

幹細胞からの薬物動態関連臓器細胞の分化誘導技術

岩尾 岳洋・松永 民秀*

はじめに

薬物は体内に入ってから効果を発現し体外に排泄されるまで、薬物動態と呼ばれる吸収・分布・代謝・排泄の一連の過程をたどる。肝臓や小腸には多くの薬物代謝酵素や薬物トランスポーターが発現しており、これらは薬物の体内動態を大きく左右する重要な臓器である。したがって、医薬品の開発を行ううえでヒトにおける薬物動態、特に肝臓および小腸での代謝または吸収を開発早期の段階からより正確に予測することは非常に重要である。ヒトでの薬物動態予測に実験動物が用いられているが、薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの発現パターンや発現レベル、基質特異性には大きな種差が存在することから、ヒトへの外挿は困難な場合も多い。そのため、より正確な予測を行うためには、ヒト由来の試料を用いる必要があり、肝臓については、ヒト肝マイクロソームやHepG2細胞、HepaRG細胞、ヒト初代肝細胞などを用いて評価が行われている。しかし、マイクロソームはcytochrome P450 (CYP) など膜結合酵素による代謝などの評価しかできない。また、HepG2細胞やHepaRG細胞はヒト肝がん由来の株化細胞であるため取り扱いが容易であるが、各々1種類の細胞であり、HepG2細胞は正常肝細胞とは薬物動態関連酵素の発現が異なるなどの問題がある。一方、ヒト初代肝細胞はヒトの薬物動態を予測するうえでもっとも有用であるが、短期間の培養で機能が大きく低下し、個体間差やロット間差が大きく、良質なロットに巡り合っても数量に限りがあることなどの問題がある。小腸においてもヒト小腸マイクロソームやヒト結腸がん由来のCaco-2細胞などが用いられているが、マイクロソームではもっとも重要な吸収評価ができず、Caco-2細胞は正常細胞と機能が大きく異なる。一方、ヒト初代小腸細胞は入手自体がきわめて困難である。したがって、ヒトにおける薬物動態を正確に予測するために、ヒト正常組織細胞と同等の機能を有し、かつ、安定して供給することができる細胞が求められている。

薬物動態関連臓器細胞の作製には、おもに胚性幹細胞(ES細胞)と人工多能性幹細胞(iPS細胞)が用いられている。そこで、本稿ではこれらの多能性幹細胞から肝細胞および小腸細胞への分化誘導とその薬物動態学的機能に関して概説する。

多能性幹細胞由来肝細胞

肝細胞への分化誘導法 肝細胞への分化誘導に関する報告は数多くあり、その多くは発生の過程を模倣して三つのステップで行われている(図1)。肝臓は内胚葉由来の臓器であるため、まずは多能性幹細胞から内胚葉へ分化させる。その後、肝芽細胞を経て肝細胞へと段階的に成熟させる。内胚葉への分化に関しては、高濃度のactivin Aを用いることで分化が誘導されることが知られていることから¹⁾、ほとんどの報告はこの方法により行われている。内胚葉への分化にはWntシグナルが重要であり、これを活性化させることで分化が促進されることから²⁾、WntシグナルのリガンドであるWnt3aやglycogen synthase kinase (GSK) 阻害剤が併用されることもある。肝臓発生の初期においては、心臓中胚葉からのfibroblast growth factor (FGF) シグナルやbone morphologic protein (BMP) シグナルが肝芽細胞への分化を誘導することから³⁾、内胚葉から肝芽細胞への分化にはこれらの因子が用いられる。また、dimethylsulfoxide (DMSO) も肝芽細胞への分化を誘導することが知られている⁴⁾。筆者らの検討では、肝芽細胞への分化誘導時にFGFやBMPなどの液性因子を用いた場合とDMSOを用いた場合で分化誘導効率に大きな差はなかった。したがって、筆者らはこの過程ではDMSOを用いている。最終的に肝細胞への成熟過程では、hepatocyte growth factor (HGF)、oncostatin M (OSM)、dexamethasone (DEX) が用いられる。HGFは肝細胞の増殖や維持に関係していること^{5,6)}、OSMとDEXは胎児肝細胞の成

ステップ1 (内胚葉系への分化)	ステップ2 (肝芽細胞への分化)	ステップ3 (肝細胞への分化)
Activin A Wnt3a	FGF BMP	HGF OSM Insulin
SOX17 FOXA2	HEX FOXA2 HNF1α	HNF4α FOXA2 HNF1α
Sodium butyrate GSK 阻害剤	DMSO	DEX Valproic acid

図1. 多能性幹細胞から肝細胞への分化過程

*著者紹介 名古屋市立大学大学院薬学研究科医療機能薬学専攻(教授) E-mail: tmatsu@phar.nagoya-cu.ac.jp

熟を促進することが報告されていることから⁷⁾、ほとんどの報告ではこれらを用いて成熟化が行われている。

多能性幹細胞から肝細胞への分化誘導は上記の方法を基本として行う。しかしながら、作製した多能性幹細胞由来肝細胞は胎児様の性質を持っており、薬物動態学的機能なども成人肝細胞と比べて未熟であることが課題である。そこで、この問題を克服するためのさまざまな方法が報告されている。その一つとして、肝細胞の成熟化に関連する転写因子を導入する方法がある。Takayamaらは改変アデノウイルスベクターを用いて、forkhead box protein (FOX) A2とhepatocyte nuclear factor (HNF)-1 α をそれぞれ分化の途中で細胞に導入することで、より成熟したヒトiPS細胞由来肝細胞を作製することができると報告している⁸⁾。また、多能性幹細胞から作製した肝細胞はさまざまな細胞が混在した不均一な細胞集団である。彼らは細胞外マトリックスの一つであるlaminin 111を用いて、肝幹前駆細胞を単離することで、高純度な多能性幹細胞由来肝細胞を得ることができるといことも報告している⁹⁾。一方、筆者らは低分子化合物であるvalproic acidを用いることにより、ヒトiPS細胞由来肝細胞の成熟が促進されることを見いだした¹⁰⁾。Valproic acidは医療現場では古くから抗てんかん薬として使用されているが、それ以外にも多様な薬理作用を有する。筆者らは、肝細胞成熟の促進にvalproic acidのhistone deacetylase (HDAC) 阻害作用が寄与していることを明らかにした。また、肝細胞に特異的な栄養代謝経路を利用することにより、ヒトiPS細胞由来肝細胞を単離する方法も見いだしている¹¹⁾。その他にも、肝毒性評価への利用に向けたサンドイッチ培養¹²⁾や再生医療に向けたliver budの作製¹³⁾など、培養方法を工夫することで、さまざまな分野への応用が試みられている。

肝細胞の薬物動態学的機能 多能性幹細胞由来肝細胞はalbumin (ALB) やtyrosine aminotransferase (TAT) など成熟肝細胞のマーカー発現に加え、ALB分泌能、尿素産生能など、肝細胞特異的な機能を有することが多くの報告で確認されている。薬物動態学的に重要な機能としては、医薬品の酸化的代謝に関わるCYPによる代謝がある。CYPには多くの分子種が存在するが、肝臓のCYP全体の約30%占め、約50%の医薬品の代謝に関与するCYP3A4は、その中でもっとも重要である。また、CYP3A4は核内受容体であるpregnane X receptor (PXR) やconstitutive androstane receptor (CAR) により転写が制御される。さらに、これらの核内受容体にリガンドが結合することでCYP3A4の発現を誘導する。代謝酵素の誘導は、結果的に薬物の代謝が促進され、もともと薬効を有する場合は低下、プロドラッグのように代謝で効

果が高まる薬物は薬効の上昇につながることから、薬物動態学的には重要な機能である。多能性幹細胞由来肝細胞はこのCYP3A4の代謝活性や誘導能を有することが多くの報告で示されている。筆者らもヒトiPS細胞から作製した肝細胞はCYP3A4をはじめとした各種CYPおよび抱合酵素であるUDP-glucuronosyltransferase (UGT) やsulfotransferase (SULT) の活性を有することを報告した(図2)。また、PXRのリガンドであるrifampicinによってCYP3A4の発現が誘導されることも報告している(図3)¹⁰⁾。薬物代謝酵素には遺伝子多型が存在し、多型の種類によっては活性の低下を引き起こす。Takayamaらは、CYP2D6欠損の遺伝子多型を有するヒトiPS細胞か

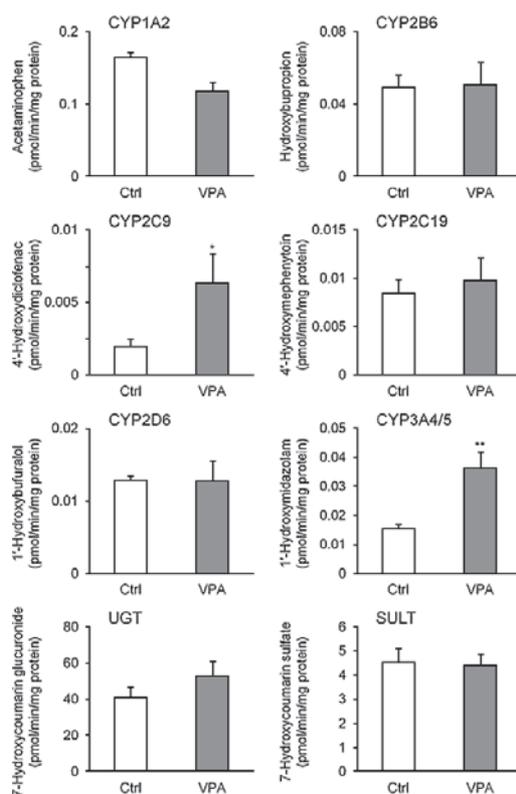


図2. ヒトiPS細胞由来肝細胞の薬物代謝酵素活性¹⁰⁾。VPA: valproic acid. *p < 0.05, **p < 0.01.

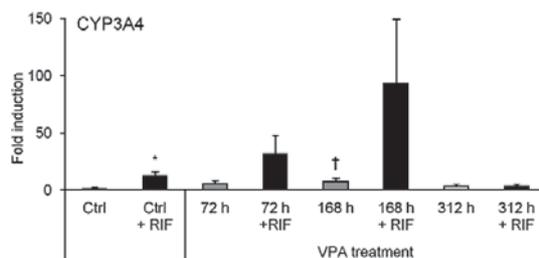


図3. ヒトiPS細胞由来肝細胞のCYP3A4誘導能¹⁰⁾。VPA: valproic acid, RIF: rifampicin. *p < 0.05, †p < 0.05 (vs コントロール群)。

ら作製した肝細胞はCYP2D6活性を欠損しており、その活性はCYP2D6を導入することによって回復したと報告している¹⁴⁾。このように、iPS細胞から作製した肝細胞は個々の遺伝情報を反映していることから、遺伝子多型を有する人における医薬品の体内動態予測や個体間差の解析にも利用可能であると考えられる。

多能性幹細胞由来小腸細胞

小腸細胞への分化誘導法 ヒト多能性幹細胞から小腸細胞への分化誘導に関する報告は、肝細胞への分化誘導の報告に比べてきわめて少ない。それに加えて、薬物動態学的機能に関する検討はほとんどされていない。以前、マウスの多能性幹細胞から胚様体を經由して腸管組織の作製が報告されたが^{15,16)}、ヒトの多能性幹細胞の場合この方法で効率よく再現性を持って作製することは難しいと思われ、研究があまり進んでいなかった。しかし、2011年にSpenceらは三次元組織体（オルガノイド）を作製するマトリゲル包埋法¹⁷⁾を用いて、ヒト多能性幹細胞から腸管オルガノイドを初めて作製した¹⁸⁾。このオルガノイドは、腸管のさまざまな細胞によって構成されており、蠕動運動も確認された。また、最近Uchidaらは、特殊なパターンプレートを使ってヒトES細胞から腸管オルガノイド（ミニ腸管）の作製を報告した¹⁹⁾。この腸管オルガノイドもさまざまな腸管細胞で構成されており、蠕動運動を制御する薬物による反応性やペプチドトランスポーター（PEPT1）によるペプチドの輸送能を有していることが示されている。しかし、薬物動態学的な観点から考えると、腸管オルガノイドを用いて薬物の消化管吸収を定量的に評価することは難しく、二次元で培養した小腸上皮細胞の単層膜での評価がより簡便であるため望ましいと考えられる。そこで筆者らは、薬物動態試験での利用を目的として、ヒトiPS細胞から小腸上皮細胞への分化誘導に関する研究を進めている。その結果、ヒトiPS細胞から薬物動態学的機能を有する小腸上皮細胞の分化誘導法を確立し²⁰⁾、分化誘導の際に低分子化合物であるmitogen-activated protein kinase kinase (MEK) 阻害剤、DNA methyltransferase (DNMT) 阻害剤、transforming growth factor (TGF)- β 阻害剤を用いることで、分化誘導が促進されることを明らかにした(図4)^{21,22)}。また、これらと併用することで、さらに分化が促進される分化誘導因子も見いだしている(未発表)。Ogakiらも筆者らとは異なる低分子化合物であるbromindirubin-3'-oxime (GSK-3 β 阻害剤)と*N*-[(3,5-difluorophenyl)acetyl]-*L*-alanyl-2-phenylglycine-1,1-dimethyl-ethyl ester (γ -secretase阻害剤)を用いて、Wnt/ β -カテニン経路の活性化とNotchシグナル経路の

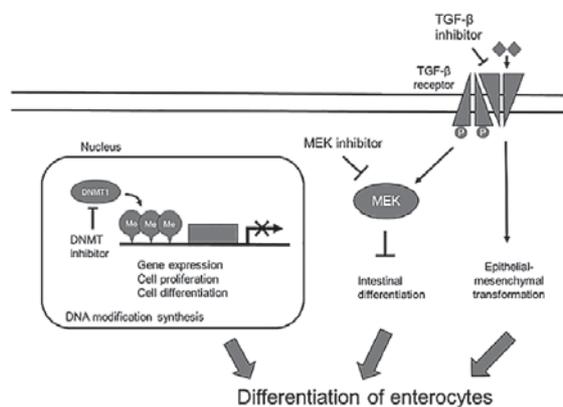


図4. 小腸上皮細胞への分化に対する低分子化合物の作用に関する概念図²²⁾

阻害をすることで、ヒトES細胞から腸管細胞への分化誘導を行ったと報告している²³⁾。

ヒト多能性幹細胞から小腸細胞への分化誘導に関する研究は、ここ数年で着実に進展してきており、今後さらなる研究の発展が期待される。

小腸細胞の薬物動態学的機能 小腸における医薬品の吸収の評価にはCaco-2細胞が広く用いられている。Caco-2細胞は絨毛を有し、極性を持った単層膜を形成するなど、ヒト小腸と形態学的に類似した性質を持つ。しかしながら、ヒトの正常小腸と比べて、薬物代謝酵素の発現レベルが非常に低い、PXRを介した薬物代謝酵素の誘導が見られない、薬物トランスポーターの発現パターンが異なる、タイトジャンクションが強固であるなど、機能的には大きく異なる²⁴⁻²⁷⁾。したがって、よりヒトの小腸に近い機能を有する細胞の作製が望まれている。筆者らが作製したヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞はCYP, UGT, SULTおよびcarboxylesterase (CES) による薬物代謝酵素活性を有していた^{21,22,28)}。特に、CESアイソザイムの発現や活性のパターンはヒト小腸に類似していた。また、rifampicinやvitamin D receptor (VDR) のリガンドである1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃によってCYP3A4の誘導も認められている(図5および未発表データを含む)。Negoroらも薬物代謝酵素誘導能について報告をしており、ヒト結腸がん由来のLS-180細胞やCaco-2細胞と比較して、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞ではPXR, VDR, glucocorticoid receptor (GR) のすべての核内受容体を介したCYP3A4の誘導が認められている²⁹⁾。また、ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞のタイトジャンクションはCaco-2細胞よりもルーズであり、ヒト小腸に近いことが筆者らの報告などから示されている^{30,31)}。さらに、PEPT1や小腸で重要な排出トランスポーターであるP-glycoprotein (P-gp), breast cancer

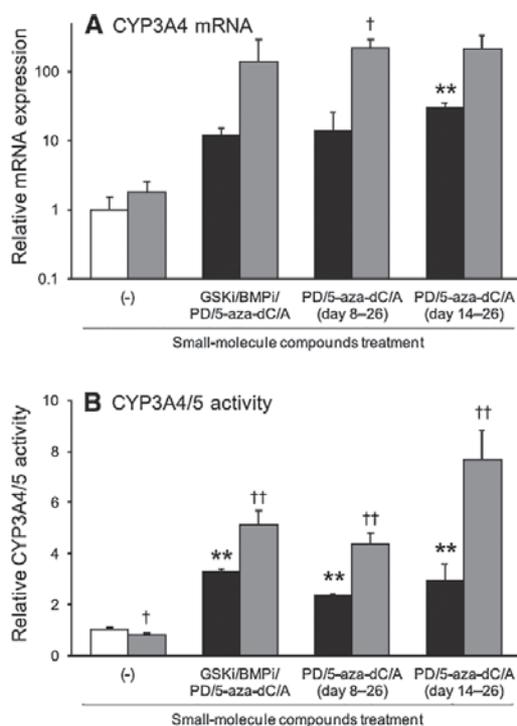


図5. ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞におけるCYP3A4の発現と活性の誘導²¹⁾。(A) CYP3A4発現, (B) CYP3A4/5活性。白と黒のバーはvehicle群を示し, グレーのバーは1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃の処理群を示す。* $p < 0.01$ (vs低分子化合物未処理群); † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ (vs vehicle群)。

resistance protein (BCRP)などの機能を有することを筆者らは明らかにしており, ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞を用いて, ヒト小腸における医薬品の吸収率を予測できる可能性も示している(未発表データを含む)³⁰⁾。

このように, 近年ヒト多能性幹細胞由来小腸細胞が有する薬物動態学的特性が明らかになりつつあることから, 小腸の新規薬物動態予測モデルとして利用されるようになる日が現実となるのもそう遠くないかもしれない。

おわりに

本稿では, 薬物動態関連臓器として重要な肝臓と小腸へのヒト多能性幹細胞からの分化誘導法とその薬物動態学的機能について述べてきた。しかし, その他にも薬物動態学的に重要な臓器(組織)として, 腎臓や血液脳関門, 胎盤などがある。ここにも薬物トランスポーターが発現しており, 薬物の体内からの排泄, 脳や胎児への移行を制御している。ヒト多能性幹細胞から腎臓オルガノイドの作製に関してはいくつか報告がされている^{32,33)}。しかし, 腎臓は複雑な臓器であるため作製が難しく, また再生医療としての研究が主に進められているため, 薬物の排泄過程を評価するモデル系としての利用に関しては

まだまだ研究が進んでいない。また, 血液脳関門については, 最近ヒトiPS細胞由来の血管内皮細胞, ペリサイト, ニューロン, アストロサイトから血液脳関門モデルの作製について報告された³⁴⁾。この報告では, 中枢神経に移行しやすい医薬品は作製した血液脳関門モデルでの透過性も高いことが示されており, 薬物動態学的機能に関するさらなる研究が期待されるところである。

文 献

- 1) D'Amour, K. A. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1534 (2005).
- 2) Hay, D. C. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 12301 (2008).
- 3) Rossi, J. M. *et al.*: *Genes Dev.*, **15**, 1998 (2001).
- 4) Hay, D. C. *et al.*: *Stem Cells*, **26**, 894 (2008).
- 5) Schmidt, C. *et al.*: *Nature*, **373**, 699 (1995).
- 6) Uehara, Y. *et al.*: *Nature*, **373**, 702 (1995).
- 7) Kamiya, A. *et al.*: *EMBO J.*, **18**, 2127 (1999).
- 8) Takayama, K. *et al.*: *J. Hepatol.*, **57**, 628 (2012).
- 9) Takayama, K. *et al.*: *Stem Cell Reports*, **1**, 332 (2013).
- 10) Kondo, Y. *et al.*: *PLoS One*, **9**, e104010 (2014).
- 11) Kondo, Y. *et al.*: *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **29**, 407 (2014).
- 12) Palakkan, A. A. *et al.*: *Biomed. Rep.*, **3**, 626 (2015).
- 13) Takebe, T. *et al.*: *Nature*, **499**, 481 (2013).
- 14) Takayama, K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 16772 (2014).
- 15) Yamada, T. *et al.*: *Stem Cells*, **20**, 41 (2002).
- 16) Ueda, T. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **391**, 38 (2010).
- 17) Sato, T. *et al.*: *Nature*, **459**, 262 (2009).
- 18) Spence, J. R. *et al.*: *Nature*, **470**, 105 (2011).
- 19) Uchida, H. *et al.*: *JCI Insight*, **2**, e86492 (2017).
- 20) Iwao, T. *et al.*: *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **29**, 44 (2014).
- 21) Iwao, T. *et al.*: *Drug Metab. Dispos.*, **43**, 603 (2015).
- 22) Kodama, N. *et al.*: *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **31**, 193 (2016).
- 23) Ogaki, S. *et al.*: *Stem Cells*, **31**, 1086 (2013).
- 24) Nakamura, T. *et al.*: *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 4 (2002).
- 25) Martin, P. *et al.*: *Br. J. Pharmacol.*, **153**, 805 (2008).
- 26) Sun, D. *et al.*: *Pharm. Res.*, **19**, 1400 (2002).
- 27) Takenaka, T. *et al.*: *Drug Metab. Dispos.*, **42**, 1947 (2014).
- 28) Kabeya, T. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **486**, 143 (2017).
- 29) Negoro, R. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **472**, 631 (2016).
- 30) Kodama, N. *et al.*: *Drug Metab. Dispos.*, **44**, 1662 (2016).
- 31) Ozawa, T. *et al.*: *Sci. Rep.*, **5**, 16479 (2015).
- 32) Takasato, M. *et al.*: *Nature*, **526**, 564 (2015).
- 33) Araoka, T. *et al.*: *PLoS One*, **9**, e84881 (2014).
- 34) Yamamizu, K. *et al.*: *Stem Cell Reports*, **8**, 634 (2017).