

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）ヒト生検腸管およびヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドを用いた新規ヒト型 in vitro 試験系の規格化・標準化に関する研究

（英 語）Standardization of human biopsy and human iPS cell-derived intestinal organoid-derived monolayers for pharmaceutical research

研究開発実施期間：令和 5 年 4 月 1 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：（日本語）水口裕之
（英 語）Hiroyuki Mizuguchi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）大阪大学・大学院薬学研究科・教授
（英 語）Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Osaka, professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文：

小腸上皮細胞は、様々な薬物代謝酵素や薬物トランスポーターを発現し、経口投与された薬物の吸収や排泄・代謝において重要な役割を担う。創薬研究において、医薬品候補化合物の小腸での吸収・排泄・代謝を評価するための in vitro 評価系としては、ヒト小腸上皮細胞の入手が困難なため、小動物由来小腸組織を用いた方法や、ヒト大腸癌細胞株である Caco-2 細胞を用いた系が汎用されている。しかしながら、種差や主要な薬物代謝酵素（CYP3A4 活性）活性の欠落といった問題がある。ヒト iPS 細胞から分化誘導した腸管上皮細胞の利用が期待されているものの、安定的な細胞製造（ロット差が大きい）や、薬物代謝酵素活性やトランスポーター活性に改善の余地があり、医薬品候補化合物のヒト小腸での“吸収・排泄・代謝”を同時に評価可能な in vitro 評価系の開発が切望されている。

近年、新たな培養技術としてオルガノイド（三次元組織構造体）培養技術が急速に発展してきた。ヒト腸管組織から採取した一部の細胞や、ヒト iPS 細胞から分化誘導した腸管上皮細胞からオルガノイドを樹立・

増幅させることで、安定的な細胞製造が可能になった。一方で、オルガノイドは（脱分化による）増殖能の獲得により、腸管上皮細胞としての機能が減弱することが課題であった。また、オルガノイドを用いた創薬試験は、種々の被験化合物がマトリゲルに捕捉されることが懸念され、利用可能な実験系が限定されていた。研究代表者らは、最近、マトリゲルから細胞を取り出し、二次元培養にて高機能な腸管上皮細胞へと分化・成熟化させる技術開発に成功した（Yamashita et al., Mol. Ther. Methods. Clin. Dev., 2021; 特願 2020-016592 号; 特願 2022-143939 号）。これらの腸管上皮細胞は、初代培養細胞と匹敵する機能を有していることを確認しており、in vitro 評価系構築の切り札の細胞系となると確信している。

そこで本研究は、ヒト小腸機能を忠実に反映した、ヒト生検腸管／ヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイド単層膜の規格化・標準化を行うことを目的とした。上述した研究代表者らの研究成果および研究資源を有効活用し、ヒト生検腸管／ヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイド単層膜のそれぞれの培養法について最適化した。その上で、腸管の各部位毎に、in vitro 評価系として使用する場合の最も標準的な株を、薬物代謝酵素活性やトランスポーター活性、網羅的な遺伝子発現解析等を通して選定した。また、他機関で本細胞を使用する際の細胞（オルガノイド）移送方法について検証を行った。薬物動態関連分子を欠損させたヒト生検由来腸管オルガノイド、およびヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の作製を行い、次世代型の評価系としての有用性を検証した。班会議において、「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン（平成 30 年 7 月 23 日付け薬生薬審発 0723 第 6 号）」への例示追加等に向けた論点整理を進めた。具体的な研究成果は以下のとおりである。

（1）薬物動態評価に適したヒト生検由来腸管オルガノイド単層膜の培養法の確立

ヒト腸管オルガノイドの培養培地としては、佐藤や Clevers らによって当初開発された培地（S 培地; Sato et al. Gastroenterology 2011）、佐藤らによる培地改良（F 培地; Fujii et al. Cell Stem Cell 2018）、三好らの培地（M 培地; Miyoshi et al. Science 2012）、あるいは市販培地（IC 培地; IntestiCult Organoid Growth Medium (Human) [STEMCELL technologies 社]）が汎用されている。すでに研究代表者らはこれらの培地の 3D オルガノイド培養における機能比較を実施し、培地によりオルガノイド構成細胞や細胞の機能が大きく変動することを報告している（Yokota et al., BBRC, 2021）。薬物動態評価を目的とした場合には、3D オルガノイドを単層培養化する必要があり、本研究では薬物動態評価に適した腸管オルガノイドおよび単層培養法の確立を行った。

上述の 4 種の培地に加え、研究代表者らがヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の分化誘導研究を通して開発した腸管分化・成熟培地（K 培地）についても検討し、規格化・標準化を行った。生検由来腸管オルガノイドの 3D 状態での維持培養を行ったところ、腸管関連遺伝子やタンパク質の発現レベルについては、M 培地>IC 培地>F 培地>S 培地の順で高い発現を示した一方で、単層培養した場合（2D）には M 培地や F 培地を用いた場合には綺麗な単層膜を形成できない場合が多く、単層化細胞を用いた実験の実施にはオルガノイドを IC 培地で培養した場合が実験の再現性や機能面で最も優れていると結論した。

しかしながら、IC 培地を用いると再現性の良い実験が実施できるが、培地が非常に高価（約 10 万円/100 mL）で持続可能な研究の実施には課題があった。そこで、生検由来腸管オルガノイドを IC 培地で培養後、セルカルチャーインサート（トランスウエル）で単層培養時の培地について検討した。その結果、M 培地を DMEM（基本培地）で 1/10 希釈した MD 培地が高い腸管機能の発現と、安定的な単層細胞の維持に有用であることが分かった。MD 培地にすることで Wnt 濃度が下がり、腸管幹細胞から吸収上皮細胞への分化が促進されたことが原因と考えられた。即ち、生検由来腸管オルガノイドの 3D 培養、単層培養に適した培養法を確立した。

また、薬物代謝酵素やトランスポーターの活性は個人差があることが知られている。また、小腸のどの部位（十二指腸、空腸、回腸）由来のオルガノイド単層膜が、*in vitro* 評価系として生体を最も反映しているのかについては分かってない。そこで、生検サンプルに加え、市販の公知の小腸細胞からもオルガノイドを作製し（計6株）、腸管機能の部位間差に着目した研究を実施した。その結果、小腸において広範に確認される分化細胞の存在はCHGAやMUC2といったマーカーにより確認された。遺伝子発現プロファイルを取得したところ、MDR1などの主要な薬物トランスポーターやCYP3A4などの薬物代謝酵素も各部位由来オルガノイドおよびその単層膜において広範な発現が認められた。また、腸管における各部位の特異的マーカー遺伝子の発現レベルからは部位特異的特徴を一部反映した結果が得られた。一方で、同一部位でもオルガノイド由来donorの個人差、あるいは培養ロット差の影響を受ける結果も確認された。機能面での部位特異性について、LC-MS/MSによりCYP分子種の活性を定量的に評価したところ、CYP2C19活性とCYP1A2活性に関しては由来部位間で大きな差は確認されなかったが、CYP3A4活性については小腸上部由来であるほど活性が高い結果となり、由来部位の影響が確認された。

さらに、日本ベーリンガー社において、これらのオルガノイドの移送・拡大培養・単層化が可能であり、各種化合物による薬物代謝酵素やトランスポーターの遺伝子発現およびタンパク質発現を評価し、本培養系のロバスト性を確認した。さらに、クローン病患者から小腸1例、非炎症性腸疾患患者から小腸1例のオルガノイド樹立に成功した。

（2）薬物動態評価に適したヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞オルガノイド単層膜の培養法の確立

研究代表者らは最近、ヒトiPS細胞から腸管上皮細胞への分化の各工程を全面的に最適化し、ヒト初代培養腸管上皮細胞やヒト初代培養（凍結）肝細胞と同等のCYP3A4活性を有する分化誘導プロトコルを確立した。さらに、本細胞をオルガノイド培養したところ、40継代以上（10e40倍以上）の安定な細胞増幅が可能であり、この腸管オルガノイドを単層膜化し、適切な培地で培養したところ、ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞をさらにしのごCYP3A4活性やトランスポーター活性を示す細胞系の開発に成功した（特願2022-143939号）。そこで、薬物動態評価に適したヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞オルガノイド単層膜の調製法の確立を目的に、ヒト生検由来腸管オルガノイド単層膜の培養法確立と同様の手法で、オルガノイド培地や単層化培地の最適化を行った。その結果、F培地が安定的なヒトiPS細胞由来腸管オルガノイドの維持・培養に最適なことを見出した。単層化培地については、生検オルガノイドの場合とは異なり、オルガノイド培養に用いたF培地では腸管関連遺伝子の発現レベルや薬物代謝酵素活性（CYP3A4活性）は低く、評価系として不適切であった。一方、K培地を用いて単層化細胞を培養したところ、腸管関連遺伝子の遺伝子発現レベルや活性が劇的に上昇し、ヒト成人腸管と同等レベルであった。さらに、CYP3A4の薬物誘導試験に最適な培地についても確立した。また、本ヒト腸管オルガノイドは1年以上増幅させながら継代培養が可能であったが、1年以上培養を続けたヒト腸管オルガノイドを単層膜化しても、腸管機能には変化がなく、高い機能をもった腸管細胞の供給が可能なことを実証した。このような結果により、本培養系は従来系と比較してヒト生体に近い機能を有していることに加え、培養系としての安定性と汎用性を兼ね備えていることを明らかにした。汎用性を確認するため、Y0-2株に加え、異なったヒトiPS細胞株としてTic株、b-iPS株についても同様に腸管細胞に分化誘導し、オルガノイドを樹立した。さらに、本腸管オルガノイドをセルカルチャーインサート（トランスウェル）で培養した場合の腸管関連遺伝子やタンパク質の発現レベルや電気抵抗値等を確認したところ、用いるiPS細胞株を変えても、高い腸管機能を示すことを確認した。これらの腸管オルガノイドにおいても長期の継代培養が可能なことを確認した。また、実用面において重要な単層培養化の場合の播種密度や、単層培養できる日数等について検討を行い、最適な範囲を確定した。

さらに、多くの外部研究者への同オルガノイドの利用促進のため、宅急便を用いたオルガノイドの移送試験を行った。当初は冬季での寒冷気候中でも輸送が可能かどうかを主眼としていたが、近年の酷暑の影響を鑑み夏季における輸送に関しても検討を行った。試行回数を重ねるとともに国内の5か所以上の研究施設への移送を行ったことでオルガノイドを宅急便で比較的簡便に輸送できる条件を見出した。具体的には、培養しているプレートを密閉容器（二次容器）に培養インキュベーターと同じ空気組成（5%CO₂）になるよう封入し、それを保温性の高いボックスに蓄熱材（37℃の熱を維持する）を緩衝材とともに同梱することで宅急便での輸送が可能となった。夏季においては保冷剤も併用する必要性が示唆された。このようにして、輸送したオルガノイドから移送前の細胞と同程度の高機能なオルガノイド単層膜を作製可能であることについても確認できた。すでにこれらを大学や企業などの複数の研究施設へ輸送し、先方施設において薬物代謝能や薬物輸送能を従来どおり評価可能であることも確認できた。一方、本ヒトiPS細胞由来腸管オルガノイドの市販化（キット化）を目指した準備として、市販化（商業利用）可能な3社のiPS細胞株を腸管分化させ、腸管オルガノイドの樹立を試みた。その結果、全ての株から同様に腸管オルガノイドを樹立できた。さらに、それらを単層膜化し機能を検証することで最適な株を見出した。

（3）薬物代謝酵素やトランスポーターを欠損させた腸管オルガノイド単層膜を用いた次世代評価系開発

従来、特定の薬物動態関連分子の寄与を調べる際には、阻害剤を用いる実験系が汎用されてきた。しかしながら、阻害剤の特異性や阻害効果等に限界があった。そこで、ゲノム編集技術を利用して薬物代謝酵素（CYP3A4）やトランスポーター（MDR1 [Pgp]、BCRP、PEPT1）等の薬物動態関連分子を欠損したヒト生検腸管／ヒトiPS細胞由来腸管オルガノイド単層膜を作製し、各分子の薬物動態への影響を正確に評価できる次世代評価系の開発を目的に、CYP3A4、MDR1、BCRP、PEPT1を欠損させたヒト生検由来腸管オルガノイド、およびヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の作製を行った。

CRISPR-CAS9系によるゲノム編集を用いることで、CYP3A4、MDR1、BCRPを欠損させたヒト生検由来腸管オルガノイド、およびMDR1、BCRPを欠損させたヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞オルガノイドの作製に成功した。各分子を欠損させたヒト生検由来腸管オルガノイド、およびヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の腸管機能を確認した結果、いくつかの分子種においては、確かに遺伝子配列レベルでは染色体の両アリの該当遺伝子部分がノックアウト出来ているにもかかわらず、活性が認められるものがあった。そのうち、CYP3A4を標的としたgRNAを新たに設計し、それを用いてCYP3A4を欠損させたヒトiPS細胞株を新たに樹立し、分化誘導に向けた基盤を整えた。

また、新たな標的としてグルクロン酸抱合酵素であるUGT1A1を欠損したヒト生検腸管オルガノイドの作製を行った。樹立したUGT1A1欠損ヒト生検腸管オルガノイドを用いて、腸管における毒性発現が認められる化合物（SN38）による毒性試験を実施した。その結果、野生型株と比較して、UGT1A1欠損株における細胞生存率は低い値を示し、SN38濃度依存的な毒性発現が認められた。しかし、ゲノム編集に用いた野生型株のゲノムを解析した結果、UGT1A1の活性低下を引き起こす変異（SNP）があることが明らかとなった。すなわち、UGT1A1活性の低いヒト生検腸管オルガノイドに対してUGT1A1欠損のゲノム編集を行なっていたため、今後SNPを有さないドナー由来のオルガノイドを用いてUGT1A1欠損株を樹立する必要性が見出された。

（4）規格化・標準化に向けた細胞系の評価

研究代表者が実施した研究結果が第三者においても安定的に実施可能か検証すること、及び多くのステークホルダーの意見を研究に反映させることは、規格化・標準化に向けての必要条件である。そこで、他機関（研究室）でも安定的な各種試験が可能か検討した。具体的には、研究代表者が作製し、凍結保存されたヒトiPS細胞由来腸管オルガノイドを、分担研究者（国立衛研・諫田泰成、大阪大学・近藤昌夫あるいは丹羽

祐貴)に移送し、分担研究者においても、同細胞が単層培養でき、優れた腸管機能を持つことを確認した。また、ヒト十二指腸および空腸由来オルガノイド、および同単層膜を用いた各種試験が分担研究者(日本ベーリンガー社・岸本航先生)においても再現できることを確認した。一方、分担研究者や研究協力者だけでなく、AMED、PMDA、厚生労働省、さらには製薬協の担当者にも参加いただいた班会議を実施し、産業・規制・臨床の視点から議論を深め、規格化・標準化に使用する細胞系等の議論を行った。そこで決定した優先順位を踏まえ、in vitro ヒト腸管モデル系について、「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン(平成30年7月23日付け薬生薬審発0723第6号)」に準じて、薬物代謝及びトランスポーターの機能を解析するため当該解析方法を他機関(研究室)に技術導出し、インターラボ間でのバリデーションを厳密に評価した。具体的には、国内の2つの機関に陸路でヒトiPS細胞由来腸管オルガノイドを同時期に輸送し、当ラボも含めた各施設で播種・培養・アッセイのスケジュールを全て合わせて比較検討を行った。その結果、遺伝子発現解析においてはインターラボ間でも概ね似た遺伝子発現パターンが見られた。しかしながら、TEERやCYP3A4活性についてはその値がラボ間で大きく異なり、施設間での機能差が顕著に表れてしまった。細胞状態と輸送状況について再度確認するとともに、輸送後の単層膜形成までの時間と播種操作について、インターラボ間での再度のすり合わせが必要と考えられた。また、国内の別機関にて空輸にてヒトiPS細胞由来腸管オルガノイドを生きたまま輸送した際、輸送先にて生細胞数の大幅な低下が確認され、機能にも大きな悪影響が確認された。これにより、オルガノイド移送に際して気圧変化を考慮する必要性が明確化された。

以上より、ヒト生検腸管およびヒトiPS細胞由来腸管オルガノイドを用いた上記4項目の検討により、新規ヒト型 in vitro 試験系として両培養系の機能を明らかにできた。この成果は両者を規格化・標準化するうえで重要な知見をもたらすものである。

英文：

Small intestinal epithelial cells express various drug-metabolizing enzymes and drug transporters and play a crucial role in the absorption, excretion, and metabolism of orally administered drugs. In drug discovery research, methods using small animal-derived small intestinal tissue or the human colorectal cancer cell line Caco-2 are widely used as in vitro assessment systems to evaluate the absorption, excretion, and metabolism of drug candidate compounds in the small intestine, as human small intestinal epithelial cells are difficult to obtain. However, these methods face challenges such as species differences and the lack of activity of key drug-metabolizing enzymes (e.g., CYP3A4). Although the use of intestinal epithelial cells differentiated from human iPS cells is promising, challenges remain regarding stable cell production (significant batch-to-batch variability) and the need for improvements in drug-metabolizing enzyme and transporter activity. Consequently, there is an urgent need for the development of an in vitro assay system capable of simultaneously evaluating the “absorption, excretion, and metabolism” of drug candidate compounds in the human small intestine.

In recent years, organoid culture technology—a new form of three-dimensional tissue culture—has advanced rapidly. By establishing and expanding organoids from specific cells derived from human intestinal tissue or from intestinal epithelial cells differentiated from human iPS cells, it has become possible to stably produce cells. However, a major challenge has been that as organoids acquire proliferative capacity, their function as intestinal epithelial cells diminishes. Furthermore, drug discovery testing using organoids has been limited due to concerns that various test compounds may become trapped in Matrigel. The principal investigators recently succeeded in developing a technology to remove cells from Matrigel and differentiate and mature them into highly functional intestinal epithelial cells via two-dimensional culture (Yamashita et al., *Mol. Ther. Methods. Clin. Dev.*, 2021; Japanese Patent Application No. 2020-016592; Japanese Patent Application No. 2022-143939). It has been confirmed that these intestinal epithelial cells possess functions comparable to those of primary cultured cells, and we are confident that they will serve as a key cell line for establishing in vitro evaluation systems.

Therefore, this study aimed to standardize and formalize the culture protocols for monolayer membranes derived from human biopsy-derived intestinal tissue and human iPS cell-derived intestinal organoids, which faithfully reflect human small intestinal function. By effectively utilizing the research findings and resources of the principal investigators mentioned above, we optimized the respective culture methods for human biopsy-derived intestinal organoid monolayers and human iPS cell-derived intestinal organoid monolayers. Furthermore, for each intestinal region, we selected the most standard strains for use as in vitro evaluation systems through analyses of drug-metabolizing enzyme activity, transporter activity, and comprehensive gene expression profiling. We also verified methods for transporting cells (organoids) when these cells are used at other institutions. We generated human biopsy-derived intestinal organoids and human iPS cell-derived intestinal epithelial cells lacking pharmacokinetic-related molecules and verified their usefulness as next-generation evaluation systems.