

ヒト結腸がん細胞Caco-2の機能を 高める改良培養法の開発

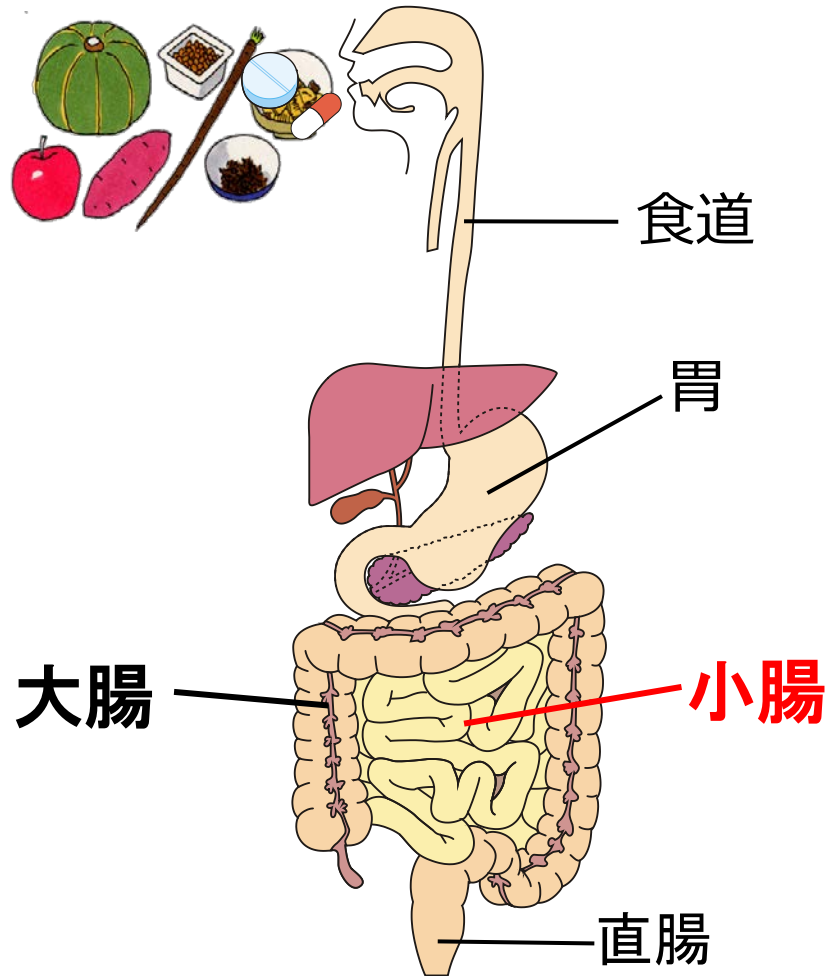
名古屋市立大学 大学院薬学研究科

臨床薬学分野

特任教授 松永民秀

2025年10月28日

経口摂取と消化管の構造

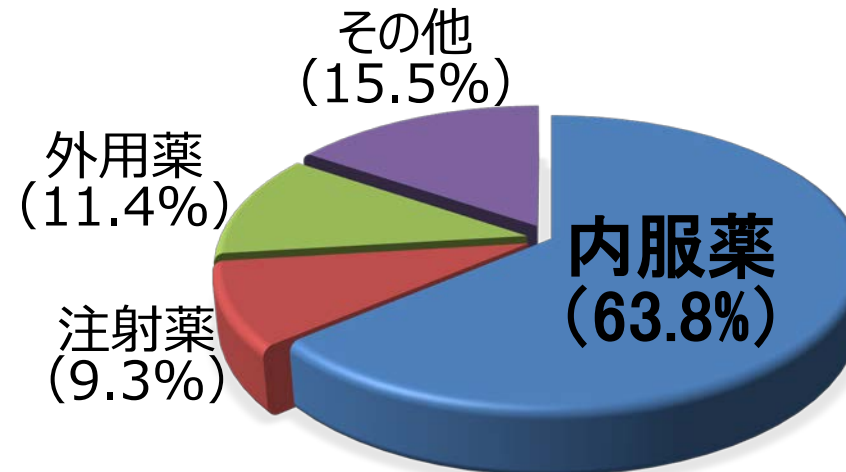


ヒト消化管における小腸と大腸

1. 食品に含まれる成分

- ① 栄養素（糖質、アミノ酸、ペプチド、脂肪酸、ビタミン、微量元素等）
- ② 食品成分（フラボノイド類、食物繊維等）
- ③ 化学物質（プラスチックモノマー、可塑剤、食品添加物質、農薬等）
- ④ 製造・加工工程の非意図的生成物（アクリルアミド、クロロプロパノール類、PAH類、フラン等）
- ⑤ 微生物
- ⑥ 環境物質（重金属、ダイオキシン類、マイクロプラスチック）等

2. 医薬品の割合



保健機能食品：
特定保健用食品（トクホ）、
機能性表示食品、栄養機能
食品

従来技術とその問題点

1 Ussing chamber法

2 反転腸管法

3 ヒト小腸上皮細胞：倫理的問題、入手困難、
供給量が少ない、非常に不安定で寿命が短い

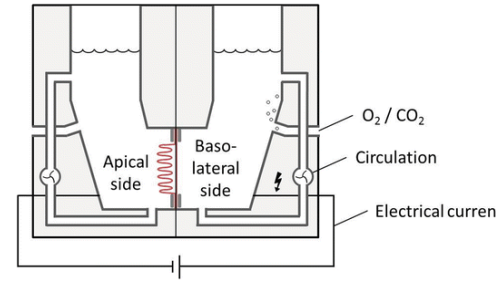
4 Caco-2細胞：ヒト結腸がん由来株化細胞

5 輸送体タンパク質発現系

極性細胞（LLC-PK1、MDCK II）発現系

非極性細胞（HEK293細胞、HeLa細胞）発現系

アフリカツメガエル卵母細胞発現系



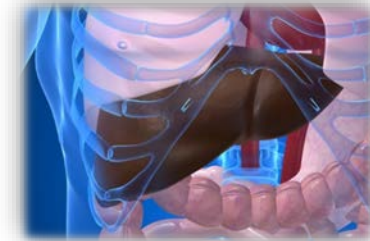
Ussing chamber model



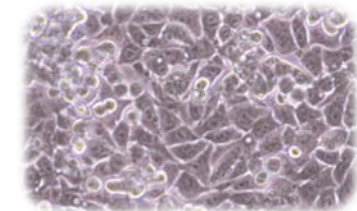
種差

NAMs

NAMs: 新しいアプローチ方法論



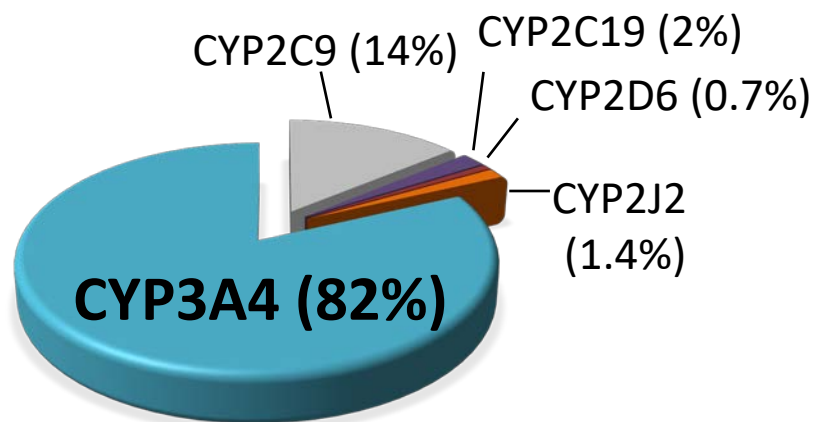
ヒト腸組織、
腸管上皮細胞



株化細胞
(Caco-2細胞、
発現細胞系等)

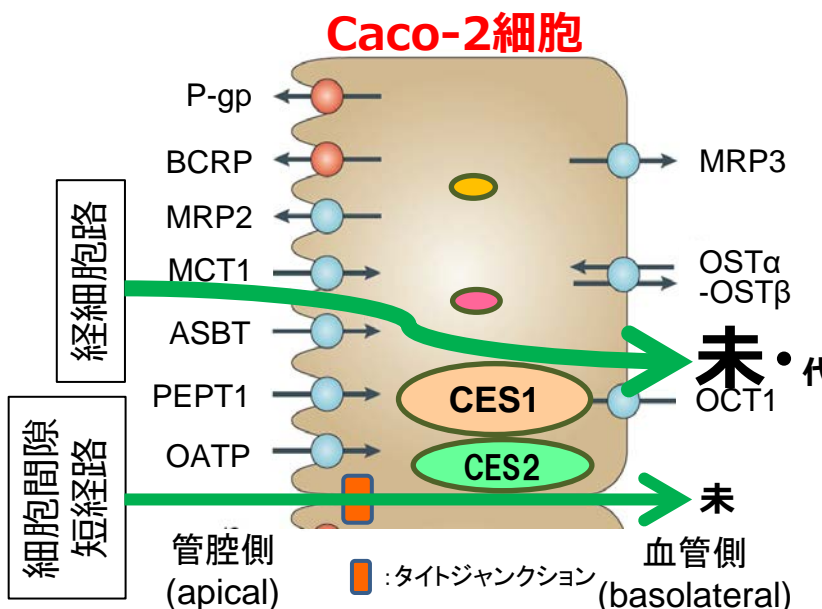
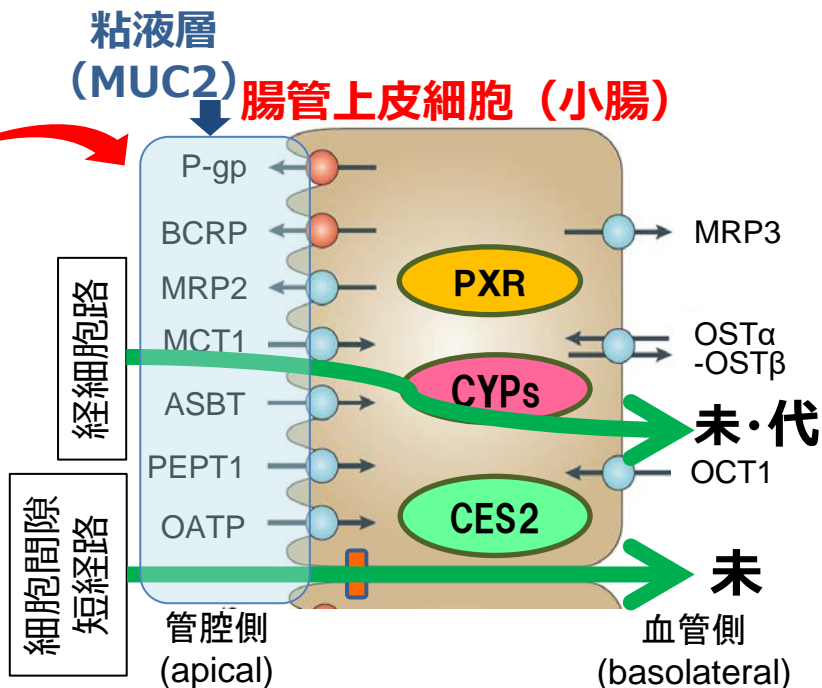
従来技術とその問題点

フェロジピンの経口投与



小腸上皮細胞のCYP発現量

(CMAJ, 185, 309, 2013;
Drug Metab Pharmacokinet, 25, 28, 2010
Nat Rev Drug Discov, 9, 215, 2010)



フェロジピン初回通過効果

小腸 (100% ⇒ 30%)

肝臓 (30% ⇒ 15%)

腸管上皮細胞 (小腸)

- CYP高発現⇒代謝○
- PXR高発現⇒誘導○
- CES2高発現⇒プロドラッグの予測○
- MUC2高発現⇒粘液層○

正常細胞・組織の入手が困難 対応：結腸がん由来株化細胞利用

Caco-2細胞

- CYP低発現⇒代謝×
- PXR低発現⇒誘導×
- CES1高発現⇒プロドラッグの予測×(肝)
- MUC2発現無⇒粘液層×

従来技術とその問題点

創薬研究等の腸管モデル細胞として現在**Caco-2細胞**が主に用いられているが、

生体の機能と乖離が有り、薬物動態や安全性などの予測精度が不十分である。

一方、がん細胞由来の細胞株で取り扱いが容易であり、これまでの膨大な結果がある。もし、**Caco-2細胞の欠点を克服できれば利便性は高いが、簡便な解決策は見出されていない。**

従来技術とその問題点

「機能が不十分で生体と乖離が有る」が、Caco-2細胞しかなかった。

その為、世界中で薬物の吸収評価や安全性試験に利用されていた。

Caco-2細胞の生体との乖離

- CYP3A4低発現⇒代謝の評価不可
- MUC2低発現⇒粘液層（非攪拌水層）の影響評価不可
- CES1高発現⇒CES2特異的プロドラッグ評価不可
- トランスポーター発現パターン異なる⇒薬物吸収の予測困難

MUC2:腸の粘液層の主要成分、CES: カルボキシルエステラーゼ

しかし

創薬研究においては
現在も多くの試験で
用いられている

膨大なデータが
蓄積されている

松

竹

梅

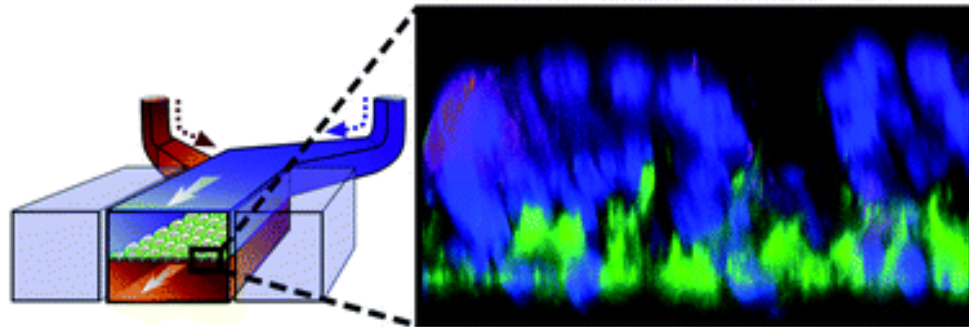
予測性 : ヒト生体由来腸管組織・細胞 \geq ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞 $>>>$ Caco-2細胞

利便性 : ヒト生体由来腸管組織・細胞 $<<<$ ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞 \leq Caco-2細胞（利便性高い）

価 格 : ヒト生体由来腸管組織・細胞 $>>>$ ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞 $>$ Caco-2細胞（安価）

Caco-2細胞の機能を高める培地と培養法の開発

Microphysiological System (MPS : 生体模倣システム)



Kim HJ et al. Lab Chip 12:2165-74, 2012.

Kim HJ and Ingber DE. Integr Biol (Camb). 5:1130-40, 2013.

ハーバード大学ヴィース研究所

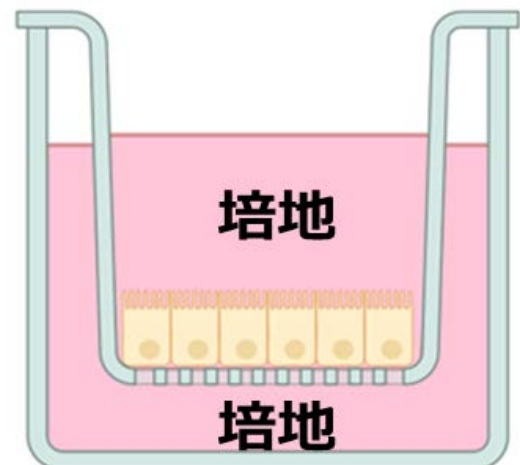


Emulate社製
Gut-Chip (腸チップ)

<https://emulatebio.com/human-emulation-system/>

- MPSの利用
- CYP3A4等遺伝子導入
- 外部よりムチンの添加
- ムチン産生細胞との共培養

従来法



セルカルチャーインサート

改良型Caco-2細胞

形態：陰窩絨毛様

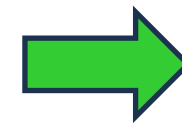
機能：

CYP3A4 ↑↑

CES1 ↓

CES2 ↑

MUC2 ↑↑↑



難溶性薬物の代謝・吸収評価
プロドラッグの代謝・吸収評価
毒性試験 (粘膜障害)
腸内細菌との共培養試験 等

新技術の特徴・従来技術との比較

- Caco-2細胞の欠点であった、粘膜層主成分MUC2や薬物代謝酵素CYP3A4の発現を顕著に高くすることに成功した。
- 従来はMUC2分泌細胞との共培養やCYP3A4遺伝子導入あるいは高価なMPSの使用に限られていたが、我々の新技術により、簡便なやり方のままで細胞機能が向上できた。
- 新技術の適用には、煩雑な操作や特別な装置等はいらない。
- ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞、腸管オルガノイドあるいは生体模倣システムと比較すると大幅なコスト削減が期待される。

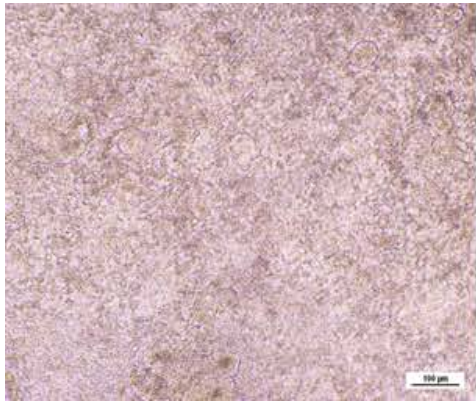
新技術の特徴・従来技術との比較

	演者らの 新技術シーズ	BioAssay Systems社	ケー・エー・シー	富士フイルム	Emulate社
構成	Caco-2細胞を本発明の培地を用いて培養	人工膜透過性試験(PAMPA)を用いる	Caco-2細胞を既存法で培養した Ready-to-Use製品	F-hiSIEC (ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞)	Gut Chip (MPS 生体模倣モデル)
得られる特性	薬物代謝酵素、ムチンの発現上昇、陰窩絨毛様の形態と生体に近いTEER値	受動拡散による膜透過評価	CYP3A4、ムチン2の発現が顕著に低く、CES1/CES2比が生体と異なる	生体に近い遺伝子発現を示し、高い機能を有する	薬物代謝酵素、ムチンの発現上昇、陰窩絨毛様の形態
凹凸構造	○あり	×なし	×なし	×なし	○あり
粘液	○あり	×なし	×なし	△あり	○あり
代謝酵素	○あり	×なし	△あり	○あり	○あり
コスト*	中 (改良培地代のみ)	低 (¥400/試料)	中 (¥7,400/試料)	高 (¥13,100/試料)	非常に高 ^{a)} (380,417円/試料 ^{b)} 、 455,417円/試料 ^{c)})
適用分野	薬物動態試験、安全性試験、食品成分の吸収評価	受動拡散による膜透過のハイスループットスクリーニング	薬物動態試験、安全性試験等	薬物動態試験、安全性試験等	菌との共培養
その他	膨大な情報がある。PAMPAと比較して高価、F-hiSIECと比較すると安価。	薬物代謝やトランスポーター関与の評価は不可能。安価。	細胞の形態は扁平で生体と異なる。	細胞の形態は扁平で生体と異なる。高価。	非常に高価なシステムとチップが必要。低分子化合物の試験には不適。

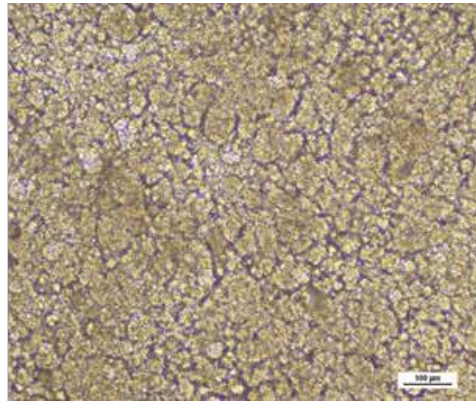
*: 卸業者の情報あるいは企業HPの価格より計算 (2024年12月現在)、a) チップ+細胞のキット価格をベースに資産、b) 十二指腸チップ、c) 結腸チップ

Caco-2細胞の改良培養法の開発

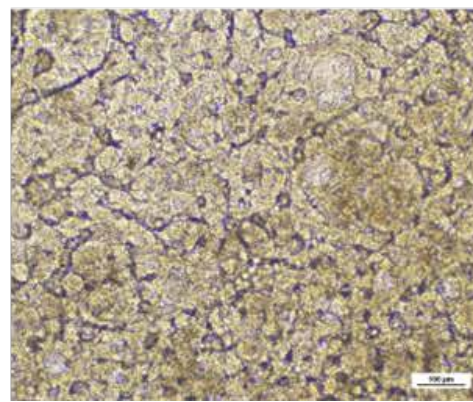
- ・使用細胞：Caco-2細胞
- ・培養容器：セルカルチャーインサート（Greiner社 ϕ : 0.4 μ m）



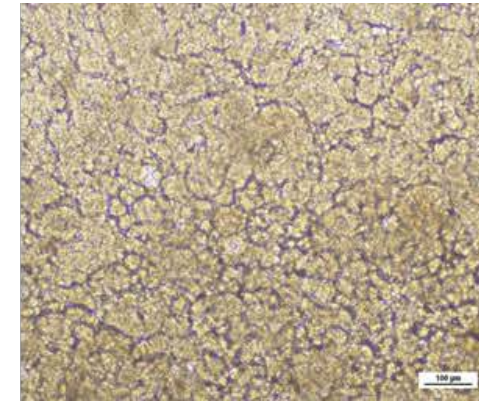
通常培養法



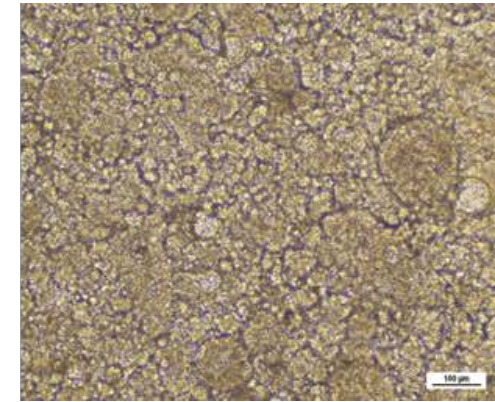
条件1



条件2



条件3



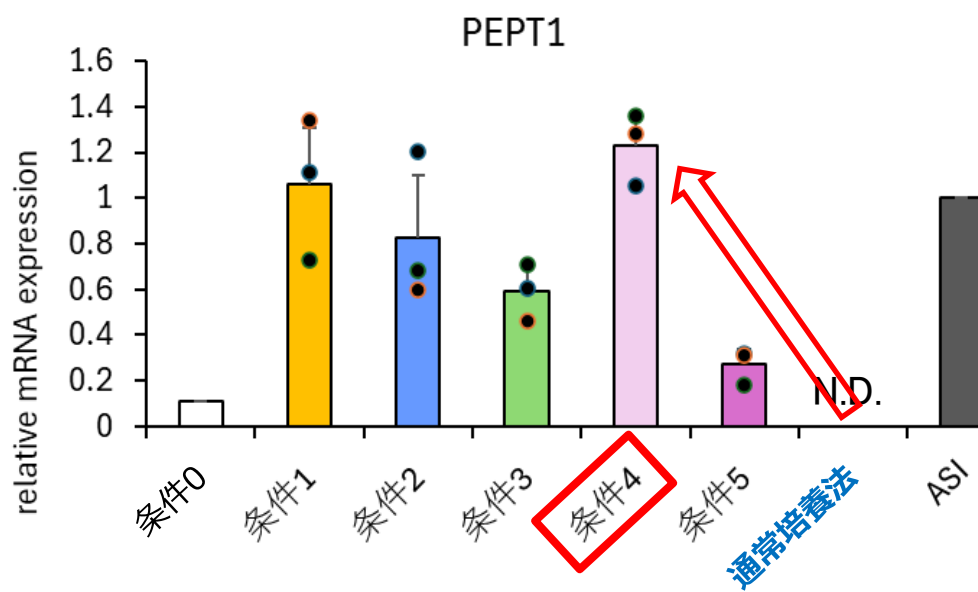
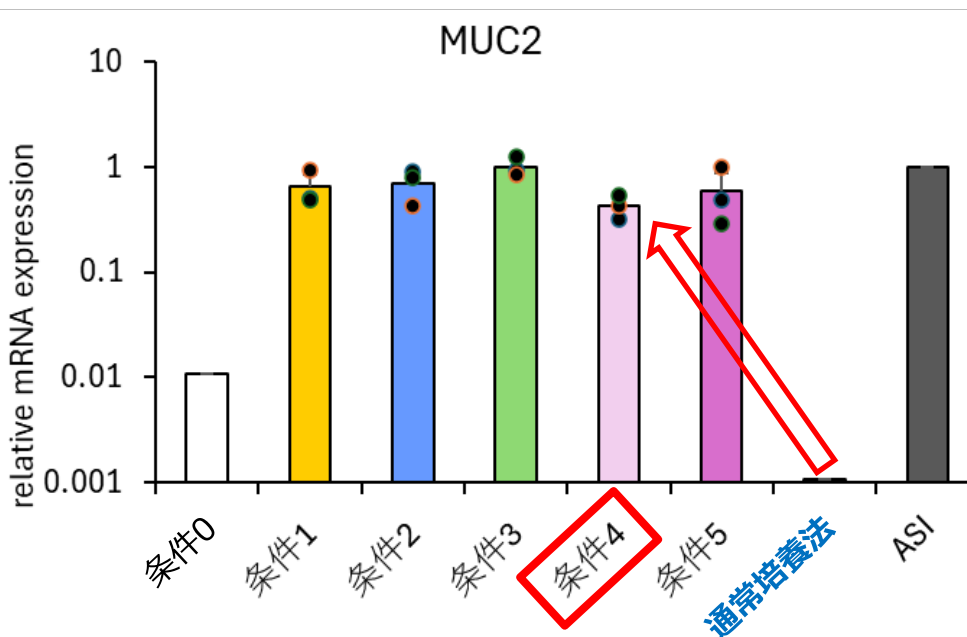
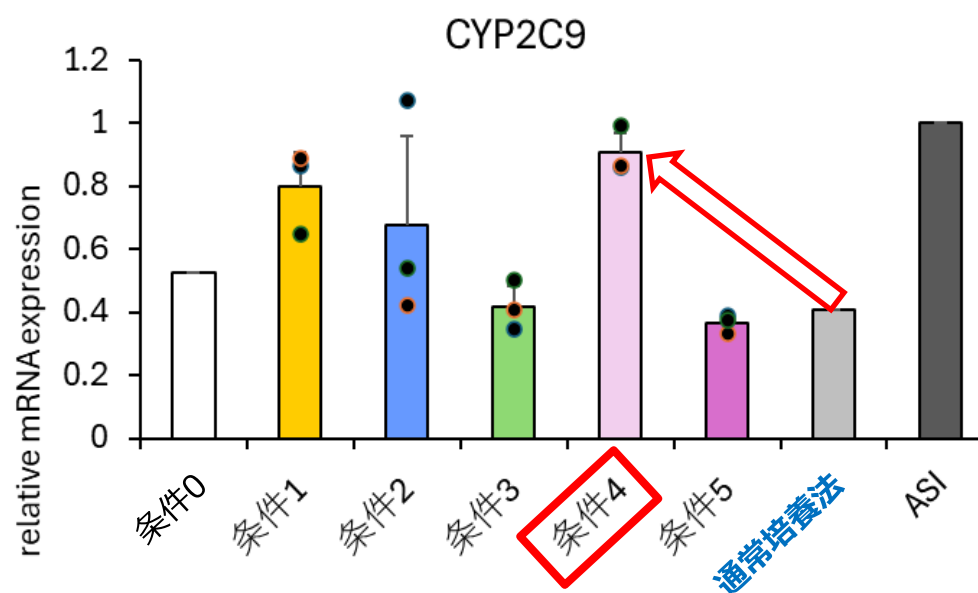
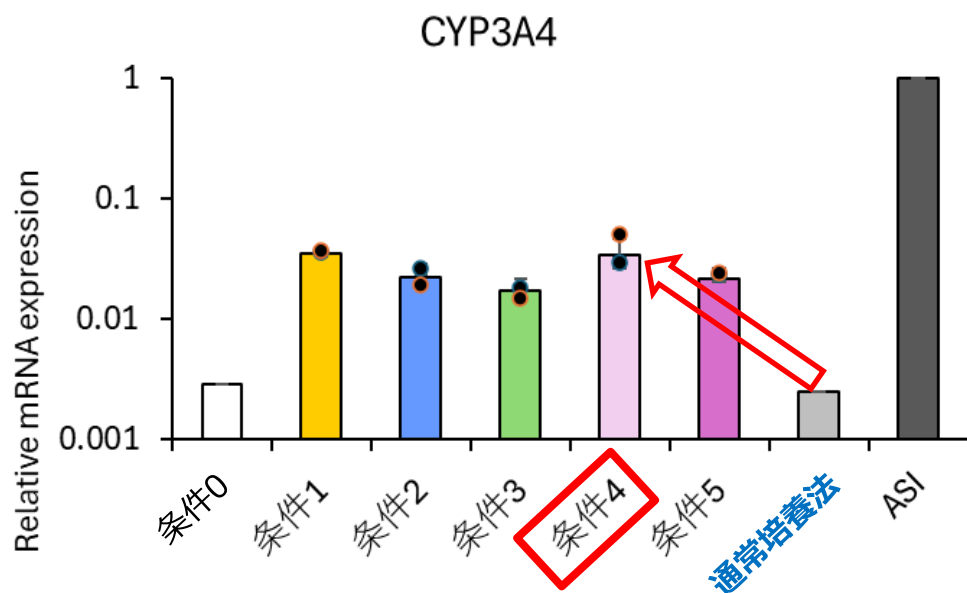
条件4

通常のCaco-2細胞と新規培養条件を適用したCaco-2細胞の明視野画像（day11）

Scale bar : 100 μ m

従来のCaco-2細胞に新規培養 条件1～4を適用することで
凹凸状の立体構造をとることが明らかになった。

改良培養後のCaco-2細胞の遺伝子発現



CYP : cytochrome P450
MUC2 : mucin2
PEPT1 : peptide transporter 1

新規培養方法適用

通常培養法

MUC2とCYP3A4 :
ASIの1/500~1/1000
PEPT1 : 1/10以下

条件0と比較

CES1 : 1/10以下に減少
CES2 : 約3倍上昇
MUC2 : 約100倍上昇
(生体と同レベル)
CYP3A4 : 約10倍増加

Mean \pm S.D. 条件0, 通常培養法, ASI : $n = 1$ 条件1, 2, 3, 4, 5 : $n = 3$

ASI : 成人小腸

想定される用途

- 改良培養法で培養したCaco-2細胞は、薬物動態試験（薬物の吸収・代謝）や安全性試験に利用が期待される。
- 分泌型ムチンMUC2の発現が生体とほぼ同じであることから、ムチン層（非拡散水層）の影響評価が可能となる。
- 上記以外に、腸内細菌との共培養も可能であり、非常に容易、且つ安価に腸管モデルを作れるのはメリットが大きいと考えられる。
- これまでCaco-2細胞を用いた豊富な情報を利用できるのは大きなメリットである。
- 特別な手法や装置は一切関係なく、改良された培地で培養するだけであることから、切り替えにハードルが低い。

実用化に向けた課題

- 薬物代謝能の更なる機能向上（CYP3A4、CES2等）
- 現在、培地の最適化について開発済み。施設内の再現性は確認済なので、多施設検証を現在行っているところである。
- 今後、機能解析及び腸内細菌との共培養等、応用面について実験データを取得し、ユーザーの具体的な要求仕様=context of use（COU）に適用していく場合の条件設定を行っていく。
- 本技術の利用を希望する企業との連携を目指す。

社会実装への道筋

時期	取り組む課題・明らかにしたい原理	社会実装へ取り組み
基礎研究	・改良培養法の開発が完了（培地の改良、培養法の改良）	
現在	・標準手順書作成、多施設検証試験、（大学：2大学、国立研究機関：1施設、グローバルCRO企業：1社）	・AMED-MPS事業での腸管チップへの利用検討
1年後	・グローバルCROとの共同研究進展（新規モダリティへの対応等） ・新たなアプリケーションの開発（企業のCOUへの対応等） ・薬物代謝能の評価と機能向上（CYP3A4、CES、PEPT1等）	・デモンストレーション実施 ・JSTのGAP Fund事業へ応募し研究資金獲得
2年後	・グローバルCRO企業に特許許諾 ・改良培地の上市を検討（培地製造企業の選定） ・腸内細菌共培養MPSへ搭載（例：腸肝軸、脳腸軸等のモデル構築）	・評価基礎データの提供 ・サンプル提供 ・JSTのGAP Fund事業へ応募し研究資金獲得
3年後	・他のCRO企業、製薬企業、食品企業への売り込み	・デモンストレーション実施

CRO (Contract Research Organization) : 医薬品開発業務受託機関

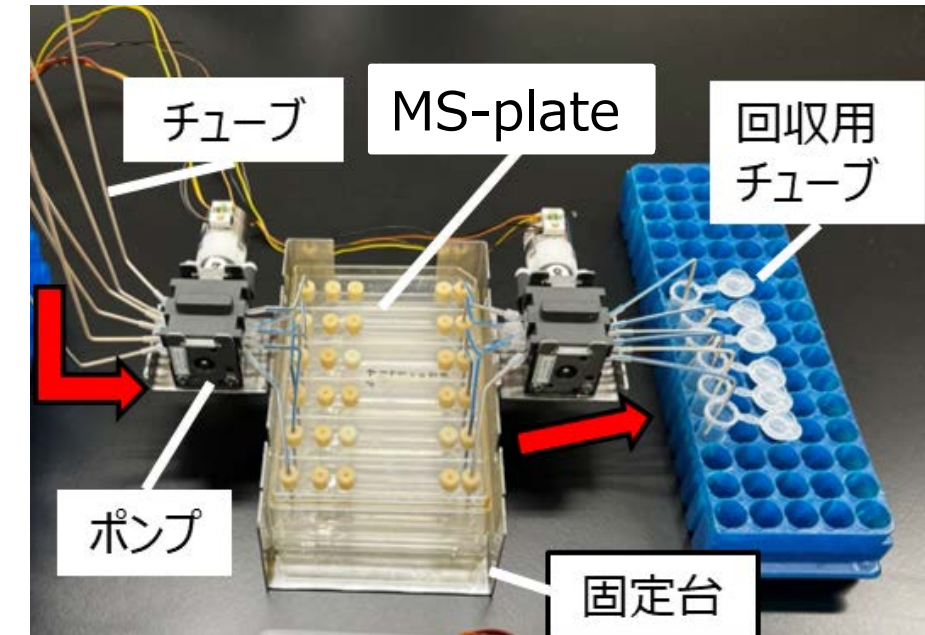
COU (context of use) : 製薬企業の創薬プロセス等における具体的な要求仕様、使用の目的

企業への期待

- 新たなアプリケーションの開発は、企業のCOUを知り、その企業との連携が最も近道と考えている。
- 解決したい課題（COU）を持つ、企業との共同研究を希望。
- また、新しいアプローチ方法論（NAMs）の導入を検討している企業、特に新規モダリティへの展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

企業への貢献、PRポイント

- 本技術は実験動物を使わず、MPSにも搭載可能で、NAMsに貢献できると考えている。
- 培地を変えるだけで、従来法と大きな変更は無く、導入が非常に簡単。
- 本技術の導入にあたり必要な追加実験を行うことで科学的な裏付けを行うことが可能。
- 本格導入にあたって、Caco-2細胞培養だけでなく、腸管MPS（腸管チップ）等の技術指導や我々のMPS（右写真）の使用も可能。



6連 小腸－肝臓連結MPS（MS-plate）

これまでの培地交換

開発の目的
操作の簡便化・リスク低減・自動装置に適応

ピンセットでのインサーター持ち上げ操作必要

効率が悪い
操作性が悪い
落とすリスクが高い

- 各メーカー（6種類）のセルカルチャーインサートが嵌合
- 培地交換時等プレートを傾けた際にも安定
- 自動培養装置にも対応

住友ベークライト株式会社
スミロン コンパニオンプレート
2025年4月上市

PCT/JP2023/018621.
2023年5月18日.



本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 腸管がん由来細胞から、小腸様の高い腸管上皮細胞様機能と形態を有する細胞を作製する方法、及びその利用
- 出願番号 : PCT/JP2025/005848
- 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、小川勇、中井孝明

産学連携の経歴

- 2012年-2016年 厚生科研HBV事業に分担者として採択（抗HBV薬開発）
- 2017年-2021年 AMED-HBV1事業に分担者として採択（抗HBV薬開発）
- 2017年-2021年 AMED-MPS1事業に代表者として採択（MPS、細胞開発）
- 2022年-2026年 AMED-MPS2事業に分担者として採択（MPS開発）
- 2022年-2024年 AMED-HBV2事業に分担者として採択（抗HBV薬開発）
- 2025年-2027年 AMED-HBV3事業に分担者として採択（抗HBV薬開発）

2011年-現在 製薬企業 3 社、食品企業 5 社、MPS開発 4 社、iPS細胞製品 1 社、精密機器メーカー 1 社、電気機器メーカー 1 社、CRO 1 社と共同研究実施

- ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞（富士フイルム F-hiSIEC 2019年9月上市）
- F-hiSIEC用改良培地（富士フイルム F-hiSIEC™ Culture Medium AL 2025年4月上市）
- 改良コンパニオンプレート（住友ベークライト スミロン コンパニオンプレート 2025年4月上市）
- 小腸－肝臓連結MPS（MS-plate：仮称）（共同開発：伸晃化学）
- 腸内細菌共培養MPS（共同開発：ウシオ電機）
- 浮遊型凍結肝細胞を接着型に変換する培地（開発済・海外企業と検証試験実施中）

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