



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬科学）
報告番号	甲第2025号
学位記番号	第408号
氏名	今倉 悠貴
授与年月日	令和6年3月22日
学位論文の題名	ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の薬物動態、毒性及び免疫研究への応用
論文審査担当者	主査： 星野 真一 副査： 松永 民秀， 肥田 重明， 尾関 哲也

名古屋市立大学学位論文

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の薬物動態、
毒性及び免疫研究への応用

令和 5 年度 (2024年3月)

名古屋市立大学大学院薬学研究科 臨床薬学分野

今倉 悠貴

一. 本論文は2024年3月 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 星野 真一 教授

副査 肥田 重明 教授

尾関 哲也 教授

松永 民秀 教授

二. 本論文は、学術情報誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

【基礎となる報文】

1. Y. Imakura, S. Mima, N. Yamazaki, A. Inomata, S. Mochizuki, T. Iwao, T. Matsunaga. Utility of human induced pluripotent stem cell-derived small intestinal epithelial cells for pharmacokinetic, toxicological, and immunological studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **692**, 149356 (2024).

三. 本論文の基礎となる研究は、松永 民秀 教授の指導のもとに名古屋市立大学大学院薬学研究科及び富士フイルム株式会社において行われた。

略語一覽

5-FU	5-fluorouracil
5'-DFUR	5'-deoxy-5-fluorouridine
ABC	ATP-binding cassette
ALPI	alkaline phosphatase, intestinal
BCRP	breast cancer resistance protein
BSA	bovine serum albumin
CAT1	calcium transport protein 1
CD	cluster of differentiation
CDX2	caudal type homeobox 2
CES	carboxylesterase
CNT	concentrative nucleoside transporter
CYP	cytochrome P450
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCLK1	doublecortin-like kinase 1
EAAC	excitatory amino acid carrier
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
ENT	equilibrative nucleoside transporter
ER	efflux ratio
FABP2	fatty acid-binding protein 2
FAT	fatty acid translocase
FBS	fetal bovine serum
FFAR	free fatty acid receptor
GATA4	GATA binding protein 4
GBA	glucosylceramidase beta
GLUT	glucose transporter
GP2	glycoprotein 2
GPR	G protein-coupled receptors
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HCAR2	hydroxycarboxylic acid receptor 2
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

hiSIECs	human induced pluripotent stem cell-derived small intestinal epithelial cells
IFN γ	interferon gamma
IL-8	interleukin-8
iPS	induced pluripotent stem
ISX	intestine specific homeobox
LCT	lactase
LDH	lactate dehydrogenase
LPS	lipopolysaccharide
LYZ	lysozyme
M cells	microfold cells
MDR1	multidrug resistance 1
MES	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
MGAM	maltase-glucoamylase
MUC2	mucin 2
MRP	multidrug resistance-associated protein
NPC1L1	Niemann-Pick C1 Like 1
OATP	organic anion transporting polypeptide
OCT1	organic cation transporter 1
OST	organic solute transporter
Pam3CSK4	Pam3CysSerLys4
P_{app}	apparent permeability coefficient
PBS	phosphate buffered saline
PEPT1	peptide transporter 1
P-gp	P-glycoprotein
PXR	pregnane X receptor
REG4	regenerating family member 4
RIF	rifampicin
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SCFAs	short-chain fatty acids
SGLT1	sodium-glucose cotransporter 1
SI	sucrase -isomaltase

SLC	solute carrier
SULT	sulfotransferase
TEER	transepithelial electrical resistance
TLRs	toll-like receptors
TNF α	tumor necrosis factor alfa
TREH	trehalase
TRPV6	transient receptor potential cation channel subfamily V member 6
UGT	UDP-glucuronosyltransferase
UPLC–MS/MS	ultraperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry
VD3	1 α ,25-dihydroxyvitamin D ₃
VDR	vitamin D receptor

目次

第一章	序論.....	9
第二章	hiSIECs の基本特性と薬物動態に関する特性	12
2.1	緒言	12
2.2	実験方法	13
2.2.1	細胞の培養	13
2.2.2	Real-Time RT-PCR.....	13
2.2.3	免疫蛍光染色	16
2.2.4	フローサイトメトリー	17
2.2.5	電子顕微鏡での観察	17
2.2.6	経上皮電気抵抗 (TEER) 値測定	17
2.2.7	CYP3A4/5 活性の測定	18
2.2.8	CYP3A4 誘導試験	18
2.2.9	膜透過試験	18
2.2.10	統計解析	19
2.3	実験結果	20
2.3.1	hiSIECs の腸管上皮細胞としての特性.....	20
2.3.1.1	hiSIECs の腸管上皮細胞マーカーの発現と細胞形態.....	20
2.3.1.2	hiSIECs のバリア機能.....	22
2.3.1.3	hiSIECs の各種腸管上皮細胞に関する特性.....	23
2.3.2	hiSIECs の薬物動態に関する特性.....	24
2.3.2.1	hiSIECs の薬物代謝酵素に関する特性.....	24
2.3.2.2	hiSIECs のトランスポーターに関する特性.....	27
2.4	考察	29

2.5	小括	32
第三章	hiSIECs の毒性に関する特性	33
3.1	緒言	33
3.2	実験方法	35
3.2.1	細胞の培養	35
3.2.2	抗悪性腫瘍薬による消化管毒性の評価	35
3.2.3	γ セクレターゼ阻害剤による消化管毒性の評価	35
3.2.4	統計解析	36
3.3	実験結果	37
3.3.1	細胞障害性の抗悪性腫瘍薬による消化管毒性	37
3.3.2	γ セクレターゼ阻害剤による消化管毒性	39
3.4	考察	41
3.5	小括	42
第四章	hiSIECs の免疫に関する特性	43
4.1	緒言	43
4.2	実験方法	45
4.2.1	細胞の培養	45
4.2.2	Real-Time RT-PCR	45
4.2.3	Interleukin-8 産出量の評価	45
4.2.4	短鎖脂肪酸による応答評価と炎症評価	46
4.2.5	M 細胞モデルを用いた取り込み評価	47
4.2.6	統計解析	48
4.3	実験結果	49
4.3.1	TLRs を介した免疫応答	49

4.3.2	短鎖脂肪酸による免疫応答と炎症モデル	51
4.3.3	M 細胞による取り込み評価モデル.....	54
4.4	考察	56
4.5	小括	57
第五章	総括.....	58
謝 辞	60
引用文献	61

第一章 序論

小腸は、薬物や食品の吸収及び代謝を担う消化器官であり、バイオアベイラビリティを予測する上で重要な役割を果たしている¹⁻³⁾。また、小腸は常に増殖と分化を繰り返している上皮細胞を有し、様々な化合物の影響を受けやすいため、毒性の標的臓器ともされる⁴⁾。さらに、小腸には免疫学的な側面もあり、腸管免疫や腸内細菌叢に作用する機能性食品のターゲットとしても注目されている⁵⁾。吸収及び代謝や毒性、免疫といった小腸の多様な側面を理解し、医薬品、食品、腸内細菌に関する研究を推進するためには、ヒト小腸の機能を再現した評価モデルの開発が必要である。

非臨床試験において、ヒト小腸での吸収や代謝を含むバイオアベイラビリティを予測するために、実験動物が広く利用されている。しかし、代謝酵素やトランスポーターには種差があるため、臨床的な予測性能は不十分である^{6,7)}。また、動物愛護の観点から、動物の利用を減らすことが求められており、動物実験代替法の開発が期待されている。ヒト結腸がん由来の Caco-2 細胞は、小腸を研究するための *in vitro* モデルとして広く使用されている⁸⁻¹³⁾。一方、代謝酵素、トランスポーター及びレセプターの発現パターンがヒト正常小腸と異なるため、その有用性は限定的であり¹⁴⁻¹⁶⁾、細胞株や継代数による性能のばらつきが、さらにその応用を妨げている^{17,18)}。凍結保存されたヒト初代腸管上皮細胞は、高い代謝活性を示す¹⁹⁾。さらに、外科手術で残存組織として得られたヒト腸管スライスを用いた Ussing chamber は、ヒトの腸管吸収の予測モデルとして有用である^{20,21)}。しかしながら、これらのヒト細胞や組織は生存期間が限られており、加えて取得の複雑さやサンプル固有のばらつきがあるため、繰り返し再現良く評価に用いるのには課題がある。最近では、ヒト腸管陰窩から分離した腸管幹細胞を用いてオルガノイドを培養する方法が発見され、腸管モデルとして用いられて

いる^{22,23)}。しかし、腸管オルガノイドは内腔側が閉ざされており、頂端側へのアクセスが困難であることや、ヒト腸陰窩の入手可能性も限られていることから、応用が限定的である。

そこで近年、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞 (human induced pluripotent stem cell-derived small intestinal epithelial cells, hiSIECs) が、注目されている。hiSIECs は、セルカルチャーインサート上でヒト腸管上皮細胞のシートとしてバリア機能を示し、cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) 等の薬物代謝酵素やトランスポーターをヒト腸管上皮細胞と同等に発現しており、ヒト小腸の機能を反映する有望な細胞として研究が発展してきている²⁴⁻³¹⁾。これまでに hiSIECs の薬物動態学的特性については多くの研究が報告されているが、それらは小腸の一部の機能を評価しているにすぎない。hiSIECs は、薬物動態に加えて、毒性及び免疫など小腸に関わる様々な研究に利用できるポテンシャルを秘めているが、その応用可能性は十分に解明されていないのが現状である。本研究では、薬物動態、毒性及び免疫学的観点から hiSIECs のヒト小腸モデルとしての有用性について明らかにすることを目的とした。

最初に、本研究で利用する hiSIECs について、基本的な特性として腸管上皮細胞らしさやバリア機能を評価した。また、小腸の主要な機能である薬物動態学的機能について、薬物代謝酵素とトランスポーターに注目して解析した。そこで、第二章では、hiSIECs の腸管上皮細胞としての特性や薬物動態学的機能を評価した知見について論ずる。

消化管毒性は、臨床試験にて神経毒性、心毒性、肝毒性に次いで多く生じる副作用であることが知られている^{32,33)}。細胞障害性の抗悪性腫瘍薬や、 γ セクレターゼ阻害剤によって生じる消化管毒性について、hiSIECs を用いて評価できるか検討した。そこで、第三章では、hiSIECs の消化管毒性評価モデルとしての有用

性を、作用機序の異なる 2 種類の薬物を例として検証した結果について論ずる。

また小腸は免疫学的にも重要な器官であり、腸管免疫や腸内細菌叢に作用する機能性食品の標的としても注目されている⁵⁾。食品や腸内細菌がヒト小腸に及ぼす影響やその作用機序を理解するためのツールとして、hiSIECs の応用可能性を検証した。そこで、第四章では、hiSIECs の免疫に関する特性として、免疫応答や炎症反応、異物の取り込み活性について検討した。

第二章 hiSIECs の基本特性と薬物動態に関する特性

2.1 緒言

小腸は、薬物や食品の吸収及び代謝を担う消化器官であり、バイオアベイラビリティを予測する上で重要な役割を果たしている¹⁻³⁾。そのため、経口薬の開発において、小腸における吸収及び代謝を評価することは重要である。したがって、これらを予測するための評価モデルとして、実験動物^{6,7)}や、Caco-2 細胞⁸⁻¹³⁾、及びヒト腸管から採取された初代細胞¹⁹⁾や組織^{20,21)}に加えて、hiSIECs²⁴⁻³¹⁾についても薬物動態学的な評価が行われてきている。したがって本章では、本研究で利用する hiSIECs について、腸管上皮細胞らしさを有していることを確認した上で、薬物動態学的機能の検証を、薬物代謝酵素とトランスポーターに注目して実施した。

最初に、hiSIECs の腸管上皮細胞らしさを確認するために、腸管上皮細胞のマーカー発現や細胞形態を評価した。また、腸管上皮細胞が有する重要な特性であるバリア機能についても、hiSIECs をセルカルチャーインサート上にて培養して検証した。加えて、杯細胞等の各種腸管上皮細胞のマーカー発現についても評価した。

そして、hiSIECs の薬物動態学的機能の評価した。薬物代謝酵素やトランスポーターについて、hiSIECs における mRNA 発現を Caco-2 細胞やヒト成人小腸の発現レベルと比較した。また、小腸における主要な薬物代謝酵素やトランスポーターとして、hiSIECs における CYP3A4/5 及び P-gp の活性を評価した。さらに、小腸における薬物間相互作用の一つである酵素誘導を評価することが可能か、誘導剤である rifampicin (RIF) 及び $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ (VD₃) を用いて検証した。

2.2 実験方法

2.2.1 細胞の培養

hiSIECsとしては、富士フイルム株式会社（東京）のF-hiSIECを用いた。F-hiSIECは、ヒトiPS細胞から、内胚葉、腸管幹細胞へと分化された後に、腸管上皮細胞へと分化される工程の途中で凍結保存されており、これを取扱説明書に従って解凍播種、培養することで腸管上皮細胞への最終的な分化を完了させ、評価に利用した。簡単に説明すると、細胞播種前に96ウェルプレート（Corning、ニューヨーク州、米国）、または24ウェルセルカルチャーインサート（Merck Millipore、マサチューセッツ州、米国）をMatrigel GFR（Corning）でコーティングした。F-hiSIECを解凍し、Matrigel GFRでコーティングしたプレートまたはセルカルチャーインサート上に播種し、取扱説明書に従って9-13日間培養した。なお、本試験におけるLotは、ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への独立した製造Lotを示す。Caco-2細胞は、株式会社ケー・エー・シー（京都）のPOCA Caco-2を使用して準備した。本細胞は、24ウェルセルカルチャーインサートに播種してから20日目まで分化されており、取扱説明書に従って添付の培地でさらに1日間培養した。

2.2.2 Real-Time RT-PCR

Qiazol（Qiagen、Hilden、ドイツ）とRNeasy Plus Mini kit（Qiagen）を用いて、hiSIECs及びCaco-2細胞のRNAを抽出した。cDNA合成はhigh-capacity RNA-to-cDNA kits（Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ州、米国）を、Real-Time PCRの反応混合液はTaqMan gene expression master mix（Thermo Fisher Scientific）を、反応にはViiA 7 Real-Time PCR System（Applied Biosystems、カリフォルニア州、米国）を使用し、取扱説明書に従った。PCRプライマーは、Table 1に示したものをを用いた。内在性コントロールとして18S ribosomal RNAを用いて補

正した。コントロールとして、BioChain Institute（カリフォルニア州、米国）より購入したヒト成人小腸の total RNA を用いた。独立した 2Lot 以上の hiSIECs について $n=1$, triplicate で試験し、再現性が得られることを確認した上で、代表的な 1 試験の結果を示す。

Table 1. TaqMan Assays used in this study.

Gene name	Assay ID	Gene name	Assay ID
18S	Hs03003631_g1	LYZ	Hs00426232_m1
ABCA1	Hs01059137_m1	MGAM	Hs01090216_m1
ABCB1	Hs00184500_m1	MUC2	Hs03005103_g1
ABCC1	Hs01561483_m1	NPC1L1	Hs00905233_m1
ABCC2	Hs00960489_m1	REG4	Hs00230746_m1
ABCC3	Hs00978452_m1	SLC15A1	Hs00192639_m1
ABCG2	Hs01053790_m1	SLC1A1	Hs00188172_m1
ABCG5	Hs00223686_m1	SLC22A1	Hs00427552_m1
ABCG8	Hs00223690_m1	SLC28A1	Hs00984391_m1
CD36	Hs00354519_m1	SLC28A2	Hs01035846_m1
CDX2	Hs01078080_m1	SLC29A1	Hs01085706_m1
CES1	Hs00275607_m1	SLC29A2	Hs01546959_g1
CES2	Hs01077945_m1	SLC2A2	Hs01096908_m1
CYP2C19	Hs00426380_m1	SLC2A5	Hs01086390_m1
CYP2C9	Hs02383631_s1	SLC51A	Hs00380895_m1
CYP3A4	Hs00604506_m1	SLC51B	Hs01057182_m1
CYP3A5	Hs02511768_s1	SLC5A1	Hs01573793_m1
DCLK1	Hs00178027_m1	SLCO2B1	Hs01030343_m1
FABP2	Hs01573164_g1	SULT1B1	Hs00234898_m1
GATA4	Hs00171403_m1	TREH	Hs00389383_m1
GATA6	Hs00232018_m1	TRPV6	Hs00367960_m1
GBA	Hs00986836_g1	UGT1A1	Hs02511055_s1
GP2	Hs00426805_m1	UGT2B7	Hs00426592_m1
ISX	Hs01368145_m1	Villin 1	Hs01031739_m1
LCT	Hs00158722_m1		

2.2.3 免疫蛍光染色

免疫蛍光染色のため、細胞を 4°C の methanol 中で固定透過処理した。洗浄後、1% ウシ血清アルブミン (BSA)、22.5 mg/mL グリシン、0.1% Tween 20 を含む PBS にて室温で 30 分間ブロッキングした。次いで細胞を Table 2 に示す一次抗体と共に 4°C で一晩インキュベートした。一次抗体は以下のように希釈した： villin 1 1:200、mucin 2 (MUC2) 1 : 200、glycoprotein 2 (GP2) 1:600。続いて、Table 2 に示す二次抗体と共に室温で 60 分間インキュベートした。その後、細胞を 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) と共に室温で 5 分間インキュベートした。細胞の観察は、BZ-X (キーエンス、大阪) を使用した。

Table 2. Antibodies used in this study.

Antibody	Supplier	Catalogue number	Application
anti-villin 1	Abcam	ab130751	IHC, FC
anti-occludin	Thermo Fisher Scientific	33-1500	IHC
anti-MUC2	Abcam	ab11197	IHC
anti-GP2	MBL	D277-3	IHC
Rabbit IgG Isotype Control	Abcam	ab172730	FC
Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 conjugate	Abcam	ab150077	IHC, FC
Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor 568 conjugate	Abcam	ab175473	IHC

2.2.4 フローサイトメトリー

6 ウェルプレートで培養した hiSIECs を、TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific) とともに 37°C で 30 分間インキュベートし、プレートから剥離した。Live/Dead Fixable Aqua (Thermo Fisher Scientific) を使用して死細胞を染色し、その後 4% paraformaldehyde 中に室温で 15 分間静置して固定した。細胞は、フローサイトメトリーバッファー (2% FBS を含む PBS) 中に保存した。その後、サポニンを添加したフローサイトメトリーバッファーと交換した後、Table 2 に示す一次抗体を添加し、暗所で室温にて 1 時間インキュベートした。続いて、Table 2 に示す二次抗体とも同様に反応させた。最後に、染色された細胞を Attune NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific) で分析し、Table 2 に示す rabbit IgG isotype control 及び同様の二次抗体で染色した細胞と比較することで、陽性細胞の割合を算出した。

2.2.5 電子顕微鏡での観察

セルカルチャーインサートで培養した hiSIECs を、2.5% グルタルアルデヒドリン酸緩衝液で細胞を固定した。そのサンプルをボゾリサーチセンター (御殿場) に送付し、解析を委託した。

2.2.6 経上皮電気抵抗 (TEER) 値測定

hiSIECs の経上皮電気抵抗 (TEER) 値は、Millicell ERS-2 (Merck Millipore) を用いて、培地交換前に測定した。測定値は、セルカルチャーインサートの底面積 (0.33 cm^2) に基づいて $\Omega \times \text{cm}^2$ に変換した。

2.2.7 CYP3A4/5 活性の測定

hiSIECs を、5 μ M の midazolam (富士フイルム和光純薬株式会社、大阪) を含む F-hiSIEC Assay Medium (富士フイルム株式会社) とともに 37°C で 2 時間インキュベートした。代謝産物は、ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) を用いて定量した。Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞の総タンパク質量を測定し、タンパク質量当たりの活性を算出した。

2.2.8 CYP3A4 誘導試験

hiSIECs における CYP3A4 mRNA 発現量の誘導を評価した。hiSIECs を Matrigel GFR でコーティングしたセルカルチャーインサート上に播種し、その後、取扱説明書に従って 7 日間培養した。次に、前培養として F-hiSIEC Assay Medium で培養した (7-9 日目)。hiSIECs を、5-20 μ M の RIF (富士フイルム和光純薬株式会社) または 1-100 nM の VD3 (富士フイルム和光純薬株式会社) を含む F-hiSIEC Assay Medium で 48 時間処理し (9-11 日目)、CYP3A4 mRNA 発現量を、上記と同様の方法で Real-Time RT-PCR を用いて評価した。

2.2.9 膜透過試験

セルカルチャーインサートで培養した hiSIECs の、apical 側のチャンバーに HBSS-A 溶液 (10 mM MES (Thermo Fisher Scientific)、4.5 g/L グルコースを含む HBSS (Thermo Fisher Scientific)、pH 6.5) を、basal 側のチャンバーに HBSS-B 溶液 (10 mM HEPES (Thermo Fisher Scientific)、4.5 g/L グルコースを含む HBSS、pH 7.4) を添加して、37°C で少なくとも 1 時間プレインキュベートした。その後、apical 側のチャンバーを 110 μ M の lucifer yellow (富士フイルム和光純薬株

株式会社)を含む HBSS-A 溶液に交換し、37°C で 60 分間インキュベートしながら試験を実施した。Apical 側及び basal 側チャンバーから溶液を回収し、EnSpire (PerkinElmer、マサチューセッツ州、米国)を用いて評価した。

基質として 10 μ M の digoxin (Thermo Fisher Scientific) を用いて、双方向輸送試験を実施した。10 mM HEPES (pH 7.4) を含む HBSS を試験バッファーとして使用した。37°C で 1 時間のプレインキュベーション後、基質を含む試験バッファーを apical 側又は basal 側チャンバーに添加し、続いて 37°C で 1 時間インキュベートした。未反応の基質を、UPLC-MS/MS を用いて評価した。

P_{app} は以下のとおり算出した。

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0}$$

ここで、 dQ/dt は単位時間あたりに透過した化合物の量であり、 A はセルカルチャーインサートの表面積 (0.33 cm^2) であり、 C_0 はドナーチャンバー中の化合物の初期濃度である。Digoxin の efflux ratio (ER) は、basal 側から apical 側への輸送の P_{app} を、apical 側から basal 側への輸送の P_{app} で割ることによって算出した。

2.2.10 統計解析

多重比較は、分散分析を行った後、Dunnett's test を用いて実施した。これらの分析には、SPSS Statistics 28.0 software (IBM、ニューヨーク州、米国)を用いた。

2.3 実験結果

2.3.1 hiSIECs の腸管上皮細胞としての特性

hiSIECs の腸管上皮細胞としての特性を解析するために、腸管上皮細胞のマーカ発現や細胞形態、及びバリア機能の形成を評価した。加えて、杯細胞等の各種腸管上皮細胞のマーカ発現についても評価した。

2.3.1.1 hiSIECs の腸管上皮細胞マーカの発現と細胞形態

hiSIECs は、腸管上皮細胞マーカである villin 1、caudal type homeobox 2 (CDX2)、intestine specific homeobox (ISX)、GATA binding protein 4 (GATA4)、GATA6、fatty acid-binding protein 2 (FABP2) について、ヒト成人小腸と同程度の mRNA 発現を示した (Fig. 1A)。次に、免疫蛍光染色により villin 1 のタンパク質レベルでの発現が認められた (Fig. 1B)。また、フローサイトメトリーによる解析の結果、hiSIECs における villin 1 陽性細胞の割合は 90%以上であった (Fig. 1C)。他の hiSIECs に関する報告においては、villin 1 陽性細胞の割合が 95%程度であり²⁹⁾、それと同程度であることが確認された。さらに、電子顕微鏡によって hiSIECs の細胞表面には微絨毛が形成されていることも観察された (Fig. 1D)。

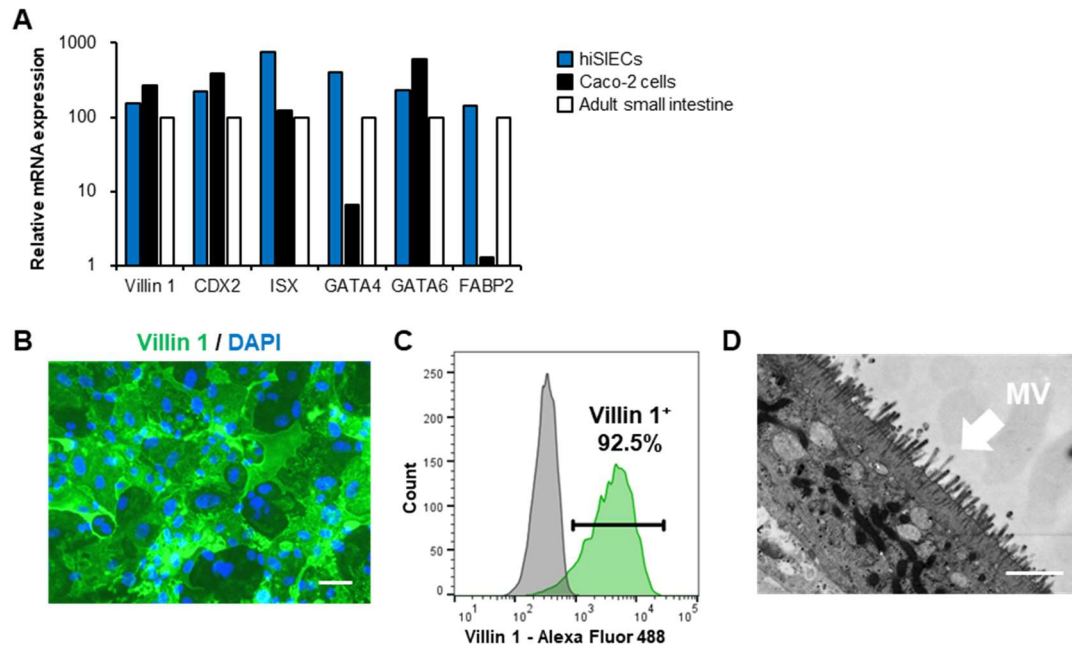


Figure 1. Expressions of small intestinal epithelial markers and cell morphology of hiSIECs.

(A) The gene expression levels of small intestinal epithelial markers were determined by real-time RT-PCR. The mRNA levels in the adult small intestine were arbitrarily defined as 100. (B) Immunofluorescence staining of villin 1 (green) was performed in the hiSIECs. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). The scale bar represents 50 μm . (C) The percentages of villin 1-positive cells were measured by flow cytometry analysis. (D) Electron microscope images of microvilli (MV, white arrow). The scale bar represents 2.0 μm .

2.3.1.2 hiSIECs のバリア機能

腸管上皮細胞が有する特性として、hiSIECs のバリア機能を評価した。免疫蛍光染色により、バリア機能の形成に必要となるタイトジャンクション関連タンパク質である occludin の発現が認められた (Fig. 2A)。次に、hiSIECs をセルカルチャーインサート上で培養すると、安定した経上皮電気抵抗 (TEER) 値を示した (Fig. 2B)。さらに、細胞間隙経路で透過するとされる lucifer yellow の透過性試験により、ヒト腸管スライスを用いた Ussing chamber における P_{app} 値 $2.99 \pm 1.53 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}^{20}$ と比較して同等以下の P_{app} 値を示すことから、hiSIECs が薬物透過性を評価するのに十分なバリア機能を備えていることを確認した (Fig. 2C)。

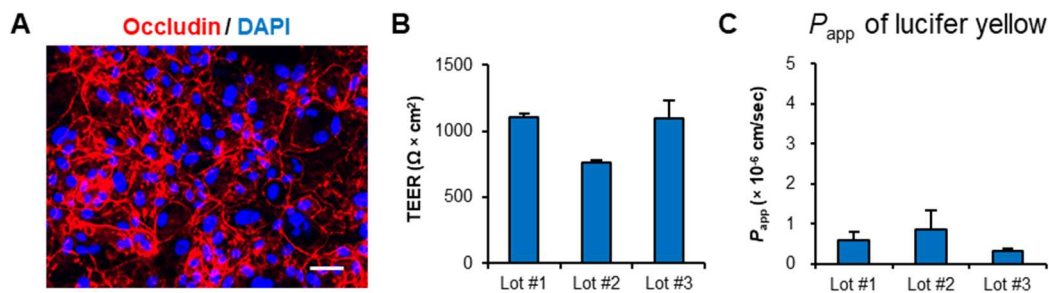


Figure 2. Barrier function of hiSIECs.

(A) Immunofluorescence staining of occludin (red) was performed in the hiSIECs. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). The scale bar represents 50 μm . (B) TEER values of the hiSIEC monolayer were measured. Data were presented as means \pm S.D. ($n = 3$). (C) The permeability of lucifer yellow across the hiSIEC monolayer. Data were presented as means \pm S.D. ($n = 3$).

2.3.1.3 hiSIECs の各種腸管上皮細胞に関する特性

ヒト小腸の腸管上皮細胞には、大半を占める吸収上皮細胞に加えて、杯細胞、内分泌細胞、パネート細胞、M細胞、タフト細胞が含まれている。hiSIECsは、各細胞のマーカである MUC2、regenerating family member 4 (REG4)、lysozyme (LYZ)、GP2、doublecortin-like kinase 1 (DCLK1) の mRNA 発現を示した (Fig. 3A)。また、免疫蛍光染色により、hiSIECs において MUC2 及び GP2 陽性細胞が分化されていることが明らかとなった (Fig. 3B)。

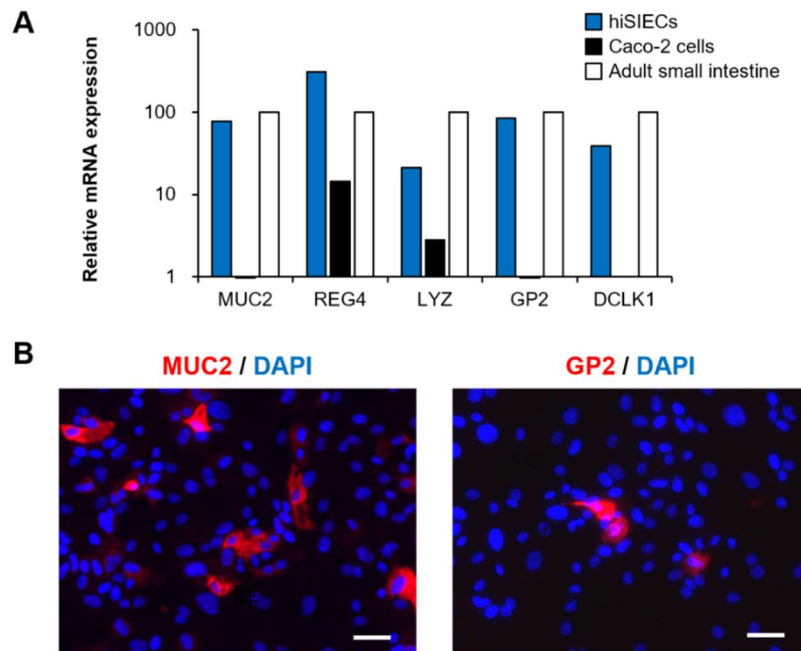


Figure 3. Expression of other major intestinal epithelial cell-type markers in hiSIECs.

(A) The gene expression levels of small intestinal epithelial markers were determined by real-time RT-PCR. The mRNA levels in the adult small intestine were arbitrarily defined as 100. (B) Immunofluorescence staining of MUC2 and GP2 (red) was performed in the hiSIECs. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). The scale bar represents 50 μm .

2.3.2 hiSIECs の薬物動態に関する特性

hiSIECs の薬物動態に関する特性について、薬物代謝酵素及びトランスポーターの観点から評価した。

2.3.2.1 hiSIECs の薬物代謝酵素に関する特性

最初に、薬物代謝酵素について、hiSIECs や Caco-2 細胞の mRNA 発現量を評価した。その結果、hiSIECs は、第 I 相の薬物代謝酵素である CYP3A4、CYP3A5、CYP2C9、CYP2C19、carboxylesterase 2 (CES2) や、第 II 相の薬物代謝酵素である UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1)、UGT2B7、sulfotransferase family 1B1 (SULT1B1)、グリコシダーゼである sucrase-isomaltase (SI)、lactase (LCT)、trehalase (TREH)、maltase-glucoamylase (MGAM) の二糖加水分解酵素、glucosylceramidase beta (GBA) について、ヒト成人小腸と同等の mRNA 発現を示した (Fig. 4A)。

薬物代謝酵素として代表的な cytochrome P450 (CYP) の中では、CYP3A4 が小腸において大半を占めるとされている³⁴⁾。Kabeya らは、ヒト初代腸管上皮細胞及び Caco-2 細胞における CYP3A4/5 の活性を midazolam の 1'-hydroxylation を指標に評価し、それぞれ 848 ± 149 及び 26 ± 3 pmol/2h/mg protein であることを報告している³⁰⁾。同様の手法で hiSIECs における CYP3A4/5 活性を評価した結果、ヒト初代腸管上皮細胞と同等の活性を示した (Fig. 4B)。

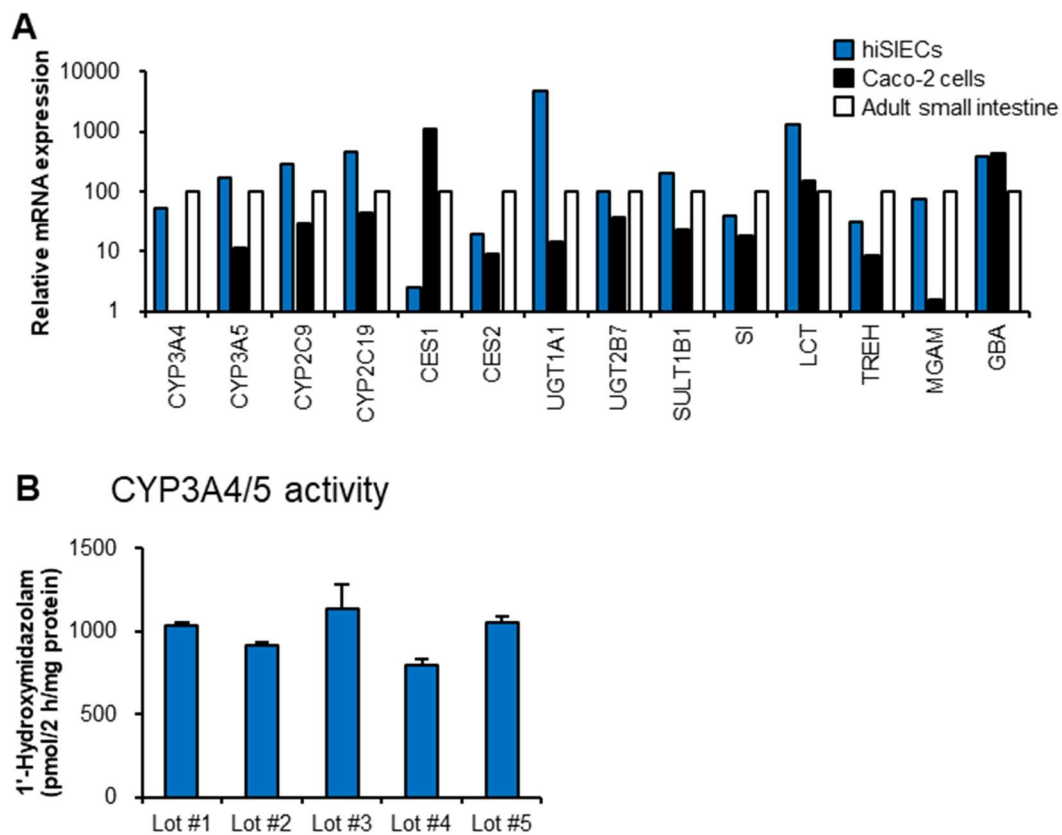


Figure 4. Pharmacokinetic characteristics regarding the metabolizing enzymes of hiSIECs.

(A) The gene expression levels of the drug-metabolizing enzymes were determined by real-time RT-PCR. The mRNA levels in the adult small intestine were arbitrarily defined as 100. (B) The CYP3A4/5 activities in hiSIECs were evaluated by midazolam hydroxylation. Data were presented as means \pm S.D. ($n = 3$).

加えて、腸管上皮細胞の CYP3A4 は様々な薬物によって誘導されることが知られている。CYP3A4 誘導剤である RIF や VD3 を hiSIECs に作用させると、CYP3A4 mRNA 発現量の有意な上昇が認められた (Fig. 5A)。また、複数 Lot において、安定して誘導が見られることが明らかとなった (Fig. 5B)。

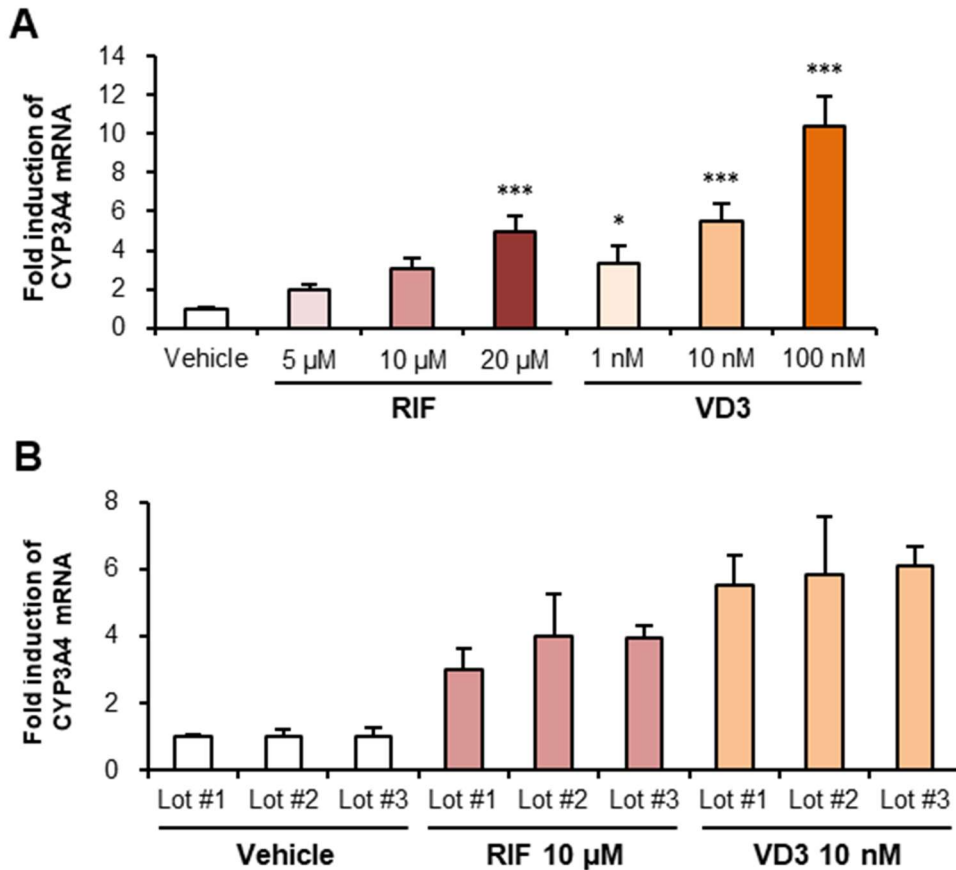


Figure 5. CYP3A4 induction potency of the hiSIECs.

(A) Induction of the gene expression level of CYP3A4 by RIF and VD3. The gene expression level of the vehicle group was taken as 1. Data were presented as means \pm S.D. ($n = 3$). Statistical significance levels compared with the vehicle group: * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$. (B) Induction of the gene expression level of CYP3A4 by 10 μ M RIF and 10 nM VD3. The gene expression level of the vehicle group was taken as 1. Data were presented as means \pm S.D. ($n = 3$).

2.3.2.2 hiSIECs のトランスポーターに関する特性

次に、トランスポーターについて、hiSIECs や Caco-2 細胞の mRNA 発現量を評価した。その結果、hiSIECs は腸管上皮細胞が有するトランスポーターである ATP-binding cassette subfamily A member 1 (ABCA1)、ABCB1/multiple drug resistance 1 (MDR1) (P-glycoprotein (P-gp))、ABCC1/multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1)、ABCC2/MRP2、ABCC3/MRP3、ABCG2/breast cancer resistance protein (BCRP)、ABCG5、ABCG8、solute carrier family 1 member 1 (SLC1A1) /excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1)、SLC2A2/glucose transporter 2 (GLUT2)、SLC2A5/GLUT5、SLC5A1/sodium-glucose cotransporter 1 (SGLT1)、SLC15A1/peptide transporter 1 (PEPT1)、SLC22A1/organic cation transporter 1 (OCT1)、SLC28A1/concentrative nucleoside transporter 1 (CNT1)、SLC28A2/CNT2、SLC29A1/equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1)、SLC29A2/ENT2、SLC51A/organic solute transporter alpha (OSTA)、SLC51B/OSTB、SLCO2B1/organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1)、Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1)、CD36/fatty acid translocase (FAT)、transient receptor potential cation channel subfamily V member 6 (TRPV6) /calcium transport protein 1 (CAT1) について、mRNA 発現を示すことが明らかとなった (Fig. 6A)。

さらに、薬物の腸管吸収に影響する重要なトランスポーターとして、P-gp に着目して機能解析を実施した。典型的な P-gp 基質である digoxin について、apical to basal (A to B) 方向を上回る basal to apical (B to A) 方向の輸送が認められ、排出トランスポーターとして正しく機能していることが示された (Fig. 6B)。

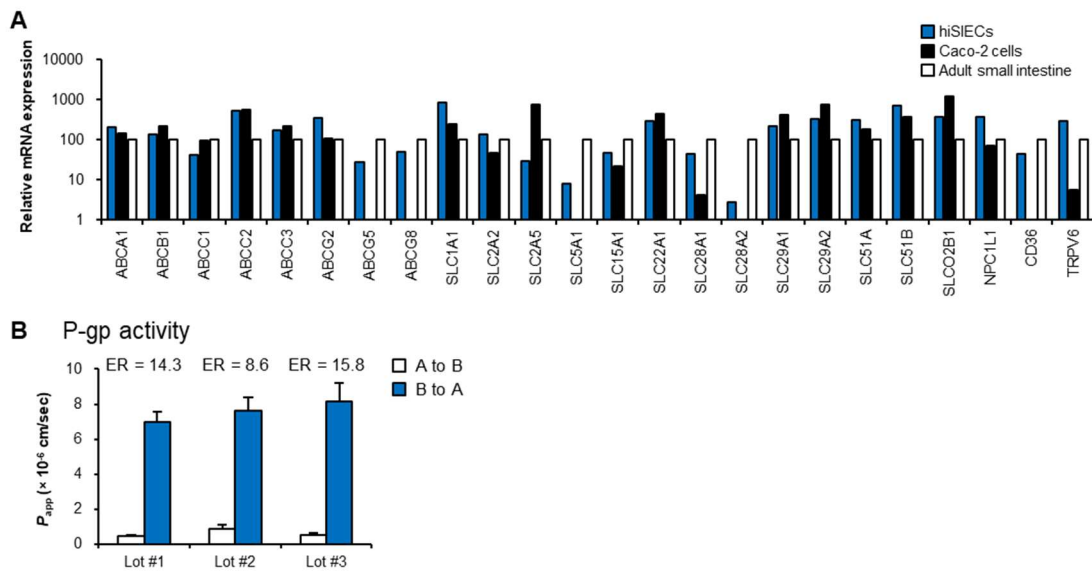


Figure 6. Pharmacokinetic characteristics regarding the transporters of hiSIECs. (A) The gene expression levels of transporters were determined by real-time RT-PCR. The mRNA levels in the adult small intestine were arbitrarily defined as 100. (B) The transport activities of P-gp in hiSIECs were evaluated by measuring the directional (A to B and B to A) transport of digoxin, a typical P-gp substrate. Data were presented as means \pm S.D. ($n = 3$).

2.4 考察

本章では、hiSIECs の腸管上皮細胞としての特性や薬物動態に関する特性を評価した。最初に、hiSIECs は腸管上皮細胞マーカーに関する mRNA 発現を示した (Fig. 1A)。結腸ではなく小腸近位のマーカーとして知られる GATA4^{35,36)}や、腸管上皮細胞の成熟度の指標とされる FABP2^{37,38)}について、hiSIECs の mRNA 発現がヒト成人小腸と同程度であったことから、hiSIECs が成熟した小腸の腸管上皮細胞であることが示唆された。また、hiSIECs における villin 1 陽性細胞の割合は 90%以上であった (Fig. 1C)。したがって、大部分の細胞が iPS 細胞から腸管上皮細胞へと特異的に分化していることが示された。

腸管上皮細胞が有する重要な特性の一つであるバリア機能についても、hiSIECs は安定した機能が認められた (Fig. 2)。我々は以前に、Caco-2 細胞の TEER 値が $650 \pm 34 \Omega \times \text{cm}^2$ であり、細胞間隙経路で透過するとされる lucifer yellow の P_{app} 値が $0.06 \pm 0.02 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$ であったことを報告した³⁰⁾。hiSIECs の TEER 値は、Caco-2 細胞と同等であったが、lucifer yellow の透過性は hiSIECs の方が高かった。Caco-2 細胞はヒト初代腸管上皮細胞よりも強力な密着結合を持ち、細胞間隙経路を通る化合物の透過性が低下すると報告されており³⁹⁾、hiSIECs の方がよりヒト生体に近い透過性を示すことが期待できる。また一方で、ヒト小腸組織の TEER 値は $50\text{--}100 \Omega \times \text{cm}^2$ であることが知られており⁴⁰⁾、hiSIECs の方が高い TEER 値を示す。これは、ヒト小腸組織には未熟な腸管幹細胞も豊富に含まれている一方で、hiSIECs には成熟した腸管上皮細胞がより多く含まれるためだと考えられる。

さらに、hiSIECs は、杯細胞、内分泌細胞、パネート細胞、M 細胞、タフト細胞のマーカー発現を示した (Fig. 3)。杯細胞 (MUC2) 及び M 細胞 (GP2) のマーカー陽性細胞が存在することを免疫染色により確認したが、Yamada らは同様

の hiSIECs について、内分泌細胞 (chromogranin A) 及びパネート細胞 (lysozyme) のマーカー陽性細胞が存在することを報告している⁴¹⁾。したがって、hiSIECs には各種細胞が含まれていることが示唆され、各種細胞に注目したアッセイへの応用も期待できる。本章では、ヒト腸管上皮の大半を占める吸収上皮細胞が有する薬物動態学的特性について論じたが、第三章では杯細胞、第四章では M 細胞に着目した応用展開について論ずる。

本章では、hiSIECs の薬物動態に関する特性として、薬物代謝酵素及びトランスporter について評価した。多くの薬物代謝酵素及びトランスporter の mRNA 発現レベルは、hiSIECs とヒト成人小腸の間で同様であり (Fig. 4A and 6A)、hiSIECs はヒト初代腸管上皮細胞と同等の CYP3A4/5 活性や、安定した排出トランスporter P-gp の活性を有していた (Fig. 4B and 6B)。加えて、これらの活性は複数の製造 Lot 間で安定しており、再現性試験に適した細胞であることが示唆された。ここでは代表的な薬物代謝酵素やトランスporter の活性に着目して評価したが、他にも Kitaguchi らは同様の hiSIECs が UGT ファミリー酵素の活性を有することや、21 種類の薬物について hiSIECs が Caco-2 細胞よりも高い腸管吸収性予測精度を有することを報告している ($r=0.830$ and 0.401 , respectively)⁴²⁾。今後、hiSIECs がその他の薬物代謝酵素やトランスporter の評価にも活用されることに期待したい。

特定の薬物代謝酵素及びトランスporter の寄与を評価するにあたっては、リコンビナントタンパク質⁴³⁾、ミクロソーム⁴⁴⁾、過剰発現細胞株^{45,46)}や Caco-2 細胞⁸⁻¹³⁾をはじめとした別の *in vitro* 評価系を用いることもできる。それらと比較して、hiSIECs は複数の薬物代謝酵素及びトランスporter を、ヒト成人小腸と同様のレベルで発現しているため、複合的な寄与を評価することが可能である。近年、Agustina らは hiSIECs を用いて、イソフラボンが硫酸転移酵素による

代謝を受けた後、排出トランスポーターである BCRP により腸管管腔側に排出される様子を再現し、それらに対する BCRP 阻害剤の影響を評価している⁴⁷⁾。このように、hiSIECs は薬物代謝酵素及びトランスポーターの双方の影響を受ける化合物や、二次的、三次的な反応を評価するツールとしても期待できる。

hiSIECs はヒト成人小腸と概ね同様のレベルで薬物代謝酵素及びトランスポーターを発現していたが、例えば UGT1A1 の mRNA 発現量は突出して高く、CES1、SLC5A1、SLC28A2 の mRNA 発現量は低いレベルであった。UGT1A1 については、Kitaguchi らの報告⁴²⁾によっても、同様の hiSIECs について mRNA 発現量がヒト初代腸管上皮細胞の 95 倍高いことが報告されている。同時に、著者らは UGT1A1 特異的な代謝による β -estradiol の 3-glucuronide 生成量を評価しているが、hiSIECs と Caco-2 細胞の活性はヒト初代腸管上皮細胞のそれぞれ 3.8 倍、0.017 倍であることも報告されており、mRNA 発現量に差があるにも関わらず、活性はヒト初代腸管上皮細胞同等であることが示されている。CES については、CES1 の発現量は肝臓・Caco-2 細胞 > 小腸、CES2 の発現量は小腸・肝臓 > Caco-2 細胞であることを Kabeya らが報告している⁴⁸⁾。したがって、hiSIECs の CES1 発現レベルはヒト成人小腸よりも低いレベルを示したが、これは小腸としての特徴をより強調した結果であると考察できる。また、SLC5A1 や SLC28A2 が低い発現レベルを示していることは、課題である。近年 Shirai らが、5-aza-2'-deoxycytidine を除いた培地で同様の hiSIECs を気液培養することにより、SLC5A1 の発現量が 10 倍以上上昇することを見出した⁴⁹⁾。SLC28A2 については評価されていないが、このような培養法の改良により、さらにヒト成人小腸に近いレベルまで発現量が上昇する可能性がある。

また、hiSIECs を CYP3A4 誘導剤である RIF 及び VD3 に曝露すると、CYP3A4 の mRNA 発現レベルが濃度依存的に有意に増加した (Fig. 5)。したがって、

hiSIECs は、RIF 及び VD3 の受容体である pregnane X receptor (PXR) 及び vitamin D receptor (VDR) を介した酵素誘導など、薬物間相互作用の研究に利用できると考えられる。他の評価系として、例えば Caco-2 細胞は VDR を介した誘導が認められるものの、PXR をほとんど発現しておらず、これを介した誘導は見られないことが報告されている⁵⁰⁾。また、indole 3-propionic acid がマウス空腸の PXR を活性化する一方で、マウス肝臓の PXR を活性化しないという臓器間差が報告されており⁵¹⁾、さらに種差^{52,53)}も報告されていることから、hiSIECs はヒト小腸における薬物間相互作用を評価できる点で有用である。

2.5 小括

本章では、hiSIECs が腸管上皮細胞の特性として、腸管上皮細胞マーカーの発現やバリア機能を有していることが認められた。また、各種腸管上皮細胞の存在も示唆された。さらに、薬物代謝酵素やトランスポーターの活性、誘導剤による酵素誘導が安定して認められ、腸管における薬物動態を予測するためのツールとして有望であることが示唆された。

第三章 hiSIECs の毒性に関する特性

3.1 緒言

小腸は、常に増殖と分化を繰り返している上皮細胞を有し、様々な化合物の影響を受けやすいため、毒性の標的臓器となりうる⁴⁾。消化管における毒性は、臨床試験にて神経毒性、心毒性、肝毒性に次いで多く生じる副作用であることが知られており^{32,33)}、米国の臨床試験に参加した患者において、最も一般的な有害事象であったという報告もある⁵⁴⁾。消化管毒性に対しては対処療法が必要となることが多く、患者のQOLを低下させ、薬剤投与量の制限や治療法の制限により結果として有効性が犠牲となってしまう可能性がある⁵⁵⁾。したがって、消化管毒性を回避するための研究は重要であり、本章では、hiSIECsを用いて消化管毒性を評価できるか検証した。

最初に、細胞障害性の抗悪性腫瘍薬による消化管毒性について、評価した。抗悪性腫瘍薬として、5-FUをモデル薬物として選択し、同時に5-FUのプロドラッグである5'-DFUR及びcapecitabineについても検討した。capecitabineは2段階の代謝を介して5'-DFURに変換されるように設計されているため、誘発される消化管毒性は5'-DFURよりも少ない⁵⁶⁾。hiSIECsを用いて、細胞障害性の抗悪性腫瘍薬による消化管毒性、及びプロドラッグ設計に順じた毒性強度を評価できるか検証した。

次に、消化管の分化バランスが乱されるような毒性について評価した。第二章では、吸収上皮細胞に加えて、杯細胞、内分泌細胞、パネート細胞、M細胞、タフト細胞が、hiSIECsに含まれていることが示唆された。これらの細胞種の分化には様々なシグナルが関わっている⁵⁷⁾。例えば、抗アルツハイマー薬として開発された γ シクレターゼ阻害剤は、Notchシグナルを阻害し、杯細胞への異常分化を引き起こすことで、下痢等の症状が引き起こされることが知られている^{58,59)}。

Notch シグナルの阻害によって腸管上皮細胞の異常分化や、免疫系細胞の分化障害などの重篤な副作用を引き起こすとされ⁵⁸⁾、Notch シグナルを阻害しない毒性回避型の γ セクレターゼモジュレーターが開発された。 γ セクレターゼ阻害剤及び γ セクレターゼモジュレーターについて評価することで、hiSIECsを用いて、消化管における分化異常、及びその作用機序に基づいた毒性回避を検出できるか検証した。

3.2 実験方法

3.2.1 細胞の培養

hiSIECsは、第二章と同様の方法にて培養した。なお本章では、培養期間中に薬物を作用させる試験を実施したが、その手法については3.2.3項に記載する。

3.2.2 抗悪性腫瘍薬による消化管毒性の評価

細胞障害性の抗悪性腫瘍薬による消化管毒性を評価するために、セルカルチャーインサート上で培養した hiSIECs を、それぞれ 1–1000 μM の 5-fluorouracil (5-FU)、5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR)、又は capecitabine (いずれも富士フイルム和光純薬株式会社) で処理した。薬物添加 72 時間後、5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) 陽性細胞の割合、lactate dehydrogenase (LDH) 漏出量、及び TEER 値を測定した。EdU 陽性細胞は、Click-iT EdU Cell Proliferation Kit (Thermo Fisher Scientific) を取扱説明書に従って用い、染色した。培養上清の LDH 活性は、LDH cytotoxicity detection kit (タカラバイオ株式会社、滋賀) を取扱説明書に従って用い、測定した。TEER 値は、第二章と同様の方法にて測定した。

3.2.3 γ セクレターゼ阻害剤による消化管毒性の評価

腸管分化に対する γ セクレターゼ阻害剤による影響を評価するために、セルカルチャーインサート上に hiSIECs を播種後、0.1–10 μM の γ セクレターゼ阻害剤とともに 8 日間培養した。Notch 阻害活性のある γ セクレターゼ阻害剤として、LY411575 (ChemScene、ニュージャージー州、米国) 及び semagacestat (MedChemExpress、ニュージャージー州、米国) を用い、Notch 阻害活性のない γ セクレターゼモジュレーターとして、tarenflurbil (MedChemExpress) を用いた。薬物とともに 8 日間培養した後、real-time RT-PCR により杯細胞のマーカである

る MUC2 や、吸収上皮細胞のマーカーである alkaline phosphatase, intestinal (ALPI) 及び SI の mRNA 発現量を第二章と同様の方法にて測定した。PCR プライマーは、Table 3 に示したものをを用いた。

Table 3. TaqMan Assays used in this study.

Gene name	Assay ID
18S	Hs03003631_g1
ALPI	Hs00357579_g1
MUC2	Hs03005103_g1
SI	Hs00356112_m1

3.2.4 統計解析

多重比較は、第二章と同様の方法にて Dunnett's test を用いて実施した。

3.3 実験結果

3.3.1 細胞障害性の抗悪性腫瘍薬による消化管毒性

最初に、細胞障害性の抗悪性腫瘍薬による消化管毒性を評価した。消化管毒性を誘発するとされる 5-FU と、そのプロドラッグである 5'-DFUR 及び capecitabine を hiSIECs に作用させた。その結果、EdU 陽性細胞の割合や TEER 値の有意な低下や、LDH 漏出量の増加が認められた (Fig. 7)。またこれらの指標によると、消化管毒性の強さの順は、5-FU、5'-DFUR、capecitabine であることが示された。

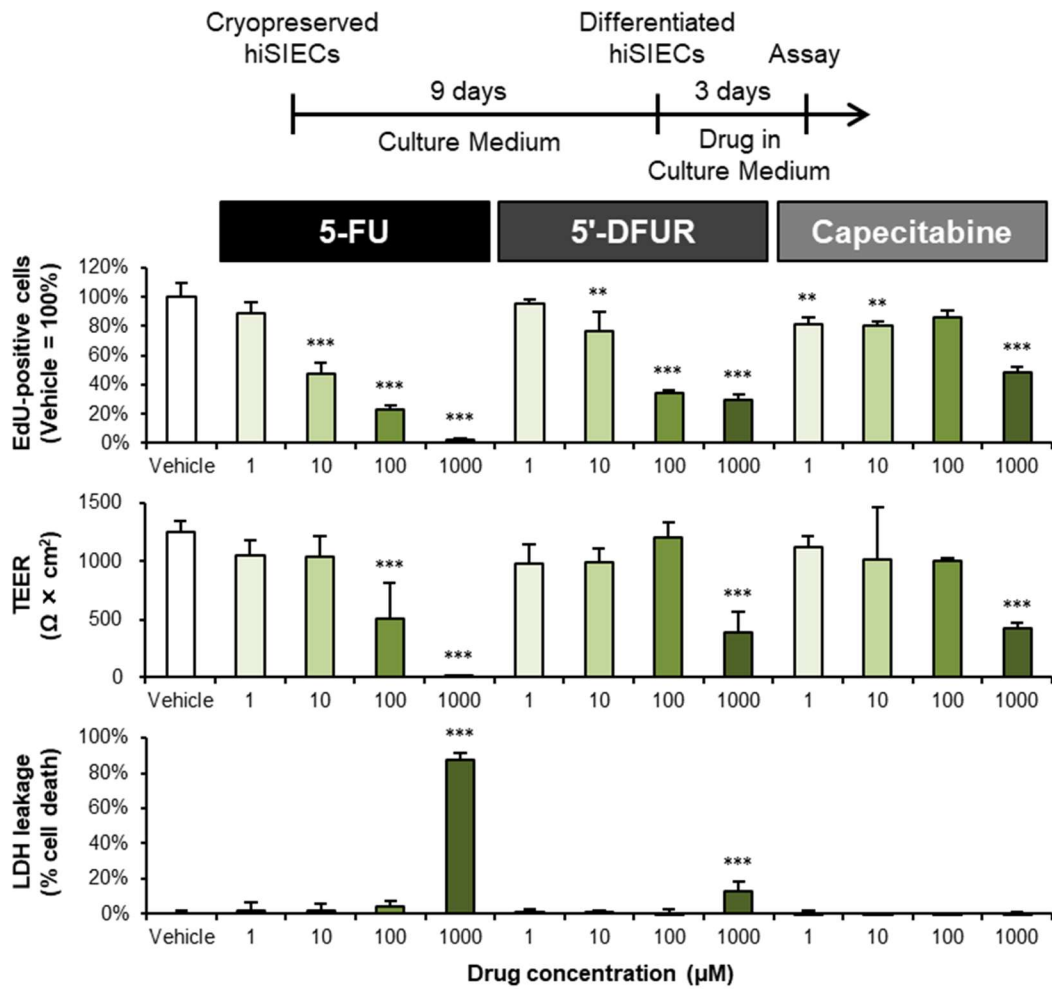


Figure 7. Intestinal toxicity due to cytotoxic anticancer drugs.

The cryopreserved hiSIECs were cultured for 9 days. Then, the differentiated cells were treated with 5-FU, 5'-DFUR, or capecitabine for 3 days. After drug treatment, the percentage of EdU-positive cells, LDH leakage, and TEER values of the hiSIECs were determined. Data were presented as means \pm S.D. ($n = 3$). Statistical significance levels compared with the vehicle group: ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

3.3.2 γ セクレターゼ阻害剤による消化管毒性

次に、消化管の分化バランスが乱されるような毒性について評価した。抗アルツハイマー薬として開発された γ セクレターゼ阻害剤は、Notch シグナルを阻害する。本剤が消化管に作用すると、杯細胞への異常分化を引き起こし、下痢等の症状が引き起こされることが知られている^{58,59)}。そこで、 γ セクレターゼ阻害剤である LY411575 と semagacestat、及び Notch シグナルを阻害しない γ セクレターゼモジュレーターである tarenflurbil を、hiSIECs の分化過程に作用させた。その結果、 γ セクレターゼ阻害剤は、杯細胞マーカー (MUC2) を有意に増加させ、吸収上皮細胞マーカー (ALPI 及び SI) を有意に減少させることが示された (Fig. 8)。一方、 γ セクレターゼモジュレーターは、同様の変動を誘発しないことが確認された。

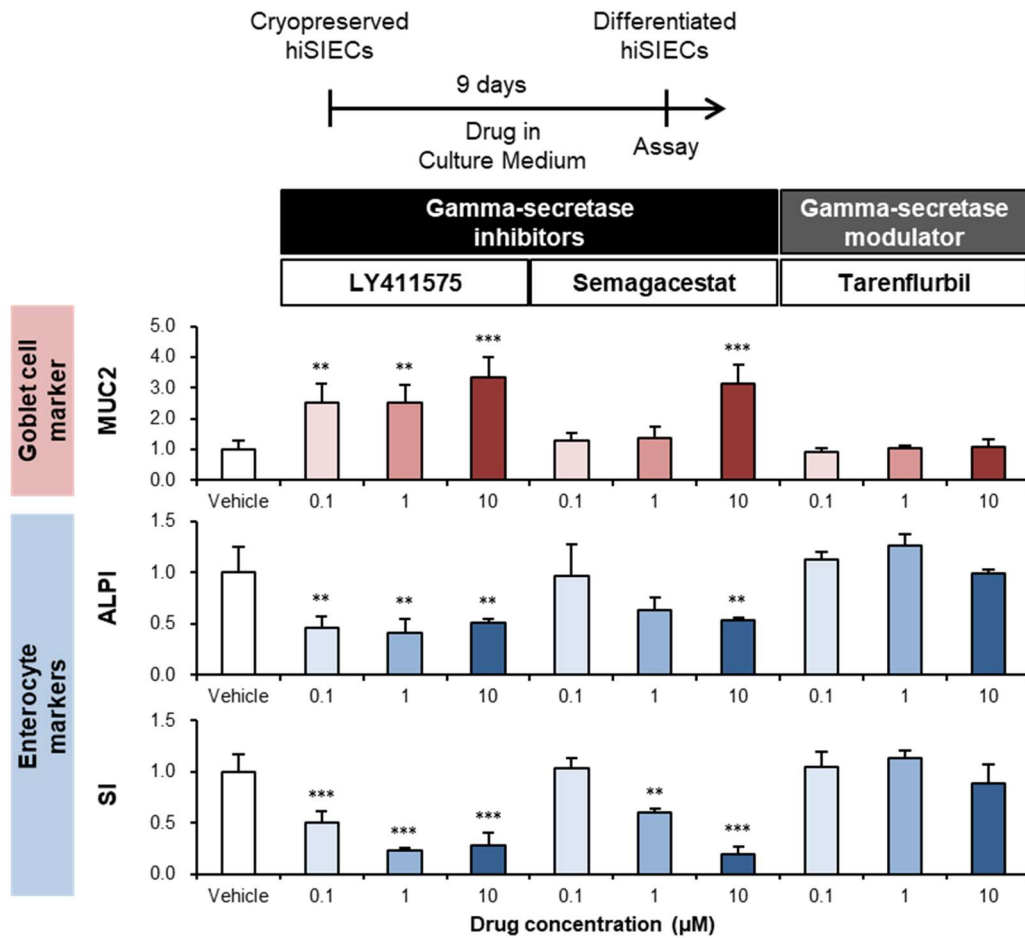


Figure 8. Intestinal toxicity caused by abnormal intestinal epithelial differentiation.

The cryopreserved hiSIECs were cultured with drugs during the differentiation process. Gamma-secretase inhibitors with Notch inhibitory activity (LY411575 and semagacestat) or gamma-secretase modulators without Notch inhibitory activity (tarenflurbil) were used. After drug treatment, the gene expression levels of goblet cell marker (MUC2) and enterocyte markers (ALPI and SI) were determined by real-time RT-PCR. The gene expression levels of the vehicle group were taken as 1.0. Data were presented as means \pm S.D. ($n = 3$). Statistical significance levels compared with the vehicle group: ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

3.4 考察

本章では、二種類の消化管毒性について、hiSIECs を用いて評価できるか検証した。最初に、細胞障害性の抗悪性腫瘍薬による消化管毒性は、hiSIECs における EdU 陽性細胞数の減少、バリア機能の低下、及び LDH 漏出量の増加を指標として評価された (Fig. 7)。これらの指標の中では、EdU 陽性細胞数が最も感度良く毒性を検出した。EdU 陽性細胞数という指標は、毒性の標的となる増殖細胞に特異的なものであったため、高感度で毒性を検出できたと考えられる。

5'-DFUR 及び capecitabine は 5-FU のプロドラッグである。capecitabine は 2 段階の代謝を介して 5'-DFUR に変換されるように設計されているため、誘発される消化管毒性は 5'-DFUR よりも少ない⁵⁶⁾。我々の試験においても、消化管毒性の強さを示す上記の指標は、5-FU、5'-DFUR、capecitabine の順に毒性が強いことが示され、hiSIECs においてもヒトで生じる消化管毒性と同様の序列で評価できることが示唆された。

抗悪性腫瘍薬による単純な細胞障害性を評価するためには、Caco-2 細胞等も利用できると考えられる。本研究と同様に 5-FU を作用させて細胞生存率等を評価している報告^{60,61)}もあるが、抗悪性腫瘍薬による毒性ではなく、薬効について議論されているものが多い。評価にがん化細胞株を用いる場合は、抗悪性腫瘍薬による変動が、薬効もしくは毒性のどちらを示しているものか理解しづらいという欠点が考えられる。また、第二章で示されたとおり、hiSIECs は Caco-2 細胞より腸管上皮細胞に近い薬物動態学的特性を有する。したがって、hiSIECs は、薬物代謝酵素によって活性化される抗悪性腫瘍薬 (プロドラッグ)⁶²⁾や、薬物代謝酵素によって解毒される抗悪性腫瘍薬⁶³⁾、もしくはトランスポーターによって細胞内に吸収、又は細胞外に排泄される抗悪性腫瘍薬^{64,65)}の毒性について、より正確に評価できる可能性がある。

さらに本章では、分化バランスの異常による消化管毒性として、 γ セクレターゼ阻害剤を例に評価した (Fig. 8)。第二章では、吸収上皮細胞に加えて、杯細胞、内分泌細胞、パネート細胞、M細胞、タフト細胞が、hiSIECsに含まれていることが示唆された (Fig.3)。これらの細胞種の分化には様々なシグナルが関わっており⁵⁷⁾、Notchシグナルを阻害すると、吸収上皮細胞への分化が抑制され、杯細胞への分化が促進される^{58,59)}。我々の試験においても、Notchシグナルの阻害活性を有する γ セクレターゼ阻害剤の添加により、吸収上皮細胞マーカーの発現レベルが有意に低下すると同時に、杯細胞マーカーの発現レベルが顕著に増加した。一方、Notchシグナルを阻害しない毒性回避型の γ セクレターゼモジュレーターでは同様の変化は観測されなかった。したがって、hiSIECsは消化管毒性の作用機序に基づいて、毒性回避のためのリード化合物の修飾及び評価に利用できることが考えられる。

本作用機序による毒性は、単純な細胞障害性の毒性とは異なり、Caco-2細胞のような単一な細胞株では捉えることができないと推測される。hiSIECsの特徴である、複数種の細胞の存在が示唆されていること、及び*in vitro*でそれらの分化過程を再現していることが、分化バランスの異常を*in vitro*で捉える上で重要な要素であると考えられる。

3.5 小括

本章では、hiSIECsを用いることで、細胞障害性の抗悪性腫瘍薬、又は γ セクレターゼ阻害剤による二種類の消化管毒性を評価できることが示された。したがって、hiSIECsが、様々な作用機序による消化管毒性の評価や、それらの作用機序を理解した上での医薬品候補化合物の選抜、並びに順位付けに利用できることが示唆された。

第四章 hiSIECs の免疫に関する特性

4.1 緒言

小腸は、外界から栄養を吸収するための広い表面積を有する器官であり、食物抗原や腸内常在菌、宿主への侵入を狙う病原体等と常に接触している⁶⁶⁾。これは免疫システムにとって重要な課題であり、腸管免疫系には人体で最も多くの免疫細胞が集まっている⁶⁷⁾。また、小腸には腸内細菌叢が存在しており、食品成分と腸内細菌が接触する場所であることから、食品成分、微生物—宿主間の関係が豊富な環境となっている⁶⁸⁾。以上より、小腸は機能性食品の標的としても注目されており⁵⁾、食品や腸内細菌がヒト腸管に及ぼす影響を解析し、その作用メカニズムを明らかにするためには、ヒト腸管の機能を再現した評価モデルが必要である。また近年、動物愛護の観点から動物実験代替法の開発が期待されており、特に食品や化粧品の研究開発におけるその期待は大きい。本章では、動物実験代替法の一つである hiSIECs について、免疫研究への応用展開を検討した。

最初に、hiSIECs の免疫応答性について注目した。自然免疫において重要な Toll 様受容体 (Toll-like receptors, TLRs)⁶⁹⁾ や、腸内細菌の代謝物である短鎖脂肪酸⁷⁰⁾ の受容体を介した反応を評価した。

次に、腸管における炎症反応に着目した。腸管の炎症は、様々な疾患と関連があることが知られている⁷¹⁾。hiSIECs に炎症性サイトカインを作用させることで炎症モデルを作製できるか検証した。また、作製した hiSIECs の炎症モデルにより、短鎖脂肪酸の抗炎症作用^{72,73)} について評価した。

そして、小腸は十二指腸、空腸、回腸の三つの部位から構成されており、抗原や細菌、ウイルスの取り込みに関わる M 細胞は、空腸、回腸に存在している。hiSIECs は、ヒト iPS 細胞から十二指腸、空腸、回腸のそれぞれを特異的に分化できているものではないのが現状であるが、第二章では M 細胞が hiSIECs に含

まれていることが示唆された。本章では、M 細胞の機能的な側面として、その取り込み活性について検証した。

4.2 実験方法

4.2.1 細胞の培養

hiSIECsは、第二章と同様の方法にて培養した。なお本章では、培養期間中に他の細胞と共培養させる試験を実施したが、その手法については4.2.5項に記載する。

4.2.2 Real-Time RT-PCR

第二章と同様の方法にて行った。PCR プライマーは、Table 4 に示したものを
用いた。

Table 4. TaqMan Assays used in this study.

Gene name	Assay ID	Gene name	Assay ID
18S	Hs03003631_g1	GPR43	Hs00271142_s1
CXCL8	Hs00174103_m1	TLR1	Hs00413978_m1
GPR109A	Hs02341584_s1	TLR2	Hs01014511_m1
GPR120	Hs00699184_m1	TLR3	Hs00152933_m1
GPR40	Hs03045166_s1	TLR4	Hs00152939_m1
GPR41	Hs02519193_g1	TLR5	Hs00152825_m1

4.2.3 Interleukin-8 産出量の評価

TLRs のリガンドに対する応答を評価するために、hiSIECs 又は Caco-2 細胞を、50 µg/mL の Pam3CysSerLys4 (Pam3CSK4; Tocris Bioscience、Bristol、英国) 又は 100 ng/mL の lipopolysaccharide (LPS; 富士フイルム和光純薬株式会社) を含む培地、もしくはそれらを含まない培地で 24 時間インキュベートした。その後、培養上清を回収し、市販の ELISA キット (R&D Systems、ミネソタ州、米国) を取扱説明書に従って使用し、interleukin-8 (IL-8) のタンパク質産生量を評価した。

4.2.4 短鎖脂肪酸による応答評価と炎症評価

短鎖脂肪酸による応答評価では、hiSIECs を 96 ウェルプレートで 9 日間培養した後、短鎖脂肪酸である 20 mM 酢酸ナトリウム、20 mM プロピオン酸ナトリウム、又は 5 mM 酪酸ナトリウム（いずれも富士フイルム和光純薬株式会社）を添加した。24、48、及び 96 時間後の hiSIECs から、第二章と同様の方法にて、RNA 抽出及び cDNA 合成を行った。mRNA 発現量を評価するために、TaqMan gene expression assays (Thermo Fisher Scientific) 又は SYBR Green PCR systems (ThermoFisher Scientific) を用いて real-Time RT-PCR を実施した。PCR プライマーは、Table 4 及び Table 5 に示したものをを用いた。

炎症評価では、hiSIECs をセルカルチャーインサートで 8 日間培養した後、炎症状態を誘導するために、100 ng/mL tumor necrosis factor alpha (TNF α ; PeproTech、ニュージャージー州、米国) や、50 ng/mL interferon gamma (IFN γ ; PeproTech) をセルカルチャーインサートの basal 側に添加した。同時に、短鎖脂肪酸をセルカルチャーインサートの apical 側に添加して、その抗炎症効果を評価した。炎症性サイトカイン及び短鎖脂肪酸を添加してから 24 時間後に、第二章と同様の方法にて TEER 値を測定した。

Table 5. Primer sequences used for real-time RT-PCR in SCFAs assay.

Gene name	Sence 5' → 3'	Antisence 5' → 3'
18S	GGCCCTGTAATTGGAATGAGTC	CCAAGATCCAACACTACGAGCTT
CCL2	GGAACCGAGAGGCTGAGACTA	CTTTCATGCTGGAGGCGAGA
CCL20	ACTGGGTACTCAACACTGAGC	CAAAGCAGCCAGGAGCAAAC
CCL25	TCATTTCTGGGCTCCATCGG	GACCCAAAAGACAGAGGCGT
CCL28	TGCACGGAGGTTTCACATCA	AGGATGACAGCAGCCAAGTC
CXCL1	CTGGCTTAGAACAAAGGGGCT	TAAAGGTAGCCCTTGTTTCCCC
CXCL10	CACACTAGCCCCACGTTTTCT	TGGTGCTGAGACTGGAGGTT
CXCL11	TGGAAGCAGGAAAGGTGCAT	TGGAAGGAGTAGAAATGCTGAACA
IL15	AGGATTTACCGTGGCTTTGAGT	CTGCACTGAAACAGCCCAA
IL33	GACTCCTCCGAACACAGAGC	AGGCTTCATTTTTTCAGTATTCTTGT
IL6	TCAATATTAGAGTCTCAACCCCA	TTCTCTTTCGTTCCCGGTGG
IL7	TCGTCCGCTTCCAATAACCC	TCCGAATCACCGCAGGAAAA
TGFB1	CGCGTGCTAATGGTGGAAC	GTTTCAGGTACCGCTTCTCGG
TNF	CCCATGTTGTAGCAAACCCTC	TATCTCTCAGCTCCACGCCA

4.2.5 M 細胞モデルを用いた取り込み評価

hiSIECs をセルカルチャーインサート (孔径 3 μm 、Merck Millipore) に播種し、取扱説明書に従って培養した。B リンパ球由来の細胞株である Raji 細胞 (ATCC、#CCL-86) を、取り扱い説明書に従って前培養した。hiSIECs の播種から 5 日目に、hiSIECs が培養されたセルカルチャーインサートの basal 側チャンバーに、Raji 細胞を 5×10^5 cells/well 添加した。5 日間の共培養の後、Raji 細胞を除去し、取り込み活性を評価した。培地を 25 mM HEPES (Thermo Fisher Scientific) を含む HBSS (pH 7.4、Thermo Fisher Scientific) に置換し、4°C 又は 37°C で 1 時間プレインキュベートした。並行して、蛍光粒子である Fluosphere Carboxylate-Modified Microspheres (Thermo Fisher Scientific、#F8811、0.2 μm) を、25 mM HEPES を含む HBSS に 4.5×10^9 particles/mL の濃度となるように混合した。アッセイの直前に、第二章と同様の方法にて TEER 値を測定し、apical 側の HBSS バッファ

一を蛍光粒子含有の HBSS バッファーに置換し、4°C 又は 37°C で 2 時間インキュベートした。透過した蛍光粒子の数を、Attune NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて評価した。

4.2.6 統計解析

多重比較は、第二章と同様の方法にて Dunnett's test を用いて実施した。

4.3 実験結果

4.3.1 TLRs を介した免疫応答

最初に、自然免疫で重要な役割を担っている TLRs⁶⁹⁾に着目して、hiSIECs や Caco-2 細胞の mRNA 発現量を評価した。その結果、hiSIECs は、腸管上皮細胞が有する主要な TLRs について mRNA 発現を示した (Fig. 9A)。さらに、TLR2/1 及び TLR4 のリガンドである Pam3CSK4 と LPS をそれぞれ hiSIECs に作用させると、IL-8 産出量の有意な上昇が見られた (Fig. 9B)。一方、TLR4 の発現が低い Caco-2 細胞では、LPS に対する応答が見られなかった。

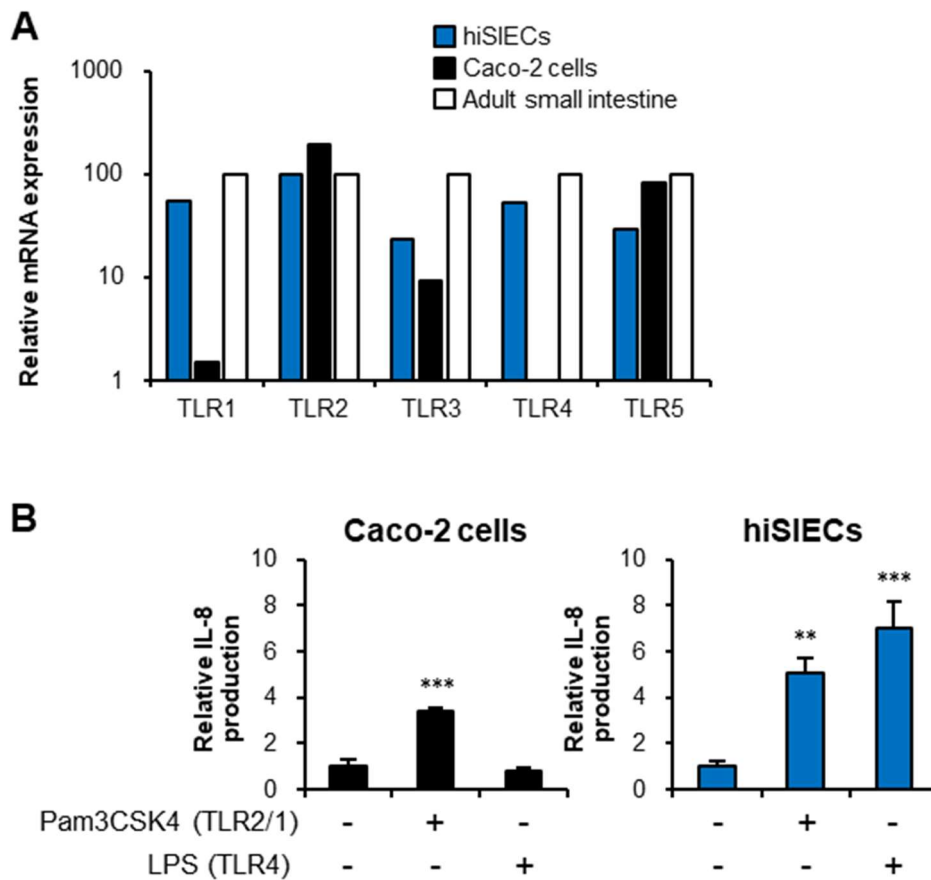


Figure 9. Immune responses of hiSIECs for TLRs ligands.

(A) The gene expression levels of the toll-like receptors were determined by real-time RT-PCR. The mRNA levels in the adult small intestine were arbitrarily defined as 100.

(B) IL-8 production levels of Caco-2 cells or hiSIECs after treatment with medium alone, Pam3CSK4 (TLR2/1 ligand), and LPS (TLR4 ligand), respectively. The gene expression levels of the vehicle group were taken as 1 (Caco-2 cells and hiSIECs, respectively). Data were presented as means \pm S.D. ($n = 3$). Statistical significance levels compared with the vehicle group: ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

4.3.2 短鎖脂肪酸による免疫応答と炎症モデル

次に、脂肪酸について、hiSIECs や Caco-2 細胞の mRNA 発現量を評価した。その結果、hiSIECs は、短鎖脂肪酸受容体である G protein-coupled receptors 41 (GPR41) /free fatty acid receptor 3 (FFAR3)、GPR43/FFAR2、GPR109A/hydroxycarboxylic acid receptor 2 (HCAR2)、及び長鎖脂肪酸受容体である GPR40/FFAR1、GPR120/FFAR4 について mRNA 発現を示した (Fig. 10A)。さらに、短鎖脂肪酸である acetate、propionate、butyrate をそれぞれ hiSIECs に作用させると、炎症に関わるサイトカインの遺伝子発現量について変動が見られた (Fig. 10B)。ヒト腸管や Caco-2 細胞などの株化細胞においては、短鎖脂肪酸によって TNF α 、IL-6、IL-8 の発現量が低下し⁷⁴⁻⁷⁶⁾、反対に抗炎症性サイトカインである TGF β 1 の発現量は上昇することが報告されているが⁷⁷⁾、hiSIECs においても同様の挙動が見られた。

さらに、培地中に TNF α と IFN γ を添加することにより、hiSIECs の炎症状態を誘導した。炎症状態の hiSIECs では、バリア機能が低下した (Fig. 11)。一方、同時に抗炎症作用のある短鎖脂肪酸を添加すると、バリア機能が維持された。

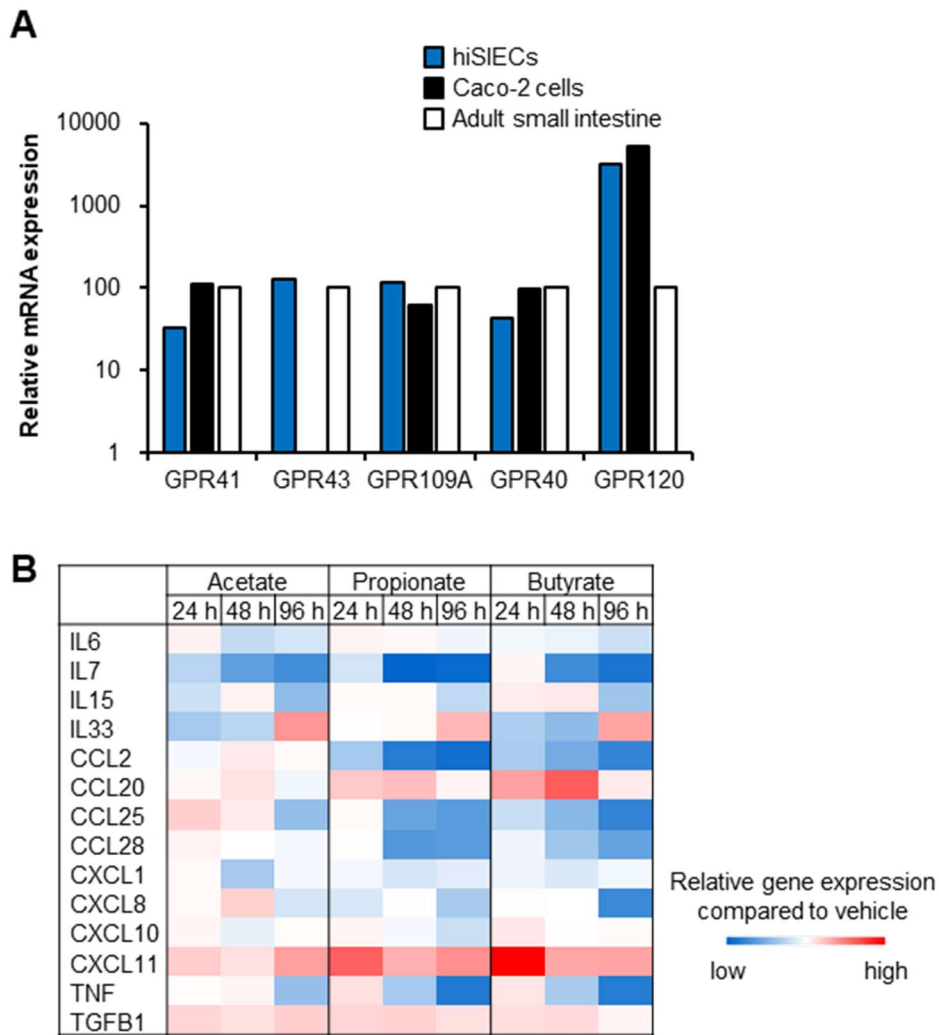


Figure 10. Immune responses of hiSIECs for fatty acids.

(A) The gene expression levels of short-chain and long-chain fatty acid receptors were determined by real-time RT-PCR. The mRNA levels in the adult small intestine were arbitrarily defined as 100. (B) Cytokine gene expression levels in hiSIECs after treatment with acetate, propionate, and butyrate, respectively.

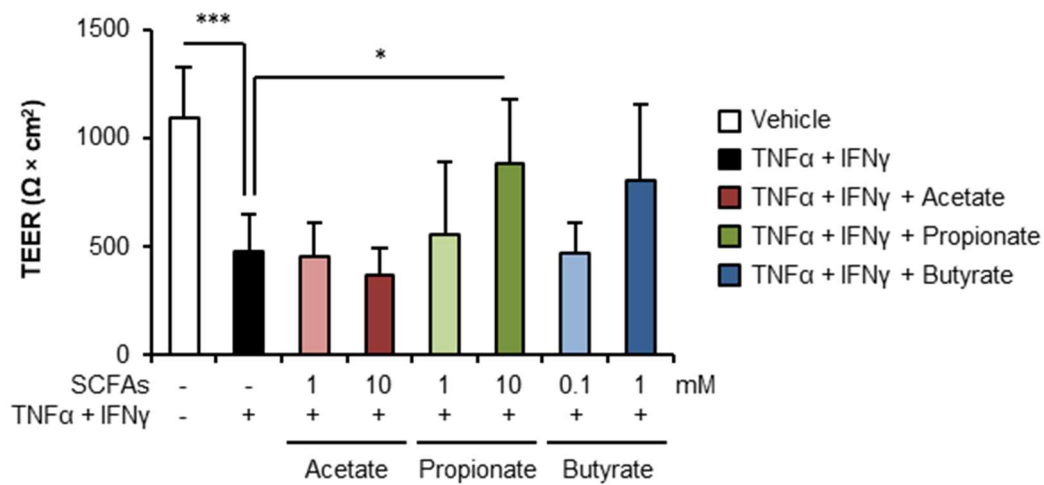


Figure 11. Inflammatory assay using hiSIECs.

TEER values of the hiSIEC monolayer incubated with medium alone, TNF α + IFN γ , and TNF α + IFN γ + SCFAs, respectively. Data were presented as means \pm S.D. ($n = 6$). Statistical significance levels compared with the TNF α + IFN γ group: * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

4.3.3 M 細胞による取り込み評価モデル

M 細胞による、抗原や細菌、ウイルスの取り込みは、腸管免疫系における重要な機能であり、食物に対する耐性や粘膜免疫応答と密接に関連している^{78,79)}。第二章にて論じたとおり、hiSIECs には M 細胞が存在することを前提として、その M 細胞の機能を検証した。Caco-2 細胞は、B リンパ球由来の細胞株である Raji 細胞と共培養することで、M 細胞モデルを構築できることが報告されている⁸⁰⁻⁸²⁾。これらの報告を参考に、hiSIECs についても Raji 細胞との共培養を試みた。その結果、hiSIECs と Raji 細胞の共培養により、通常は腸管バリアを通過しない大きなサイズである 0.2 μm の蛍光粒子について、輸送が認められた (Fig. 12 A)。またこの輸送は、hiSIECs 単独や、もしくは 4°C 条件下では認められなかった。また、共培養によって TEER 値はやや低下するものの、腸管吸収を評価するには十分なバリア機能が維持されていることが確認された (Fig. 12B)。

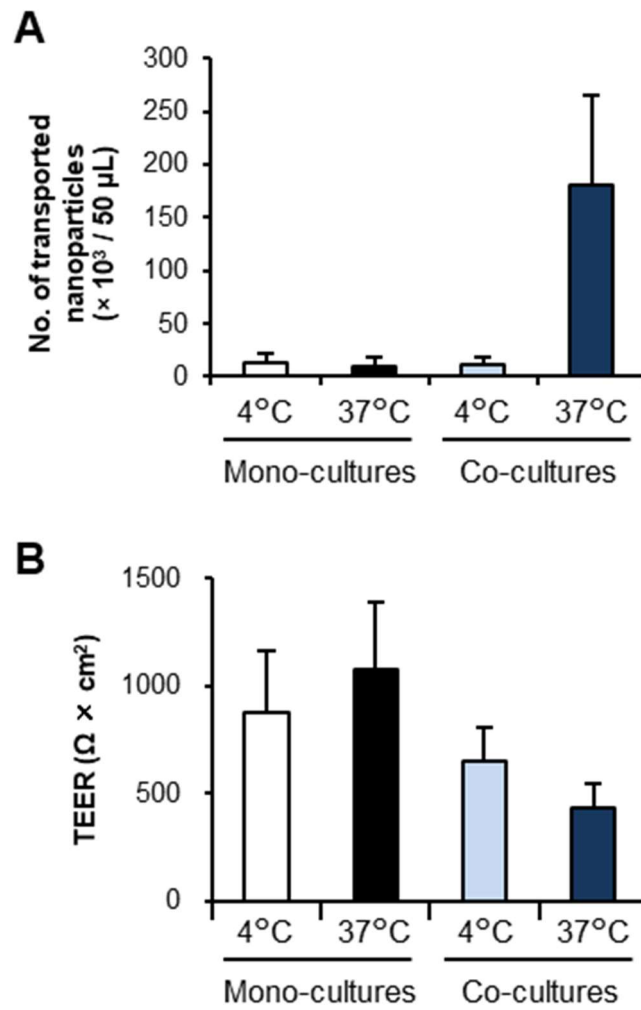


Figure 12. Particle uptake activity and barrier function of M-cell model using hiSIECs cocultured with Raji cells.

(A) The temperature-dependent transport of nanoparticles via the hiSIEC monolayer or that cocultured with Raji cells. Data were presented as means \pm S.D. ($n = 4$). (B) TEER values of the hiSIEC monolayer or that cocultured with Raji cells immediately before the transport assay. Data were presented as means \pm S.D. ($n = 4$).

4.4 考察

本章では、hiSIECsの免疫に関する特性として、免疫応答や炎症反応、異物の取り込み活性を評価した。最初に、hiSIECsはTLRsや短鎖脂肪酸受容体を介した自然免疫応答を示した (Fig. 9 and 10)。一方、本研究にて比較対象として用いたCaco-2細胞は、グラム陰性菌の細胞壁成分であるLPS等を認識するTLR4⁸³⁾や、腸内細菌代謝物である酢酸やプロピオン酸を認識するGPR43⁸⁴⁾について、ほとんど発現が認められなかった。したがって、hiSIECsはCaco-2細胞では検出できない応答を評価することができ、TLRsを標的とする天然由来成分や機能性食品の研究、並びにプロバイオティクス又はプレバイオティクス開発を目指した短鎖脂肪酸を産生する腸内細菌の研究に活用できる可能性がある。

腸管の炎症は、様々な疾患と関連があることが知られている⁷¹⁾。本研究では、TNF α 及びIFN γ を用いて炎症モデルを作製し、短鎖脂肪酸による抗炎症作用^{72,73)}を確認した (Fig. 11)。この炎症モデルを利用することで、腸管の炎症状態を抑制する物質の探索が可能になると考えられる。また、腸管上皮細胞としてCaco-2細胞を用いて、様々な免疫細胞と共培養することで、腸管免疫系を評価するモデルが報告されている⁸⁵⁾。同様に、hiSIECsを免疫細胞と共培養することで、より複雑な免疫システムを再現した共培養評価モデルを開発できると期待される。

また、hiSIECsはRaji細胞と共培養することで蛍光粒子の輸送を示し、hiSIECsに含まれるM細胞が取り込み活性を有することが示唆された (Fig. 12)。Caco-2細胞をRaji細胞と共培養することでM細胞モデルを構築できることが報告されているが⁸⁰⁻⁸²⁾、hiSIECsを用いたM細胞モデルには構築時間が短い(約10日間)という利点がある。

hiSIECs単体においても、M細胞マーカーであるGP2陽性細胞が存在した一方で、蛍光粒子の輸送は見られなかった。これは、M細胞マーカー陽性細胞の

存在と、トランスサイトosis機能の発達には差異があり、Raji 細胞から供給される何らかの生化学的因子が、この差異を埋めているものと推測される。Raji 細胞による M 細胞モデル構築に寄与する生化学的因子については、IL-6、RANKL、TNF α の関与が示唆されているものの^{86,87)}、現在のところは不明である⁸²⁾。今後、hiSIECs 単体と、Raji 細胞と共培養した hiSIECs を比較して、どのような差異があるのか、RT-PCR や免疫染色などで解析をしていくことが必要である。その結果として、トランスサイトosis機能を発達させるために必要な生化学的因子が特定された場合、Raji 細胞との共培養を必要とせずとも、その生化学的因子の添加のみによって、M 細胞モデルを構築できる可能性がある。

また近年、M 細胞の取り込み機能は、腸内細菌や抗原の取り込みに関する免疫研究だけではなく、マイクロプラスチックの取り込みに関する毒性研究⁸⁸⁾や、経口ワクチンのドラッグデリバリーシステムに関する研究⁸⁹⁾においても注目を集めており、本モデルの応用展開が期待される。さらに M 細胞評価モデルについての理解を深めるためには、本研究で用いた蛍光粒子だけではなく、抗原や腸内細菌の取り込みを評価することが必要である。

4.5 小括

本章では、hiSIECs が TLRs や短鎖脂肪酸受容体を介して免疫応答を示すことや、炎症状態を誘導した上で抗炎症作用を持つ物質を評価できることが示された。また、Raji 細胞との共培養により蛍光粒子の輸送が見られたことから、M 細胞による取り込みを評価できる可能性が示唆された。複雑な腸管免疫系のある側面については、hiSIECs を用いて評価することができ、機能性食品や腸内細菌の研究に応用できることが示唆された。

第五章 総括

本研究で以下のことが明らかとなった。

1. hiSIECs が腸管上皮細胞の特性として、腸管上皮細胞マーカーの発現やバリア機能を有していることが明らかとなった。加えて、薬物代謝酵素やトランスポーターの活性、誘導剤による酵素誘導が安定して認められ、腸管における薬物動態を予測するためのツールとして有望であることが示唆された。
2. hiSIECs を用いて、細胞障害性の抗悪性腫瘍薬、又は γ セクレターゼ阻害剤による二種類の消化管毒性を評価できることが明らかとなった。したがって、hiSIECs が、様々な作用機序による消化管毒性の評価や、それらの作用機序を理解した上での医薬品候補化合物の選抜、並びに順位付けに利用できることが示唆された。
3. hiSIECs が TLRs や短鎖脂肪酸受容体を介して免疫応答を示すことや、炎症状態を誘導した上で抗炎症作用を持つ物質を評価できることが明らかとなった。また、Raji 細胞との共培養により蛍光粒子の輸送が見られたことから、M 細胞による取り込みを評価できる可能性が示唆された。

本研究により、hiSIECs が薬物動態、毒性及び免疫研究に応用できることが示された。hiSIECs は小腸における現象の再現や評価を可能にする新しいツールである。今後は、薬物動態、毒性、免疫を専門とする研究者によって、hiSIECs の可能性や限界をより明確にしていく必要があり、本研究がそのきっかけとなることを望む。さらに、hiSIECs がより多くの研究者に使用されることに伴って、標準化やガイドライン化が進むことにも期待する。また、将来的には食品や化粧品の開発だけでなく、医薬品の開発においても動物実験の削減や代替が求められる中で、hiSIECs への期待はますます高まると考えられる。hiSIECs が動物実

験代替法として活用されることにも期待したい。ヒト腸管上皮細胞の特徴を備えている hiSIECs は、腸管に関わる医薬品、機能性食品、サプリメント、腸内細菌などの研究に多大なる影響を与え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頂き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、岩尾岳洋 准教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の審査にあたり、主査を務めていただきました名古屋市立大学大学院薬学研究科遺伝情報学分野 星野真一 教授、副査を務めていただきました名古屋市立大学大学院薬学研究科衛生化学分野 肥田重明 教授、名古屋市立大学大学院薬学研究科薬物送達学分野 尾関哲也 教授に深謝いたします。

本研究の推進にあたり、多大なるご支援を賜りました富士フィルム株式会社の上司や、研究を共に遂行した同僚のみなさまに、心より感謝を申し上げます。

最後に、常に私を支えてくれた家族に感謝します。

引用文献

- 1) Peters S. A., Jones C. R., Ungell A.-L., Hatley O. J. D., *Clin. Pharmacokinet.*, **55**, 673–696 (2016).
- 2) Alqahtani S., Mohamed L. A., Kaddoumi A., *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **9**, 1241–1254 (2013).
- 3) Shimizu M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 232–241 (2010).
- 4) Gelberg H., *Compr. Toxicol.*, 139-178 (2018).
- 5) Salminen S., Bouley C., Boutron-Ruault M. C., Cummings J. H., Franck A., Gibson G. R., Isolauri E., Moreau M. C., Roberfroid M., Rowland I., *Br. J. Nutr.*, **80(S1)**, S147-171 (1998).
- 6) Li H., Wang X., Wang Y., Zhang M., Hong F., Wang H., Cui A., Zhao J., Ji W., Chen Y.-G., *Cell Regen.*, **11**, 19 (2022).
- 7) Musther H., Olivares-Morales A., Hatley O. J. D., Liu B., Rostami Hodjegan A., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **57**, 280–291 (2014).
- 8) Sambuy Y., De Angelis I., Ranaldi G., Scarino M. L., Stammati A., Zucco F., *Cell Biol. Toxicol.*, **21**, 1–26 (2005).
- 9) Hidalgo I. J., Raub T. J., Borchardt R. T., *Gastroenterology*, **96**, 736–749 (1989).
- 10) Yee S., *Pharm. Res.*, **14**, 763–766 (1997).

- 11) Sun D., Lennernas H., Welage L. S., Barnett J. L., Landowski C. P., Foster D., Fleisher D., Lee K.-D., Amidon G. L., *Pharm. Res.*, **19**, 1400–1416 (2002).
- 12) Sun H., Chow E. C., Liu S., Du Y., Pang K. S., *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **4**, 395–411 (2008).
- 13) Shimizu M., *J. Tradit. Complement. Med.*, **2**, 81–83 (2012).
- 14) Lennernäs H., Palm K., Fagerholm U., Artursson P., *Int. J. Pharm.*, **127**, 103–107 (1996).
- 15) Nakamura T., Sakaeda T., Ohmoto N., Tamura T., Aoyama N., Shirakawa T., Kamigaki T., Nakamura T., Kim K. I., Kim S. R., Kuroda Y., Matsuo M., Kasuga M., Okumura K., *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 4–6 (2002).
- 16) Maubon N., Le Vee M., Fossati L., Audry M., Le Ferrec E., Bolze S., Fardel O., *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **21**, 659–663 (2007).
- 17) Hayashi R., Hilgendorf C., Artursson P., Augustijns P., Brodin B., Dehertogh P., Fisher K., Fossati L., Hovenkamp E., Korjamo T., Masungi C., Maubon N., Mols R., Müllertz A., Mönkkönen J., O’Driscoll C., Oppers-Tiemissen H. M., Ragnarsson E. G. E., Rooseboom M., Ungell A.-L., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **35**, 383–396 (2008).
- 18) Bentz J., O’Connor M. P., Bednarczyk D., Coleman J., Lee C., Palm J., Pak Y.

- A., Perloff E. S., Reyner E., Balimane P., Brännström M., Chu X., Funk C., Guo A., Hanna I., Herédi-Szabó K., Hillgren K., Li L., Hollnack-Pusch E., Jamei M., Lin X., Mason A. K., Neuhoff S., Patel A., Podila L., Plise E., Rajaraman G., Salphati L., Sands E., Taub M. E., Taur J.-S., Weitz D., Wortelboer H. M., Xia C. Q., Xiao G., Yabut J., Yamagata T., Zhang L., Ellens H., *Drug Metab. Dispos.*, **41**, 1347–1366 (2013).
- 19) Ho M.-C. D., Ring N., Amaral K., Doshi U., Li A. P., *Drug Metab. Dispos.*, **45**, 686–691 (2017).
- 20) Michiba K., Maeda K., Kurimori K., Enomoto T., Shimomura O., Takeuchi T., Nishiyama H., Oda T., Kusuhara H., *Drug Metab. Dispos.*, **49**, 84–93 (2021).
- 21) Li M., de Graaf I. A. M., Groothuis G. M. M., *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **12**, 175–190 (2016).
- 22) Sato T., Stange D. E., Ferrante M., Vries R. G. J., Van Es J. H., Van den Brink S., Van Houdt W. J., Pronk A., Van Gorp J., Siersema P. D., Clevers H., *Gastroenterology*, **141**, 1762–1772 (2011).
- 23) Sato T., Clevers H., *Science*, **340**, 1190–1194 (2013).
- 24) Ogaki S., Shiraki N., Kume K., Kume S., *Stem Cells*, **31**, 1086–1096 (2013).
- 25) Iwao T., Toyota M., Miyagawa Y., Okita H., Kiyokawa N., Akutsu H., Umezawa

- A., Nagata K., Matsunaga T., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **29**, 44–51 (2014).
- 26) Iwao T., Kodama N., Kondo Y., Kabeya T., Nakamura K., Horikawa T., Niwa T., Kurose K., Matsunaga T., *Drug Metab. Dispos.*, **43**, 603–610 (2015).
- 27) Ogaki S., Morooka M., Otera K., Kume S., *Sci. Rep.*, **5**, 17297 (2015).
- 28) Ozawa T., Takayama K., Okamoto R., Negoro R., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Mizuguchi H., *Sci. Rep.*, **5**, 16479 (2015).
- 29) Negoro R., Takayama K., Kawai K., Harada K., Sakurai F., Hirata K., Mizuguchi H., *Stem cell reports*, **11**, 1539–1550 (2018).
- 30) Kabeya T., Mima S., Imakura Y., Miyashita T., Ogura I., Yamada T., Yasujima T., Yuasa H., Iwao T., Matsunaga T., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **35**, 374–382 (2020).
- 31) Yoshida S., Honjo T., Iino K., Ishibe R., Leo S., Shimada T., Watanabe T., Ishikawa M., Maeda K., Kusuhara H., Shiraki N., Kume S., *Stem cell reports*, **16**, 295–308 (2021).
- 32) Hornberg J. J., Laursen M., Brenden N., Persson M., Thougard A. V, Toft D. B., Mow T., *Drug Discov. Today*, **19**, 1131–1136 (2014).
- 33) Cook D., Brown D., Alexander R., March R., Morgan P., Satterthwaite G., Pangalos M. N., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **13**, 419–431 (2014).

- 34) Paine M. F., Hart H. L., Ludington S. S., Haining R. L., Rettie A. E., Zeldin D. C., *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 880–886 (2006).
- 35) Lepage D., Bélanger É., Jones C., Tremblay S., Allaire J. M., Bruneau J., Asselin C., Perreault N., Menendez A., Gendron F.-P., Boudreau F., *Sci. Rep.*, **6**, 36776 (2016).
- 36) Walker E. M., Thompson C. A., Kohlnhofer B. M., Faber M. L., Battle M. A., *BMC Res. Notes*, **7**, 902 (2014).
- 37) Derikx J. P. M., Blijlevens N. M. A., Donnelly J. P., Fujii H., Kanda T., van Bijnen A. A., Heineman E., Buurman W. A., *Ann. Oncol.*, **20**, 337–342 (2009).
- 38) Reisinger K. W., Elst M., Derikx J. P. M., Nikkels P. G. J., de Vries B., Adriaanse M. P. M., Jellema R. K., Kramer B. W. W., Wolfs T. G. A. M., *Pediatr. Res.*, **76**, 261–268 (2014).
- 39) Takenaka T., Harada N., Kuze J., Chiba M., Iwao T., Matsunaga T., *J. Pharm. Sci.*, **105**, 915–924 (2016).
- 40) Srinivasan B., Kolli A. R., Esch M. B., Abaci H. E., Shuler M. L., Hickman J. J., *J. Lab. Autom.*, **20**, 107–126 (2015).
- 41) Yamada S., Noda T., Okabe K., Yanagida S., Nishida M., Kanda Y., *J. Pharmacol. Sci.*, **149**, 139–146 (2022).

- 42) Kitaguchi T., Mizota T., Ito M., Ohno K., Kobayashi K., Ogawa I., Qiu S., Iwao T., Hanioka N., Tanaka M., Matsunaga T., *Drug Metab. Dispos.*, **50**, 17–23 (2022).
- 43) Cronin J. M., Yu A.-M., *Drug Metab. Dispos.*, **51**, 685–699 (2023).
- 44) Kadono K., Akabane T., Tabata K., Gato K., Terashita S., Teramura T., *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 1230–1237 (2010).
- 45) Tang F., Horie K., Borchardt R. T., *Pharm. Res.*, **19**, 773–779 (2002).
- 46) Wang Z., Pal D., Patel A., Kwatra D., Mitra A. K., *Int. J. Pharm.*, **441**, 40–49 (2013).
- 47) Agustina R., Masuo Y., Kido Y., Shinoda K., Ishimoto T., Kato Y., *Drug Metab. Dispos.*, **49**, 972–984 (2021).
- 48) Kabeya T., Matsumura W., Iwao T., Hosokawa M., Matsunaga T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **486**, 143–148 (2017).
- 49) Shirai K., Qiu S., Minowa H., Hashita T., Iwao T., Matsunaga T., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 100994 (2023).
- 50) Schmiedlin-Ren P., Thummel K. E., Fisher J. M., Paine M. F., Watkins P. B., *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 1446–1453 (2001).
- 51) Dutta M., Lim J. J., Cui J. Y., *Drug Metab. Dispos.*, **50**, 478–491 (2022).

- 52) Jones S. A., Moore L. B., Shenk J. L., Wisely G. B., Hamilton G. A., McKee D. D., Tomkinson N. C., LeCluyse E. L., Lambert M. H., Willson T. M., Kliewer S. A., Moore J. T., *Mol. Endocrinol.*, **14**, 27–39 (2000).
- 53) LeCluyse E. L., *Chem. Biol. Interact.*, **134**, 283–289 (2001).
- 54) Federer C., Yoo M., Tan A. C., *Assay Drug Dev. Technol.*, **14**, 557–566 (2016).
- 55) Kornblau S., Benson A. B., Catalano R., Champlin R. E., Engelking C., Field M., Ippoliti C., Lazarus H. M., Mitchell E., Rubin J., Stiff P. J., Vokes E., Wadler S., *J. Pain Symptom Manage.*, **19**, 118–129 (2000).
- 56) Inomata A., Horii I., Suzuki K., *J. Toxicol. Pathol.*, **11**, 177 (1998).
- 57) Gehart H., Clevers H., *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **16**, 19–34 (2019).
- 58) Wong G. T., Manfra D., Poulet F. M., Zhang Q., Josien H., Bara T., Engstrom L., Pinzon-Ortiz M., Fine J. S., Lee H.-J. J., Zhang L., Higgins G. A., Parker E. M., *J. Biol. Chem.*, **279**, 12876–12882 (2004).
- 59) Collins M., Michot J.-M., Bellanger C., Mussini C., Benhadji K., Massard C., Carbonnel F., *EXCLI J.*, **20**, 819–827 (2021).
- 60) Hoffmann O. I., Ilmberger C., Magosch S., Joka M., Jauch K.-W., Mayer B., *J. Biotechnol.*, **205**, 14–23 (2015).
- 61) Thant A. A., Wu Y., Lee J., Mishra D. K., Garcia H., Koeffler H. P., Vadgama J.

- V, *Anticancer Res.*, **28**, 3579–3592 (2008).
- 62) Singh Y., Palombo M., Sinko P. J., *Curr. Med. Chem.*, **15**, 1802–1826 (2008).
- 63) Wang F., Zhang X., Wang Y., Chen Y., Lu H., Meng X., Ye X., Chen W., *Drug Metab. Dispos.*, **51**, 543–559 (2023).
- 64) Puris E., Fricker G., Gynther M., *Pharmaceutics*, **15**, (2023).
- 65) Xiao H., Zheng Y., Ma L., Tian L., Sun Q., *Front. Pharmacol.*, **12**, 648407 (2021).
- 66) Santaolalla R., Fukata M., Abreu M. T., *Curr. Opin. Gastroenterol.*, **27**, 125–131 (2011).
- 67) Agace W. W., McCoy K. D., *Immunity*, **46**, 532–548 (2017).
- 68) Agace W. W., McCoy K. D., Santaolalla R., Fukata M., Abreu M. T., Kastl A. J. J., Terry N. A., Wu G. D., Albenberg L. G., *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, **46**, 125–131 (2011).
- 69) Lavelle E. C., Murphy C., O’Neill L. A. J., Creagh E. M., *Mucosal Immunol.*, **3**, 17–28 (2010).
- 70) Dalile B., Van Oudenhove L., Vervliet B., Verbeke K., *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **16**, 461–478 (2019).
- 71) Garrett W. S., Gordon J. I., Glimcher L. H., *Cell*, **140**, 859–870 (2010).

- 72) Carretta M. D., Quiroga J., López R., Hidalgo M. A., Burgos R. A., *Front. Physiol.*, **12**, 662739 (2021).
- 73) Maslowski K. M., Vieira A. T., Ng A., Kranich J., Sierro F., Yu D., Schilter H. C., Rolph M. S., Mackay F., Artis D., Xavier R. J., Teixeira M. M., Mackay C. R., *Nature*, **461**, 1282–1286 (2009).
- 74) Segain J. P., Raingeard de la Blétière D., Bourreille A., Leray V., Gervois N., Rosales C., Ferrier L., Bonnet C., Blottière H. M., Galmiche J. P., *Gut*, **47**, 397–403 (2000).
- 75) Saleri R., Borghetti P., Ravanetti F., Cavalli V., Ferrari L., De Angelis E., Andrani M., Martelli P., *Porc. Heal. Manag.*, **8**, 21 (2022).
- 76) Hung T. Van, Suzuki T., *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 108–117 (2018).
- 77) Martin-Gallausiaux C., Larraufie P., Jarry A., Béguet-Crespel F., Marinelli L., Ledue F., Reimann F., Blottière H. M., Lapaque N., *Front. Immunol.*, **9**, 2838 (2018).
- 78) Dillon A., Lo D. D., *Front. Immunol.*, **10**, 1499 (2019).
- 79) Kobayashi N., Takahashi D., Takano S., Kimura S., Hase K., *Front. Immunol.*, **10**, 2345 (2019).
- 80) Kernéis S., Bogdanova A., Kraehenbuhl J. P., Pringault E., *Science*, **277**, 949–

- 952 (1997).
- 81) Gullberg E., Leonard M., Karlsson J., Hopkins A. M., Brayden D., Baird A. W., Artursson P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **279**, 808–813 (2000).
- 82) Beloqui A., Brayden D. J., Artursson P., Pr eat V., des Rieux A., *Nat. Protoc.*, **12**, 1387–1399 (2017).
- 83) Kim H.-J., Kim H., Lee J.-H., Hwangbo C., *Immun. Ageing*, **20**, 67 (2023).
- 84) Yang G., Chen S., Deng B., Tan C., Deng J., Zhu G., Yin Y., Ren W., *Front. Immunol.*, **9**, 1434 (2018).
- 85) Kleiveland C. R., “The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models,” Chap. 18, ed. by Verhoeckx, K., Cotter, P., L opez-Exp osito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H., Cham (CH): Springer, 2015, pp.197–205.
- 86) Miyake M., Ragnarsson E., Nakai D., Artursson P., *J. Pharm. Sci.*, **105**, 2099–2104 (2016).
- 87) Wood M. B., Rios D., Williams I. R., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **311**, C498–507 (2016).
- 88) Visalli G., Facciol a A., Pruiti Ciarello M., De Marco G., Maisano M., Di Pietro A., *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **18**, 5833 (2021).

- 89) Brayden D. J., Jepson M. A., Baird A. W., *Drug Discov. Today*, **10**, 1145–1157
(2005).