



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士(薬学)
報告番号	甲第2033号
学位記番号	第416号
氏名	白井 晃太郎
授与年月日	令和6年3月22日
学位論文の題名	ヒト人工多能性幹細胞由来小腸上皮細胞の新規分化誘導法の開発
論文審査担当者	主査： 湯浅 博昭 副査： 松永 民秀, 頭金 正博, 井上 靖道

名古屋市立大学学位論文

ヒト人工多能性幹細胞由来小腸上皮細胞の
新規分化誘導法の開発

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
白井晃太郎

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 湯浅 博昭 教授

副査 松永 民秀 教授

頭金 正博 教授

井上 靖道 准教授

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. Kotaro Shirai, Shimeng Qiu, Hanako Minowa, Tadahiro Hashita, Takahiro Iwao, Tamihide Matsunaga.

Air-liquid interface culture and modified culture medium promote the differentiation of human induced pluripotent stem cells into intestinal epithelial cells.

Drug Metabolism and Pharmacokinetics, **55**, 100994 (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において行われた。

略語一覽

5AZA	5-aza-2'-deoxycytidine
A 83-01	3-(6-methyl-2-pyridinyl)-N-phenyl-4-(4-quinolinyl)-1H-pyrazole-1-carbothioamide
ABC	ATP binding cassette
AHR	aryl hydrocarbon receptor
ALI	air-liquid interface
A to B	apical to basal
ASI	adult small intestine
BCRP	breast cancer resistance protein
BSA	bovine serum albumin
B to A	basal to apical
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CAR	constitutive androstane receptor
CES	carboxylesterase
CHGA	chromogranin A
conv.	conventional
CYP	cytochrome P450
c-MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCLK1	doublecortin like kinase 1
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMEM/F12	DMEM mixed 1:1 with Ham's F-12
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DNMT	DNA methyltransferase
EGF	epidermal growth factor
ER	efflux ratio
ERK	extracellular signal-regulated kinase
F_a	fraction absorbed
F_g	fraction escaping gut-wall elimination
F_h	fraction escaping hepatic elimination

FABP2	fatty acid binding protein 2
FBS	fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
FGF2	fibroblast growth factor 2
GLUT2	glucose transporter type 2
GLUT5	glucose transporter type 5
GO	Gene Ontology
GP2	glycoprotein 2
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid
hiIOs	human iPS cell-derived intestinal organoids
hiSIECs	human iPS cell-derived small intestinal epithelial cells
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
iPS	induced pluripotent stem
KLF4	Kruppel-like factor 4
KSR	KnockOut Serum Replacement
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LCT	lactase
LGR5	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5
LL	liquid-liquid
LYZ	lysozyme
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MGAM	maltase-glucoamylase
MUC2	mucin 2
NEAA	non-essential amino acid
NPC1L1	Niemann-Pick C1-like protein 1
NR	nuclear receptor
OCT3/4	octamer transcription factor-3/4
OLFM4	olfactomedin 4
P-gp	P-glycoprotein
P_{app}	apparent permeability coefficient

PBS (-)	phosphate buffered saline without calcium, magnesium
PEPT1	peptide transporter 1
P_{sf}	scaling factor
PXR	pregnane X receptor
RNA	ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR	reverse transcription-quantitative PCR
SGLT1	sodium-glucose cotransporter 1
SI	sucrase-isomaltase
SLC	solute carrier transporter
SOX2	sex determining region Y-box 2
TEER	transepithelial electrical resistance
TGF- β	transforming growth factor-beta
TPM	transcripts per million
TREH	trehalase
VIL1	villin 1
Y-27632	(1R,4r)-4-((R)-1-aminoethyl)-N-(pyridin-4-yl)- cyclohexanecarboxamide
ZO-1	zonula occludens-1

目次

1. 序論	1
2. 低分子化合物添加期間の最適化と ALI 培養の効果検証.....	4
2.1 緒言	4
2.2 実験方法	5
2.2.1 試薬および細胞	5
2.2.2 ヒト iPS 細胞の培養.....	6
2.2.3 ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化.....	6
2.2.4 RNA 抽出および、reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR)	6
2.2.5 経上皮電気抵抗 (TEER) 値の測定.....	7
2.2.6 薬物代謝酵素活性試験	8
2.2.7 LC-MS/MS による代謝物の定量	8
2.2.8 P-glycoprotein (P-gp) 輸送活性測定	9
2.2.9 LC-MS/MS による digoxin の定量.....	9
2.2.10 統計解析	10
2.3 実験結果	11
2.3.1 PD98059 (MEK 阻害剤) の添加期間検討.....	11
2.3.2 A 83-01 (TGF- β 受容体阻害剤) の添加期間検討.....	12
2.3.3 5AZA (DNMT 阻害剤) の添加期間検討.....	13
2.3.4 ALI 培養の効果検証.....	14
2.3.5 novel hiSIECs の特徴評価	16
2.4 考察	19
2.5 小括	22
3. F-hiSIEC™における新規分化誘導法の効果.....	23
3.1 緒言	23
3.2 実験方法	24
3.2.1 試薬および細胞	24
3.2.2 F-hiSIEC™の培養	24
3.2.3 RNA-Seq	25
3.2.4 RNA 抽出および、RT-qPCR	25
3.2.5 TEER 値の測定	27

3.2.6 Lucifer yellow 膜透過試験.....	27
3.2.7 免疫蛍光染色	27
3.2.8 薬物代謝酵素活性および膜透過試験	28
3.2.9 LC-MS/MS による化合物の定量	28
3.2.10 統計解析	29
3.3 実験結果	30
3.3.1 F-hiSIECTMに対する new medium と ALI 培養の効果検証	30
3.3.2 腸管バリア機能評価	34
3.3.3 薬物代謝酵素活性および膜透過試験	36
3.4 考察	39
3.5 小括	42
4. 総括	43
謝辞	44
引用文献	45

1. 序論

消化管における薬物動態を評価することの重要性

消化管における薬物動態を正確に評価することは、医薬品開発、特に経口薬開発において重要である。経口薬のバイオアベイラビリティ (F_{oral}) は一般に以下の式で表される。

$$F_{oral} = F_a \times F_g \times F_h$$

ここで、 F_a は消化管吸収率、 F_g は消化管代謝回避率、 F_h は肝代謝回避率である。上記の式の右辺には消化管が関与するファクターが3つのうち2つを占めており (F_a 、 F_g)、ここから腸において初回通過効果を受ける医薬品のバイオアベイラビリティを考える際の消化管の重要性が窺える。実際、消化管での薬物動態の変化が経口薬のバイオアベイラビリティを大きく変える例は少なくない。例えば、抗ウイルス薬バラシクロビルは、消化管吸収が不良なアシクロビルにアミノ酸のバリンを結合させ、小腸の peptide transporter 1 (PEPT1) の基質としたことで F_a を改善した例である^{1,2)}。また、グレープフルーツジュースは消化管の cytochrome P450 (CYP) 3A4 を阻害することで、フェロジピンなどの CYP3A4 の基質薬物の消化管代謝回避率、すなわち F_g を増加させることがよく知られている³⁾。

以上のように、消化管における薬物動態は経口薬開発において非常に重要であるが、後述するようにその高精度な評価系はまだないのが現状である。そのため、臨床試験段階になって初めて医薬品候補化合物の消化管動態不良が見つかる場合も見受けられ、これは新薬の開発コストを増大させる。

現状の評価系の問題点

動物実験は経口投与後の薬物の挙動を包括的に調べることができる評価系である。しかし、ヒトと実験動物の間には無視できない種差が存在することが明らかになっている⁴⁾。加えて、動物愛護に対する関心の高まりから、動物実験を制限する必要性が生じてきている。欧州連合では2013年に化粧品開発での動物実験が廃止されている⁵⁾。また、米国食品医薬品局 (FDA) は「FDA近代化法2.0」において医薬品の臨床試験前の動物試験を義務化しない方針としており⁶⁾、動物実験廃止の流れは医薬品開発の領域にも既に及びはじめている。これらの理由から、動物実験代替の *in vitro* 評価法が求められている。

消化管における医薬品の吸収を担うのは主に小腸である。加えて、小腸組織に

において薬物動態を制御する要因は、主に小腸上皮の有する機能である^{7,8)}。従って、消化管における薬物動態を評価するための *in vitro* モデルは小腸上皮に着目して構築される。そこで、*in vitro* モデルとしてまず挙げられるのが、初代ヒト小腸上皮細胞である。しかし、これらの細胞は供給量が少ない上、活性を維持しながら *in vitro* で培養することが困難である⁹⁾。さらに、現在市販されている凍結細胞は接着不可能で浮遊培養を行うため、薬物の膜透過試験が実施できない。

初代ヒト小腸上皮細胞の代替として、ヒト結腸癌由来の Caco-2 細胞がある。Caco-2 細胞は培養が簡便であり、小腸上皮細胞と類似の形態を有するため、腸管の *in vitro* モデルとして広く使われている。しかし、Caco-2 細胞は、CYP3A4 や carboxylesterase 2 (CES2) の発現が低いなど^{10,11)}、正常ヒト小腸上皮細胞とはいくつかの相違点を示すことが知られており、経口薬の消化管動態を精度高く評価できない場合が予想されることから、薬物動態評価系として不十分であると考えられる。

新たな選択肢：ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞由来小腸

iPS 細胞は、4 種類の遺伝子、octamer transcription factor-3/4 (OCT3/4)、sex determining region Y-box 2 (SOX2)、Kruppel-like factor 4 (KLF4)、v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (c-MYC) を体細胞に導入することによって、山中らが樹立した多能性幹細胞である^{12,13)}。iPS 細胞の大きな特徴は、増殖力に富み、生体を構成する様々な細胞に分化する能力を有することであり、この特徴を活かせばヒト iPS 細胞から、「安定供給可能かつヒト小腸と同等の特徴・機能を有した細胞」を作製することが可能であると考えられる。

佐藤らの初代腸管細胞由来オルガノイドの培養技術¹⁴⁾を基礎とした、ヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイド (human iPS cell-derived intestinal organoids, hiIOs) の作製法が、ヒト iPS 細胞に由来する腸細胞として初めて Spence らによって報告された¹⁵⁾。それ以降、hiIOs について様々な分化法が報告されている^{16,17)}。一方、hiIOs のような神経系や間葉系の細胞を含む腸管様のミニ臓器ではなく、iPS 細胞から直接的に腸管上皮細胞を高純度で作製する試みも報告されている¹⁸⁻²⁰⁾。特に、Kabeya らによって報告された transforming growth factor (TGF)- β 受容体阻害剤、DNA methyltransferase (DNMT) 阻害剤、mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) 阻害剤、cyclic adenosine monophosphate (cAMP) シグナル活性化剤の 4 つの低分子化合物を使用して作製するヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞

(human iPS cell-derived small intestinal epithelial cells, hiSIECs) は、低コストかつ簡便にヒト iPS 細胞から腸管細胞を作製できる上に、機能も非常に高い¹⁸⁾。しかしながら、この細胞は solute carrier family 5 member 1/sodium/glucose cotransporter 1 (SLC5A1/SGLT1) といった、小腸における物質動態に影響を与える遺伝子の発現が低い。また、薬物の P_{app} と *in vivo* の $F_a \cdot F_g$ とを比較すると、CYP3A4 の基質となる薬物は相関曲線から大きく外れることが課題であり、薬物代謝を受ける薬物の透過予測を行うには未だ機能不足であることが示唆されている²¹⁾。

そこで本研究では、より生体の小腸上皮細胞に近い特徴を有する hiSIECs を開発することを目的に、上述の 4 つの低分子化合物を用いた hiSIECs の作製法の改良について検討を行なった。改良点として、まず低分子化合物の添加期間の最適化を行った。次に、培養法の見直しとして気-液界面 (air-liquid interface, ALI) 培養法の適用について検討を行なった。そして、最適化したプロトコルで作製した hiSIECs の薬物動態学的機能について評価を実施した。

2. 低分子化合物添加期間の最適化と ALI 培養の効果検証

2.1 緒言

hiSIECs の作製法の中でも、MEK 阻害剤である PD98059、TGF- β 受容体阻害剤である 3-(6-methyl-2-pyridinyl)-N-phenyl-4-(4-quinolinyl)-1H-pyrazole-1-carbothioamide (A 83-01)、DNMT 阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5AZA)、cAMP シグナル活性化剤である forskolin の 4 つの低分子化合物を使用する方法は、高い薬物動態学的機能を有することが報告されている²¹⁾。しかし、ヒト小腸に高発現する遺伝子の一部の発現や、CYP3A4 の関わる薬物代謝の予測性は依然として低い。この課題解決のため、本章ではヒト iPS 細胞 Windy 株を用いて小腸上皮細胞の分化誘導プロトコルの改良を試みた。

まず着目したのは、分化促進の目的で添加している低分子化合物の添加期間である。前述の 4 因子は、先に PD98059、A 83-01、5AZA の組み合わせが提案され²²⁾、その後 forskolin の添加がさらに分化を促進するという報告がなされた²¹⁾。従って、forskolin が分化プロトコルに組み込まれた上での PD98059、A 83-01、5AZA の必要性については未だ検証されていない。また、これらを分化の後半から除くという方法はこれまで検討されていない。そこで、本章では PD98059、A 83-01、5AZA について、それらの有無および添加期間の変更が hiSIECs の作製にどのように影響するか調べた。

ALI 培養は、気相と液相の境界部分で細胞を培養する方法であり、呼吸器系の細胞を培養する方法としては比較的広く用いられている^{23, 24)}。腸細胞においては、マウス腸細胞由来の腸管オルガノイドの培養に適用し、長期培養を成功させた報告がある²⁵⁾。しかし、hiSIECs の作製に ALI 培養を適用した報告は未だ無く、その効果は不明である。そこで、ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化の過程に ALI 培養を組み込むことが分化の促進につながるかどうかについて、検討を行なった。

2.2 実験方法

2.2.1 試薬および細胞

ヒト iPS 細胞 (Windy) はヒト胎児肺線維芽細胞 MRC-5 から樹立された株であり、国立成育医療研究センター研究所 (Tokyo, Japan) の梅澤明弘博士よりご供与いただいた。Matrigel matrix growth factor reduced は Corning (Corning, NY, USA) より、human adult small intestine total RNA (5 donors, lot = C409285) は BioChain Institute (Newark, CA, USA) より、dimethyl sulfoxide (DMSO)、Accutase および ammonium formate solution は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) より、Roswell Park Memorial Institute (RPMI) + GlutaMax medium、N2 supplement、B27 serum free supplement、bovine serum albumin (BSA)、GlutaMax、Hanks' balanced salt solution (calcium, magnesium, no phenol red) (HBSS)、BCA Protein Assay Kit、KnockOut Serum Replacement (KSR) および HepExtend は Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) より、4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) buffer、2-mercaptoethanol および diclofenac は Merck (Burlington, MA, USA) より、セルカルチャーインサート (ThinCert, 0.4 μ m pore size, translucent, 24well plates) は Greiner Bio-One (Kremsmünster, Austria) より、phosphate buffered saline without calcium, magnesium (PBS (-)) は TaKaRa Bio (Shiga, Japan) より、fetal bovine serum (FBS) は Nichirei Biosciences (Tokyo, Japan) より、fibroblast growth factor 2 (FGF2)、activin A および epidermal growth factor (EGF) は PeproTech (Cranbury, NJ, USA) より、A 83-01 は AdoQ BioScience (Irvine, CA, USA) より、(S)-mephenytoin は Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA) より、(1R,4r)-4-((R)-1-Aminoethyl)-N-(pyridin-4-yl)-cyclohexanecarboxamide (Y-27632) は Focus Biomolecules (Plymouth Meeting, PA, USA) より、KAPA SYBR Fast qPCR Kit ABI Prism は Kapa Biosystems (Wilmington, MA, USA) より、1:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's nutrient mixture F-12 (DMEM/F12)、forskolin、PD98059、5AZA、midazolam、mitomycin C、ultrapure water、methanol および acetonitrile は FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) より、MEM non-essential amino acid (NEAA)、L-glutamine および penicillin-streptomycin mixed solution は Biological Industries (Beit Haemek, Israel) より、4'-hydroxydiclofenac および 4'-hydroxymephenytoin は Sumika Chemical Analysis Service, Ltd. (Osaka, Japan) より、1'-hydroxymidazolam は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) より、RNeasy Mini Kit および QIAshredder は QIAGEN (Valencia, CA, USA) より、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA

Remover は TOYOBO (Osaka, Japan) より購入した。その他の試薬はすべて市販の特級または生化学用のものを用いた。

2.2.2 ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞は 20% KSR、1% NEAA、2 mM L-glutamine、0.1 mM 2-mercaptoethanol、5 ng/mL FGF2 を含む DMEM/F12 を用いて、mitomycin C 処理により不活化したマウス胎仔線維芽細胞上で培養した。培地交換は毎日行い、3-4 日毎に継代培養を行った。ヒト iPS 細胞の小腸上皮細胞への分化は、ヒト iPS 細胞が培養ディッシュに対し、未分化コロニーの占める割合が約 70%になった時点から開始した。

2.2.3 ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化

ヒト iPS 細胞は、0.5% FBS、100 units/mL penicillin G、100 µg/mL streptomycin sulfate、100 ng/mL activin A を含む RPMI + GlutaMax medium で 48 時間培養後、2% FBS、100 units/mL penicillin G、100 µg/mL streptomycin sulfate、100 ng/mL activin A を含む RPMI + GlutaMax medium で 24 時間培養することで内胚葉に分化させた。その後、2% FBS、1% GlutaMax、100 units/mL penicillin G、100 µg/mL streptomycin sulfate、250 ng/mL FGF2 を含む DMEM/F12 (腸管幹細胞培地) で 96 時間培養することで腸管幹細胞に分化させた。腸管幹細胞を 10 µM Y-27632 を加えた腸管幹細胞培地で 1 時間インキュベートした後、Accutase を用いて剥離し、あらかじめ DMEM/F12 で 30 倍に希釈した Matrigel matrix growth factor reduced 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た。播種した細胞を 10 µM Y-27632 を含む分化培地で 1 日培養し、その後 30 µM forskolin を含む分化培地で 18 日間培養した。さらに、Figure 1-3 および 5 に示すように、20 µM PD98059、0.5 µM A 83-01、5 µM 5AZA の添加と、ALI 培養をそれぞれ行った。なお、分化培地は 2% FBS、2% N2 supplement、1% B27 serum free supplement、1% HepExtend、1% NEAA、1% GlutaMax、100 units/mL penicillin G、100 µg/mL streptomycin sulfate および 20 ng/mL EGF を含む DMEM/F-12 である。

2.2.4 RNA 抽出および、reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR)

RNeasy Mini Kit と QIAshredder の取扱説明書に従い、細胞の RNA を抽出した。抽出した RNA を、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用い、

取扱説明書に従って cDNA へ逆転写した。RT-qPCR は、KAPA SYBR Fast qPCR Kit ABI Prism と LightCycler 96 System (Roche, Basel, Switzerland) を用いて行った。使用したプライマーの塩基配列を Table 1 に示す。qPCR 反応は、95°C で 3 min のプレインキュベーションにより開始し、95°C で 10 sec、60°C で 20 sec、72°C で 1 sec の 3 ステップを 40 回繰り返した。RT-qPCR の結果は、hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) をハウスキーピング遺伝子として、delta-delta-Ct 法により算出した。

Table 1. Primer sequences used for RT-qPCR.

Gene name	Sense 5' → 3'	Antisense 5' → 3'
<i>ABCB1</i>	CCCATCATTGCAATAGCAGG	TGTTCAAACCTTCTGCTCCTGA
<i>ABCG2</i>	AGATGGGTTTCCAAGCGTTCAT	CCAGTCCCAGTACGACTGTGACA
<i>CES2</i>	CTGGGGAGTCTTGTCATGT	GGAAGGGAAGGTCATGTTGA
<i>CHGA</i>	TCCGACACACTTTCCAAGCC	TTCTGCTGATGTGCCCTCTC
<i>CYP2C9</i>	GACATGAACAACCTCAGGACTTT	TGCTTGTCGTCTCTGTCCCA
<i>CYP2C19</i>	GAACACCAAGAATCGATGGACA	TCAGCAGGAGAAGGAGAGCATA
<i>CYP3A4</i>	CTGTGTGTTTCCAAGAGAAGTTAC	TGCATCAATTTCTCCTGCAG
<i>DCLK1</i>	TAGCACAGCAGCTGGAGTTT	GAGTTGAGTTCTGGGAGGAGC
<i>FABP2</i>	TTGGAAGGTAGACCGGAGTG	AGGTCCCCCTGAGTTCAGTT
<i>GP2</i>	CAATGTGCCTACCCACTGGA	AGCACGGACTCAACAGACAG
<i>HPRT1</i>	CTTTGCTTTCCTTGGTCAGG	TCAAGGGCATATCCTACAACA
<i>LGR5</i>	TGCTCTTACCAACTGCATC	CTCAGGCTCACCAGATCCTC
<i>LYZ</i>	TCAATAGCCGCTACTGGTGT	AATGCCTTGTGGATCACGGA
<i>MUC2</i>	AGAAGGCACCGTATATGACGAC	CAGCGTTACAGACACACTGCTC
<i>OLFM4</i>	CCAGCTGGAGGTGGAGATAAGA	CCACACCACCATGACCACAG
<i>SI</i>	GGTAAGGAGAAACCGGGAAG	GCACGTCGACCTATGGAAAT
<i>SLC5A1</i>	CAACATCGCCTATCCAACCT	TAAACAACCTTCCGGCAATC
<i>SLC15A1</i>	CACCTCCTTGAAGAAGATGGCA	GGGAAGACTGGAAGAGTTTTATCG
<i>VIL1</i>	AGCCAGATCACTGCTGAGGT	TGGACAGGTGTTCTCCTTC

2.2.5 経上皮電気抵抗 (TEER) 値の測定

TEER 値は、EVOM3 (WPI, Sarasota, FL, USA) を使い、取扱説明書に従って測定した。ALI 培養の well には、液-液 (liquid-liquid, LL) 培養の well と同量の分化培地をインサート内に添加した後に測定を行なった。

2.2.6 薬物代謝酵素活性試験

hiSIECs を培養するセルカルチャーインサートを、basal 側から試験液が漏出しないようパラフィルムを敷いた 12-well plate の well 上に静置し、インサート内の培地を 10 mM HEPES を含む HBSS (HBSS-HEPES) に交換し、37°C で 20 min プレインキュベーションした。その後、インサート内を 5 μ M diclofenac、50 μ M (S)-mephenytoin、5 μ M midazolam を含む HBSS-HEPES に置換し、37°C で 6 h インキュベーションした。インキュベーション後の上清を測定サンプルとして回収し、liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) を用いて定量した。薬物代謝酵素活性を標準化するために、試験後の hiSIECs の総タンパク質量を TaKaRa BCA Protein Assay Kit を用いて、取扱説明書に従い定量した。

2.2.7 LC-MS/MS による代謝物の定量

薬物代謝酵素活性試験で得られた上清 30 μ L に対し、内部標準の 10 ng/mL niflumic acid を含む acetonitrile 90 μ L を加え、さらに 50% acetonitrile 6 μ L と混和した。その後、1,000 \times g、4°C、5 min で遠心した上清を FastRemover for protein (GL Sciences, Tokyo, Japan) で濾過し、LC-MS/MS による解析に用いた。LC-MS/MS システムには QTRAP 6500 (AB SCIEX, Framingham, MA, USA) および Nexera XR (Shimadzu, Kyoto, Japan) を使用し、liquid chromatography カラムには ACQUITY UPLC BEH C18 column (1.7 μ m, 2.1 \times 50 mm) (Waters Corporation, Milford, MA, USA) を 40°C で使用した。移動相には 10 mM ammonium formate を含む ultrapure water (A) と acetonitrile (B) を使用し、流速は 0.4 mL/min とした。移動相の gradient は以下に示す条件とした: 0–0.01 min 2% B、0.01–3.50 min 2%–100% B、3.50–4.00 min 100% B、4.00–4.10 min 100%–2% B、4.10–5.50 min 2% B。Mass spectrometry 測定は以下に示す条件とした: positive ion mode、550°C TIS temperature、5500 V ion spray voltage、30 psi curtain gas、12 psi collision gas、65 psi nebulizing gas、70 psi TIS gas。また、化合物ごとの詳細な測定条件は Table 2 に示す。

Table 2. Multiple reaction monitoring conditions for LC-MS/MS.

	Compounds	Ion mode	Q1 mass (Da)	Q3 mass (Da)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Metabolites	4'-Hydroxydiclofenac	Positive	311.824	230	16	10	43	12
	4'-Hydroxymephenytoin	Positive	235.1	150.1	51	10	29	8
	1'-Hydroxymidazolam	Positive	342.107	203	81	10	35	12
Internal standard	Niflumic acid	Positive	283.014	245	51	10	41	14

2.2.8 P-glycoprotein (P-gp) 輸送活性測定

P-gp の基質として、10 μ M digoxin を、阻害剤として 100 μ M verapamil を使用した。培地を HBSS-HEPES に交換し、阻害剤の存在下または非存在下、37°C で 20 min プレインキュベーションした。その後、receiver 側に HBSS-HEPES を、donor 側に 10 μ M digoxin を含む HBSS-HEPES に置換し、阻害剤の存在下または非存在下、37°C で 60 min インキュベーションした。20、40、60 min 時点で receiver 側からサンプリングを行ない、LC-MS/MS を用いて定量した。

見かけの膜透過係数 (P_{app}) の算出は以下の式に基づき行なった。

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

ここで、 dQ/dt は単位時間あたりに透過した化合物の量、 A はセルカルチャーインサートの表面積 (0.336 cm²)、 C_0 は donor 側の化合物の初濃度である。

Digoxin の efflux ratio (ER) は、basal to apical (B to A) 方向の P_{app} を apical to basal (A to B) 方向の P_{app} で除すことによって算出した。

2.2.9 LC-MS/MS による digoxin の定量

サンプリングした上清 50 μ L に対し、内部標準の 10 ng/mL niflumic acid を含む acetonitrile と methanol の 7:3 混合溶液 200 μ L を加え、さらに 50% acetonitrile 5 μ L と混和した。その後、1,000 \times g、4°C、5 min で遠心した上清を FastRemover for protein で濾過し、LC-MS/MS による解析に用いた。LC-MS/MS システムには QTRAP 6500 および Nexera XR を使用し、liquid chromatography カラムには ACQUITY UPLC BEH C18 column (1.7 μ m, 2.1 \times 50 mm) を 40°C で使用した。移動相には 0.02% formic acid を含む ultrapure water (A) および 0.02% formic acid を

含む acetonitrile (B) を使用し、流速は 0.5 mL/min とした。移動相の gradient は以下に示す条件とした: 0–0.50 min 2% B、0.50–3.00 min 2%–99% B、3.00–5.00 min 99% B、5.00–5.01 min 99%–2% B、5.01–6.00 min 2% B。Mass spectrometry 測定は以下に示す条件とした: positive ion mode、350°C TIS temperature、–4500 V ion spray voltage、20 psi curtain gas、10 psi collision gas、35 psi nebulizing gas、65 psi TIS gas。また、化合物ごとの詳細な測定条件は Table 3 に示す。

Table 3. Multiple reaction monitoring conditions for LC-MS/MS.

	Compounds	Ion mode	Q1 mass (Da)	Q3 mass (Da)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Substrate	Digoxin	Negative	779.2	649.3	–206.8	–10.0	–46.5	–10.0
Internal standard	Niflumic acid	Negative	281.0	237.2	–20.8	–11.0	–22.3	–23.8

2.2.10 統計解析

統計分析には、SPSS Statistics software version 25.0 (IBM, Chicago, IL, USA) を用いた。2 群比較には Student's *t*-test を、多重比較には Dunnett's test を実施した。

2.3 実験結果

2.3.1 PD98059 (MEK 阻害剤) の添加期間検討

PD98059 を分化後半の 12 日間添加する従来の分化法に対して、添加日数を 8 日間、4 日間、非添加と減らした群を設定し比較を行なった (Figure 1)。その結果、PD98059 の添加期間を短くするにつれて、腸管上皮細胞マーカーである villin 1 (VIL1) と小腸における主要な CYP 分子種である CYP2C9、CYP3A4 の遺伝子発現が減少した。

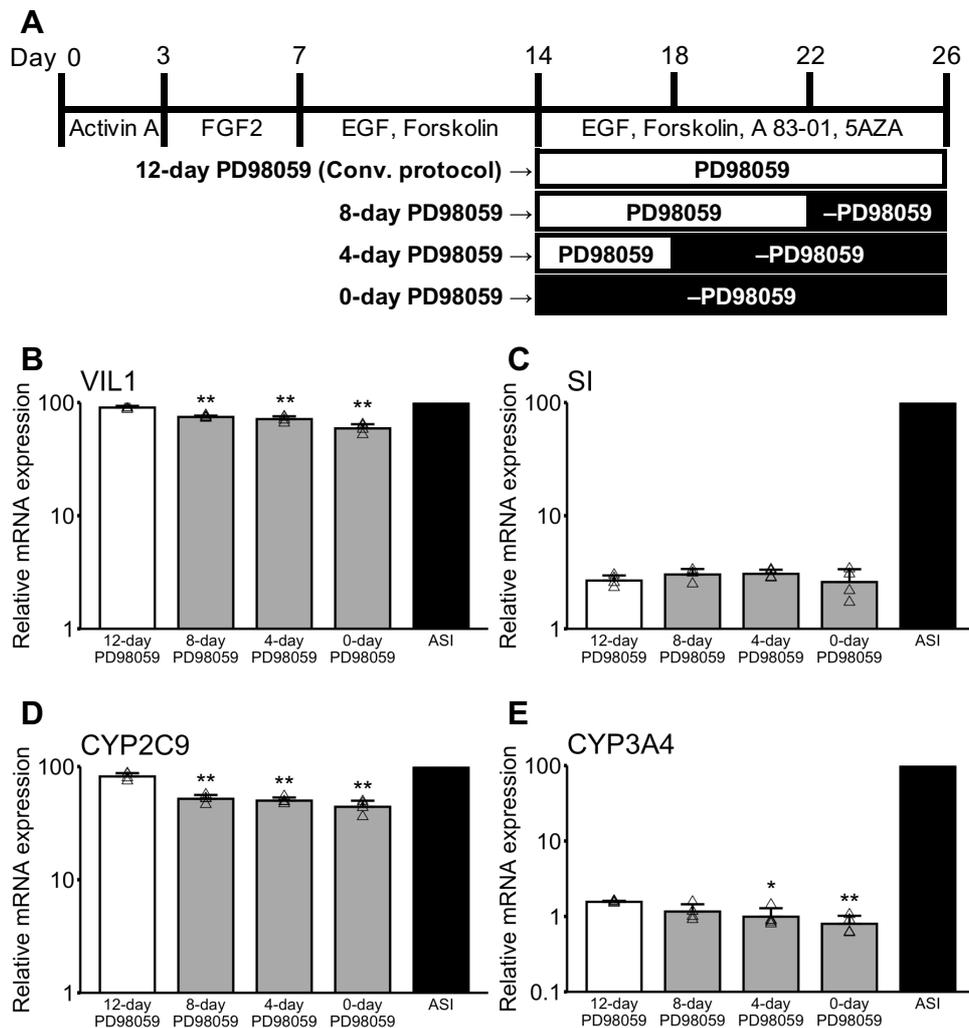


Figure 1. Investigation of PD98059 (MEK inhibitor) in the hiSIEC generation protocol. (A) A schematic diagram of the hiSIEC generation protocols used in this experiment. (B–E) RT-qPCR results. The mRNA expression levels are represented relative to the level in the adult small intestine (ASI), which is set to 100. HPRT1 was used as a housekeeping gene. All data are presented as the mean \pm S.D. ($n = 4$, ASI: $n = 1$). Data are representative of several independent experiments. Statistical significance levels compared with conv. protocol group: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.3.2 A 83-01 (TGF- β 受容体阻害剤) の添加期間検討

A 83-01 を分化後半の 12 日間添加する従来の分化法に対して、添加日数を 8 日間、4 日間、非添加と減らした群を設定し比較を行なった (Figure 2)。その結果、A 83-01 の添加期間を短くするにつれて、VIL1、CYP2C9、CYP3A4 に加え、小腸上皮細胞マーカーである sucrase-isomaltase (SI) の遺伝子発現の減少が確認された。

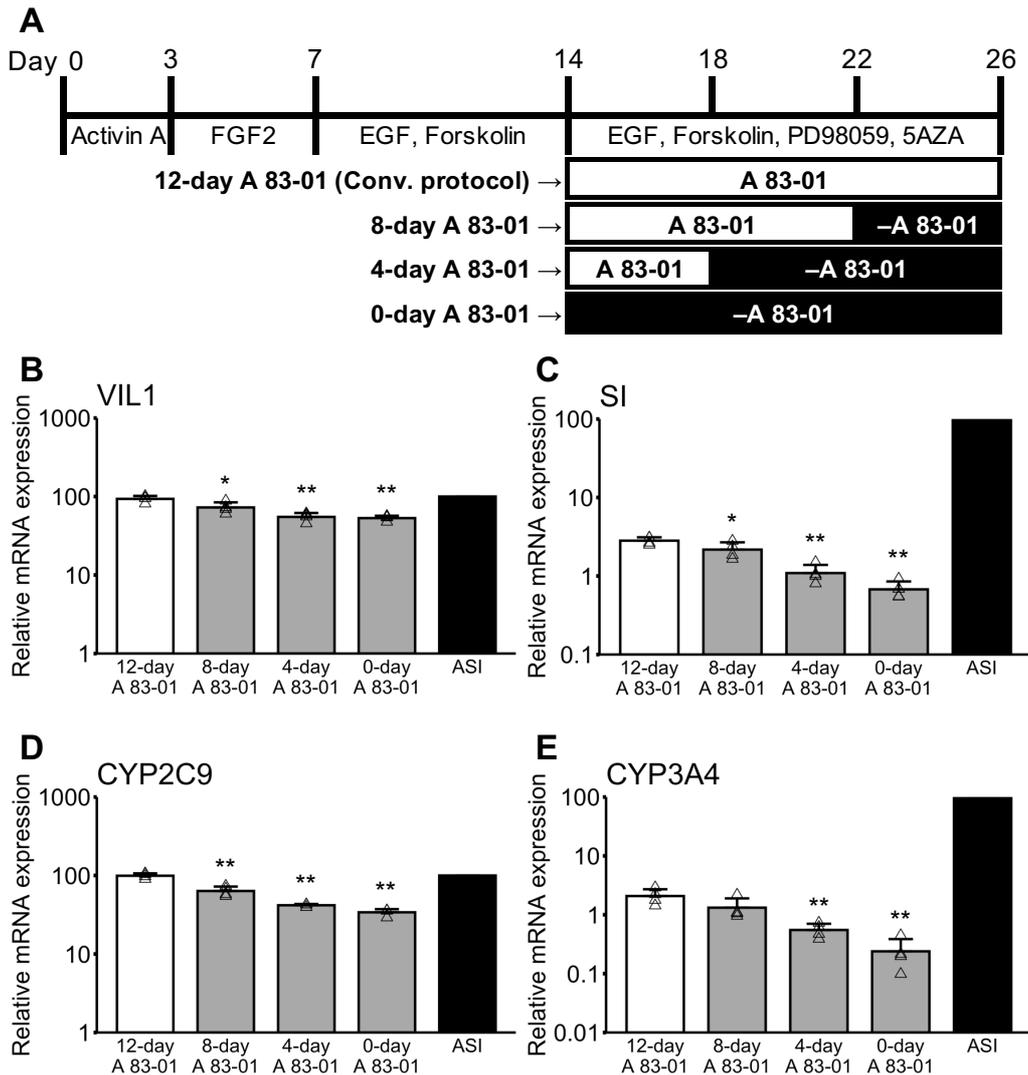


Figure 2. Investigation of A 83-01 (TGF- β receptor inhibitor) in the hiSIEC generation protocol. (A) A schematic diagram of the hiSIEC generation protocols used in this experiment. (B–E) RT-qPCR results. The mRNA expression levels are represented relative to the level in the ASI, which is set to 100. HPRT1 was used as a housekeeping gene. All data are presented as the mean \pm S.D. ($n = 4$, ASI: $n = 1$). Data are representative of several independent experiments. Statistical significance levels compared with conv. protocol group: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.3.3 5AZA (DNMT 阻害剤) の添加期間検討

5AZA を分化後半の 12 日間添加する従来の分化法に対して、添加日数を 8 日間、4 日間、非添加と減らした群を設定し比較を行なった (Figure 3)。その結果、添加期間を短縮した群で腸管上皮細胞マーカーである VIL1 と SI、薬物代謝酵素である CYP2C9 と CYP3A4 の遺伝子発現が従来法よりも高く、特に 4-day 5AZA 群ではいずれも有意に高くなった。一方、5AZA を全く添加しない場合には従来法と比べて CYP3A4 の発現上昇は確認されなかった。

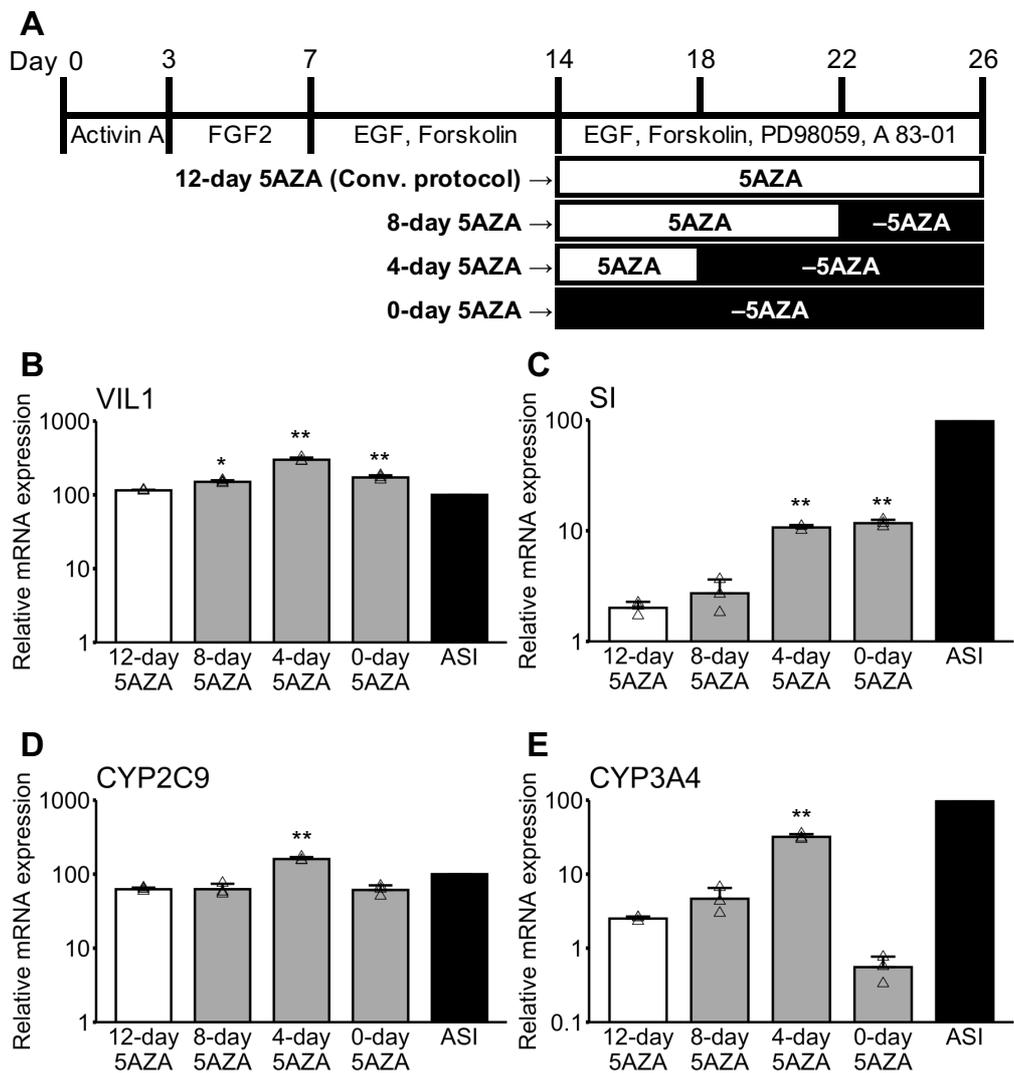


Figure 3. Investigation of 5AZA (DNMT inhibitor) in the hiSIEC generation protocol. (A) A schematic diagram of the hiSIEC generation protocols used in this experiment. (B–E) RT-qPCR results. The mRNA expression levels are represented relative to the level in the ASI, which is set to 100. HPRT1 was used as a housekeeping gene. All data are presented as the mean \pm S.D. ($n = 3$, ASI: $n = 1$). Data are representative of several independent experiments. Statistical significance levels compared with conv. protocol group: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.3.4 ALI 培養の効果検証

ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化に対する ALI 培養の効果を調べるため、セルカルチャーインサートの膜上に分化途中の細胞を播種し、インサート内の培地を除くという方法で ALI 培養 (Figure 4) の効果について検討を行なった。具体的には、前述の 4 日間のみ 5AZA を添加する分化法を基礎として、従来の LL 培養を行う群と ALI 培養を 4、8、12 日間行う群の比較を行なった (Figure 5)。その結果、SI、CYP2C9、CYP3A4 の遺伝子発現は、8 日間 ALI 培養を行なった群で最も高く、それより短期間 (4 日間) でも長期間 (12 日間) でも効果は減弱することが確認された。

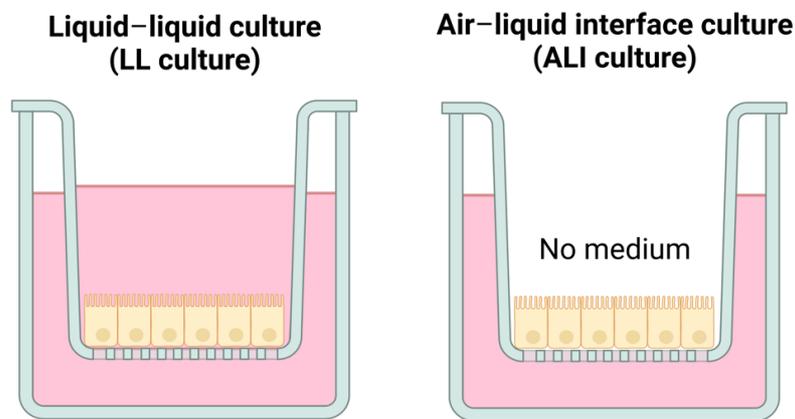


Figure 4. Schematic of ALI culture. In ALI culture, the cell culture insert cups contained no medium. LL culture is a common cell culture method. Figures were created using BioRender.com.

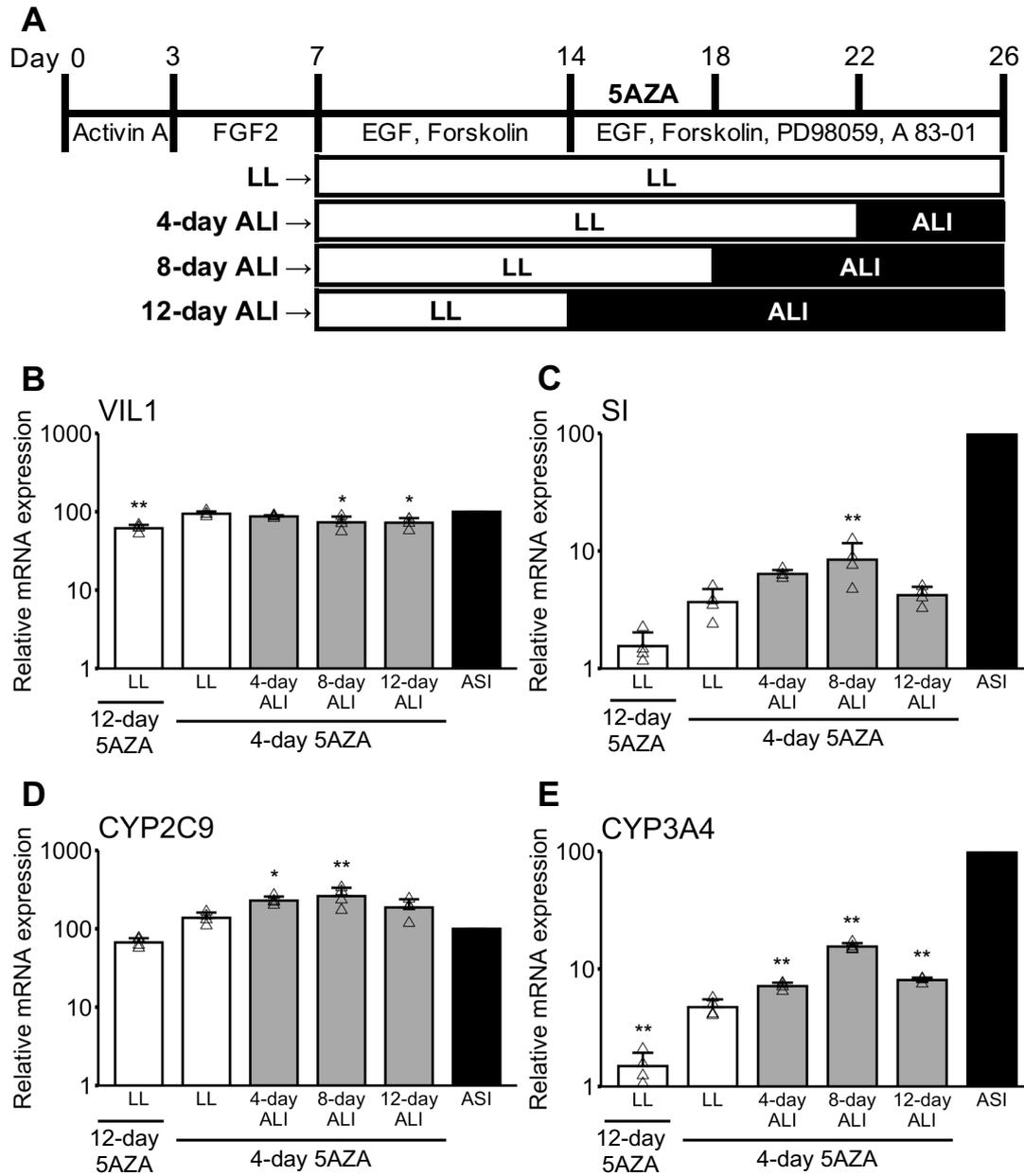


Figure 5. Investigation of ALI culture. (A) A schematic diagram of the hiSIEC generation protocols used in this experiment. (B–E) RT-qPCR results. The mRNA expression levels are represented relative to the level in the ASI, which is set to 100. HPRT1 was used as a housekeeping gene. All data are presented as the mean \pm S.D. ($n = 4$, ASI: $n = 1$). Data are representative of several independent experiments. Statistical significance levels compared with LL + 4-day 5AZA group: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

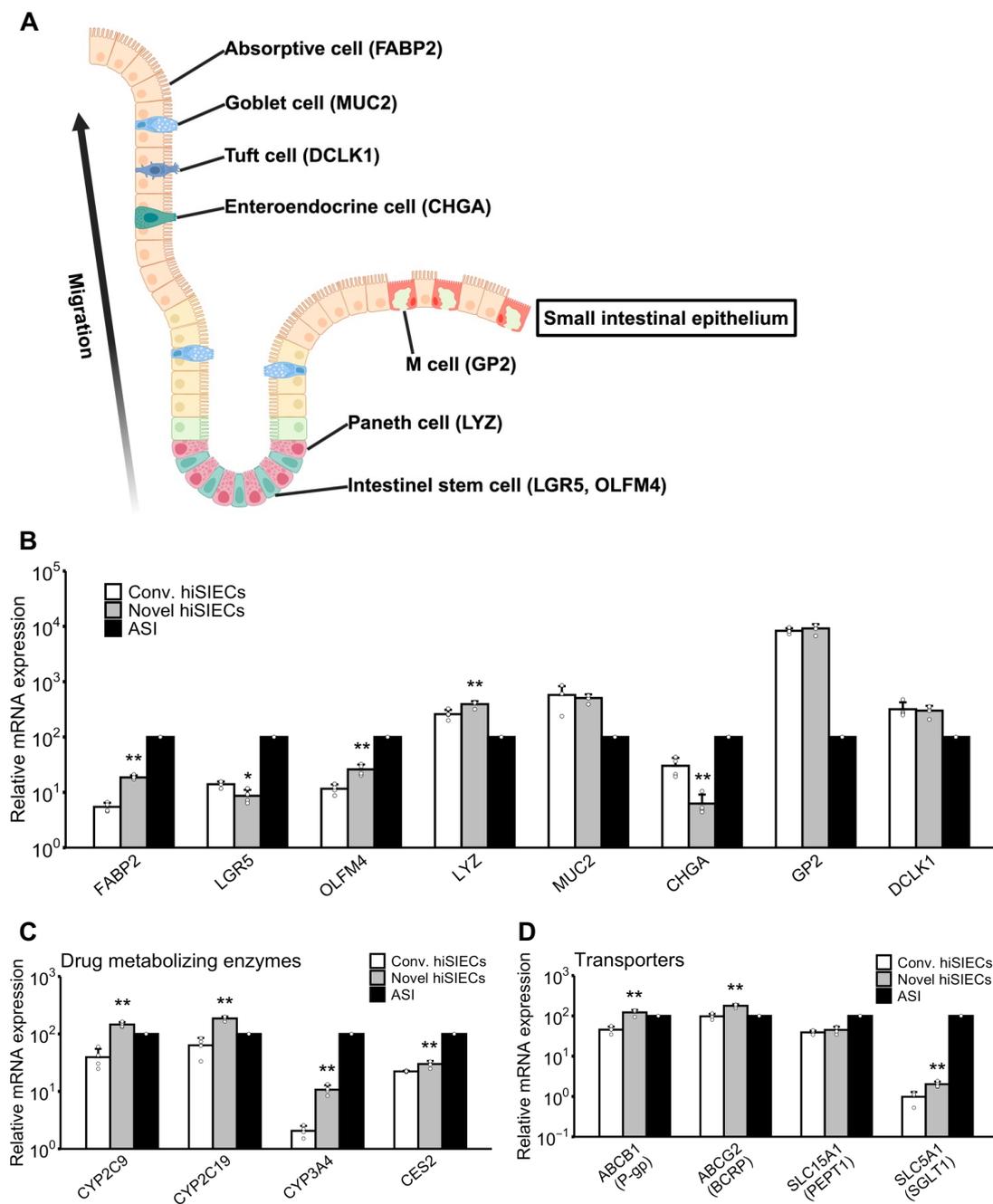
2.3.5 novel hiSIECs の特徴評価

ここまでの結果から、5AZA の添加期間を 4 日間に留め、8 日間の ALI 培養を行なう方法 (新規法) で作製する hiSIECs (novel hiSIECs) が、従来法で作製するもの (conventional hiSIECs, conv. hiSIECs) よりも生体の小腸上皮細胞に近い遺伝子発現プロファイルを有する可能性が示唆された。そこで、novel hiSIECs の特徴についてさらに詳細に調べるため、より広範な遺伝子の発現解析と薬物代謝酵素活性、TEER 値、P-gp 活性の評価を行なった。

小腸上皮は腸管幹細胞とそこから分化する多種の細胞から構成される (Figure 6A)。そこで、各種の細胞のマーカーについて、遺伝子発現解析を行なった (Figure 6B)。その結果、小腸上皮細胞のマーカーとして知られる fatty acid binding protein 2 (FABP2) や、腸管幹細胞マーカーである olfactomedin 4 (OLFM4)、パネート細胞マーカーの lysozyme (LYZ) の発現が novel hiSIECs において増加していた。対照的に、腸管幹細胞マーカーである leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5) と内分泌細胞マーカーの chromogranin A (CHGA) の遺伝子発現は novel hiSIECs において低下していた。一方、杯細胞マーカーの mucin 2 (MUC2)、M 細胞マーカーの glycoprotein 2 (GP2)、タフト細胞マーカーの doublecortin like kinase 1 (DCLK1) の発現に明らかな変化は認められなかった。また、薬物代謝酵素の遺伝子発現に関しては、CYP2C9 と CYP3A4 に加え、小腸に発現する薬物代謝酵素の CYP2C19、CES2 にも増加傾向が認められた (Figure 6C)。さらに、トランスポーターの ATP binding cassette subfamily B member 1/P-glycoprotein (ABCB1/P-gp)、ATP binding cassette subfamily G member 2/breast cancer resistance protein (ABCG2/BCRP)、SLC5A1/SGLT1 の遺伝子発現も novel hiSIECs において増加していた (Figure 6D)。

次に、薬物代謝酵素活性を評価した。その結果、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4/5 の活性は、従来法と比較して増加していた (Figure 6E-G)。この結果は、遺伝子発現解析の結果と一致している。続いて、TEER 値の測定と P-gp の輸送活性の測定を行なった。TEER 値は conv. hiSIECs に比較して、novel hiSIECs では有意に低かった (Figure 6H)。P-gp の輸送活性については、10 μ M digoxin を基質、100 μ M verapamil を阻害剤としてそれぞれ使用し、評価を行なった。その結果、novel hiSIECs における B to A 方向の digoxin の P_{app} は、conv. hiSIECs よりも高い値を示した (Figure 6I)。また、同 P_{app} は verapamil の添加によって減少したことから、P-gp による輸送活性を反映していることが示唆された。B to A 方向の digoxin の

P_{app} を A to B 方向の P_{app} で除した ER の値は conv. hiSIECs で 4.0、novel hiSIECs で 3.4 を示し、ほぼ同等の結果となった。



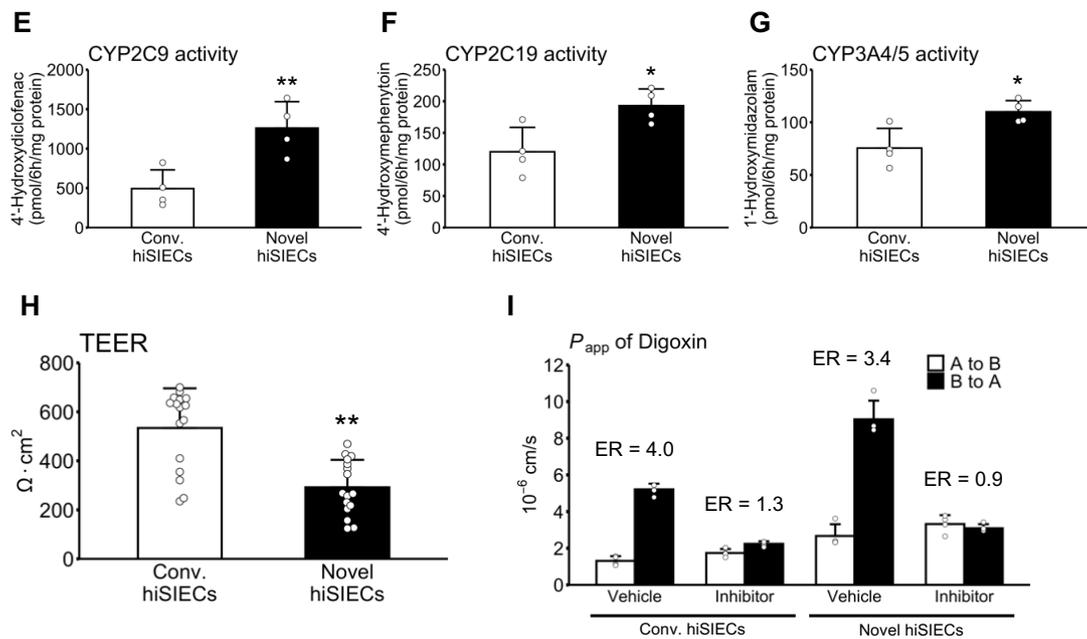


Figure 6. Characterization of novel hiSIECs. Conv. hiSIECs are cells cultured in LL + conv. medium, novel hiSIECs are cells cultured in ALI + new medium. (A) Diagram of the small intestinal epithelium. Genes in parentheses represent markers used in this study. Figure was created using BioRender.com. (B–D) RT-qPCR results. The mRNA expression levels are represented relative to the level in the ASI, which is set to 100. HPRT1 was used as a housekeeping gene. Data are presented as the mean \pm S.D. ($n = 4$, ASI: $n = 1$). (E–G) Drug metabolizing activities in conv. hiSIECs and novel hiSIECs. CYP2C9, CYP2C19, and CYP3A4/5 activities were examined by measuring the amounts of 4'-hydroxydiclofenac (produced from 5 μM diclofenac), 4'-hydroxymephenytoin (produced from 50 μM (*S*-mephenytoin), and 1'-hydroxymidazolam (produced from 5 μM midazolam), respectively. Data are presented as the mean \pm S.D. ($n = 4$). (H) TEER values on differentiation day 26. The TEER values of ALI-cultured cells were measured after adding the same amount of medium on the apical side as in the LL group. Data are presented as mean \pm S.D. ($n = 16$). (I) P-gp activity results. Cells were incubated with the transport buffer containing 10 μM digoxin at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 60 min in the presence or absence of 100 μM verapamil, a P-gp inhibitor. Data are presented as mean \pm S.D. ($n = 4$). (B–I) Data are representative of several independent experiments. Statistical significance levels compared with the conv. hiSIECs group: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.4 考察

本章では、PD98059、A 83-01、5AZA の添加期間の最適化と、ALI 培養の適用について検討を行なった。

分化の終盤に PD98059 と A 83-01 をそれぞれ分化培地から除いたところ、添加期間の短縮に伴って腸管上皮マーカーや薬物代謝酵素の遺伝子発現が低下した (Figure 1, 2)。腸管上皮細胞の終末分化に mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK/ERK) シグナルの不活化が必要であるとの報告があり²⁶⁾、また、TGF- β は上皮間葉転換を誘導する因子の一つであることが知られている²⁷⁾。これらの知見をもとに、PD98059 と A 83-01 は hiSIECs の分化プロトコルに組み込まれた。今回の結果から、これら2つは forskolin を添加するプロトコルの下でも必要であり、分化の完了まで添加し続けるのが最適であると言える。

5AZA を分化の終盤に分化培地から除いたところ、分化完了までの12日間添加し続けるより、4日間の添加に留めた方が腸管上皮細胞マーカーと薬物代謝酵素の遺伝子発現が高かった (Figure 3)。5AZA は DNMT 阻害剤であり、その DNA に対する脱メチル化作用が pregnane X receptor (PXR) の発現制御を介して CYP3A4 の発現を上昇させるとの報告がある²⁸⁾。実際、5AZA を添加した場合には1日も添加しない場合よりも CYP3A4 の遺伝子発現は高い傾向が見られる。しかし、12日間添加し続けるより4日間の添加に留めた方が CYP3A4 の遺伝子発現が高いというのは本研究で初めて明らかにした。この理由として、5AZA は細胞毒性の高い化合物として知られていることから^{29, 30)}、長期間の曝露が細胞の機能低下を惹起している可能性がある。5AZA の短期間の添加でも hiSIECs の分化には十分な DNMT 阻害効果が得られる可能性が本研究結果から予想され、5AZA の分化促進効果と細胞毒性の間の最もバランスが取れる添加期間が4日程度であるものと推察される。

分化の終盤に ALI 培養を導入したところ、LL 培養で培養したものに比べて SI と薬物代謝酵素の遺伝子発現が高まった (Figure 5)。従って、ALI 培養は hiSIECs の分化を促進する可能性が考えられる。なお、ALI 培養が hiSIECs に影響を与える機序については今回検討をしていないが、考えられる一つの仮説は、細胞に対する酸素供給の改善である。肝細胞に関して、培地を入れた細胞培養容器の底部の酸素濃度が、細胞の酸素需要を満たすには不十分であるとする報告がある^{31, 32)}。また、腸細胞に関して、低酸素条件下で大腸オルガノイドを分化すると大腸

幹細胞の数が増加することが報告されている³³⁾。この結果は、低酸素条件では腸管幹細胞の未分化維持機構が強まり、腸管上皮細胞の分化が進みづらくなることを示唆しているとも考えられる。これらを踏まえると、ALI 培養の適用によって細胞が空気中の酸素に直接曝露され、酸素供給量が増えたことにより、hiSIECs の分化が促進された可能性が考えられる。一方、腸管管腔は嫌気的環境であり、上述の仮説は生体環境と異なるという考え方もある。しかし、生体内では *in vitro* と異なり、絶えず血中のヘモグロビンから高効率に酸素が細胞に対して供給されている。これを踏まえると、酸素供給量を増加させる系が必ずしも生体の小腸上皮細胞とかけ離れた環境であるとは言い切れない。

5AZA の添加を分化中盤の 4 日間に留め、ALI 培養を適用して作製した hiSIECs が、従来の hiSIECs よりも生体の小腸上皮細胞に近い性質を持つものと予想し、本章ではさらに詳細な検証を行なった。

小腸上皮を構成する細胞のうち、代謝や吸収に主に関与する吸収上皮細胞については、*novel hiSIECs* で FABP2、薬物代謝酵素、トランスポーターの遺伝子発現が *conv. hiSIECs* よりも増加していた (Figure 6B–D)。また、実際に薬物代謝酵素活性が増加していたこと (Figure 6E–G) から、より成熟した吸収上皮細胞となっていることが示唆された。一方、P-gp については、遺伝子発現に増加が見られたものの、ER は *novel hiSIECs* と *conv. hiSIECs* で同等の結果となった (Figure 6D, I)。この結果を詳細に見ると、B to A 方向の P_{app} は *novel hiSIECs* の方が高い値を示しているものの、A to B 方向の P_{app} も *novel hiSIECs* で増加した影響でそのような ER の結果となっていることがわかる。A to B 方向の P_{app} の変化から、単純拡散あるいは細胞間隙経路を介した薬物透過特性が変化している可能性がある。実際、*novel hiSIECs* では TEER 値が *conv. hiSIECs* よりも低くなっており、細胞が形成しているバリアの性質が変化している可能性が示唆されている (Figure 6H)。従って、今回の ER の結果から P-gp の輸送活性に変化がないとは断定できないものと考えられる。なお、*novel hiSIECs* の TEER 値が *conv. hiSIECs* よりも低いことに関しては、ヒト小腸上皮の TEER 値が 40–100 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ であることを踏まえると^{34,35)}、より生体の小腸上皮の性質に近づいた可能性が考えられる。

小腸上皮を構成する細胞のうち吸収上皮細胞以外については、RT-qPCR の結果から、パネート細胞マーカーである LYZ の増加と内分泌細胞のマーカーである CHGA の低下が認められ、これらの細胞の存在割合の変化が示唆された。一方、ともに腸管幹細胞のマーカーとして知られる LGR5 と OLFM4 の遺伝子発現

は、それぞれ減少と増加を示し、矛盾する結果となった。この結果については、腸管幹細胞の存在比よりは、腸管幹細胞が胎児型か成人型かの違いを示しているかもしれない。成人の腸管幹細胞は、胎児の腸管幹細胞に比べて **LGR5** の遺伝子発現が低く、**OLFM4** の遺伝子発現が高いとする報告がある³⁶⁾。よって、**novel hiSIECs** における **LGR5** の低発現と **OLFM4** の高発現は、含まれる腸管幹細胞の性質が胎児よりも成人のものに近づいたことを示している可能性がある。

Novel hiSIECs では、**CYP3A4** や **SGLT1** の遺伝子発現が成人小腸に近づき、従来の **hiSIECs** よりも生体の小腸上皮細胞に近い性質を持つ可能性が示唆された。一方、**CYP2C9** や **CYP2C19** など一部の遺伝子については成人小腸の発現量を上回っており、これらはむしろ生体の小腸上皮を模倣できていない可能性がある。しかし、創薬における薬物動態試験や毒性試験に使用する **in vitro** 評価系には、**in vivo** で生じる現象を見逃すことなく検出できる高い感度も要求される。よって、成人小腸の遺伝子発現を超えていることは必ずしもデメリットになるとは限らず、目的に応じて **hiSIECs** の実際の機能を検討することが重要であるものと考ええる。

2.5 小括

本章では、より生体の小腸上皮細胞に近い特徴を有する hiSIECs を開発することを目的に PD98059、A 83-01、5AZA の添加期間の最適化と、ALI 培養の適用について検討を行なった。結果として、PD98059 と A 83-01 は従来通り分化終盤の 12 日間添加する必要があるのに対し、5AZA は分化中盤の 4 日間のみ添加し、終盤には除く方が薬物代謝酵素の発現が向上することが明らかとなった。さらに、分化の終盤に ALI 培養を適用することにより、従来よりも腸管関連マーカーの遺伝子発現と薬物代謝機能の高い hiSIECs を作製可能であることを示した。他の報告にあるヒト小腸と比較すると CYP3A4 をはじめとする薬物代謝酵素の活性は不十分であるものの、より小腸への分化に適したヒト iPS 細胞株を使用する等の検討次第では、小腸薬物代謝の予測精度の高い *in vitro* 評価系構築につながると考えられる。

3. F-hiSIEC™における新規分化誘導法の効果

3.1 緒言

前項では、ヒト iPS 細胞を小腸上皮細胞に分化する終盤に 5AZA を除き ALI 培養を適用することで、より薬物代謝機能の高い hiSIECs を作製可能であることを示した。富士フイルム株式会社から販売されている hiSIECs (F-hiSIEC™) は、PD98059、A 83-01、5AZA、forskolin の 4 因子を用いた hiSIECs 作製法の報告²¹⁾を基に、いくらかの改良を加えて作製されたものであり³⁷⁾、既に市販され企業等での使用実績もある。もし、前項で見出した新規分化誘導法が F-hiSIEC™にも有効であれば、より高機能なヒト小腸上皮細胞モデルの迅速な社会実装につながる。そこで、本章では、新規分化誘導法が F-hiSIEC™にも有効かどうか検討することを目的に、新規分化誘導法で培養した F-hiSIEC™の特徴について評価を行なった。

3.2 実験方法

3.2.1 試薬および細胞

F-hiSIEC™、seeding medium、culture medium は富士フイルム株式会社 (Tokyo, Japan) よりご提供いただいた。Matrigel matrix growth factor reduced は Corning より、human adult small intestine total RNA (5 donors, lot = C409285) は BioChain Institute より、DMSO および ammonium formate solution は Nacalai Tesque より、BSA、lucifer yellow、Image-iT FX Signal Enhancer、HBSS および BCA Protein Assay Kit は Life Technologies より、2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (MES) buffer、HEPES buffer、Triton X-100、phenacetin、acetaminophen および diclofenac は Merck より、paraformaldehyde は Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA) より、セルカルチャーインサート (ThinCert, 0.4μm pore size, translucent, 24-well plates) は Greiner Bio-One より、PBS (-) は TaKaRa Bio より、FBS は Nichirei Biosciences より、(S)-mephentoin は Enzo Life Sciences より、KAPA SYBR Fast qPCR Kit ABI Prism は Kapa Biosystems より、DMEM/F12、midazolam、ultrapure water および acetonitrile は FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries より、4'-hydroxydiclofenac および 4'-hydroxymephentoin は Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.より、1'-hydroxymidazolam は Cayman Chemical より、RNeasy Mini Kit、QIAshredder および RNase-Free DNase Set は QIAGEN より、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover は TOYOBO より、4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) は Dojindo (Kumamoto, Japan) より購入した。その他の試薬はすべて市販の特級または生化学用のものを用いた。

3.2.2 F-hiSIEC™の培養

F-hiSIEC™を、あらかじめ DMEM/F12 で 30 倍に希釈した Matrigel matrix growth factor reduced でコーティングしたセルカルチャーインサートに播種し、F-hiSIEC seeding medium で 24 h 培養した。その後、F-hiSIEC culture medium (conv. medium) または 5AZA を含まない new medium で 10 日間培養した。培養 4 日目から、ALI 培養を行う well にはインサート内に培地を入れずに培養を行なった。培地は 2-3 日ごとに交換し、37°C、5%CO₂/95% air で播種から 11 日間培養を行なった。模式図を Figure 7 に示した。

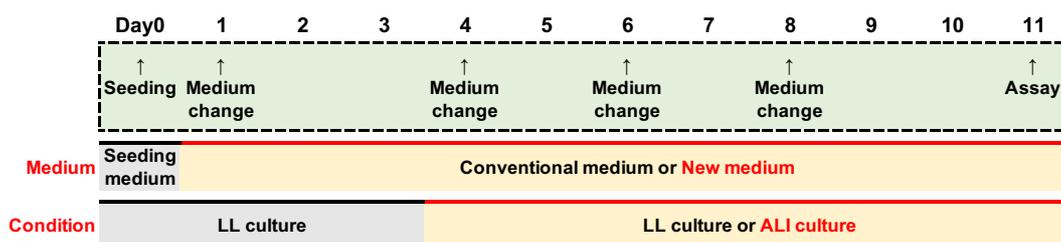


Figure 7. Experimental design of the F-hiSIEC™ culture. F-hiSIEC™ was seeded on cell culture inserts using the F-hiSIEC seeding medium (day 0). From day 1, the cells were cultured in the F-hiSIEC culture medium (conventional medium) or 5AZA-free medium (new medium). From day 4, the cells were cultured with or without medium on the apical side (LL culture and ALI culture, respectively). The medium was subsequently changed every 2 or 3 days. Each assessment was conducted on day 11.

3.2.3 RNA-Seq

RNeasy Mini Kit と QIAshredder、RNase-Free DNase Set の取扱説明書に従い、細胞の RNA を抽出した。抽出した RNA を Novogene Bioinformatics Technology Co., Ltd. (Beijing, China) にて、paired-end Illumina sequencing にかけることにより解析した。得られたデータについて、RaNA-Seq (<https://ranaseq.eu/index.php>) を利用し、以下に示す手順で分析した³⁸⁾。リードを *Homo sapiens* genome assembly GRCh38 をリファレンスゲノムとしてマッピングし、edgeR (quasi-likelihood F-test) により differential expression analysis を実施した。その後、probability (*P*) values <0.05 かつ $1 < \log_2$ (transcripts per million (TPM) of novel hiSIECs/TPM of conv. hiSIECs) を満たす遺伝子を抽出し、R ソフトウェア (4.0.3) を用いて Gene Ontology (GO) enrichment analysis を行なった。GO enrichment analysis には clusterProfiler package (3.18.1) の enrichGO function を利用し、以下の条件とした: keyType = “ENSEMBL”、OrgDb = org.Hs.eg.db、ont = “ALL”、pAdjustMethod = “BH”、qvalueCutoff = 0.05。

3.2.4 RNA 抽出および、RT-qPCR

2.2.4 と同様の方法により行なった。使用したプライマーの塩基配列を Table 4 に示す。

Table 4. Primer sequences used for RT-qPCR.

Gene name	Sense 5' → 3'	Antisense 5' → 3'
<i>ABCG8</i>	GCAGCTGGCTCAGTTCAAG	CACATCTAGCAAGGAGGCTCT
<i>AHR</i>	GCACGAGAGGCTCAGGTTATCA	GTGCATTAGACTGGACCCAAGTC
<i>APOA1</i>	ACTGTGTACGTGGATGTGCT	GCTTGCTGAAGGTGGAGGT
<i>APOA4</i>	CAGCCAGCTGAGCAACAATG	CGTAAGTGTTCACTTCTCCAAGTT
<i>ASAH2</i>	GGCATCCTCACCAGGCTATAC	CCTGAATGAGTGTGAGTGCCA
<i>NR1I3</i>	TGATCAGCTGCAAGAGGAGA	TGGATGTGCTGGATTTGGTA
<i>CD36</i>	GCCAGTTGGAGACCTGCTT	ACTTGAATGTTGCTGCTGTTCA
<i>CES2</i>	CTGGGGAGTCTTGTCCATGT	GGAAGGGAAGGTCATGTTGA
<i>CHGA</i>	TCCGACACACTTTCCAAGCC	TTCTGCTGATGTGCCCTCTC
<i>CYP1A1</i>	CCTCTTTGGAGCTGGGTTTG	GCTGTGGGGGATGGTGAA
<i>CYP1A2</i>	AGTGTCCAGCTCCTTCTGGAT	CTTTGACAAGAACAGTGTCCG
<i>CYP2C9</i>	GACATGAACAACCCTCAGGACTTT	TGCTTGTCGTCTCTGTCCCA
<i>CYP2C19</i>	GAACACCAAGAATCGATGGACA	TCAGCAGGAGAAGGAGAGCATA
<i>CYP3A4</i>	CTGTGTGTTTCCAAGAGAAGTTAC	TGCATCAATTTCTCCTGCAG
<i>ENPP7</i>	GTGAAGGCACGCTACATGAC	ACCTTGCTGGTGGTGTGT
<i>FABP2</i>	TTGGAAGGTAGACCGGAGTG	AGGTCCCCCTGAGTTCAGTT
<i>GP2</i>	CAATGTGCCTACCCACTGGA	AGCACGGACTCAACAGACAG
<i>HPRT1</i>	CTTTGCTTTCTTGGTCAGG	TCAAGGGCATATCCTACAACA
<i>LCT</i>	CTGCAGGCCTCAACAAGTCT	GGAAGCAACTCCTCTGTCTGC
<i>LGR5</i>	TGCTCTTCACCAACTGCATC	CTCAGGCTCACCAGATCCTC
<i>LYZ</i>	TCAATAGCCGCTACTGGTGT	AATGCCTTGTGGATCACGGA
<i>MGAM</i>	GGCATGATATGAATTGGAAGACCTG	GGTGCGGTAAGTGATGGCT
<i>MUC2</i>	AGAAGGCACCGTATATGACGAC	CAGCGTTACAGACACACTGCTC
<i>NPC1L1</i>	CTCCTGCTTGGCTTCTTCCA	CCACCTCGAAGTAGCGGTTT
<i>NR1I2</i>	AGGATGGCAGTGTCTGGAAC	AGGGAGATCTGGTCTCTCGAT
<i>SI</i>	GGTAAGGAGAAACCGGGAAG	GCACGTCGACCTATGGAAT
<i>SLC2A2</i>	AGAAGCATCGAGTGAGCAGAA	GCCAACTCCAATGGTTGCATA
<i>SLC2A5</i>	CGTTGCTGTGGTCTGTAACC	TTAAGATCGCAGGCACGATAGAA
<i>SLC5A1</i>	CAACATCGCCTATCCAACCT	TAAACAACCTTCCGGCAATC
<i>TREH</i>	ATTCAGTCACAGTCACAGCCA	TGGCATGTCCACAACTGCT
<i>VIL1</i>	AGCCAGATCACTGCTGAGGT	TGGACAGGTGTTCTCCTTC

3.2.5 TEER 値の測定

2.2.5 と同様の方法により行なった。

3.2.6 Lucifer yellow 膜透過試験

Apical 側の培地は 10 mM MES および 0.45 w/v% D-glucose を含み pH が 6.5 になるように調製した HBSS (HBSS-MES) に交換し、basal 側の培地は 10 mM HEPES および 0.45 w/v% D-glucose を含み pH が 7.4 になるように調製した HBSS (HBSS-HEPES) に交換して 20 min プレインキュベーションした。その後、apical 側を 125 μ M lucifer yellow を含む HBSS-MES に、basal 側を HBSS-HEPES に置換することで透過試験を開始した。Apical 側からは透過試験開始直後に、basal 側からは透過試験開始 60、90、120 min 時点でサンプリングし、各時点においてサンプリングした量と同量の HBSS-HEPES を basal 側に補充した。サンプリングした液中に含まれる lucifer yellow の量は、Nivo 3S (Perkin Elmer, Waltham, MA) を用いて、励起光波長 430 nm、蛍光波長 535 nm の条件で定量した。 P_{app} の算出は 2.2.8 の digoxin の場合と同様の方法により行なった。

3.2.7 免疫蛍光染色

細胞を 4% paraformaldehyde に 15 min 浸すことにより固定した後、0.1% Triton X-100 に 10 min 浸すことにより膜透過処理した。次に、Image-iT FX Signal Enhancer に 30 min 浸した後、5% FBS に 20 min 浸すことによりブロッキング処理した。続いて、ZO-1 (Life Technologies #33-9100) または E-cadherin (BD Transduction Laboratories #610181) の一次抗体と 5% FBS の 1:100 混合液に浸し、4°C で一晩インキュベートした。翌日、anti-mouse 二次抗体 (Life Technologies #A11001) と 5% FBS の 1:200 混合液に浸し、室温下で 60 min インキュベートした。その後、0.2 μ g/mL DAPI を含む PBS (-) に 5 min 浸すことによって細胞核を染色した。セルカルチャーインサートの膜を切り抜いてスライドガラス上に置き、SlowFade™ Diamond Antifade Mountant を滴下し、カバーガラスを被せることによりプレパラートとした。各操作の間には 3 回ずつ PBS (-) による洗浄を行ない、また、一次抗体のインキュベート以外の操作は室温下で行なった。観察は、all-in-one fluorescence microscope BZ-X800 (Keyence, Osaka, Japan) により行なった。

3.2.8 薬物代謝酵素活性および膜透過試験

Apical 側の培地は 10 mM MES および 0.45 w/v% D-glucose を含み pH が 6.5 になるように調製した HBSS (HBSS-MES) に交換し、basal 側の培地は 10 mM HEPES および 0.45 w/v% D-glucose を含み pH が 7.4 になるように調製した HBSS (HBSS-HEPES) に交換して 60 min プレインキューベーションした。その後、apical 側を 50 μ M phenacetin、5 μ M diclofenac、50 μ M (*S*)-mephénytoin、5 μ M midazolam、0.75% DMSO を含む HBSS-MES (150 μ L) に、basal 側を 0.75% DMSO を含む HBSS-HEPES (600 μ L) に置換することで試験を開始した。60 min 後に apical 側および basal 側からサンプリングし、液中に含まれる化合物量を LC-MS/MS により定量した。代謝活性は 60 min 後の apical および basal 液中に含まれる代謝物量を合計して算出した。また、estimated F_g 値は Michiba らが提案した方法³⁹⁾に改変を加えた (細胞内の代謝物量 $\text{metabolite}_{(\text{Intercellular})}$ が無視できる量であると仮定した) 以下の式により算出した。

$$F_g = \frac{\text{Substrate}_{(\text{Basolateral})}}{\text{Substrate}_{(\text{Basolateral})} + \text{Metabolite}_{(\text{Apical} + \text{Intercellular} + \text{Basolateral})}}$$
$$\doteq \frac{\text{Substrate}_{(\text{Basolateral})}}{\text{Substrate}_{(\text{Basolateral})} + \text{Metabolite}_{(\text{Apical} + \text{Basolateral})}}$$

3.2.9 LC-MS/MS による化合物の定量

薬物代謝酵素活性および膜透過試験で得られたサンプル 30 μ L に対し、内部標準の 10 ng/mL niflumic acid を含む acetonitrile 90 μ L を加え、さらに 50% acetonitrile 6 μ L と混和した。その後、1,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 min で遠心した上清を FastRemover for protein で濾過し、LC-MS/MS による解析に用いた。LC-MS/MS システムには QTRAP 6500 および Nexera XR を使用し、liquid chromatography カラムには ACQUITY UPLC BEH C18 column (1.7 μ m, 2.1 \times 50 mm) を 40 $^{\circ}$ C で使用した。移動相には 10 mM ammonium formate を含む ultrapure water (A) と acetonitrile (B) を使用し、流速は 0.4 mL/min とした。代謝物測定時の移動相の gradient は以下に示す条件とした: 0–0.01 min 2% B、0.01–3.50 min 2%–100% B、3.50–4.00 min 100% B、4.00–4.10 min 100%–2% B、4.10–5.50 min 2% B。また、基質薬物 (未変化体) 測定時の移動相の gradient は以下に示す条件とした: 0–0.01 min 2% B、0.01–3.50 min 2%–100% B、3.50–4.00 min 100% B、4.00–4.01 min 100%–2% B、4.01–5.50 min 2% B。Mass spectrometry 測定は以下に示す条件とした: positive ion

mode、550°C TIS temperature、5500 V ion spray voltage、30 psi curtain gas、12 psi collision gas、65 psi nebulizing gas、70 psi TIS gas。また、化合物ごとの詳細な測定条件は Table 5 に示す。

Table 5. Multiple reaction monitoring conditions for LC-MS/MS.

	Compounds	Ion mode	Q1 mass (Da)	Q3 mass (Da)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Substrates	Phenacetin	Positive	180.075	110	41	10	29	12
	Diclofenac	Positive	296.188	214	111	10	25	14
	(S)-Mephenytoin	Positive	219.046	133.9	66	10	37	16
	Midazolam	Positive	326.188	291.1	41	10	21	10
Metabolites	Acetaminophen	Positive	152.1	110	51	10	23	12
	4'-Hydroxydiclofenac	Positive	311.824	230	16	10	43	12
	4'-Hydroxymephenytoin	Positive	235.1	150.1	51	10	29	8
	1'-Hydroxymidazolam	Positive	342.107	203	81	10	35	12
Internal standard	Niflumic acid	Positive	283.014	245	51	10	41	14

3.2.10 統計解析

統計分析には、SPSS Statistics software version 25.0 を用いた。2 群比較には Student's *t*-test を、多重比較には Dunnett's test を実施した。

3.3 実験結果

3.3.1 F-hiSIEC™に対する new medium と ALI 培養の効果検証

F-hiSIEC™は、取扱説明書によれば解凍後各施設で1週間程度培養することにより分化を完了させる。そこで、F-hiSIEC™においても分化終盤に5AZAを除いた new medium と ALI 培養を行なった場合について、前項の Windy 株の場合と同様の効果が見られるか検討を行った (Figure 7)。その結果、F-hiSIEC™でも new medium と ALI 培養を組み合わせることにより、腸管上皮細胞マーカーである VIL1 や小腸上皮細胞マーカーである FABP2、SI、薬物代謝酵素の CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4、CES2、パネート細胞マーカーの LYZ、M 細胞マーカーの GP2 の遺伝子発現の増加が認められた (Figure 8)。一方、conv. medium 条件のまま ALI 培養を適用しても遺伝子発現に明らかな変化は認められなかった。また、LL 培養条件のまま new medium を適用すると、多くの腸管関連マーカーの遺伝子発現に上昇傾向が見られたが、ALI 培養と組み合わせた場合と比べると上昇幅は小さかった。

RT-qPCR の結果から、new medium と ALI 培養を組み合わせで作製した novel hiSIECs が従来法で作製した conv. hiSIECs より生体の小腸上皮細胞に近い遺伝子発現プロファイルを有する可能性が示唆された。そこで、novel hiSIECs の特徴を更に詳細に調べるため、予備解析ではあるが RNA-Seq による包括的な遺伝子発現解析を実施した。GO enrichment 解析の結果、novel hiSIECs では conv. hiSIECs に比べて脂質、コレステロール、糖質といった栄養素の吸収に関与する遺伝子の発現が高まっている可能性が示唆された (Figure 9)。その結果を受け、栄養素の吸収に関与する遺伝子の発現を RT-qPCR により評価したところ、RNA-Seq で発現増加が確認された遺伝子に加えて、コレステロールトランスポーターである Niemann-Pick C1-like protein 1 (NPC1L1) や二糖分解酵素である maltase-glucoamylase (MGAM)、lactase (LCT)、trehalase (TREH)、グルコーストランスポーターである solute carrier family 2 member 2/glucose transporter type 2 (SLC2A2/GLUT2)、solute carrier family 2 member 5/glucose transporter type 5 (SLC2A5/GLUT5) の遺伝子発現も上昇していることが確認された (Figure 10A-M)。さらに、核内受容体の遺伝子発現変化についても確認したところ、CYPs を転写制御している主要な核内受容体である aryl hydrocarbon receptor (AHR)、nuclear receptor subfamily 1 group I member 3/constitutive androstane receptor (NR1I3/CAR)、nuclear receptor subfamily 1 group I member 2/pregnane X receptor

(NR1I2/PXR) はいずれも novel hiSIECs で発現が上昇していた (Figure 10N-P)。

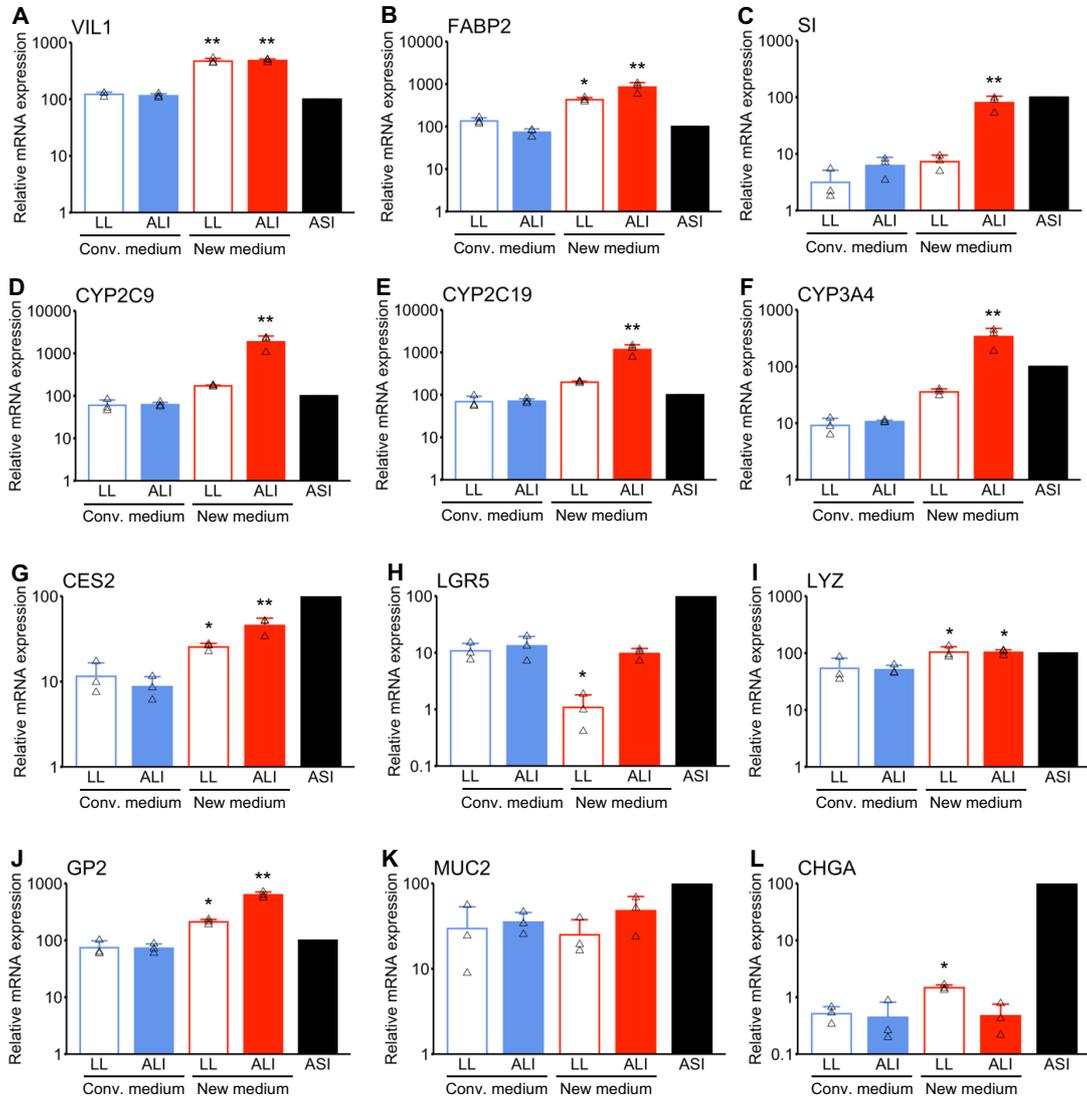


Figure 8. Effects of 5AZA removal from the culture medium and ALI culture. The mRNA expression levels were analyzed by RT-qPCR. The mRNA expression levels are represented relative to the level in the ASI, which is set to 100. HPRT1 was used as a housekeeping gene. All data are presented as the mean \pm S.D. ($n = 3$, ASI: $n = 1$). Data are representative of several independent experiments. Statistical significance levels compared with the LL + conv. medium group: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

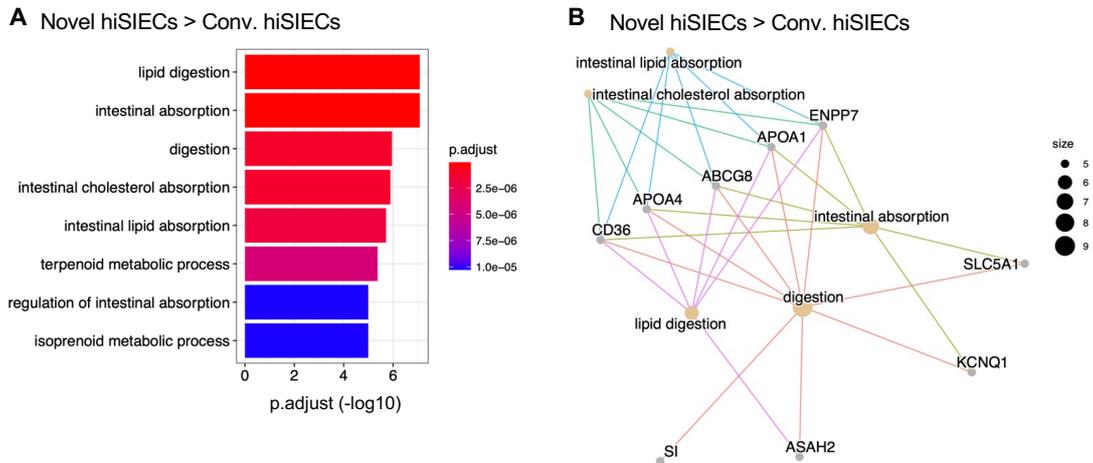
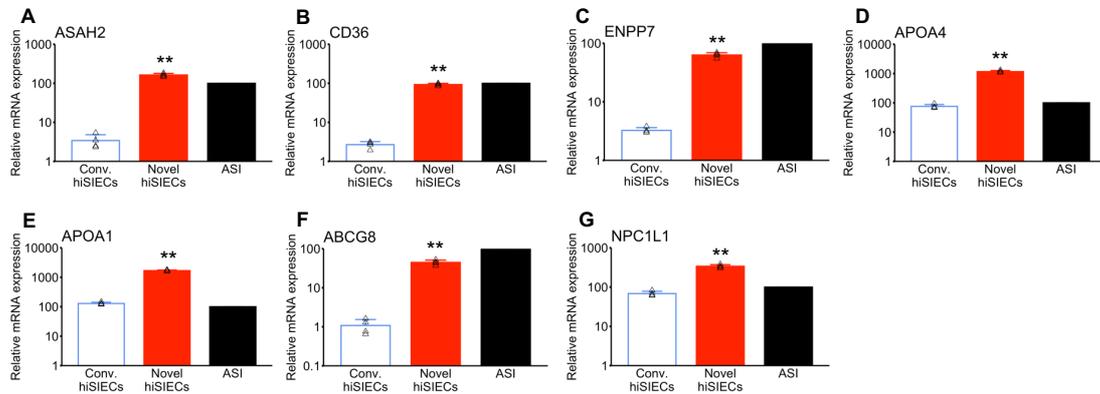
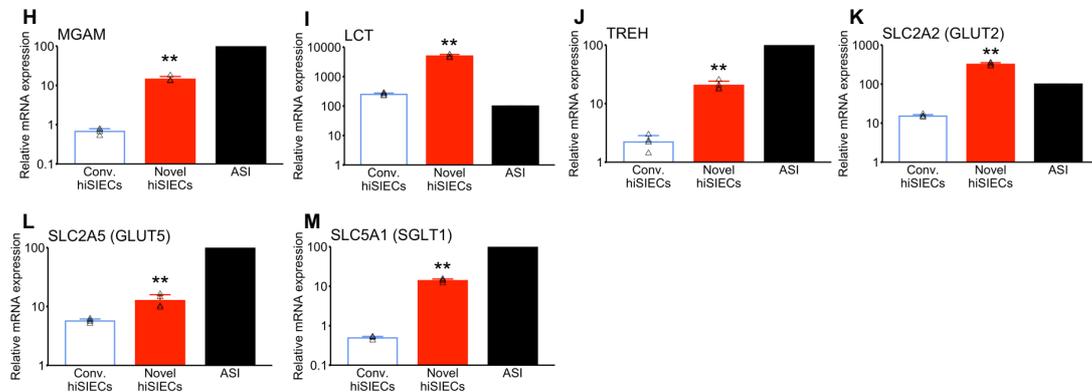


Figure 9. Comprehensive evaluation of gene expression in hiSIECs using RNA-Seq. GO enrichment analysis results from the RNA-Seq data. (A) bar plot. (B) cnet plot. Genes under analysis were selected by P values < 0.05 and $1 < \text{Log}_2(\text{TPM of novel protocol group}/\text{TPM of control group})$. $n = 1$ and confirmed the reproducibility of the results (B) using RT-qPCR. Conv. hiSIECs are cells cultured in LL + conv. medium, novel hiSIECs are cells cultured in ALI + new medium.

Lipids/Cholesterol



Carbohydrates



Nuclear receptors

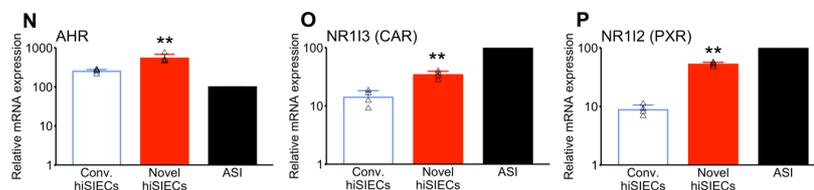


Figure 10. RT-qPCR analysis of genes involved in nutrient absorption in hiSIECs. The mRNA expression levels in hiSIECs were analyzed by RT-qPCR. The mRNA expression levels are represented relative to the level in the ASI, which is set to 100. HPRT1 was used as a housekeeping gene. All data are presented as the mean \pm S.D. ($n = 4$, ASI: $n = 1$). Data are representative of several independent experiments. Statistical significance levels compared with the conv. hiSIECs group: $**P < 0.01$. Conv. hiSIECs are cells cultured in LL + conv. medium, novel hiSIECs are cells cultured in ALI + new medium.

3.3.2 腸管バリア機能評価

腸管には、主に **tight junction** で強固に結合した一層の腸管上皮細胞と、その上を覆うムチン層によって形成され食物抗原や細菌毒素などが体内へ侵入することを防ぐバリア機能が備わっている。この腸管バリアは、薬物の傍細胞経路による吸収をも制限する機能を有しており、小腸における薬物の透過および吸収を評価するための *in vitro* 評価系には、適切なバリア機能が要求される。そこで、**novel hiSIECs** が腸管バリアを形成しているかどうかの評価を行なった。

はじめに、腸管バリアの主な構成要素である **tight junction** の強度を評価するため、TEER 値を測定した (Figure 11A)。その結果、**new medium** を使用した群は TEER 値が低くなる傾向が確認され、**novel hiSIECs** は分化終了時点で $264 \pm 2.72 \Omega \cdot \text{cm}^2$ を示した。TEER 値の結果から腸管バリア機能の破綻の可能性が危惧されたため、**lucifer yellow** を用いた膜透過試験を実施した。**Lucifer yellow** は小腸上皮をほとんど透過しないとされ、**tight junction** の評価に用いられる^{40,41)}。膜透過試験の結果、TEER 値の結果と反して、透過量は **novel hiSIECs** の方が **conv. hiSIECs** よりもむしろ低い結果となった (Figure 11B)。また、膜透過試験の結果から算出した **lucifer yellow** の $P_{\text{app}} (\times 10^{-6} \text{ cm/s})$ は、**conv. hiSIECs** で 0.33 ± 0.07 、**novel hiSIECs** で 0.20 ± 0.04 であった (Figure 11C)。さらに、腸管バリアを形成するタンパクの発現を免疫蛍光染色により調べた結果、一部蛍光が弱いところが認められるが **tight junction protein** である ZO-1 と **adherens junction protein** である E-cadherin の発現が確認された (Figure 11D)。

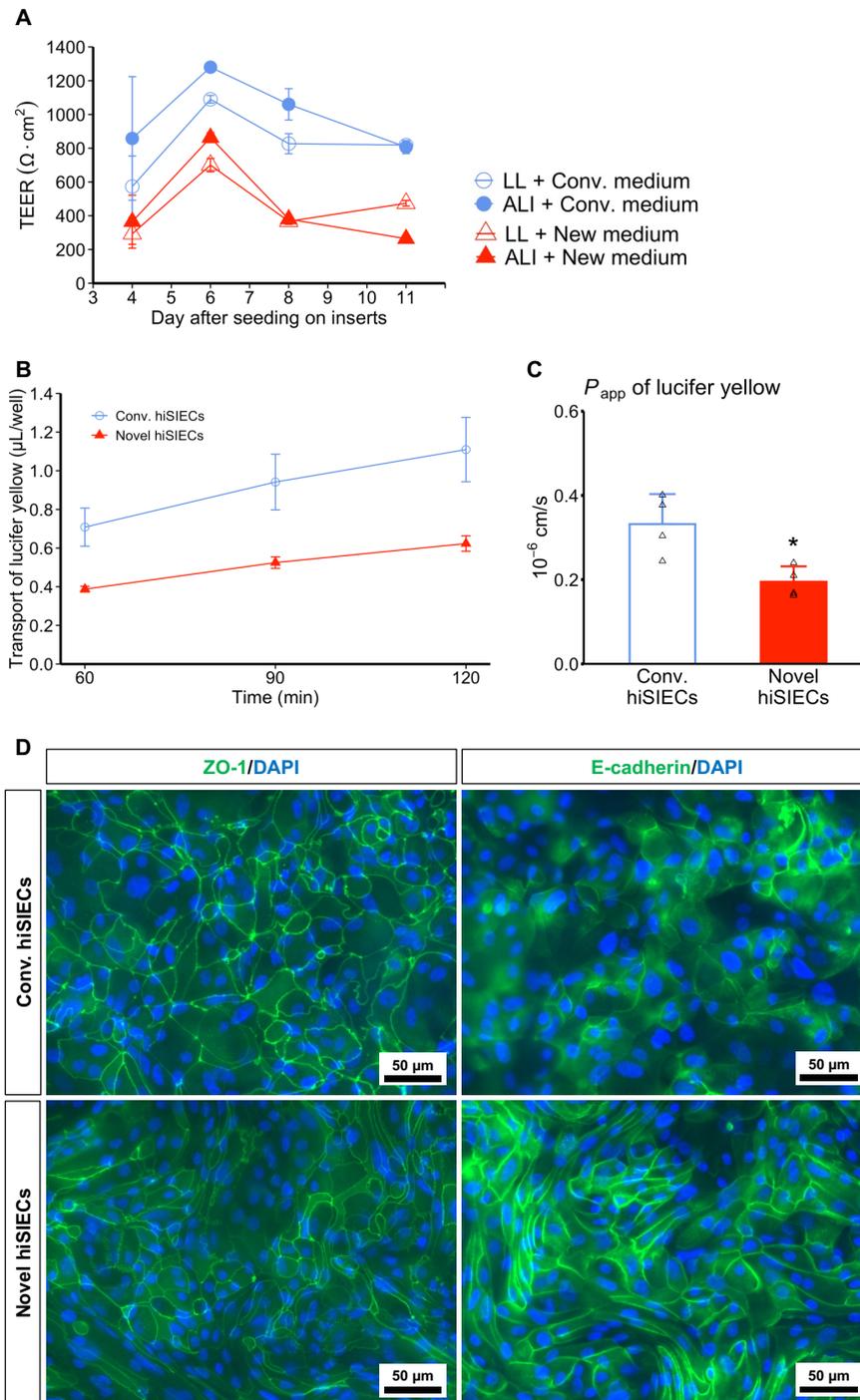


Figure 11. Evaluation of the intestinal epithelial barrier composed of hiSIECs. (A) TEER values during culture on the cell culture insert. The TEER values of ALI-cultured cells were measured after adding the same amount of medium on the apical side as in the LL group. The data are presented as mean \pm S.D. ($n = 3$). (B, C) Lucifer yellow membrane permeation test results and P_{app} values. The data are presented as mean \pm S.D. ($n = 4$). Statistical significance levels compared with the conv. hiSIECs group: * $P < 0.05$. (D) Immunofluorescence staining results. Scale bar, 50 μ m. (A–D) Data are representative of several independent experiments. Conv. hiSIECs are cells cultured in LL + conv. medium, novel hiSIECs are cells cultured in ALI + new medium.

3.3.3 薬物代謝酵素活性および膜透過試験

Novel hiSIECs は conv. hiSIECs と比較して小腸における主要な CYP の遺伝子発現が上昇していることと、小腸上皮として十分なバリア機能を有していることがここまでに示唆された。そこで、薬物代謝型 CYP の基質薬物をセルカルチャーインサート内 (apical 側) に添加し、一定時間後に apical 側および、basal 側に存在する化合物量を定量する方法で薬物代謝酵素活性および膜透過試験を実施し、薬物動態学的機能の評価を行なった。

まず、apical 側と basal 側に存在する代謝物の総量を調べることにより代謝酵素活性を評価した。その結果、novel hiSIECs の CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4/5 活性は conv. hiSIECs に比べてそれぞれ約 8.7 倍、6.7 倍、2.2 倍高かった (Figure 12A–C)。一方、novel hiSIECs の CYP1A1/2 活性は conv. hiSIECs の約 1/10 であった (Figure 12D)。これらの増減は、RNA-Seq および RT-qPCR の結果とも一致した (Figure 13)。なお、代謝酵素活性の標準化のために測定した well あたりの総タンパク量は novel hiSIECs で conv. hiSIECs の約 2.1 倍高かった (Table 6)。

次に、apical 側に存在する代謝物と、basal 側に存在する未変化体および代謝物の量を用いて、化合物の F_g 値を推算した (Table 7)。推算には、Michiba らが提案した式³⁹⁾に改変を加えた (細胞内の代謝物量が無視できると仮定した) ものをを用いた。その結果、diclofenac の estimated F_g 値は conv. hiSIECs で 0.98、novel hiSIECs で 0.68 であった。また、midazolam の推定 F_g 値は conv. hiSIECs で 0.94、novel hiSIECs で 0.74 であった。

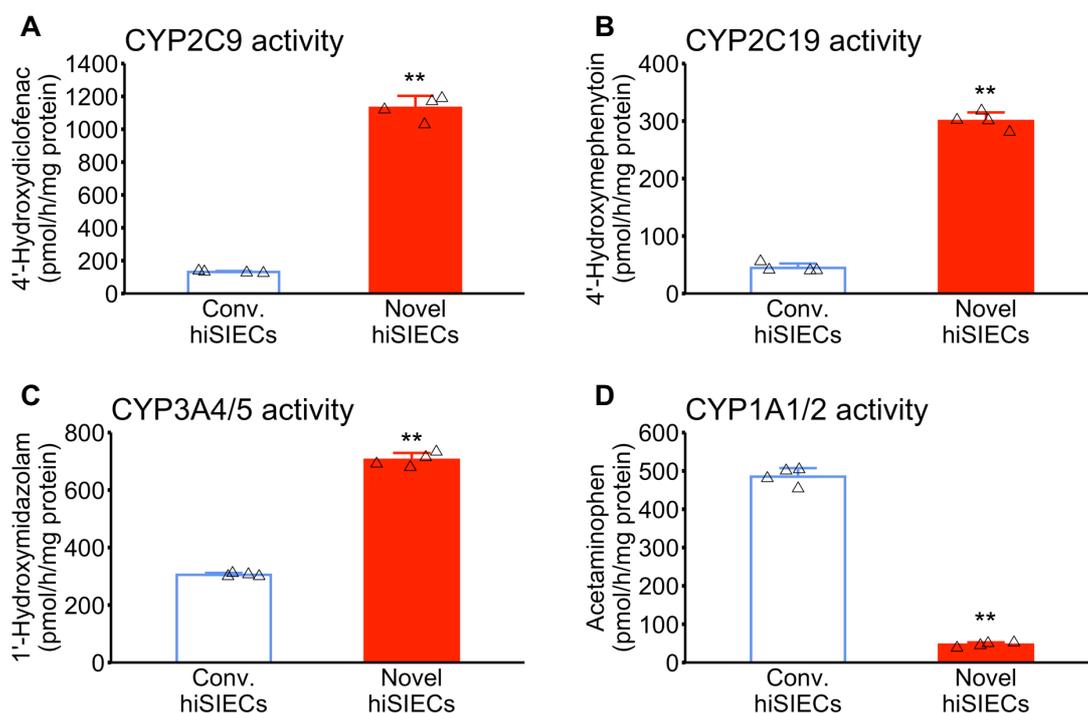


Figure 12. Drug metabolizing enzyme activities of hiSIECs. Drug metabolizing activities of CYP2C9 (A), CYP2C19 (B), CYP3A4/5 (C), and CYP1A1/2 (D) in conv. hiSIECs and novel hiSIECs. This experiment was performed using F-hiSIEC™. CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4/5, and CYP1A1/2 activities were examined by measuring the amounts of 4'-hydroxydiclofenac (produced from 5 μ M diclofenac), 4'-hydroxymephenytoin (produced from 50 μ M (*S*)-mephenytoin), 1'-hydroxymidazolam (produced from 5 μ M midazolam), and acetaminophen (produced from 50 μ M phenacetin), respectively. The values in the figure are the sum of the metabolites present in the apical and basal chambers, and all data are presented as the mean \pm S.D. ($n = 4$). Data are representative of several independent experiments. Statistical significance levels compared with the conv. hiSIECs group: ** $P < 0.01$. Conv. hiSIECs are cells cultured in LL + conv. medium, novel hiSIECs are cells cultured in ALI + new medium.

Table 6. Total protein contents of hiSIECs.

Group	mg protein/well
Conv. hiSIECs	0.0607 \pm 0.004
Novel hiSIECs	0.130 \pm 0.004

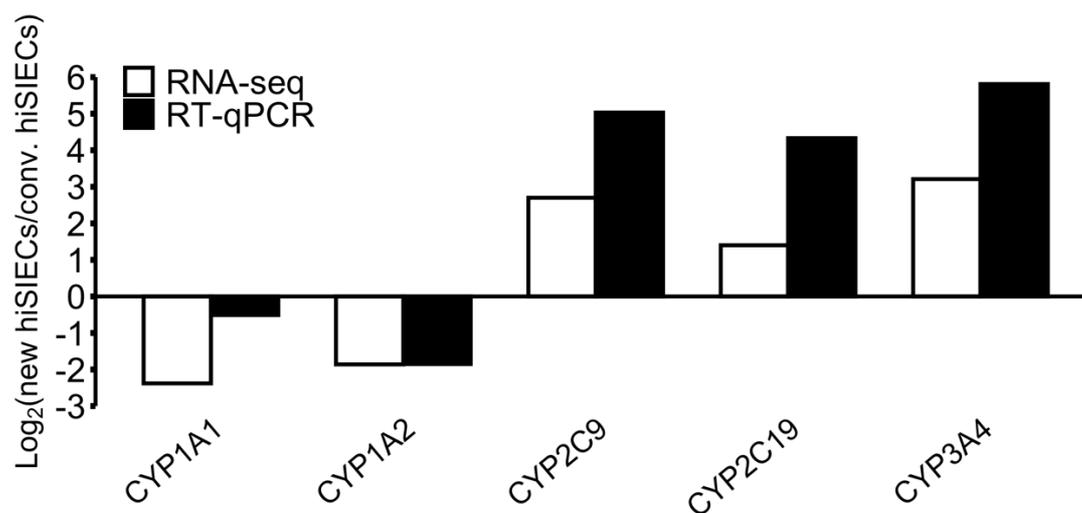


Figure 13. Gene expression changes of drug metabolizing enzymes. RNA-Seq data were calculated from TPM values ($n = 1$); RT-qPCR data were calculated from mean Cq values normalized to HPRT1 ($n = 3$). RT-qPCR results are representative of several independent experiments.

Table 7. Estimation of F_g values in hiSIECs. Estimation of F_g values of phenacetin (50 μ M), diclofenac (5 μ M), (*S*)-mephenytoin (50 μ M), and midazolam (5 μ M) in conv. hiSIECs and novel hiSIECs. ^bWe calculated the F_g values based on the estimation equation proposed by Michiba et al. ³⁹⁾, with a slight modification. All data are presented as mean \pm S.D. ($n = 4$). Data are representative of several independent experiments. ^aVarma et al. ⁴²⁾. Conv. hiSIECs are cells cultured in LL + conv. medium, novel hiSIECs are cells cultured in ALI + new medium.

Substrate	Metabolite	Enzyme	Group	Substrate _{Basolateral} / C_0 (μ L/h/well)	Metabolite _{Apical+Basolateral} / C_0 (μ L/h/well)	Estimated F_g ^a	In vivo human F_g value ^b
Phenacetin	Acetaminophen	CYP1A1/2	Conv. hiSIECs	68.5 \pm 3.24	0.588 \pm 0.0265	0.991 \pm 0.0006	-
			Novel hiSIECs	68.2 \pm 4.47	0.121 \pm 0.0137	0.998 \pm 0.00009	
Diclofenac	4'-Hydroxydiclofenac	CYP2C9	Conv. hiSIECs	80.1 \pm 2.77	1.59 \pm 0.108	0.981 \pm 0.001	0.64
			Novel hiSIECs	61.8 \pm 2.55	29.3 \pm 1.74	0.679 \pm 0.006	
(S)-Mephenytoin	4'-Hydroxymephenytoin	CYP2C19	Conv. hiSIECs	69.9 \pm 3.06	0.0536 \pm 0.00616	0.999 \pm 0.00007	-
			Novel hiSIECs	70.6 \pm 3.77	0.779 \pm 0.0506	0.989 \pm 0.0007	
Midazolam	1'-Hydroxymidazolam	CYP3A4/5	Conv. hiSIECs	41.1 \pm 1.80	2.58 \pm 0.165	0.941 \pm 0.003	0.55
			Novel hiSIECs	35.7 \pm 2.77	12.3 \pm 0.646	0.743 \pm 0.006	

3.4 考察

本章では、新規分化誘導法で培養した F-hiSIEC™ について評価を行なった。その結果、F-hiSIEC™ の培養においても 5AZA を含まない new medium を用い ALI 培養を適用すると、腸管上皮マーカーや薬物代謝酵素の遺伝子発現が増加した (Figure 8)。よって、前項で開発した新規法は F-hiSIEC™ に対しても有効であると考えられる。また、conv. hiSIECs と novel hiSIECs について、さらに RNA-Seq による包括的な遺伝子発現の違いを比較した。今回検体数が $n = 1$ であるため予備的な結果ではあるが、GO enrichment 解析の結果脂質、コレステロール、糖質といった栄養素の吸収に関与する遺伝子の発現が向上していることが示唆され (Figure 9)、RT-qPCR にてそれを裏付ける結果が得られた (Figure 10A–M)。栄養素吸収は小腸の主要な機能の一つであるため、この結果は novel hiSIECs が conv. hiSIECs よりもヒト生体小腸上皮をよく再現できている可能性を示唆している。さらに、この変化は、hiSIECs の成熟を示唆している可能性もある。小腸上皮細胞は、絨毛の陰窩部分に局在する小腸幹細胞からの分裂から分化が始まり、絨毛の下部から上部へとスライドしていくにつれて分化・成熟が進み、最後に絨毛上部から脱落する⁴³⁾。そのため、小腸上皮細胞の特性は、絨毛の底部領域と頂部領域で異なり、特に栄養吸収に関与する因子は、絨毛底部よりも絨毛頂部でより多く発現しているとされる^{44, 45)}。これらを踏まえると、novel hiSIECs は conv. hiSIECs よりも絨毛頂部領域の小腸上皮細胞に近い性質を有するようになったとも考えられる。

New medium で培養した hiSIECs は、conv. medium で培養したものより低い TEER 値を示した (Figure 11A)。しかし、lucifer yellow を用いた膜透過試験では、novel hiSIECs において conv. hiSIECs よりも低い P_{app} を示した (Figure 11B, C)。この結果から、novel hiSIECs は低い TEER 値を示すものの、tight junction に破綻が生じているわけではないことが明らかである。実際のところ、ヒト小腸上皮の TEER 値は $40\text{--}100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ であるとの報告があり^{34, 35)}、これは conv. hiSIECs よりも novel hiSIECs の方に近い値となっている。なお、TEER 値と lucifer yellow の膜透過試験の結果が矛盾した原因については今回検討していないが、conv. hiSIECs と novel hiSIECs で細胞間隙の構造や細胞膜の性質が変化し、矛盾を生じたものとする。TEER 値は tight junction 強度のみを反映するものではなく、細胞間隙空間や細胞膜の電気抵抗値も関与する⁴⁶⁾。よって、これら tight junction 強度以外の要因によって TEER 値は低下を示したものの、lucifer yellow の透過は

tight junction により制限を受けたのではないかと推察する。実際、novel hiSIECs においても ZO-1 と E-cadherin の発現が免疫蛍光染色により確認され、tight junction や adherens junction の形成が示唆された (Figure 11D)。ただし、視野内のいくつかの領域で蛍光の弱い部分が観察された。これは、novel hiSIECs が部分的に嵩高い細胞から構成されており、細胞表面の高さが不均一となっているためであると考えている。

RT-qPCR の結果、novel hiSIECs は CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 を高発現していた (Figure 8D–F)。実際に、novel hiSIECs の CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4/5 の活性は、conv. hiSIECs よりも高かった (Figure 12A–C)。核内受容体の CAR および PXR は CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 の発現を制御することが知られている⁴⁷⁾。CAR と PXR の遺伝子発現変化を調べると、いずれも novel hiSIECs において conv. hiSIECs よりも高かった (Figure 10O, P)。よって、これらの薬物代謝酵素の発現増加には CAR と PXR の増加が関与している可能性がある。

一方、小腸ではほとんど発現しないとされる CYP1A1/2 の活性は novel hiSIECs で減少した (Figure 12D)。これらは、RNA-Seq および、RT-qPCR の結果とも一致した (Figure 13)。本研究では初代ヒト小腸上皮細胞を用いておらず活性値を直接比較できないが、PD98059、A 83-01、5AZA、forskolin を用いて作製した hiSIECs の CYP1A1/2 活性は初代ヒト小腸上皮細胞よりも高い値を示すことが報告されており²¹⁾、novel hiSIECs の代謝酵素活性プロファイルがヒト小腸上皮細胞に近づいた可能性が考えられる。

PD98059、A 83-01、5AZA、forskolin を用いて作製した hiSIECs に関しては、以下の式:

$$F_a (\times F_g) = 1 - e^{-P_{sf} \times P_{app}} \quad (P_{sf}: \text{scaling factor})$$

を用いて、単純拡散する化合物の P_{app} と in vivo の F_a とを比較すると、Caco-2 細胞よりも高い相関性を示すことが報告されている²¹⁾。しかし、CYP3A4/5 により代謝を受ける化合物に関しては、上記の相関曲線から大きく外れるという問題点が指摘されている。原因として、未変化体のまま basal 側へと透過する割合が高い、すなわち P_{app} の値が高いことが考えられている。そこで、midazolam の見かけの膜透過クリアランスを確認すると conv. hiSIECs で $41 \pm 1.8 \mu\text{L/h/well}$ 、novel hiSIECs で $36 \pm 2.8 \mu\text{L/h/well}$ と減少傾向は見られたものの明らかな改善は認められなかった (Table 7)。一方、Michiba らは、膜透過クリアランスと F_a - F_g の相関曲線が化合物の F_g に影響される可能性を指摘し、 F_g を予測するための新しい式

を提案している³⁹⁾。そこで、この式を基礎とし、細胞内に蓄積する代謝物量が無視できる量であると仮定した上で estimated F_g 値を算出した (Table 7)。その結果、diclofenac と midazolam について、novel hiSIECs の系から算出された estimated F_g 値は、conv. hiSIECs の系で算出された値よりも低く、in vivo の F_g 値の報告に近づいた。CYP2C9 および CYP3A4 は、小腸における CYP の約 95% を占めることから⁷⁾、これらの予測が正確に行えらるとすれば、novel hiSIECs はヒト小腸における CYP に代謝される薬物の動態評価に有用であることが考えられる。ただし、本研究における estimated F_g の算出は、細胞内代謝物量が無視できる程度であること、基質が単一の CYP 分子種により単一の代謝物に代謝されること、二次代謝物が生成されていないこと、といった多くの前提が存在している。また、conv. hiSIECs と novel hiSIECs の代謝酵素活性を比較すると、タンパク質量あたりの代謝酵素活性の変化率 (Figure 12) と代謝クリアランスの変化率 (Table 7) は大きく異なっている。これは well あたりのタンパク質量が異なっていることに起因する (Table 6)。従って、代謝クリアランスの値から算出している estimated F_g の差は、直接 conv. hiSIECs と novel hiSIECs の薬物代謝能力の差を反映しているというよりは、あくまで細胞の搭載された chip としての性能差を表すものと考えられるべきかもしれない。さらに、今回使用した estimated F_g の算出方法は代謝経路が未知の化合物に適用できないため、創薬に hiSIECs を応用するにあたっては代謝経路未知の化合物の F_g をどのように予測するかを今後考えなければならない。これらのことから、 F_g の予測性については、より詳細な検討を行っていく必要があるものと考えられる。

3.5 小括

本章では、市販されている hiSIECs である F-hiSIEC™ に対し、5AZA を含まない new medium と ALI 培養を適用することで、新規分化誘導法で培養した F-hiSIEC™ にも有効かどうか検討することを目的に、新規分化誘導法で培養した F-hiSIEC™ の特徴について評価を行なった。その結果、novel hiSIECs は小腸の主要な薬物代謝酵素である CYP2C9、CYP3A4、CES2 などの遺伝子発現が向上した。また、小腸の主要な機能の一つである栄養素吸収に関与する遺伝子の発現も増加した。さらに、novel hiSIECs は ZO-1 と E-cadherin を発現すると同時に、lucifer yellow の透過を低く抑え、十分な腸管バリア機能を有していることが示唆された。加えて、novel hiSIECs は CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 の高い活性を示した。CYP 以外の活性や F_g 予測性についてはさらなる研究が必要であるが、novel hiSIECs はより生体の小腸上皮細胞に近い特徴を有するものと考えられる (Figure 14)。

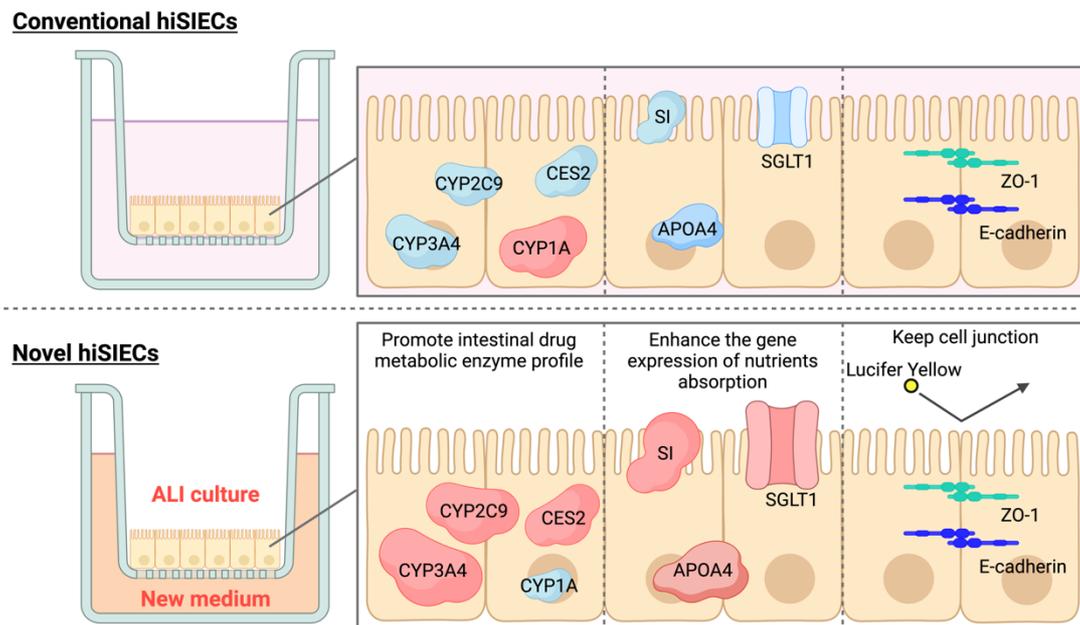


Figure 14. Graphical abstract of this study. Created with BioRender.com.

4. 総括

本研究では、5AZA を従来よりも短期間の添加に留め ALI 培養を適用することで、高い薬物代謝活性を有する hiSIECs を作製することに成功した。また、その新規分化誘導法で作製した hiSIECs は、CES2 や栄養素吸収に関わる因子の遺伝子発現も向上しており、よりヒト生体小腸上皮細胞に近い hiSIECs となっているものと考えられる。CYP 以外の活性や F_g 予測性についてはさらなる研究が必要であるが、本研究で得られた hiSIECs は、経口薬開発をはじめとする消化管薬物動態研究の発展に大きく寄与するものと考えられる。本研究で得られた知見が今後、消化管薬物動態研究に活用されていくことを期待する。

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。

本研究の遂行に際し、格別の御配慮と御激励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 鈴木匡 教授に深甚なる謝意を表します。

本論文作成にあたり、種々の有益な御助言と御校閲を賜りました、名古屋市立大学大学院薬学研究科薬物動態制御学分野 湯浅 博昭 教授、名古屋市立大学大学院薬学研究科レギュラトリーサイエンス分野 頭金 正博 教授、ならびに名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞情報学分野 井上 靖道 准教授に深謝いたします。

本研究の遂行に際し、有益な御助言とご協力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 坂下真大 講師、堀英生 講師に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、RNA-Seq に関する御指導、御助言を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科病態解析学分野 青木啓将 助教に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、親身なる御指導、有益な御助言を賜りました、邱施萌 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、ヒト iPS 細胞をご供与頂きました国立成育医療研究センター研究所 阿久津英憲 博士、宮川世志幸 博士、大喜多肇 博士、清河信敬 博士、豊田雅士 博士ならびに、梅澤明弘 博士に謹んで御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、F-hiSIECT™とその培地をご供与頂きました富士フイルム株式会社に謹んで御礼申し上げます。

本研究の一部は、科学技術振興機構「科学技術イノベーション創出に向けた大学フェロシップ創設事業」により実施されたものです。ここに記して感謝の意を表します。

大学学部生の私に研究の基礎を教えてください、大学院進学を御助言くださいました、前東北医科薬科大学教授 永田清 先生に謹んで御礼申し上げます。

最後に、研究途上終始あたたかな励ましとご協力をいただ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ならびに薬学部臨床薬学教育研究センターの卒業生、在室生ならびに研究員に感謝致します。

引用文献

- 1) Soul-Lawton J, Seaber E, On N, Wootton R, Rolan P, Posner J: Absolute bioavailability and metabolic disposition of valaciclovir, the L-valyl ester of acyclovir, following oral administration to humans. *Antimicrob Agents Chemother*, **39**, 2759–2764 (1995).
- 2) Ganapathy ME, Huang W, Wang H, Ganapathy V, Leibach FH: Valaciclovir: a substrate for the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochem Biophys Res Commun*, **246**, 470–475 (1998).
- 3) Lown KS, Bailey DG, Fontana RJ, Janardan SK, Adair CH, Fortlage LA, Brown MB, Guo W, Watkins PB: Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J Clin Invest*, **99**, 2545–2553 (1997).
- 4) Li H, Wang X, Wang Y, Zhang M, Hong F, Wang H, Cui A, Zhao J, Ji W, Chen YG: Cross-species single-cell transcriptomic analysis reveals divergence of cell composition and functions in mammalian ileum epithelium. *Cell Regen*, **11**, 19 (2022).
- 5) European Commission. "Ban on animal testing.": <https://single-market-economy.ec.europa.eu/sectors/cosmetics/ban-animal-testing_en>, accessed 30 Oct, 2023.
- 6) Wadman M: FDA no longer has to require animal testing for new drugs. *Science*, **379**, 127–128 (2023).
- 7) Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC: The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos*, **34**, 880–886 (2006).
- 8) Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y, Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Yee SW, Zamek-Gliszczynski MJ, Zhang L: Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*, **9**, 215–236 (2010).
- 9) Grossmann J, Maxson JM, Whitacre CM, Orosz DE, Berger NA, Fiocchi C, Levine AD: New isolation technique to study apoptosis in human intestinal epithelial cells. *Am J Pathol*, **153**, 53–62 (1998).
- 10) Nakamura T, Sakaeda T, Ohmoto N, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Kamigaki T, Nakamura T, Kim KI, Kim SR, Kuroda Y, Matsuo M, Kasuga M, Okumura K: Real-time quantitative polymerase chain reaction for MDR1, MRP1, MRP2, and CYP3A-mRNA levels in Caco-2 cell lines, human duodenal enterocytes, normal colorectal tissues, and colorectal adenocarcinomas. *Drug Metab Dispos*, **30**, 4–6 (2002).
- 11) Kabeya T, Matsumura W, Iwao T, Hosokawa M, Matsunaga T: Functional analysis of

- carboxylesterase in human induced pluripotent stem cell-derived enterocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **486**, 143–148 (2017).
- 12) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, **131**, 861–872 (2007).
 - 13) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**, 663–676 (2006).
 - 14) Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H: Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, **459**, 262–265 (2009).
 - 15) Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar MF, Vallance JE, Tolle K, Hoskins EE, Kalinichenko VV, Wells SI, Zorn AM, Shroyer NF, Wells JM: Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*, **470**, 105–109 (2011).
 - 16) Takahashi Y, Sato S, Kurashima Y, Yamamoto T, Kurokawa S, Yuki Y, Takemura N, Uematsu S, Lai CY, Otsu M, Matsuno H, Osawa H, Mizushima T, Nishimura J, Hayashi M, Yamaguchi T, Kiyono H: A refined culture system for human induced pluripotent stem cell-derived intestinal epithelial organoids. *Stem Cell Reports*, **10**, 314–328 (2018).
 - 17) Onozato D, Ogawa I, Kida Y, Mizuno S, Hashita T, Iwao T, Matsunaga T: Generation of budding-like intestinal organoids from human induced pluripotent stem cells. *J Pharm Sci*, **110**, 2637–2650 (2021).
 - 18) Kabeya T, Qiu S, Hibino M, Nagasaki M, Kodama N, Iwao T, Matsunaga T: Cyclic AMP signaling promotes the differentiation of human induced pluripotent stem cells into intestinal epithelial cells. *Drug Metab Dispos*, **46**, 1411–1419 (2018).
 - 19) Takayama K, Negoro R, Yamashita T, Kawai K, Ichikawa M, Mori T, Nakatsu N, Harada K, Ito S, Yamada H, Yamaura Y, Hirata K, Ishida S, Mizuguchi H: Generation of human iPSC-derived intestinal epithelial cell monolayers by CDX2 transduction. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, **8**, 513–526 (2019).
 - 20) Yoshida S, Honjo T, Iino K, Ishibe R, Leo S, Shimada T, Watanabe T, Ishikawa M, Maeda K, Kusuhara H, Shiraki N, Kume S: Generation of human-induced pluripotent stem cell-derived functional enterocyte-like cells for pharmacokinetic studies. *Stem Cell Reports*, **16**, 295–308 (2021).
 - 21) Kabeya T, Mima S, Imakura Y, Miyashita T, Ogura I, Yamada T, Yasujima T, Yuasa H, Iwao T, Matsunaga T: Pharmacokinetic functions of human induced pluripotent stem cell-derived small

- intestinal epithelial cells. *Drug Metab Pharmacokinet*, **35**, 374–382 (2020).
- 22) Iwao T, Kodama N, Kondo Y, Kabeya T, Nakamura K, Horikawa T, Niwa T, Kurose K, Matsunaga T: Generation of enterocyte-like cells with pharmacokinetic functions from human induced pluripotent stem cells using small-molecule compounds. *Drug Metab Dispos*, **43**, 603–610 (2015).
 - 23) Prytherch Z, Job C, Marshall H, Oreffo V, Foster M, BeruBe K: Tissue-specific stem cell differentiation in an in vitro airway model. *Macromol Biosci*, **11**, 1467–1477 (2011).
 - 24) Huang J, Hume AJ, Abo KM, Werder RB, Villacorta-Martin C, Alysandratos KD, Beermann ML, Simone-Roach C, Lindstrom-Vautrin J, Olejnik J, Suder EL, Bullitt E, Hinds A, Sharma A, Bosmann M, Wang R, Hawkins F, Burks EJ, Saeed M, Wilson AA, Muhlberger E, Kotton DN: SARS-CoV-2 infection of pluripotent stem cell-derived human lung alveolar type 2 cells elicits a rapid epithelial-intrinsic inflammatory response. *Cell Stem Cell*, **27**, 962–973 e967 (2020).
 - 25) Ootani A, Li X, Sangiorgi E, Ho QT, Ueno H, Toda S, Sugihara H, Fujimoto K, Weissman IL, Capecchi MR, Kuo CJ: Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat Med*, **15**, 701–706 (2009).
 - 26) Lemieux E, Boucher MJ, Mongrain S, Boudreau F, Asselin C, Rivard N: Constitutive activation of the MEK/ERK pathway inhibits intestinal epithelial cell differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **301**, G719–730 (2011).
 - 27) Zavadil J, Bottinger EP: TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*, **24**, 5764–5774 (2005).
 - 28) Habano W, Gamo T, Terashima J, Sugai T, Otsuka K, Wakabayashi G, Ozawa S: Involvement of promoter methylation in the regulation of Pregnane X receptor in colon cancer cells. *BMC Cancer*, **11**, 81 (2011).
 - 29) Christman JK: 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, **21**, 5483–5495 (2002).
 - 30) Juttermann R, Li E, Jaenisch R: Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11797–11801 (1994).
 - 31) Stevens KM: Oxygen requirements for liver cells in vitro. *Nature*, **206**, 199 (1965).
 - 32) Evenou F, Fujii T, Sakai Y: Spontaneous formation of highly functional three-dimensional multilayer from human hepatoma Hep G2 cells cultured on an oxygen-permeable polydimethylsiloxane membrane. *Tissue Eng Part C Methods*, **16**, 311–318 (2010).
 - 33) Walaas GA, Gopalakrishnan S, Bakke I, Skovdahl HK, Flatberg A, Ostvik AE, Sandvik AK,

- Bruland T: Physiological hypoxia improves growth and functional differentiation of human intestinal epithelial organoids. *Front Immunol*, **14**, 1095812 (2023).
- 34) Sjoberg A, Lutz M, Tannergren C, Wingolf C, Borde A, Ungell AL: Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique. *Eur J Pharm Sci*, **48**, 166–180 (2013).
- 35) Takenaka T, Harada N, Kuze J, Chiba M, Iwao T, 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*, **42**, 1947–1954 (2014).
- 36) Yu Q, Kilik U, Holloway EM, Tsai YH, Harmel C, Wu A, Wu JH, Czerwinski M, Childs CJ, He Z, Capeling MM, Huang S, Glass IA, Higgins PDR, Treutlein B, Spence JR, Camp JG: Charting human development using a multi-endodermal organ atlas and organoid models. *Cell*, **184**, 3281–3298 e3222 (2021).
- 37) 富士フイルム株式会社. "ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞 F-hiSIECTM.": <<https://www.fujifilm.com/jp/ja/business/regenerative/ips-cells/f-hisiec>>, accessed 29 Nov, 2023.
- 38) Prieto C, Barrios D: RaNA-Seq: Interactive RNA-Seq analysis from FASTQ files to functional analysis. *Bioinformatics*, **36**, 1955–1956 (2019).
- 39) Michiba K, Maeda K, Shimomura O, Miyazaki Y, Hashimoto S, Oda T, Kusuhara H: Usefulness of human jejunal spheroid-derived differentiated intestinal epithelial cells for the prediction of intestinal drug absorption in humans. *Drug Metab Dispos*, **50**, 204–213 (2022).
- 40) Zhao W, Han L, Bae Y, Manickam DS: Lucifer yellow - A robust paracellular permeability marker in a cell model of the human blood-brain barrier. *J Vis Exp*, e58900 (2019).
- 41) Rozehnal V, Nakai D, Hoepner U, Fischer T, Kamiyama E, Takahashi M, Yasuda S, Mueller J: Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. *Eur J Pharm Sci*, **46**, 367–373 (2012).
- 42) Varma MV, Obach RS, Rotter C, Miller HR, Chang G, Steyn SJ, El-Kattan A, Troutman MD: Physicochemical space for optimum oral bioavailability: contribution of human intestinal absorption and first-pass elimination. *J Med Chem*, **53**, 1098–1108 (2010).
- 43) Cui S, Chang PY: Current understanding concerning intestinal stem cells. *World J Gastroenterol*, **22**, 7099–7110 (2016).
- 44) Moor AE, Harnik Y, Ben-Moshe S, Massasa EE, Rozenberg M, Eilam R, Bahar Halpern K, Itzkovitz S: Spatial reconstruction of single enterocytes uncovers broad zonation along the intestinal villus axis. *Cell*, **175**, 1156–1167 e1115 (2018).

- 45) Beumer J, Puschhof J, Yengej FY, Zhao L, Martinez-Silgado A, Blotenburg M, Begthel H, Boot C, van Oudenaarden A, Chen YG, Clevers H: BMP gradient along the intestinal villus axis controls zonated enterocyte and goblet cell states. *Cell Rep*, **38**, 110438 (2022).
- 46) Powell DW: Barrier function of epithelia. *Am J Physiol*, **241**, G275–288 (1981).
- 47) Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H: Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol*, **82**, 667–715 (2008).