



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬学）
報告番号	甲第1703号
学位記番号	第349号
氏名	壁谷 知樹
授与年月日	平成31年3月25日
学位論文の題名	ヒト iPS 細胞を用いた小腸における薬物動態予測評価系の構築
論文審査担当者	主査： 湯浅 博昭 副査： 松永 民秀，青山 峰芳，井上 靖道

氏 名	壁谷 知樹
学位の種類	博士（薬学）
学位の番号	薬博第 349 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	ヒト iPS 細胞を用いた小腸における薬物動態予測評価系の構築
論文審査委員	（主査）教授 湯浅 博昭 （副査）教授 松永 民秀・教授 青山 峰芳・准教授 井上 靖道

## 論文内容の要旨

### 【序論】

非臨床試験の段階で経口バイオアベイラビリティ ( $F_{oral}$ ) を出来るだけ精度良く予測し、薬効と安全性を確保することは、医薬品開発の成功の確率を上げる重要な因子の一つである。 $F_{oral}$  は、消化管での吸収率 ( $F_a$ )、代謝回避率 ( $F_g$ ) および肝臓での代謝回避率 ( $F_h$ ) の積で計算される。そのため、薬物動態における小腸の寄与は大きく、薬物代謝酵素および薬物トランスポーターを考慮した消化管吸収過程の評価の重要性が高まっている。経口投与された医薬品の吸収過程の評価には、ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞が広く利用されている。しかしながら Caco-2 細胞は、ヒト正常小腸と比較して薬物代謝酵素 CYP3A4 の発現がほとんど認められていないだけでなく、プロドラッグの代謝に関わるカルボキシルエステラーゼ (CES) の発現パターンや、医薬品の透過特性に差異があることが知られている。小腸における薬物代謝および膜透過過程を評価するには、ヒト初代小腸細胞の利用が望ましいが、これは入手自体が極めて困難である。したがって、ヒト小腸における薬物動態を正確に予測するために、ヒト正常小腸と同等の機能を有したヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の作製が期待されている。

これまでに我々は、ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化誘導に、transforming growth factor (TGF) - $\beta$  受容体阻害剤、DNA methyltransferase (DNMT) 阻害剤、mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) 阻害剤が有用であることを報告した。この方法により分化した小腸上皮細胞は、小腸に発現する薬物代謝酵素の活性や、PEPT1 および BCRP のトランスポーター活性が認められた。また、膜透過試験により得られた見かけの膜透過係数 ( $P_{app}$ ) と  $F_a$  の間には良好な相関が認められ、ヒト消化管における  $F_a$  の予測が可能であることが示唆された。しかしながら、CES の機能解析について行われていないことや、小腸の主要な機能である P-gp を介した輸送活性や、CYP3A4 による代謝活性が不十分であった。

そこで本論文の前半では、ヒト iPS 細胞から分化誘導した小腸上皮細胞における CES の機能解析を行い、その機能について Caco-2 細胞と比較し得られた知見について論ずる。本論文の後半では、ヒト iPS 細胞から分化誘導した小腸上皮細胞の分化成熟および機能の向上に、cAMP シグナルの活性化が有用であることを示す。さらに、確立した新規の分化誘導法により作製された小腸上皮細胞の機能に関して、ヒト初代小腸細胞および Caco-2 細胞と比較して得られた知見について論ずる。

## 【本論】

### 1. ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の CES の機能解析

CES は、医薬品の代謝やプロドラッグの生体内変化に関わる重要な加水分解酵素である。CES には複数のアイソフォームが存在し、ヒト小腸での CES による加水分解は、CES1A よりも CES2A1 の寄与が大きい。本研究室で確立した方法によりヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞を作製し、CES の遺伝子およびタンパク質発現を解析した。これらの発現量を Caco-2 細胞、ヒト小腸またはヒト肝臓と比較したところ、遺伝子発現量解析によるヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞での CES1A の発現は、ヒト小腸と同程度であった。一方、Caco-2 細胞では 10 倍以上の発現が認められた。CES2A1 に関しては、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞と Caco-2 細胞は同程度の発現量であった。また、Western blotting 解析によるタンパク質発現解析においても、遺伝子発現量と同様に、CES1A の発現は Caco-2 細胞よりも低く、CES2A1 に関しては、両細胞間で同程度であった。これらの結果から、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の CES の発現パターンは、Caco-2 細胞よりも、ヒト小腸に類似していることが示唆された。

次に、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞と Caco-2 細胞における CES の代謝活性を比較した。CES1A と CES2A1 では、基質特異性が異なっているため、各細胞から S9 を調製し、CES の各アイソフォームに対して非選択的な基質である *p*-nitrophenyl acetate (PNPA)、CES1A の基質である monoethylglycylxylidide (MEGX) および CES2A1 の基質である aspirin を使用して、加水分解活性を評価した。その際に、CES1A および CES2A1 の阻害剤である digitonin および telmisartan を用いて、代謝活性への影響について評価した。

PNPA を基質として加水分解活性を測定したところ、どちらの細胞でも経時的な代謝物量の増加が認められた。PNPA 加水分解活性は、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞よりも Caco-2 細胞の方が高かった。ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞においては、digitonin よりも telmisartan による阻害の程度が有意に大きかった。一方、Caco-2 細胞における PNPA 加水分解活性は、digitonin および telmisartan により同程度阻害された。CES1A の基質である MEGX を使用したところ、その代謝物が Caco-2 細胞において検出され、経時的に代謝物の増加が認められた。その活性は digitonin により有意に阻害された。一方、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞において、MEGX の代謝物は認められなかった。CES2A1 の基質である aspirin を使用したところ、どちらの細胞でも経時的な代謝物量の増加が認められた。CES2A1 の活性は両細胞間で同程度であり、どちらの細胞においてもその活性は、digitonin よりも telmisartan によって顕著に強く阻害された。

以上の結果から、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞において、CES による加水分解は CES2A1 が主に関わっていることが示唆された。一方、Caco-2 細胞においては、CES1A および CES2A1 の両方が関わっていることが示唆された。

### 2. cAMP シグナルは、ヒト iPS 細胞の小腸上皮細胞への分化誘導を促進する

ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化誘導に与える cAMP シグナルの影響を調べるために、異なる作用機序にて細胞内 cAMP 濃度を高める化合物、8-bromo-cAMP (8-Br-cAMP) と 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) を選択し、分化誘導時に添加した。ヒト iPS 細胞から小腸幹細胞まで分化誘導した細胞に各化合物を 72 時間処理したところ、腸の発生に重要な転写因子である CDX2、GATA6 の陽性細胞数割合が、vehicle 群と比較して各化合物添加群で有意に増加した。8-Br-cAMP と IBMX を組み合わせて分化誘導させたところ (8-Br-cAMP+IBMX 群)、腸管マーカーである Villin1、CDX2、DPP4、FABP2 および ISX、核内受容体である PXR、薬物代謝酵素である CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 および CES2A1、薬物トランスポーターである ABCB1/MDR1、SLC15A1/PEPT1、ABCG2/BCRP および SLC5A1/SGLT1 の mRNA 発現が vehicle 群と比較して有意に増加した。さらに、小腸上皮細胞マーカーだけでなく、腸を構成する杯細胞およびパネート細胞のマーカー遺伝子の発現量も有意に増加した。

次に 8-Br-cAMP+IBMX 群において、薬物代謝活性および薬物トランスポーター活性について解析した。各 CYP 分子種、UGT および SULT に対する基質を使用し、反応後の代謝物量を測定したところ、vehicle 群と比較して小腸での代謝寄与の大きい分子種である CYP3A4 の代謝活性が 3.7 倍、CYP2C9 の代謝活性が 78 倍、CYP2C19 の代謝活性が 48 倍、UGT の代謝活性が 1.9 倍増加した。一方、小腸での代謝寄与の小さい分子種である CYP1A および CYP2B6 の薬物代謝活性は有意に低下した。また、CYP3A4 の誘導剤である  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (VD3) および rifampicin を 48 時間処理して CYP3A4 の誘導能について解析を行った。8-Br-cAMP+IBMX 群において、VD3 および rifampicin による CYP3A4 の mRNA

発現および活性の有意な誘導が認められた。一方、Caco-2 細胞では、VD3 による誘導しか認められなかった。さらに、グリシルサルコシンを基質として、PEPT1 の活性を測定したところ、vehicle 群と比較して 8-Br-cAMP+IBMX 群の輸送活性は有意に増加した。その活性は阻害剤であるイブプロフェンの処理や 4℃条件下で有意に低下した。

以上の結果から、cAMP シグナルの活性化は、ヒト iPS 細胞の小腸への分化誘導を促進し、小腸上皮細胞の機能を向上させることが示唆された。

最後に、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の薬物動態に関する機能をヒト初代小腸細胞および Caco-2 細胞と比較した。分化誘導したヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の Villin 陽性細胞の割合は 90%以上であり、電子顕微鏡による観察では微絨毛が認められた。Midazolam を基質としてヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の CYP3A4 の 1'-水酸化活性を測定したところ、約 1,200 pmol/2 h/mg protein であった。この活性はヒト初代小腸細胞と同等以上であり、Caco-2 細胞と比較して 200 倍以上高かった。経上皮電気抵抗値は、分化誘導が進むにつれて増加し、分化誘導終了時には  $250\text{--}350\ \Omega \times \text{cm}^2$  となった。Digoxin を基質として P-gp の輸送活性を測定したところ、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の apical-to-basal  $P_{\text{app}}$  および basal-to-apical  $P_{\text{app}}$  はそれぞれ、 $7.9 \pm 0.7$  および  $32.8 \pm 0.2 (\times 10^{-6} \text{ cm/sec})$  であった。これより算出した efflux ratio (ER) は 4.2 となり、排出方向優位な輸送が認められた。一方、P-gp の阻害剤を添加することで ER は 0.8 まで低下した。同様に Hoechst33342 を基質として BCRP の活性を測定したところ、apical-to-basal  $P_{\text{app}}$  および basal-to-apical  $P_{\text{app}}$  はそれぞれ、 $1.9 \pm 0.1$  および  $72.1 \pm 14.2 (\times 10^{-6} \text{ cm/sec})$  であった。これより算出した ER は 37.9 となり、排出方向優位な輸送が認められた。一方、BCRP の阻害剤を添加することで ER は 9.2 まで低下した。これらの結果により、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞は、ヒト初代小腸細胞と同等の代謝能と、既存の評価系である Caco-2 細胞と同等な排出トランスポーター機能を有した小腸上皮様細胞であることが明らかとなった。

## 【結論】

1. ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の CES の発現パターンおよび加水分解活性において、Caco-2 細胞よりもヒト小腸に類似していることが明らかとなった。したがって、CES による代謝を含めた医薬品の消化管吸収の新規評価系としてヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞が有用であることが示唆された。
2. ヒト iPS 細胞の小腸への分化誘導時に細胞内の cAMP シグナルを活性化させることで、腸の発生に関わる転写因子の発現を増加させ、分化誘導を促進し、薬物代謝酵素および薬物トランスポーターなどの機能を向上させることが明らかとなった。したがって cAMP シグナルは、ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化誘導に関与する重要なシグナル経路であることが示唆された。
3. 新たに確立した分化誘導法により作製されたヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞は、ヒト初代小腸細胞と同等の代謝能と排出トランスポーター機能を有していることが明らかとなった。ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞は、既存の評価系である Caco-2 細胞よりも、代謝能および膜透過特性の面で優れているため、様々な化合物の  $F_a$  および  $F_g$  をより高い予測精度で評価できることが示唆された。

本研究により、生体から入手困難な小腸上皮細胞をヒト iPS 細胞から作製し、吸収と代謝を同時に評価可能な新規の小腸評価系を開発することに成功した。本評価系は、優れた動態特性を有する化合物を選択する際の小腸における吸収過程の評価系として有用であり、創薬研究に多大なる影響を与えるものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

経口投与された医薬品の吸収過程の評価には、ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞が広く利用されている。しかしながら Caco-2 細胞は、ヒト正常小腸と比較して薬物代謝酵素 CYP3A4 の発現がほとんど認められていないだけでなく、プロドラッグの代謝に関わる CES の発現パターンや、医薬品の透過特性に差異があることが知られている。また、小腸における薬物代謝および膜透過過程を評価するには、ヒト初代小腸細胞の利用が望ましいが、これは入手自体が極めて困難で

ある。本研究は、高い増殖性を有し、生体を構成する様々な細胞に分化可能なヒト iPS 細胞から、生体に近い機能を有する小腸上皮細胞への分化誘導法の開発を目的としている。

本研究により得られたヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞は、CES の発現パターンおよび加水分解活性において、Caco-2 細胞よりもヒト小腸に類似していることを明らかとした。その結果、CES による代謝を含めた医薬品の消化管吸収の新規評価系としてヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞が有用であることが示唆された。また、ヒト iPS 細胞の小腸への分化誘導時に細胞内の cAMP シグナルを活性化させることで、腸の発生に関わる転写因子の発現を増加させ、分化誘導を促進し、薬物代謝酵素および薬物トランスポーターなどの機能を向上させることを明らかとした。その結果、cAMP シグナルは、ヒト iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化誘導に関与する重要な系であることが示唆された。さらに、新たに確立した分化誘導法により作製されたヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞は、ヒト初代小腸細胞と同等の代謝能と排出トランスポーター機能を有していることが明らかとなった。本研究にて見出された方法により分化誘導された小腸上皮細胞は、生体に近い機能を有することから、小腸モデル細胞として創薬研究等に利用されることが期待される。

上記の研究は、ヒト iPS 細胞から生体に近い機能を有する小腸上皮細胞を分化誘導する方法を明らかにしたものであり、分化誘導研究で重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。よって本研究者は、博士（薬学）の学位を得る資格があると認める。