

奨励金No.1500

個別化医療を志向した消化管障害の *in vitro* 評価モデルの開発

岩尾 岳洋

名古屋市立大学 大学院薬学研究科 准教授

Development of *in vitro* evaluation model of intestinal tract damage for personalized medicine

Takahiro Iwao,

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Associate Professor



消化管はさまざまな機能をもった重要な臓器である。その消化管が障害を受けると健康にさまざまな影響を及ぼす。そこで本研究ではヒト生体における消化管障害を評価可能なモデル系の構築を試みた。その結果、ヒト iPS 細胞から作製した腸管オルガノイドを、陰窩絨毛様構造を維持したまま二次元的に培養する方法を確立することができた。また、二次元的に培養した腸管オルガノイドの消化管障害の評価への利用の可能性も示唆された。

The intestine is an important organ with a variety of functions. Human health would be affected by intestinal tract damage. In this study, we attempted to construct the evaluation model of intestinal tract damage in humans. We were able to establish the two-dimensional culture method of human iPS cell-derived intestinal organoids while maintaining crypt-villus structures. Additionally, it was suggested that intestinal organoids might be used for intestinal tract damage evaluation.

1. 研究内容

1.1 目的

消化管は医薬品や栄養の吸収をはじめ、多彩な機能を有している臓器である。その重要な機能のひとつとして、外界からの異物の体内への侵入を防ぐためのバリアとしての機能がある。そのため消化管に障害がおこると消化管のバリア機能が低下するだけでなく、他の臓器へも影響を及ぼすといわれている。消化管障害を引き起こす原因としては炎症性腸疾患のような消化管の疾患によるものや、化学物質や医薬品のような化合物によるものなどがある。したがって、このような要因によって引き起こされる消化管障害を適切に評価することが必要であり、また、そのためには適切なモデル系を使用する必要がある。現在このような評価のためには実験動物やさまざまな *in vitro* 系が用いられている。しかし、実験動物はヒトとの

間に種差がある。また、近年は欧米を中心に実験動物の使用についての制限が厳しくなっており、動物実験に代わる代替法の開発が強く求められている。一方、ヒト生体における評価のためにはヒト生体由来の組織や細胞の使用が望ましいが、これらは多くの場合容易に入手することができない。また、簡便に使用できる細胞株の場合は多くががん細胞に由来するものであることから、ヒトの生体を正確に反映しているとは言い難い。したがって、ヒト生体における消化管障害を正確に評価できるモデル系の構築が必要であると考えられる。

腸管オルガノイドは吸収上皮細胞だけでなく、杯細胞や内分泌細胞、パネート細胞、腸管幹細胞など腸管を構成するさまざまな細胞種を含んでいる。また、生体の消化管のような陰窩絨毛様構造を有する三次元構造体であることから、生体を模倣する評価系としてさまざまな領域での利用が期待さ

れている。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞から腸管オルガノイドを作製し、これを用いた消化管障害の新たな評価モデルとしての構築を目的とした。

1.2 方法

これまでに我々が確立した方法を用いてヒト iPS 細胞から腸管オルガノイドを作製した (Onozato et al., J. Pharm. Sci., 2021)。このヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドをセルカルチャーインサート上に播種した。一定期間セルカルチャーインサート上で培養を行い、顕微鏡下で細胞形態の観察を行った。微絨毛やタイトジャンクションの観察においては、透過型電子顕微鏡による観察を行った。分化の程度はリアルタイム PCR 法によりマーカー遺伝子の発現レベルを解析することによって評価した。また、バリア機能の評価は、タイトジャンクションの頑健性の指標である経上皮電気抵抗値 (TEER 値) を測定することにより行った。

1.3 結果

三次元の構造をしている腸管オルガノイドは、多くの場合腸管オルガノイドの内側が腸管の管腔側に相当する構造をとっている。そのため、腸管の管腔側からの物質の曝露を考えた場合、腸管オルガノイドの内腔に注入する必要がある。しかし、実際に実験を行うにあたってこの操作を腸管オルガノイドひとつひとつに対して行うことは現実的ではない。また、腸管のバリア機能の評価を行う場合は、三次元構造体の腸管オルガノイドでは定量的な解析が難しい。そこで、操作が簡便であり、かつ、比較的定量的な解析が可能な評価系とするため、三次元構造体の腸管オルガノイドをセルカルチャーインサート上の播種し、二次元的に培養することを試みた。その結果、腸管オルガノイドで見られるような陰窩絨毛様構造を有したまま、セルカルチャーインサート上で二次元的に培養することが可能な方法を確立することができた。この陰窩絨毛様構造を有した細胞を透過型電子顕微

鏡で観察を行ったところ、高密度かつ長い微絨毛の存在が確認された。また、バリア機能を規定するタイトジャンクションの存在も確認された。そこで、さらに長期間陰窩絨毛様構造を維持したまま培養可能な方法の検討も行った。その結果、陰窩絨毛様構造を維持したまま比較的長期間培養することができた。培養している期間はバリア機能の指標である TEER 値の大きな変動はなく、一定の値を保っていた。また、遺伝子の発現解析から、腸管幹細胞などのマーカー遺伝子の発現が培養期間をとおして、比較的一定の発現レベルで推移していた。吸収上皮細胞や杯細胞など腸管上皮に存在する細胞のマーカー遺伝子の発現レベルも培養期間中は維持されていた。

1.4 結論

本研究では、ヒト iPS 細胞から三次元構造体の腸管オルガノイドを作製し、その陰窩絨毛様構造を維持したまま、二次元的に培養する方法を確立することができた。また、この二次元的に培養した腸管オルガノイドに化合物を曝露することによって消化管障害の評価が可能であることを示唆する予備的な知見を得ることができた。さらに、この二次元的に培養した腸管オルガノイドは陰窩絨毛様構造を維持したまま比較的長期間培養することができたことから、長期間の物質の曝露などによる慢性的な消化管障害の評価にも応用できる可能性が示唆された。

2. 発表（研究成果の発表）

2.1 学会発表

1. 岩尾岳洋. 医薬品の消化管吸収や安全性評価のための iPS 細胞由来腸管細胞. 日本薬物動態学会第 37 回年会 (横浜, 2022 年 11 月 7-10 日).
2. 小川 勇, 岩尾岳洋, 松永民秀. ヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドを用いた薬物吸収予測モデルの検証. 日本薬物動態学会第 37 回年会 (横浜, 2022 年 11 月 7-10 日).