene Ther.* 2011;18:384-93.
31. Kazuki, Y. and Oshimura, M. Human Artificial Chromosomes for Gene Delivery and the Development of Animal Models. *Mol. Ther.* 2011;19:1591-601.
 32. Yeung, T.M., Chia, L.A., Kosinski, C.M., and Kuo, C.J. Regulation of self-renewal and differentiation by the intestinal stem cell niche. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011;68:2513-23.
 33. Linnankoski, J., Makela, J., Palmgren, J., Mauriala, T., Vedin, C., Ungell, A.L., Lazorova, L., Artursson, P., Urtti, A., and Yliperttula, M. Paracellular porosity and pore size of the human intestinal epithelium in tissue and cell culture models. *J. Pharm. Sci.* 2010;99:2166-75.
 34. Toropainen, E., Ranta, V.P., Vellonen, K.S., Palmgren, J., Talvitie, A., Laavola, M., Suhonen, P., Hamalainen, K.M., Auriola, S., and Urtti, A. Paracellular and passive transcellular permeability in immortalized human corneal epithelial cell culture model. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2003;20:99-106.
 35. Mari Hämäläinen, K., Kontturi, K., Auriola, S., Lasse, M., and Urtti, A. Estimation of pore size and pore density of biomembranes from permeability measurements of polyethylene glycols using an effusion-like approach. *J. Control. Release* 1997;49:97-104.
 36. Barker, N. and Clevers, H. Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. *Gastroenterology* 2010;138:1681-96.
 37. Porstmann, T., Ternynck, T., and Avrameas, S. Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J. Immunol. Methods* 1985;82:169-79.
 38. Levy, E., Menard, D., Delvin, E., Montoudis, A., Beaulieu, J.F., Mailhot, G., Dube, N., Sinnett, D., Seidman, E., and Bendayan, M. Localization, function and regulation of the two intestinal fatty acid-binding protein types. *Histochem. Cell Biol.* 2009;132:351-67.
 39. Sjöberg, Å., Lutz, M., Tannergren, C., Wingolf, C., Borde, A., and Ungell, A.L. Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2013;48:166-80.
 40. Söderholm, J.D., Olaison, G., Kald, A., Tagesson, C., and Sjö Dahl, R. Absorption profiles for polyethylene glycols after regional jejunal perfusion and oral load in

- healthy humans. *Dig. Dis. Sci.* 1997;42:853-57.
41. Fihn, B.M., Sjöqvist, A., and Jodal, M. Permeability of the rat small intestinal epithelium along the villus-crypt axis: effects of glucose transport. *Gastroenterology* 2000;119:1029-36.
 42. Hollander, D. The intestinal permeability barrier: a hypothesis as to its regulation and involvement in Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 1992;27:721-26.
 43. Iwao, T., Kodama, N., Kondo, Y., Kabeya, T., Nakamura, K., Horikawa, T., Niwa, T., Kurose, K., and Matsunaga, T. Generation of enterocyte-like cells with pharmacokinetic functions from human induced pluripotent stem cells using small-molecule compounds. *Drug Metab. Dispos.* 2015;43:603-10.
 44. Kodama, N., Iwao, T., Kabeya, T., Horikawa, T., Niwa, T., Kondo, Y., Nakamura, K., and Matsunaga, T. Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase, DNA methyltransferase, and transforming growth factor-beta promotes differentiation of human induced pluripotent stem cells into enterocytes. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2016;31:193-200.
 45. Matsson, P., Bergstrom, C.A., Nagahara, N., Tavelin, S., Norinder, U., and Artursson, P. Exploring the role of different drug transport routes in permeability screening. *J. Med. Chem.* 2005;48:604-13.
 46. Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. <http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-drugs-gen/documents/document/ucm070246.pdf>.
 47. Amidon, G.L., Lennernas, H., Shah, V.P., and Crison, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.* 1995;12:413-20.
 48. Irvine, J.D., Takahashi, L., Lockhart, K., Cheong, J., Tolan, J.W., Selick, H.E., and Grove, J.R. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J. Pharm. Sci.* 1999;88:28-33.
 49. Skolnik, S., Lin, X., Wang, J., Chen, X.H., He, T., and Zhang, B. Towards prediction of in vivo intestinal absorption using a 96-well Caco-2 assay. *J. Pharm. Sci.* 2010;99:3246-65.
 50. Tavelin, S., Taipalensuu, J., Soderberg, L., Morrison, R., Chong, S., and Artursson, P. Prediction of the oral absorption of low-permeability drugs using small intestine-like 2/4/A1 cell monolayers. *Pharm. Res.* 2003;20:397-405.

51. Sugano, K., Takata, N., Machida, M., Saitoh, K., and Terada, K. Prediction of passive intestinal absorption using bio-mimetic artificial membrane permeation assay and the paracellular pathway model. *Int. J. Pharm.* 2002;241:241-51.
52. Klopman, G., Stefan, L.R., and Saiakhov, R.D. ADME evaluation. 2. A computer model for the prediction of intestinal absorption in humans. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2002;17:253-63.
53. Takenaka, T., Harada, N., Kuze, J., Chiba, M., Iwao, T., and Matsunaga, T. Application of a Human Intestinal Epithelial Cell Monolayer to the Prediction of Oral Drug Absorption in Humans as a Superior Alternative to the Caco-2 Cell Monolayer. *J. Pharm. Sci.* 2016;105:915-24.
54. Yamashita, S., Furubayashi, T., Kataoka, M., Sakane, T., Sezaki, H., and Tokuda, H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000;10:195-204.
55. Dixit, N.M. and Perelson, A.S. The metabolism, pharmacokinetics and mechanisms of antiviral activity of ribavirin against hepatitis C virus. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006;63:832-42.
56. Varma, M.V., Obach, R.S., Rotter, C., Miller, H.R., Chang, G., Steyn, S.J., El-Kattan, A., and Troutman, M.D. Physicochemical space for optimum oral bioavailability: contribution of human intestinal absorption and first-pass elimination. *J. Med. Chem.* 2010;53:1098-108.
57. Young, J.D., Yao, S.Y., Baldwin, J.M., Cass, C.E., and Baldwin, S.A. The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol. Aspects Med.* 2013;34:529-47.
58. Okayama, T., Yoshisue, K., Kuwata, K., Komuro, M., Ohta, S., and Nagayama, S. Involvement of concentrative nucleoside transporter 1 in intestinal absorption of trifluorothymidine, a novel antitumor nucleoside, in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012;340:457-62.
59. Ishida, K., Fukao, M., Watanabe, H., Taguchi, M., Miyawaki, T., Matsukura, H., Uemura, O., Zhang, Z., Unadkat, J.D., and Hashimoto, Y. Effect of Salt Intake on Bioavailability of Mizoribine in Healthy Japanese Males. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2013;28:75-80.
60. Endres, C.J., Moss, A.M., Govindarajan, R., Choi, D.S., and Unadkat, J.D. The role of nucleoside transporters in the erythrocyte disposition and oral absorption of ribavirin in the wild-type and equilibrative nucleoside transporter 1^{-/-} mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009;331:287-96.
61. Nasrallah, R., Nguyen, T., Kusari, A., Burgee, K., and Gonzalez, R. Human

- prenatal small intestine cells as a valuable source of stem cells and epithelial cells: phenotypic and functional characterization. *Cell & Tissue Transplantation & Therapy* 2014;6:1.
62. Houston, J.B. and Carlile, D.J. Prediction of hepatic clearance from microsomes, hepatocytes, and liver slices. *Drug Metab. Rev.* 1997;29:891-922.
 63. Iwatsubo, T., Hirota, N., Ooie, T., Suzuki, H., Shimada, N., Chiba, K., Ishizaki, T., Green, C.E., Tyson, C.A., and Sugiyama, Y. Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data. *Pharmacol. Ther.* 1997;73:147-71.
 64. Kato, M., Chiba, K., Hisaka, A., Ishigami, M., Kayama, M., Mizuno, N., Nagata, Y., Takakuwa, S., Tsukamoto, Y., Ueda, K., Kusuhara, H., Ito, K., and Sugiyama, Y. The intestinal first-pass metabolism of substrates of CYP3A4 and P-glycoprotein-quantitative analysis based on information from the literature. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2003;18:365-72.
 65. Gertz, M., Houston, J.B., and Galetin, A. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Intestinal First-Pass Metabolism of CYP3A Substrates with High Intestinal Extraction. *Drug Metab. Dispos.* 2011;39:1633-42.
 66. Gertz, M., Harrison, A., Houston, J.B., and Galetin, A. Prediction of human intestinal first-pass metabolism of 25 CYP3A substrates from in vitro clearance and permeability data. *Drug Metab. Dispos.* 2010;38:1147-58.
 67. Cummins, C.L., Jacobsen, W., Christians, U., and Benet, L.Z. CYP3A4-transfected Caco-2 cells as a tool for understanding biochemical absorption barriers: studies with sirolimus and midazolam. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004;308:143-55.
 68. Wacher, V.J., Wu, C.Y., and Benet, L.Z. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol. Carcinog.* 1995;13:129-34.
 69. Lin, Y.S., Dowling, A.L., Quigley, S.D., Farin, F.M., Zhang, J., Lamba, J., Schuetz, E.G., and Thummel, K.E. Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Mol. Pharmacol.* 2002;62:162-72.
 70. Fisher, J.M., Wrighton, S.A., Calamia, J.C., Shen, D.D., Kunze, K.L., and Thummel, K.E. Midazolam metabolism by modified Caco-2 monolayers: effects of extracellular protein binding. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999;289:1143-50.

71. Cummins, C.L., Mangravite, L.M., and Benet, L.Z. Characterizing the expression of CYP3A4 and efflux transporters (P-gp, MRP1, and MRP2) in CYP3A4-transfected Caco-2 cells after induction with sodium butyrate and the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Pharm. Res.* 2001;18:1102-9.