

消化管評価モデルとしての 利活用に向けた ヒトiPS細胞由来腸管細胞の開発

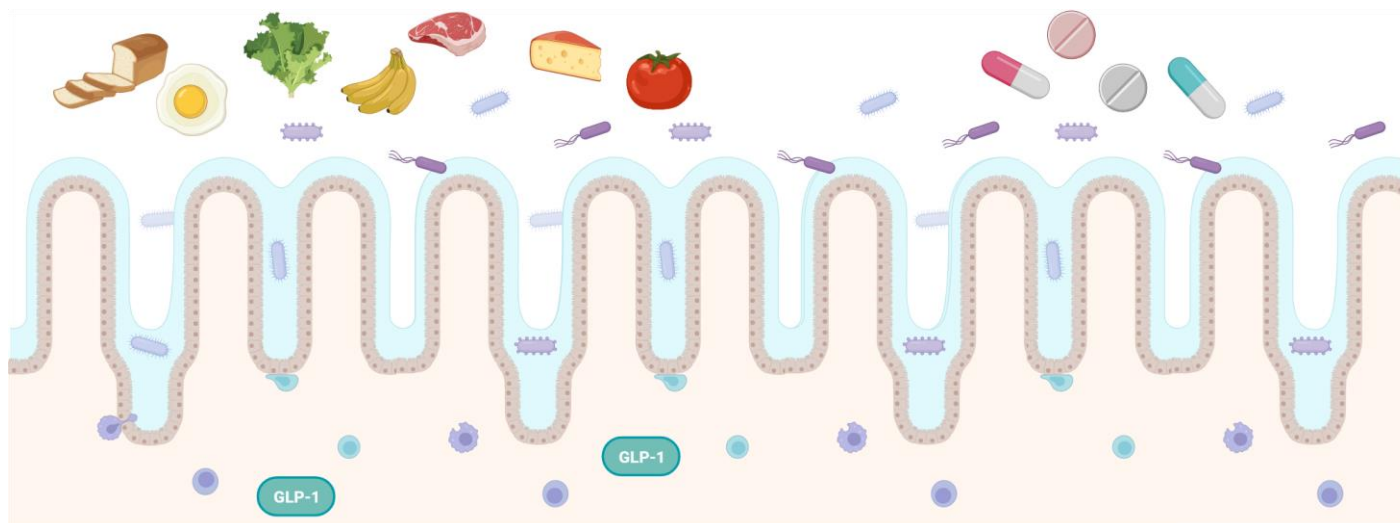
名古屋市立大学 大学院薬学研究科
臨床薬学分野

准教授 岩尾岳洋

2023年10月24日

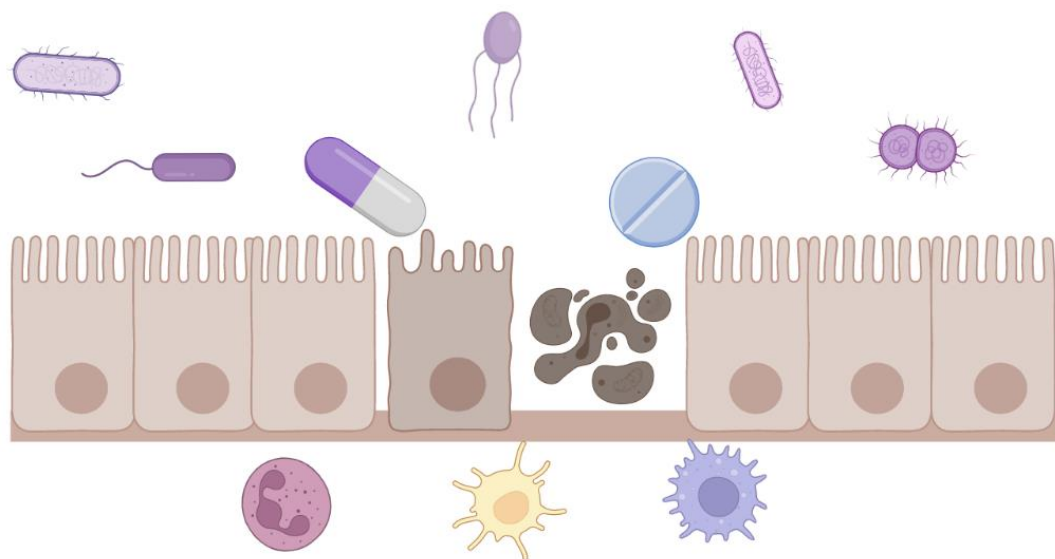
小腸は多彩な役割をもつ重要な臓器

- 食物の消化や吸収
- 医薬品などの物質の吸収や代謝
- 外来異物に対するバリア機能
- 腸管免疫（パイエル板）
- ホルモンの分泌（インクレチン）

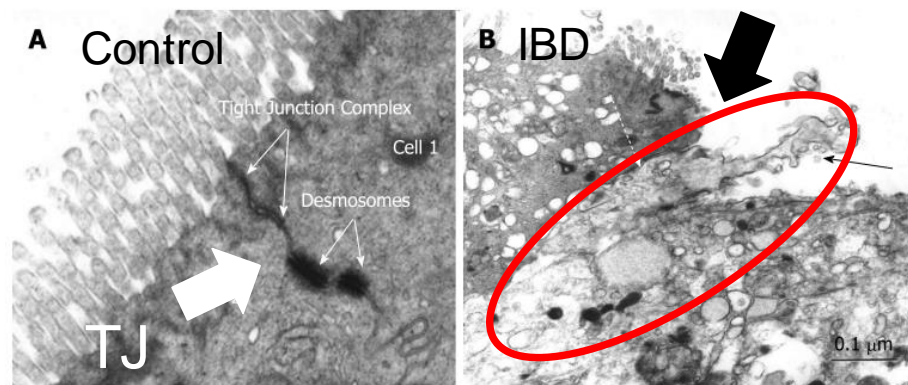


消化管の障害

消化管障害による バリア破綻



炎症性腸疾患 (IBD) での 上皮障害

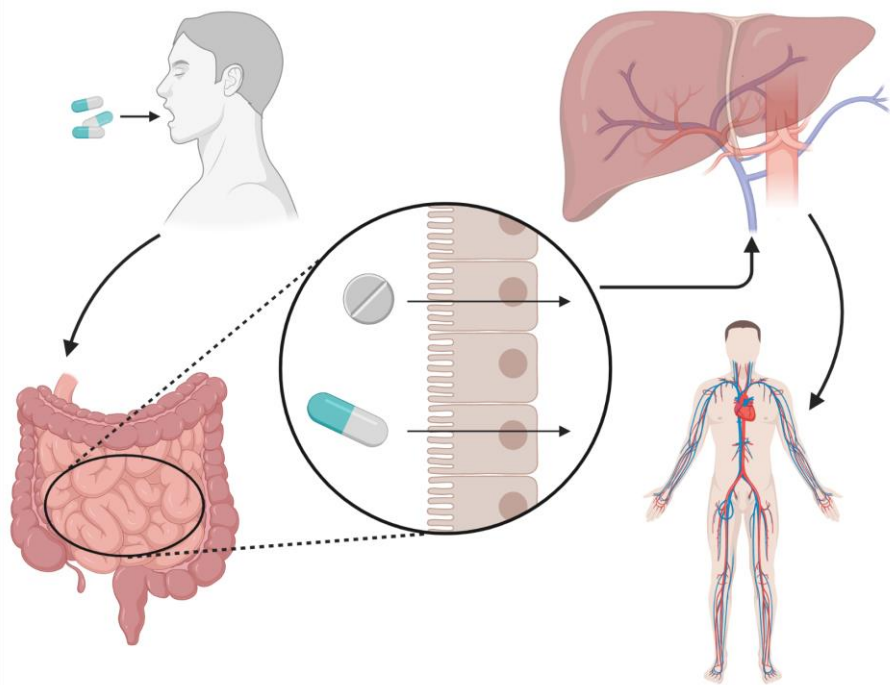


TJ: Tight junction

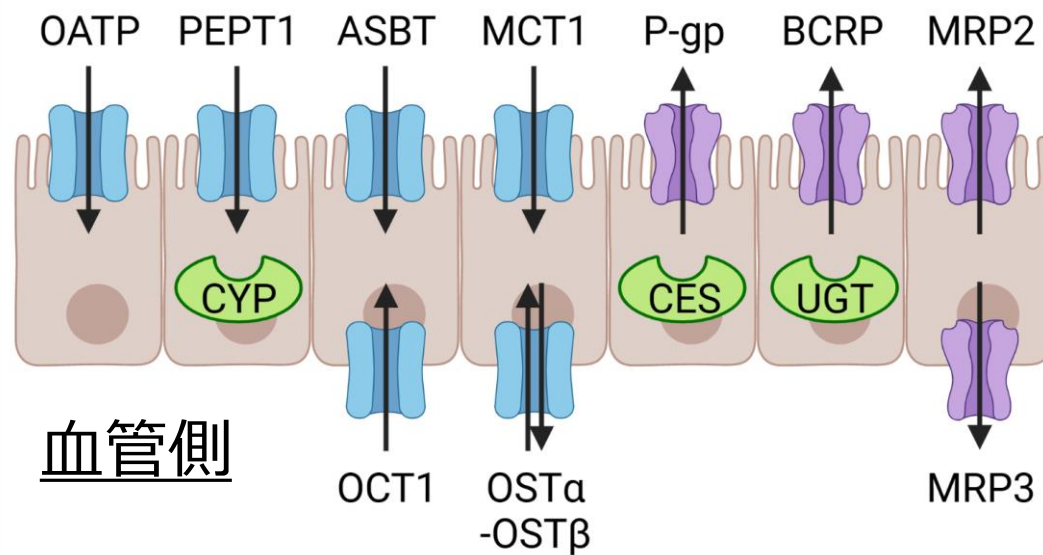
(Landy, Ronde et al. 2016)

消化管のバリア機能の低下 → 健康への影響

経口投与された医薬品の消化管吸収



小腸管腔側

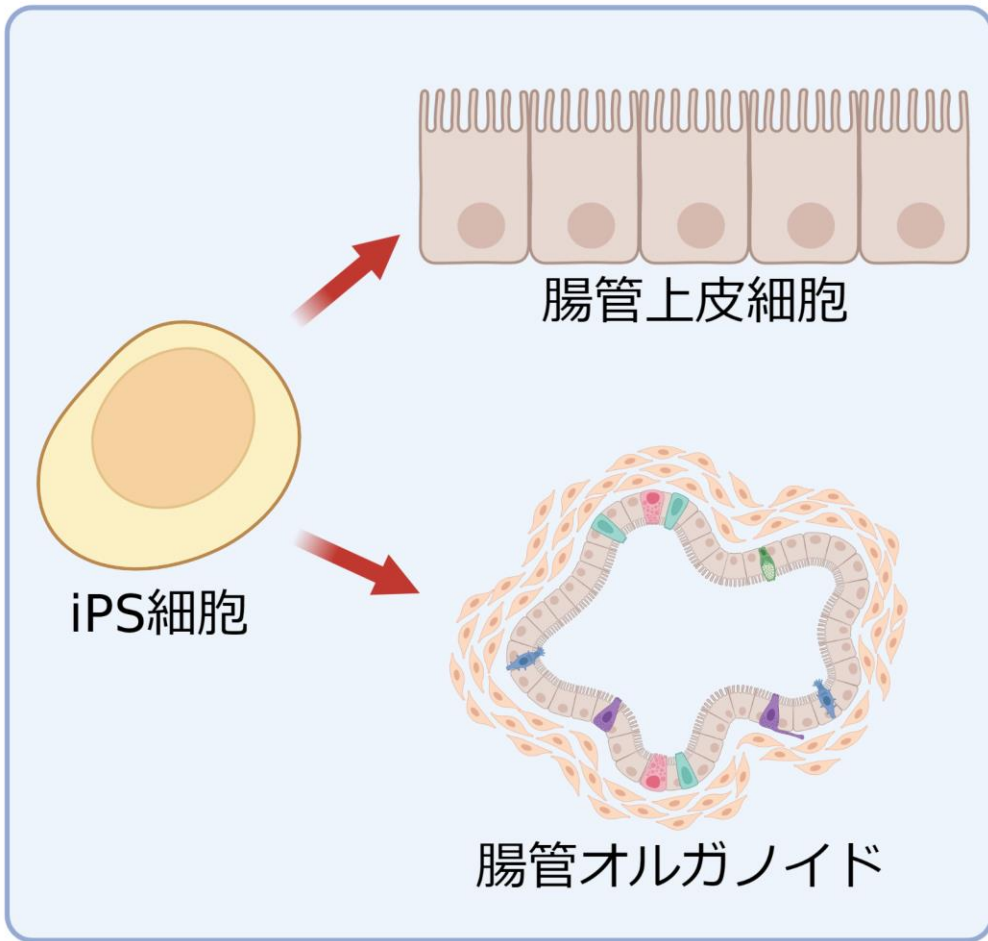


- 多くの医薬品は経口投与される
- 消化管には多くの薬物トランスポーターや薬物代謝酵素が発現している
- 経口投与された医薬品の効果や副作用の発現に影響を与える

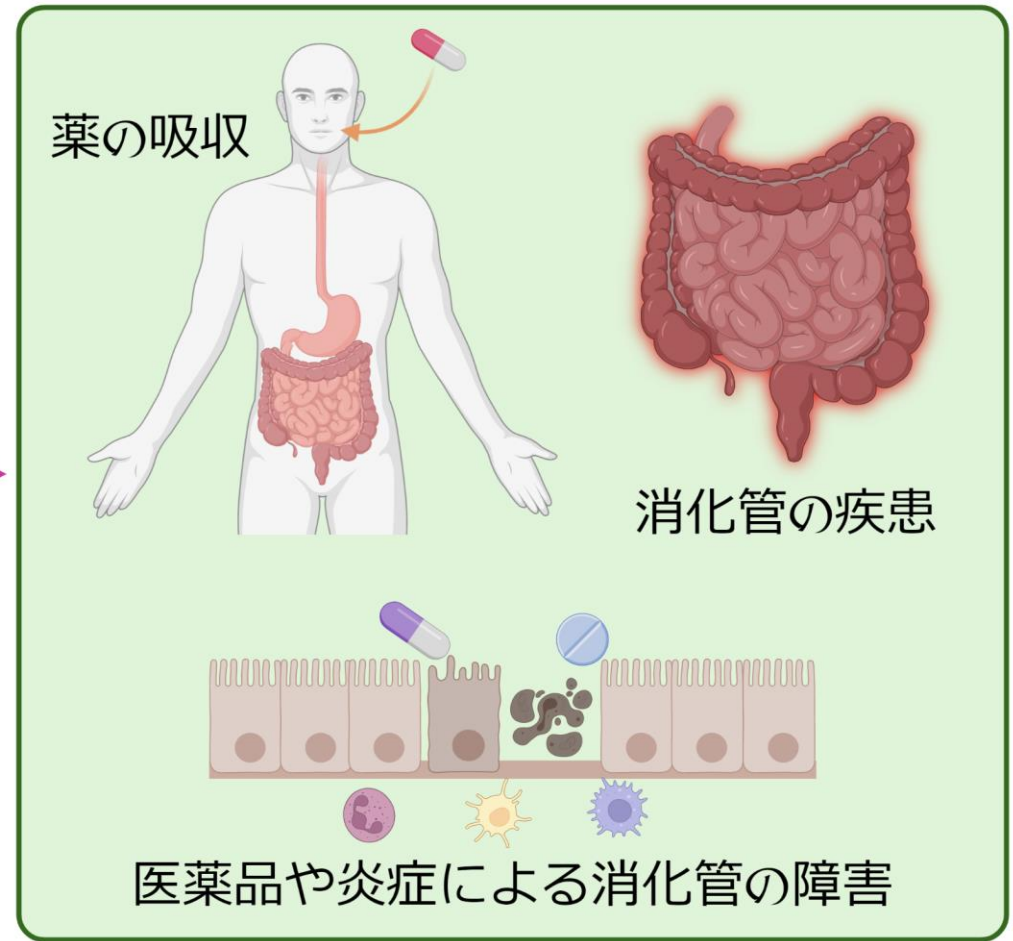
従来技術とその問題点

- Caco-2細胞（結腸がん由来細胞株）は遺伝子の発現パターンや機能がヒトの小腸とは異なる
- 腸管オルガノイドは腸管様の構造を有しているが、管腔側からの物質の曝露やスループット性に課題がある
- マトリゲル包埋による腸管オルガノイドの作製方法では大量培養が難しい
- 実験動物とヒトとの間には種差がある
- 動物実験の代替となる評価モデルの開発が望まれている

創薬研究における消化管の評価モデルの開発



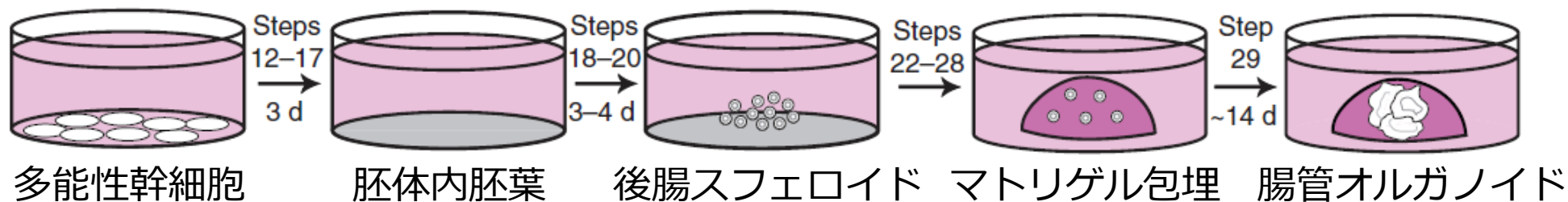
iPS細胞から腸管細胞の作製法の確立



創薬研究における評価モデルとしての利用

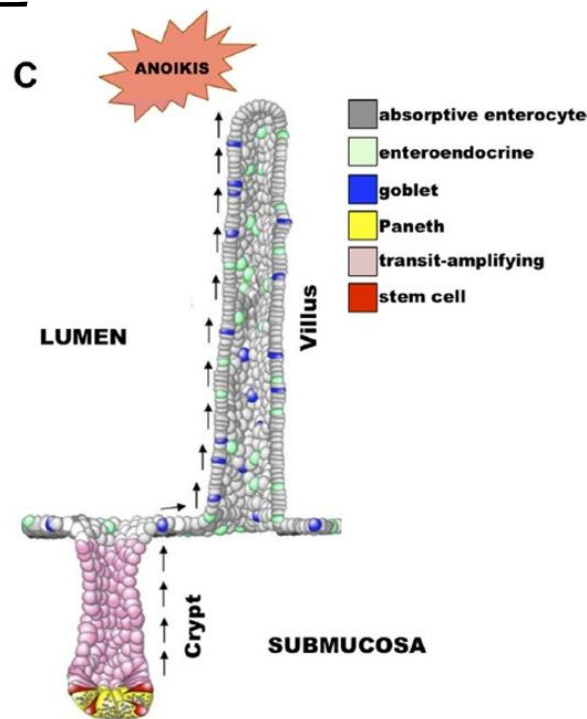
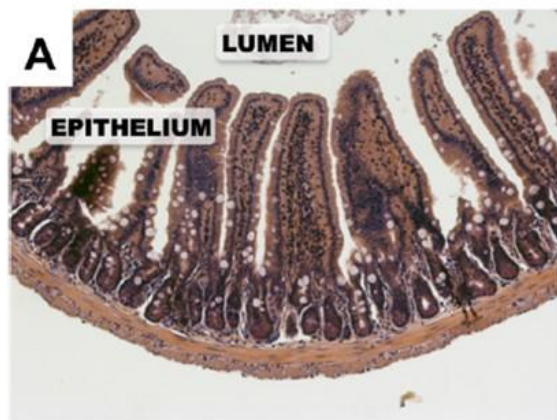
(Created with BioRender.com)

ヒトiPS細胞から腸管オルガノイドの作製



(Nature, **470**, 105, 2011; Nat Protoc, **6**, 1920, 2011)

小腸の陰窩絨毛構造



(Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, **307**, G260, 2014)

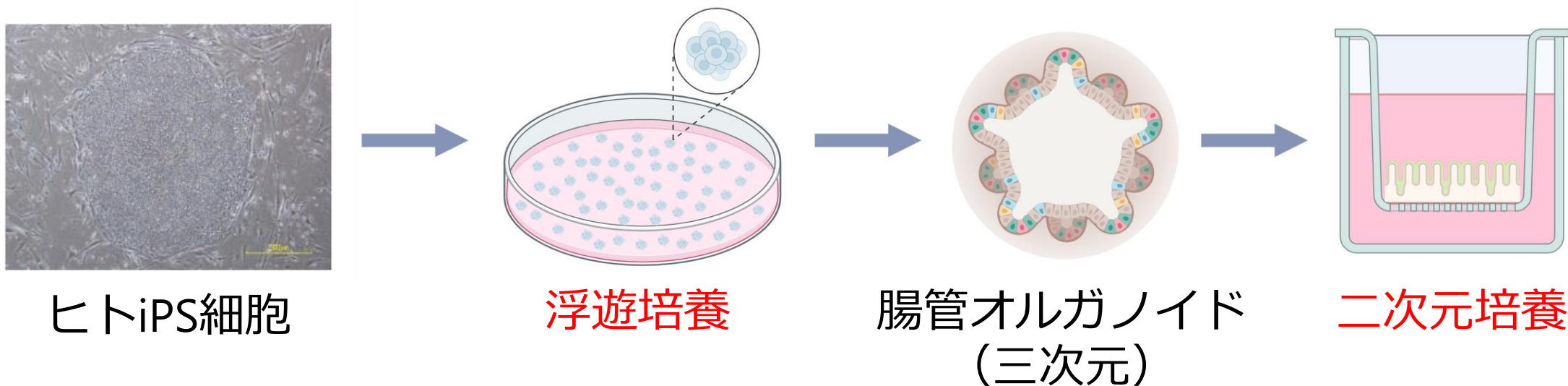
マトリゲル包埋法

- 操作性がよくない
- 大量培養に向かない



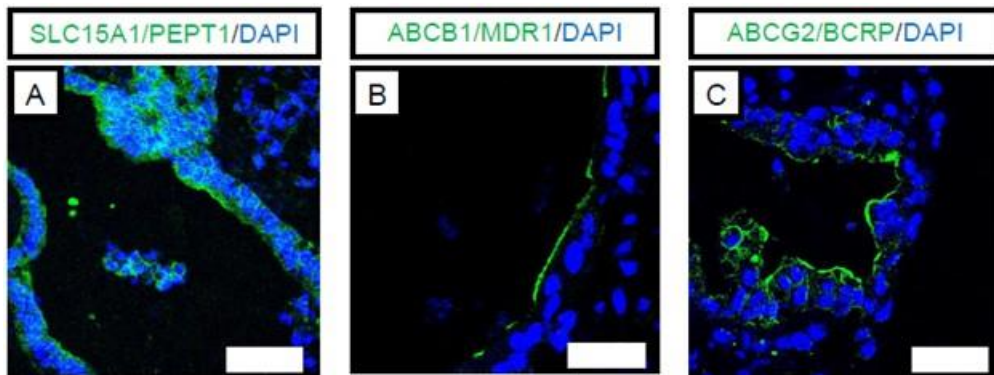
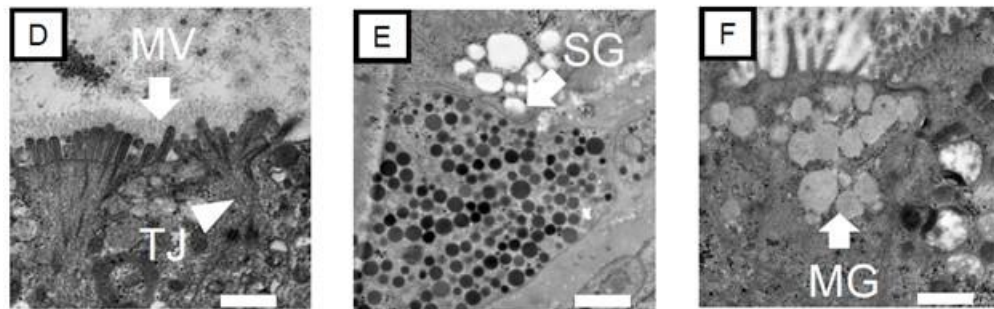
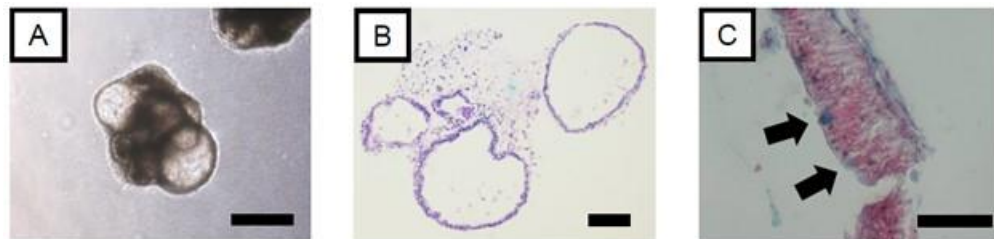
腸管オルガノイド

本技術を用いた腸管オルガノイド作製



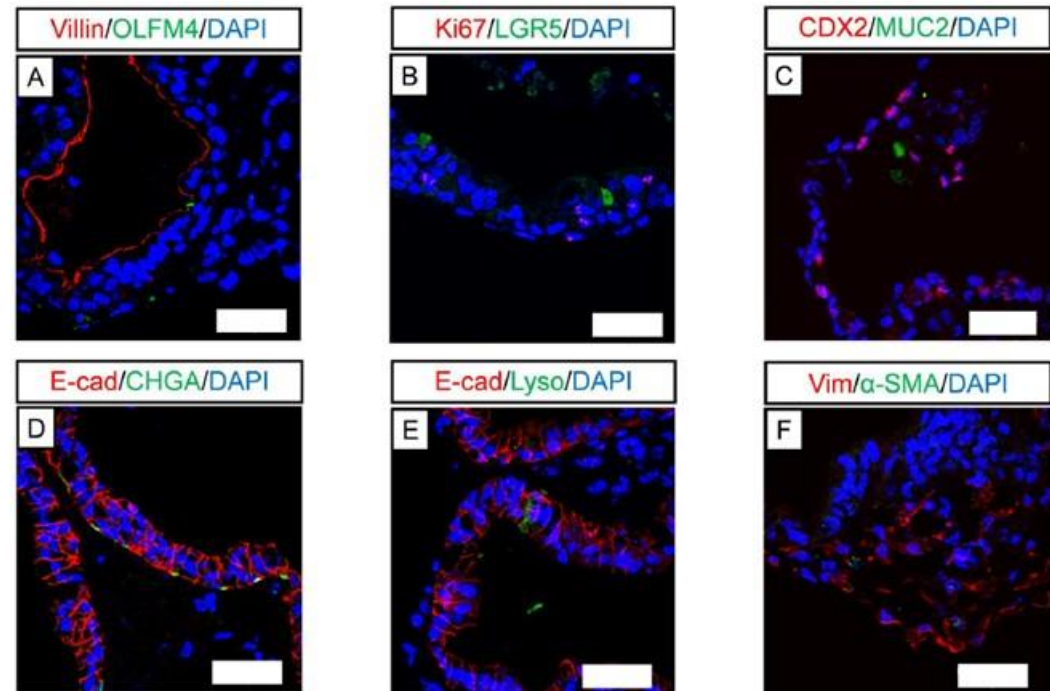
ヒトiPS細胞から腸管オルガノイドを作製の過程でマトリゲル包埋法ではなく、浮遊培養法を適用することで、均一なスフェロイドを形成し、大量に腸管オルガノイドを作製することに成功した。

ヒトiPS細胞由来腸管オルガノイドの形態



MV: 微絨毛
SG: 分泌顆粒

TJ: タイトジャンクション
MG: ムチン顆粒



マーカータンパク質

Villin: 吸収上皮細胞

Ki67: 増殖細胞

E-cad: 上皮細胞

CHGA: 腸内分泌細胞

Vim: 間葉系細胞

OLFM4, LGR5: 腸管幹細胞

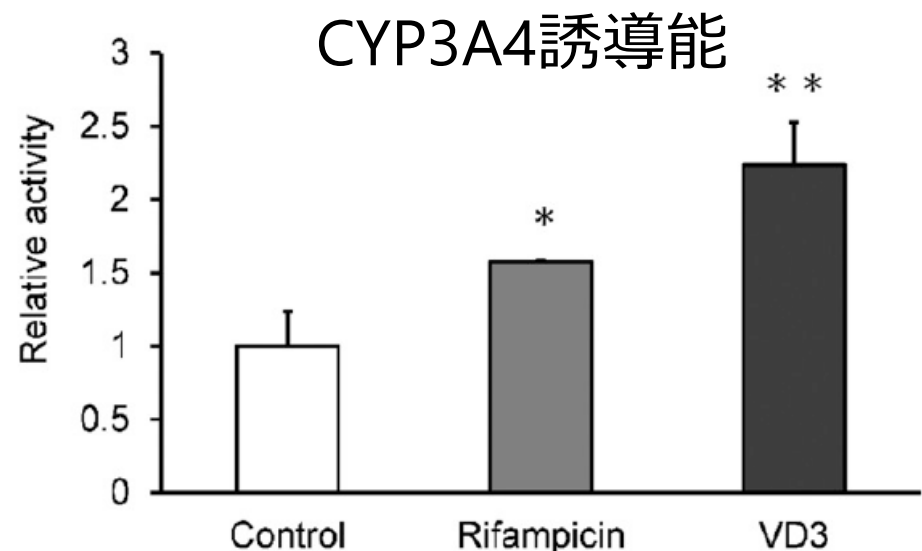
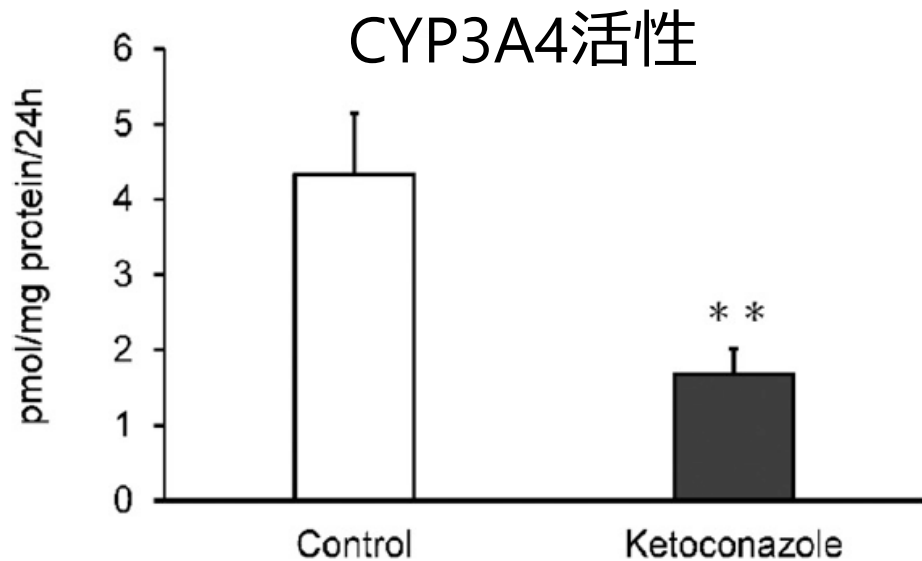
CDX2: 後腸

MUC2: 杯細胞

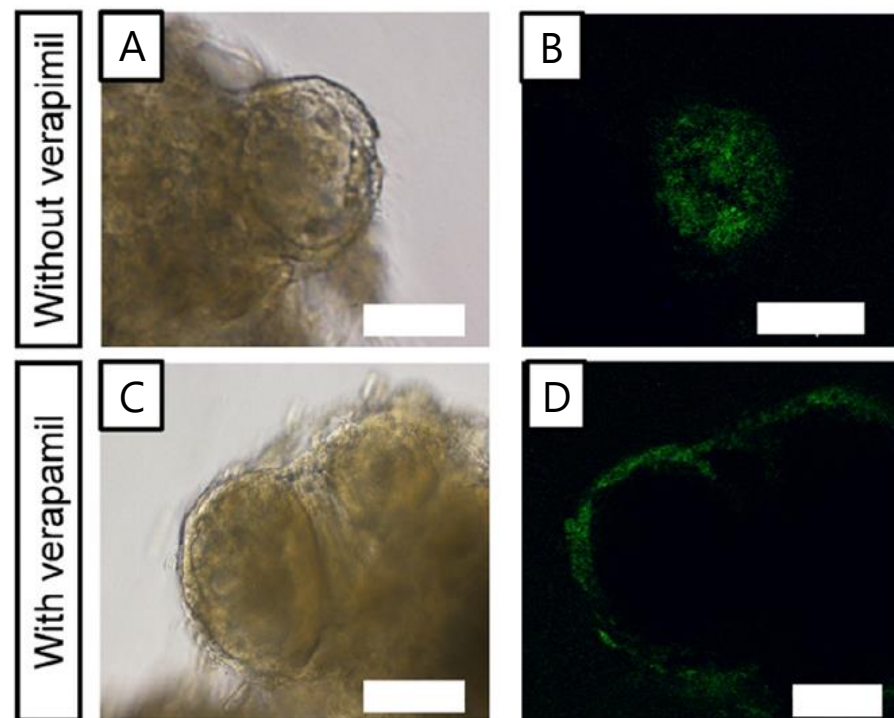
Lyso: パネート細胞

α-SMA: 平滑筋細胞

腸管オルガノイドの薬物動態学的機能



P-gp活性 (rhodamine 123)



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control; Mean \pm S.D. ($n = 4$).
Scale bar, 100 μm .

TNF- α 添加による腸管オルガノイドへの影響

タイトジャンクション アポトーシス

非吸収性
マーカー

ZO-1

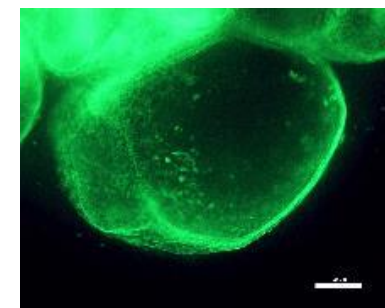
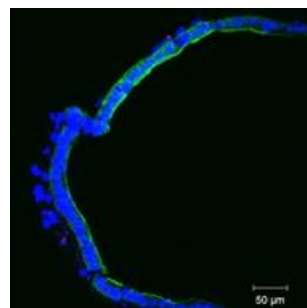
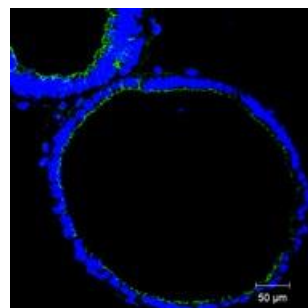
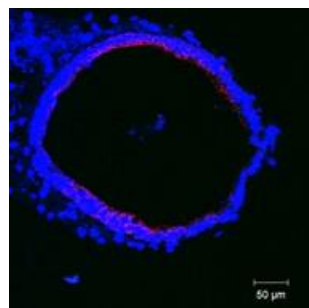
Occludin

Caspase-3

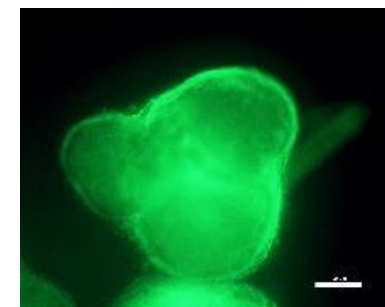
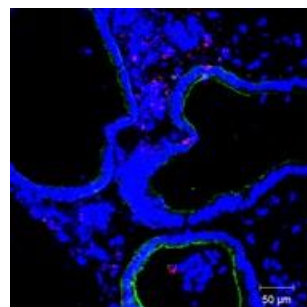
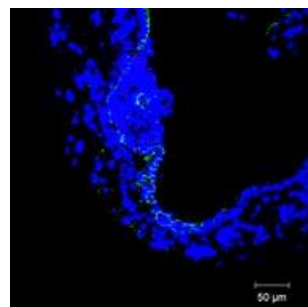
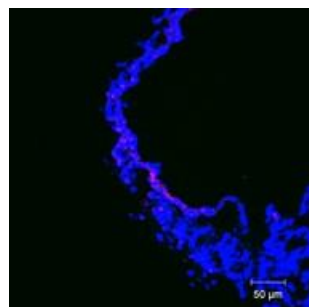
明視野

FD-4

Vehicle

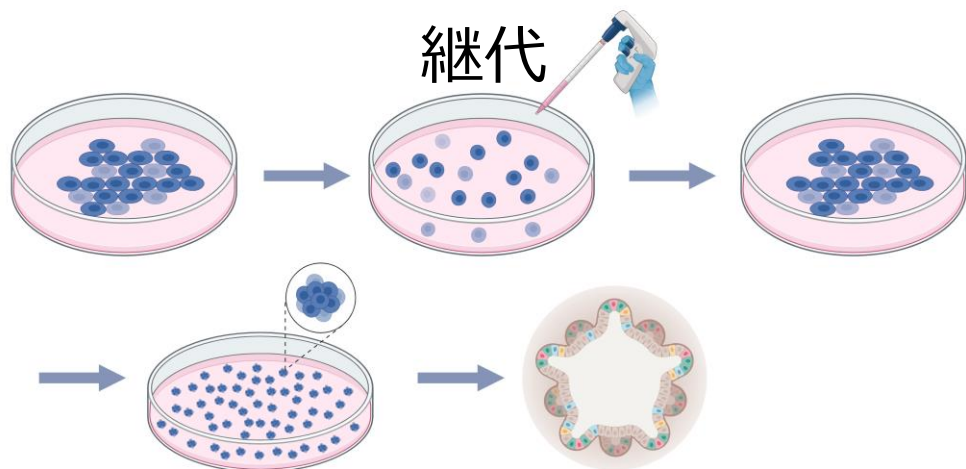


TNF- α



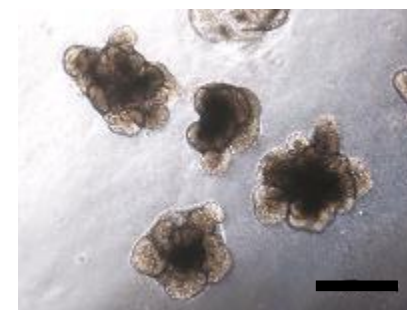
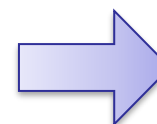
バリア機能の低下やアポトーシスが観察された

Budding構造をもった腸管オルガノイド



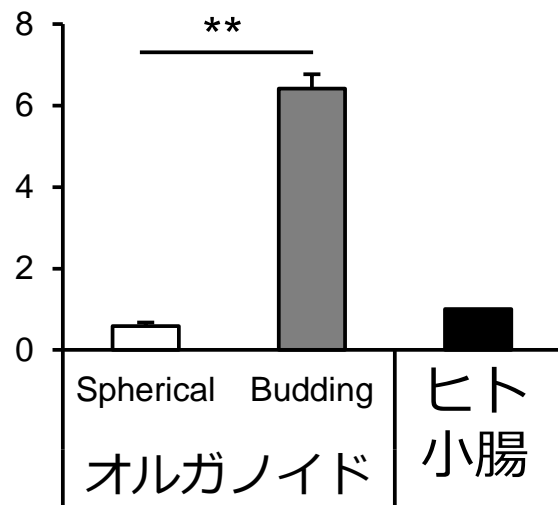
Spherical (未熟)

Budding (成熟)

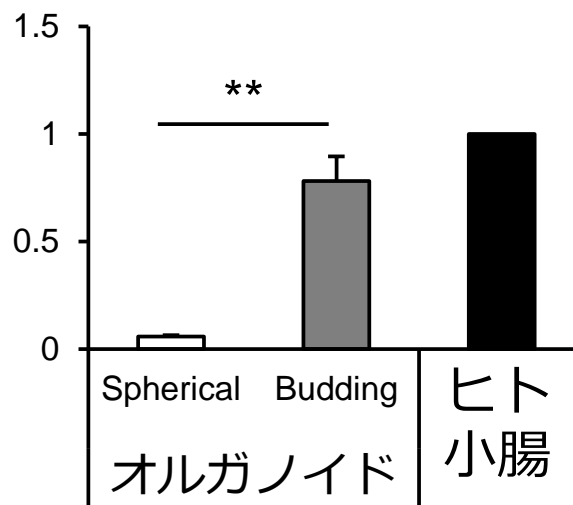


Villin1 (腸管上皮細胞)

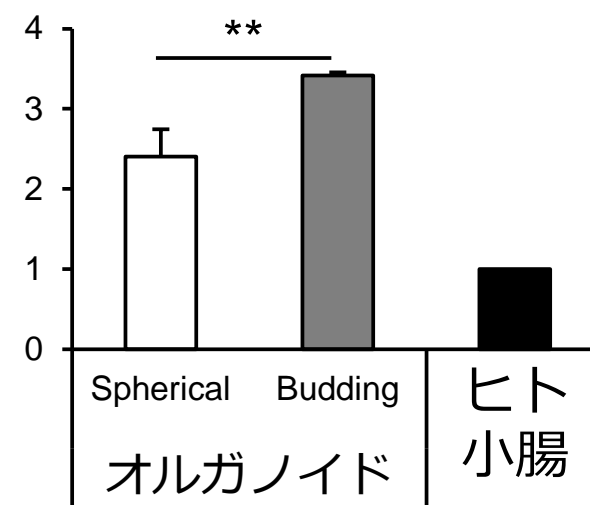
遺伝子発現レベル



MUC2 (杯細胞)



Lysozyme (パネート細胞)



Scale bar, 500 μ m; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; Mean \pm S.D. ($n = 3$). (*J Pharm Sci*, **110**, 2637, 2021)

三次元腸管オルガノイドのメリットとデメリット



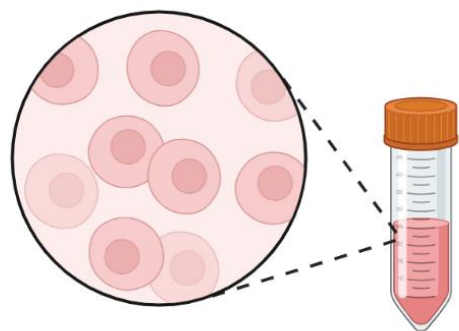
三次元
腸管オルガノイド

メリット

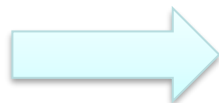
- 陰窩-絨毛様構造を有する
- 腸管を構成するさまざまな種類の細胞がある

デメリット

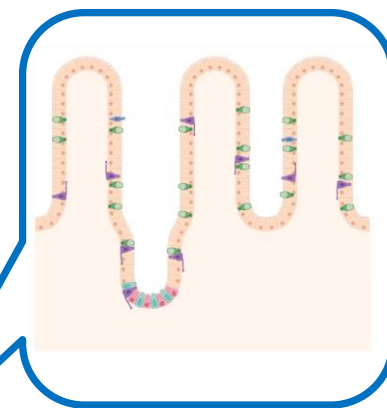
- オルガノイドの内側が腸管の管腔側に相当する
- 定量的な解析がしづらい



シングルセル化



二次元培養系へ

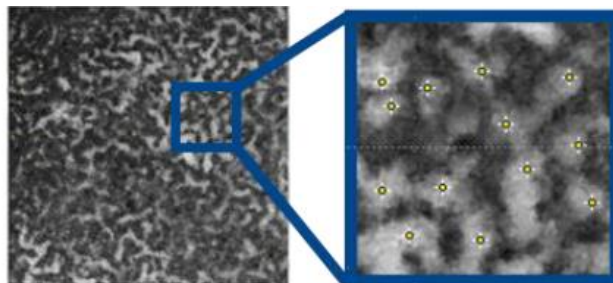
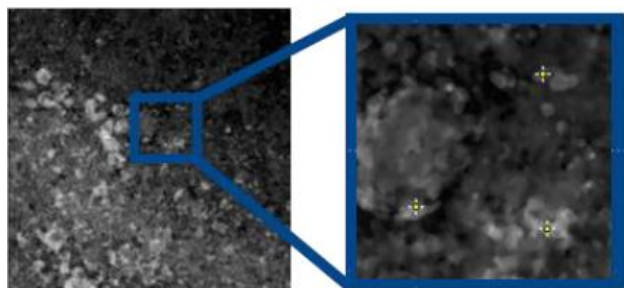
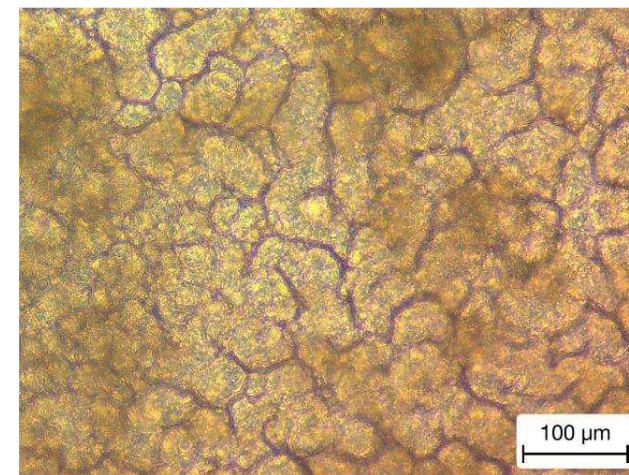
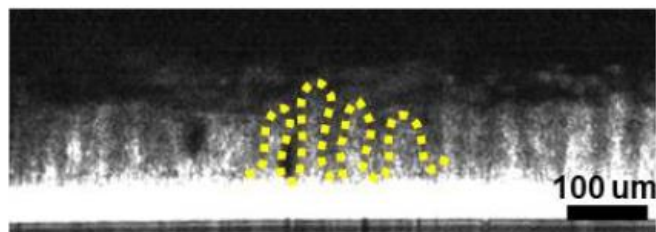
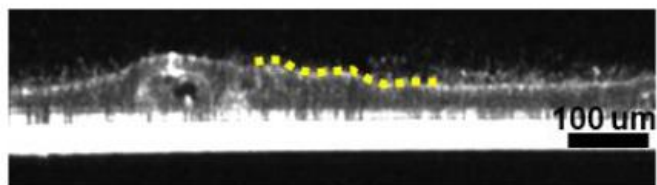


二次元培養した腸管オルガノイドの形態

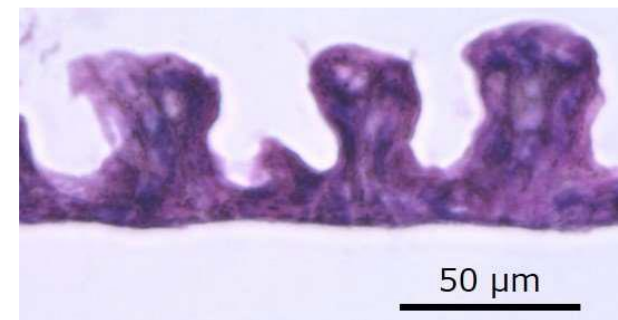
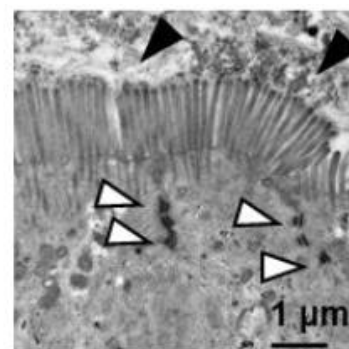
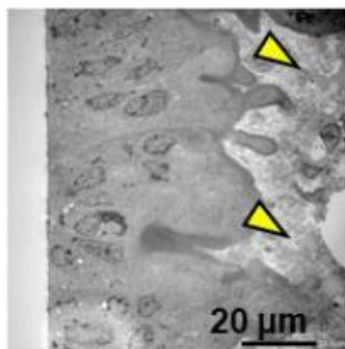
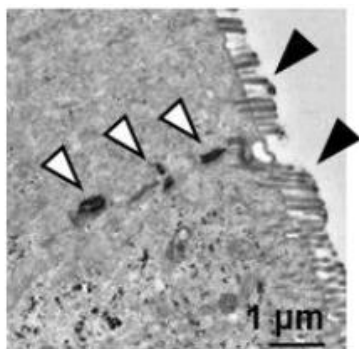
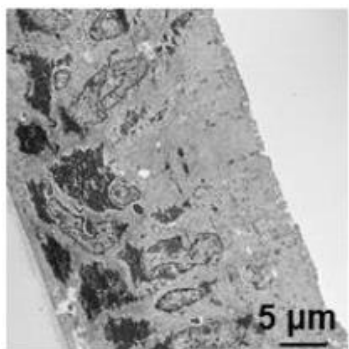
Control

Method 1

位相差顕微鏡

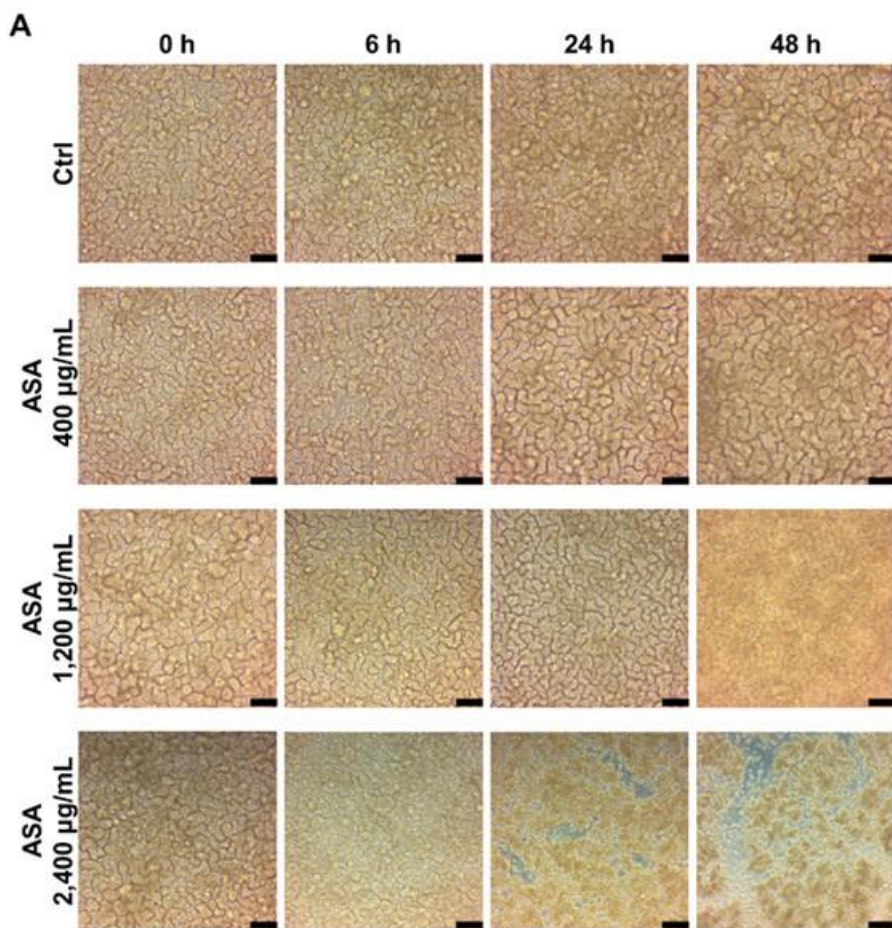


HE染色



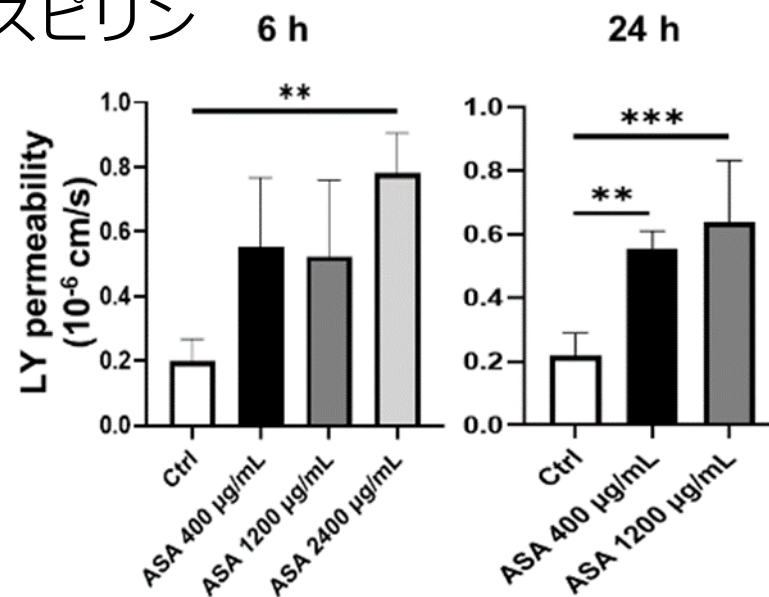
陰窩-絨毛様の構造が認められた

アスピリン (ASA) による腸管粘膜障害の評価

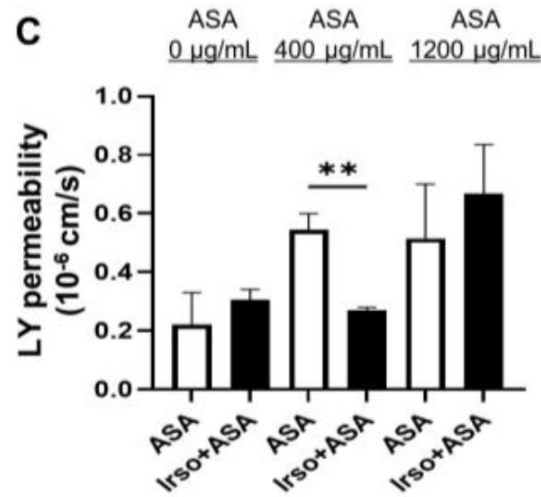


バリア機能

アスピリン



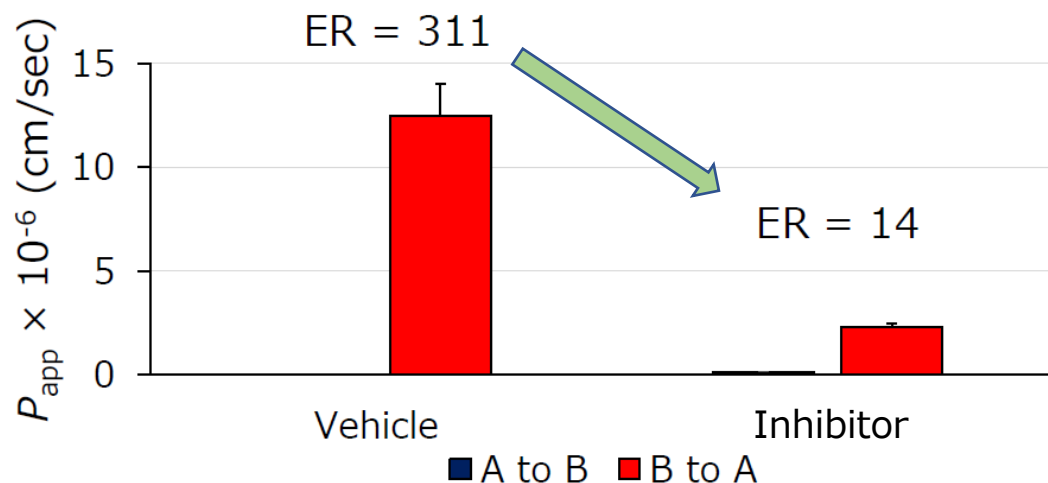
アスピリン + イルソグラジン



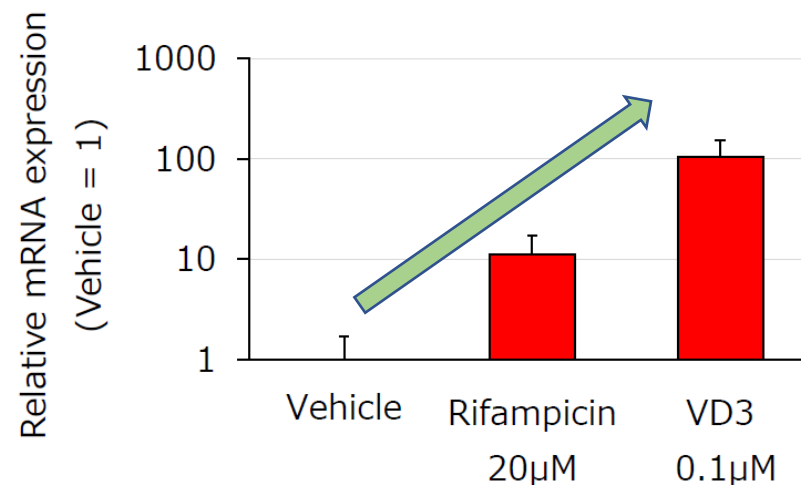
アスピリンによる消化管障害によって、バリア機能の低下が認められた。バリア機能の低下がイルソグラジン（粘膜防御性胃炎・胃潰瘍治療剤）によって抑制された。

P-gpの輸送活性とCYP3A4の発現誘導

P-gp活性



CYP3A4の発現誘導



P-gp（排出トランスポーター）を介した排出方向の輸送活性が認められた。

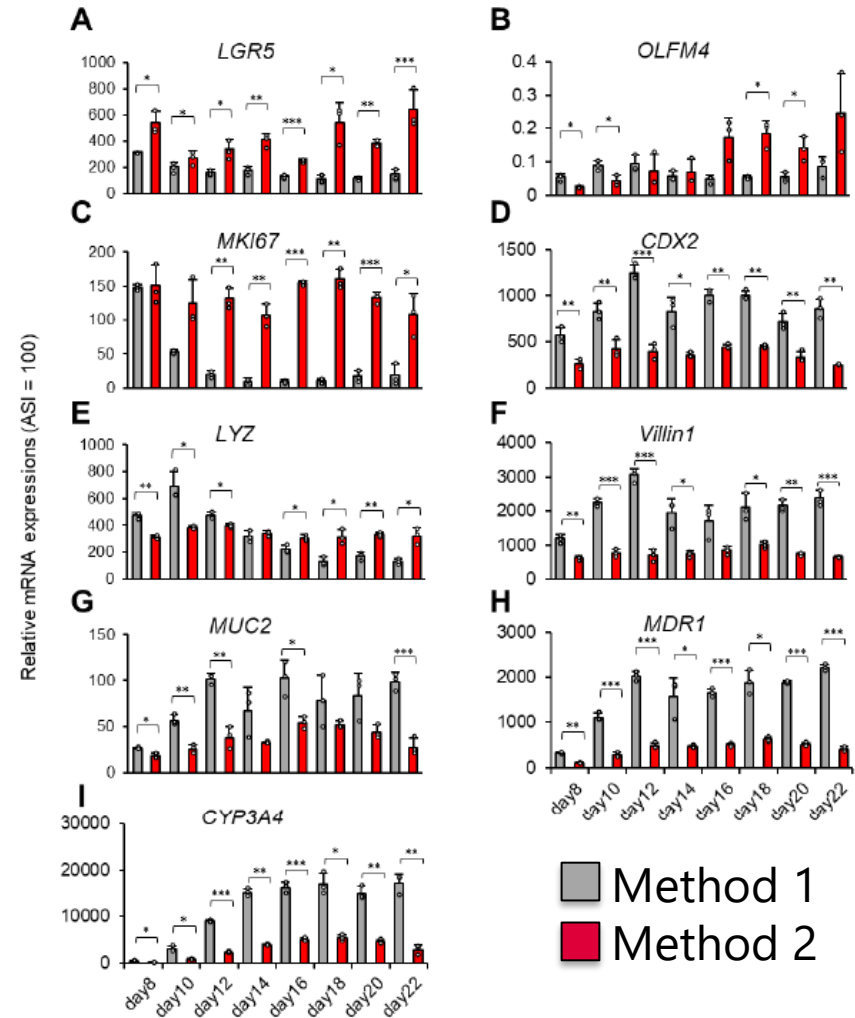
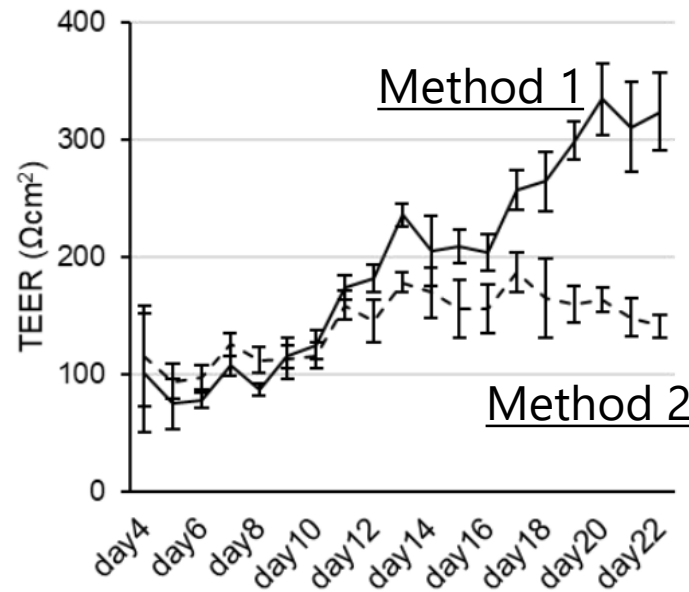
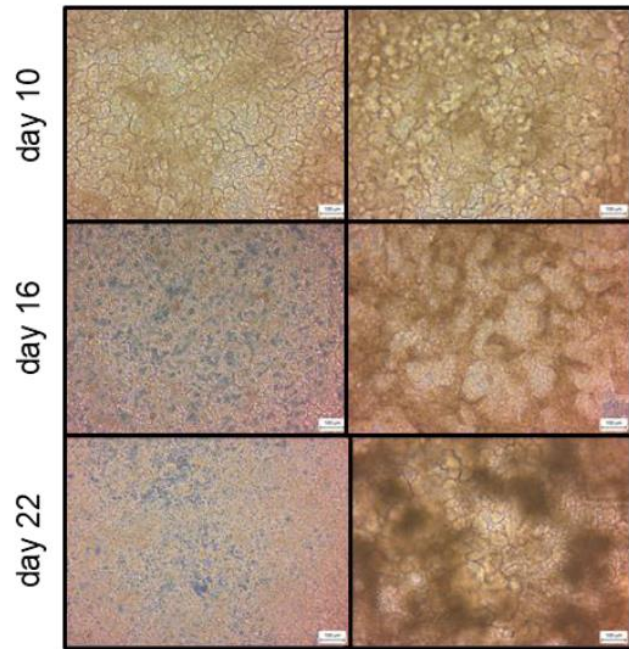
CYP3A4（小腸の主要な薬物代謝酵素）の発現がPXRやVDR（核内受容体）のリガンドによって誘導された。

二次元培養した腸管オルガノイドの長期培養

明視野画像

TEER値の経時変化

マーカーの遺伝子発現



Method 1 Method 2

Mean \pm S.D., n = 3. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, Adult small intestine = 100.

形態、TEER値（バリア機能の指標）、マーカー遺伝子の発現レベルを維持したまま長期間の培養が可能であった。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 生体腸管にみられる絨毛様構造を有したまま二次元的に培養可能な腸管細胞をヒトiPS細胞から作製することができる
- 浮遊培養を適用することで大量かつ簡便にヒトiPS細胞から腸管オルガノイドを作製できる
- 疾患特異的iPS細胞を使用することで病態モデルへの展開も期待される
- 二次元培養系を元にしたOrgan-on-chipの開発も可能

想定される用途

- 薬効・薬理試験、安全性試験、薬物動態試験などの創薬研究のためのモデル
- 腸管の病態モデルの作製による病態機序解明や治療薬開発などのためのモデル
- 実験動物の代替となるin vitro消化管モデル

実用化に向けた課題

- 現在、形態学的な特徴や遺伝子発現解析等については研究が進んでいる。機能的な面については、薬物の消化管吸収および代謝、薬物の消化管毒性にの評価に関して、利用の可能性を示している。今後は、その他の評価系としての利用の可能性を探索していく必要がある。

企業への期待

- 市販化が可能なiPS細胞を用いて作製が可能か検証を行う必要がある
- 実用化に向けて大量かつ安定した細胞の作製が必要である
- Ready-to-Useの細胞として輸送する技術

本技術に関する知的財産権 1

- ・ 発明の名称 : 多能性幹細胞由来腸管オルガノイドの作製法
- ・ 出願番号 : 特願2019-517600、米国16/611,359、
欧州18 799 226.8、中国201880030351.3、
韓国10-2019-7033665、カナダ3062600
- ・ 出願人 : 公立大学法人名古屋市立大学
- ・ 発明者 : 松永民秀、岩尾岳洋、小野里太智、小川勇

本技術に関する知的財産権2

- ・ 発明の名称 : 多能性幹細胞由来腸管オルガノイドの作製法
- ・ 出願番号 : 特願2020-554968、米国17/290,446、
欧州19878058.7
- ・ 出願人 : 公立大学法人名古屋市立大学
- ・ 発明者 : 松永民秀、岩尾岳洋、小野里太智、小川勇

産学連携の経歴

- 2014年-2015年 第一三共と共同研究実施
- 2015年 JST A-STEPに採択
- 2019年 富士フイルムよりF-hiSIEC発売
- 2023年-2024年 JST 可能性検証に採択

お問い合わせ先

名古屋市立大学
産学官共創イノベーションセンター

TEL 052-853-8309

FAX 052-841-0261

e-mail ncu-innovation@sec.nagoya-cu.ac.jp