

『細胞と小腸－肝臓連結デバイス MS-plateの開発』

名古屋市立大学大学院薬学研究科
松永 民秀

Shimadzu Tokyo Innovation Plaza 4階 メインホール

2023年8月21日(月) 16:10～16:35

利益相反（COI）の開示

発表者名：松永 民秀

私の今回の演題に関連して、開示すべき
利益相反は以下のとおりです。

研究費・特許料収入：富士フイルム(株)

本日の内容

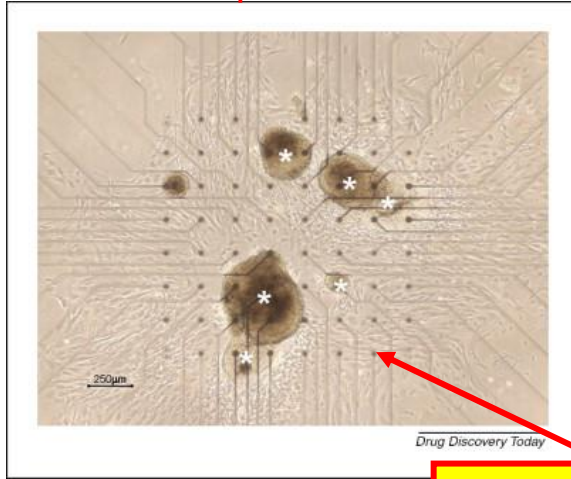
- 1 小腸－肝臓連結デバイス（MS-plate）開発の経緯
- 2 ヒトiPS細胞の腸管上皮細胞への分化誘導とその性質
- 3 小腸－肝臓連結デバイス（MS-plate）を用いた結果
- 4 初回通過効果の評価以外の利用

本日の内容

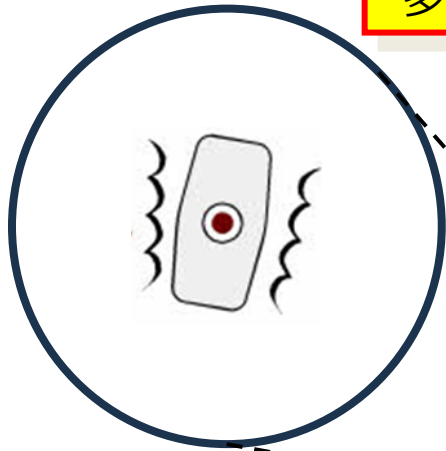
- 1 小腸－肝臓連結デバイス（MS-plate）開発の経緯
- 2 ヒトiPS細胞の腸管上皮細胞への分化誘導とその性質
- 3 小腸－肝臓連結デバイス（MS-plate）を用いた結果
- 4 初回通過効果の評価以外の利用

心筋に対する毒性

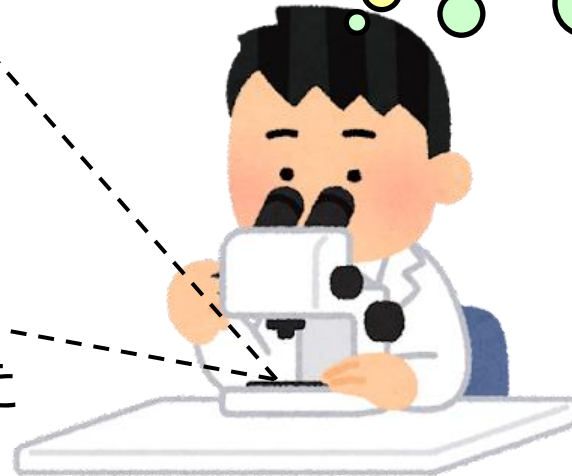
薬剤性QT延長症候群惹起の予測
Torsades de pointes (心室頻拍)



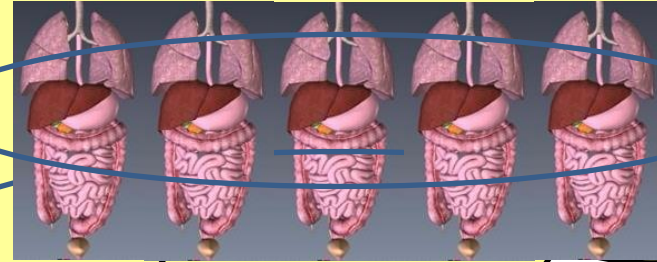
多点マイクロ電極



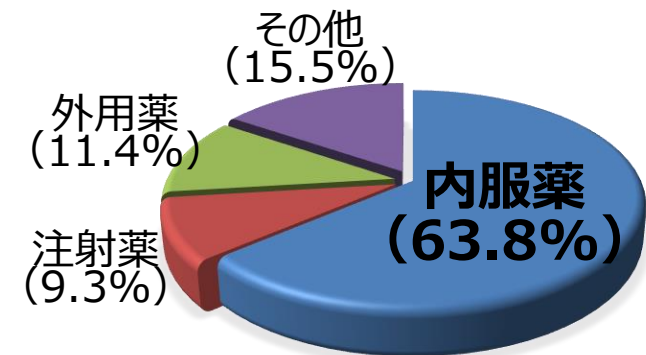
ES細胞から分化誘導した
心筋の拍動



ヒトのモデルがシャーレ上で再現できないか！？
(Human-on-a-plate)



細胞？ 組織？ 臓器？
肝臓, 小腸, 腎臓, 心臓,
肺, 血液脳関門 (BBB)



デバイス開発に関するコンセプト

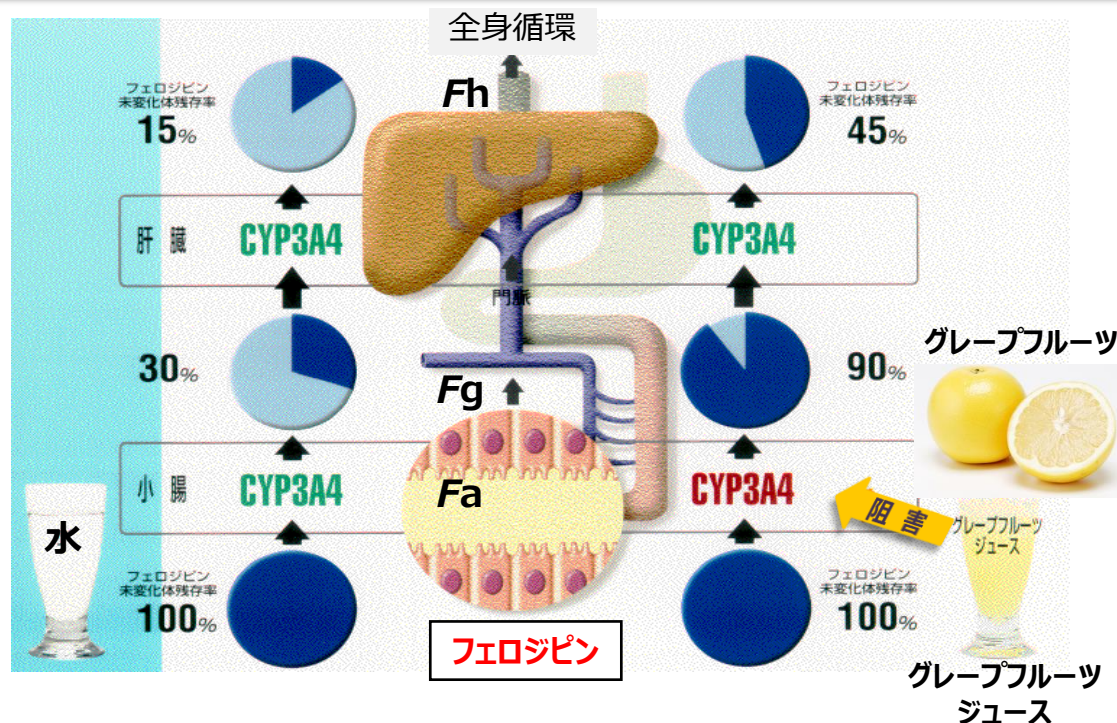
【背景】

- ・薬物動態試験・安全性試験は、企業間で統一した規格・基準での試験（非競争領域の試験）
- ・様々な技術レベルでの研究者・技術補助者が使用することを想定
- ・*In vitro*から*in vivo*予測の解析モデルが必須

【開発コンセプト】

- ・従来の方法では解決困難な技術（MPSである理由）
- ・特別な技術を必要とせず、取り扱いが容易であり、再現性ある結果が得られるデバイス
- ・生体を予測するモデル（PBPKモデル）の構築

バイオアベイラビリティ：初回通過効果と食物・薬物相互作用



$$F_{oral} = F_a \times F_g \times F_h$$

F_{oral} ：経口バイオアベイラビリティ

F_a ：消化管粘膜透過率

F_g ：消化管壁での非代謝率

F_h ：肝での非代謝・非排泄率



種差

貴重な生体モデルであるがヒトでない
動物愛護と保護の3Rの原則（倫理的課題）

消化管（小腸）

- ・薬物透過性試験：Caco-2細胞など
- ・薬物代謝試験：小腸Ms、肝細胞、肝Ms
- ・薬物相互作用
阻害試験：小腸Ms、肝細胞、肝Ms
誘導試験：肝細胞等



肝臓

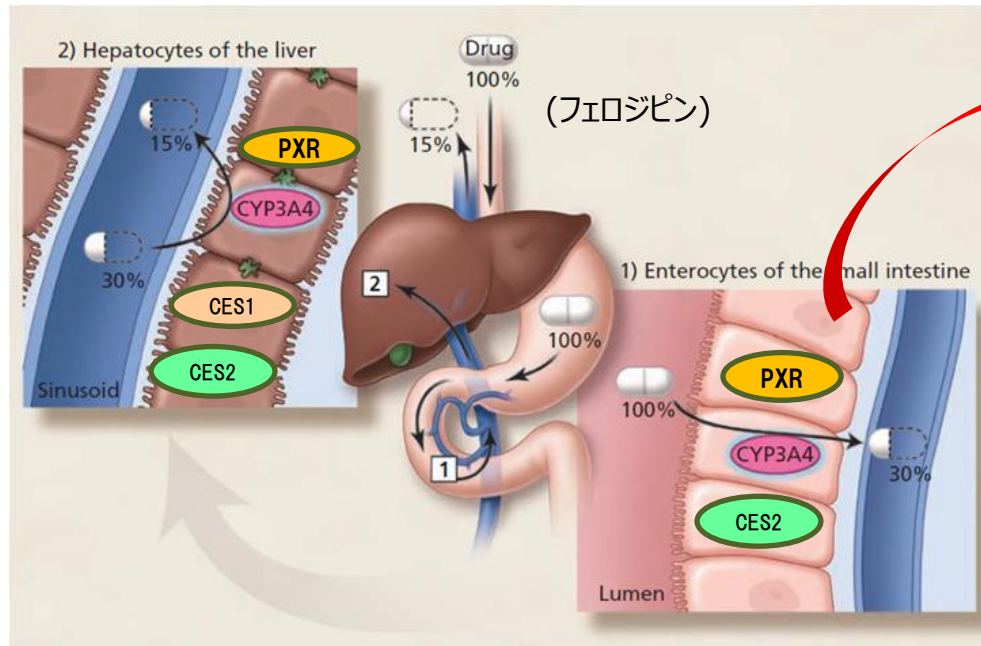
- ・薬物代謝試験：肝細胞、肝Msなど
- ・薬物相互作用
阻害試験：肝細胞、肝Ms、HepaRG細胞
誘導試験：肝細胞（凍結・非凍結）、HepaRG細胞
- ・薬物の胆汁排泄評価：トランスポーター過剰発現細胞株

- ・現在の*in vitro*試験は、複数の試験を行って予測
- ・各臓器が互いに影響しないことが前提

MPS（生体模倣システム）

一括試験により、効率化と
精度の向上が期待できる

初回通過効果の評価における小腸上皮細胞とCaco-2細胞との比較

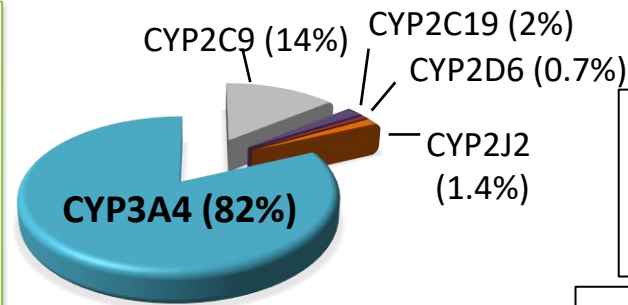


小腸上皮細胞

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○

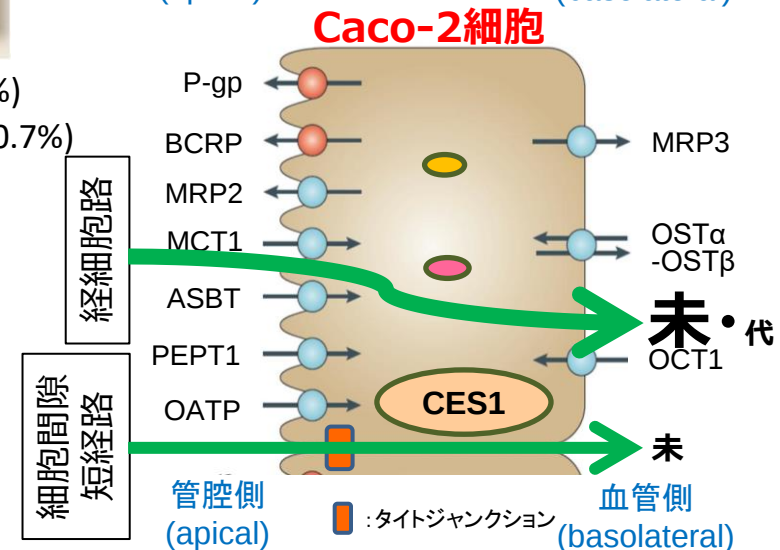
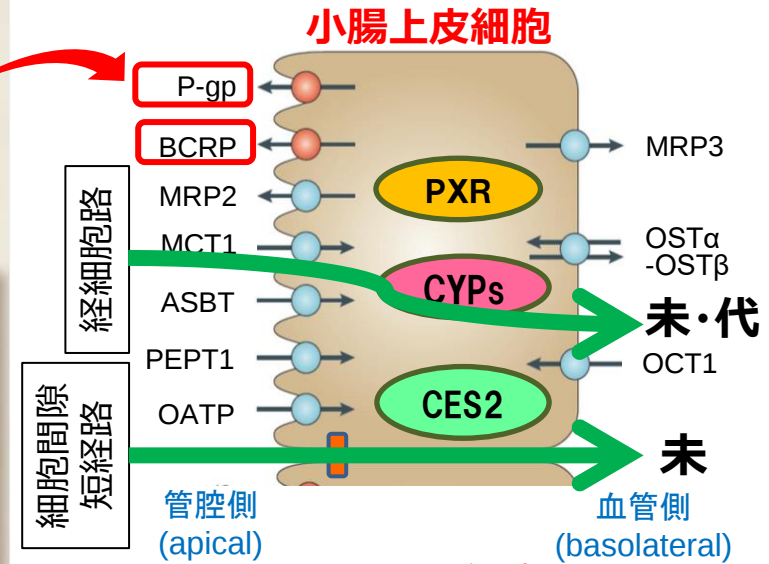
Caco-2細胞

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)



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)



MPSの設計や最適化には、高機能の細胞が必須

製薬企業の要望として肝臓はヒト凍結肝細胞。一方、小腸は・・・？

Caco-2細胞で生体を模倣するには、デバイスだけでは限度がある

MPS開発

「デバイスの開発と並行して、

それに搭載する細胞の開発が重要」

本日の内容

- 1 小腸－肝臓連結デバイス（MS-plate）開発の経緯
- 2 ヒトiPS細胞の腸管上皮細胞への分化誘導とその性質
- 3 小腸－肝臓連結デバイス（MS-plate）を用いた結果
- 4 初回通過効果の評価以外の利用

ヒトiPS細胞の腸管上皮細胞への分化誘導法

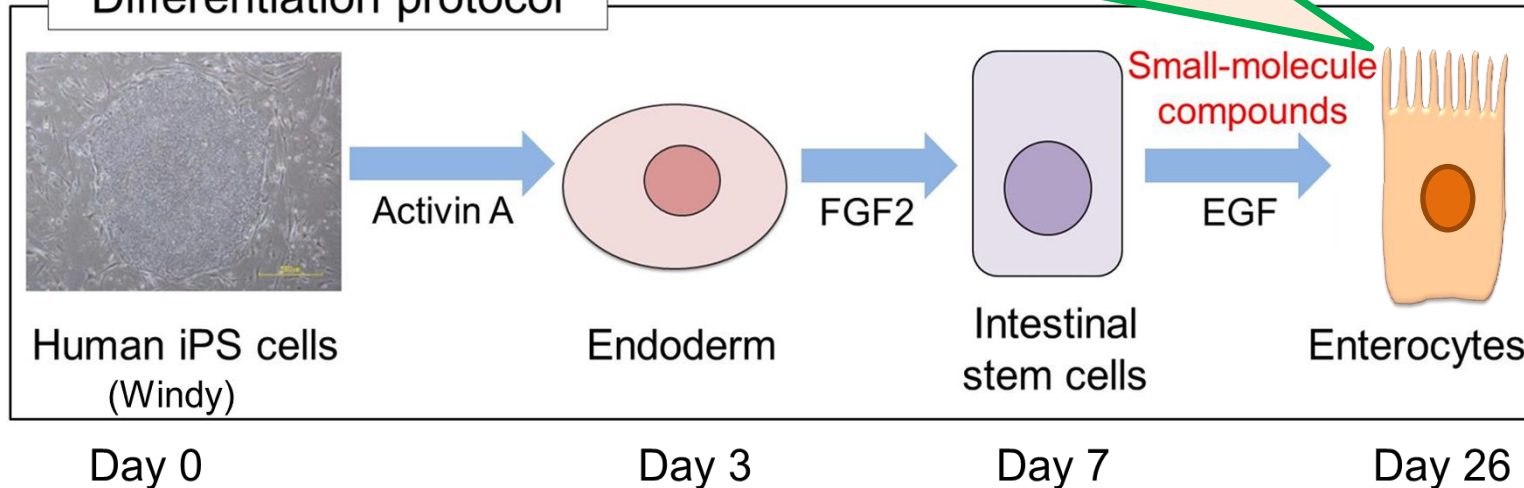
Small-molecule compounds

PD98059, 5-aza-2'-deoxycytidine and A-83-01: days 14-26

8-Br-cAMP: days 8-14 and/or Forskolin

IBMX: days 14-26

Differentiation protocol



Small-molecule compounds

MEKi (MEK inhibitor): PD98059 (20 μ M)

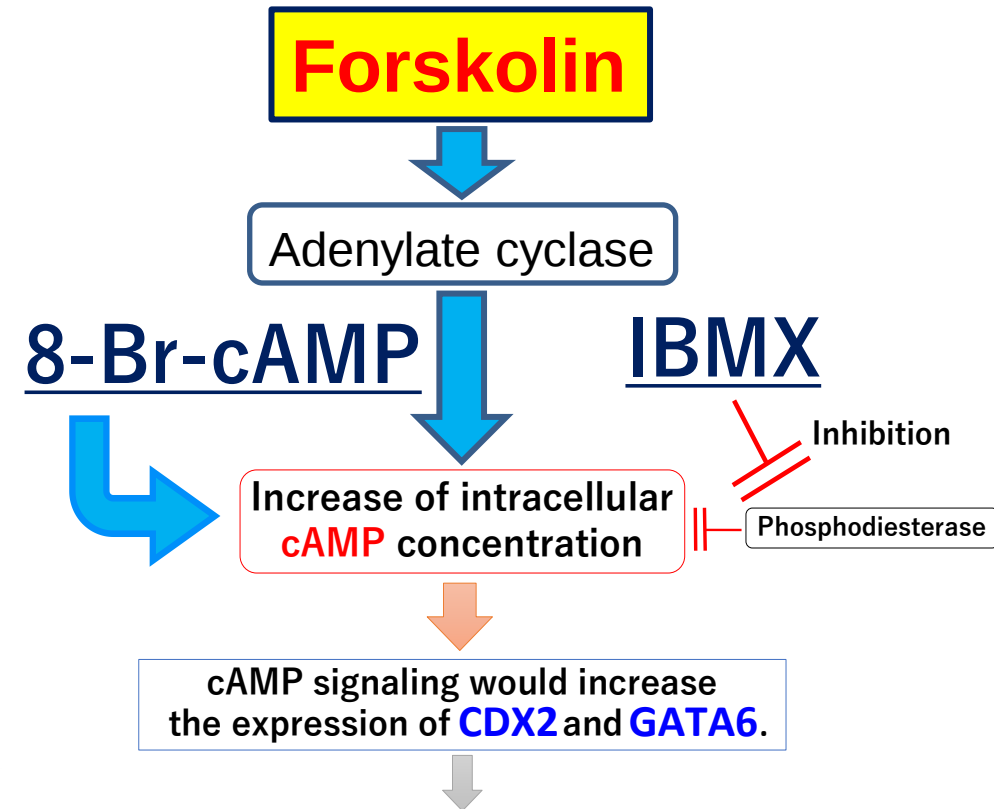
DMTi (DNA methyltransferase inhibitor): 5-aza-2'-deoxycytidine (5 μ M)

TGFi (TGF- β inhibitor): A-83-01 (0.5 μ M)

8-Br-cAMP (cAMP analog): 8-bromo-Cyclic AMP (1 mM)

IBMX (phosphodiesterase inhibitor): 3-isobutyl-1-methylxanthine (0.5 mM)

Forskolin (30 μ M)



Activation of cAMP signaling is useful for intestinal differentiation of iPS cells!!!

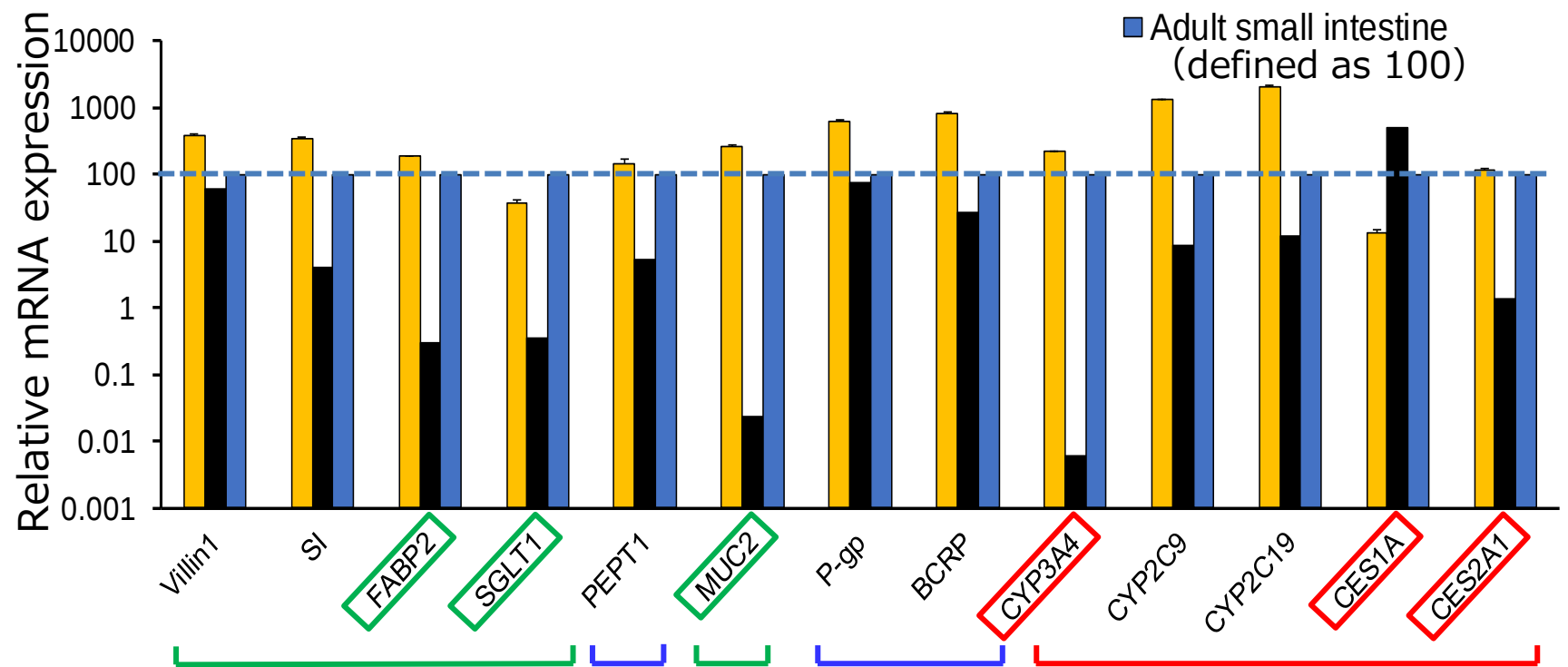
cAMPシグナリングの活性化

1. cAMPの導入 (8-Br-cAMPの添加) : **day 8-14**
2. cAMPの分解抑制 (Phosphodiesteraseの阻害) : **day 14-26**
3. **cAMPの合成促進 (Adenylate cyclaseの活性化)**

ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞における腸管上皮細胞 マーカー及び薬物動態関連遺伝子の発現

ヒトiPS細胞由来小腸上皮細胞におけるmRNA
発現レベルは、**ヒト成人小腸と同程度**

ヒトiPS細胞株：富士フイルム FF-1株



腸管マーカー

Villin 1
SI
FABP2
SGLT1
MUC2

薬物トランスポーター

PEPT1
P-gp
BCRP

薬物代謝酵素

CYP3A4
CYP2C9
CYP2C19
CES1A
CES2A1

研究支援用の
腸管上皮細胞
として実用化

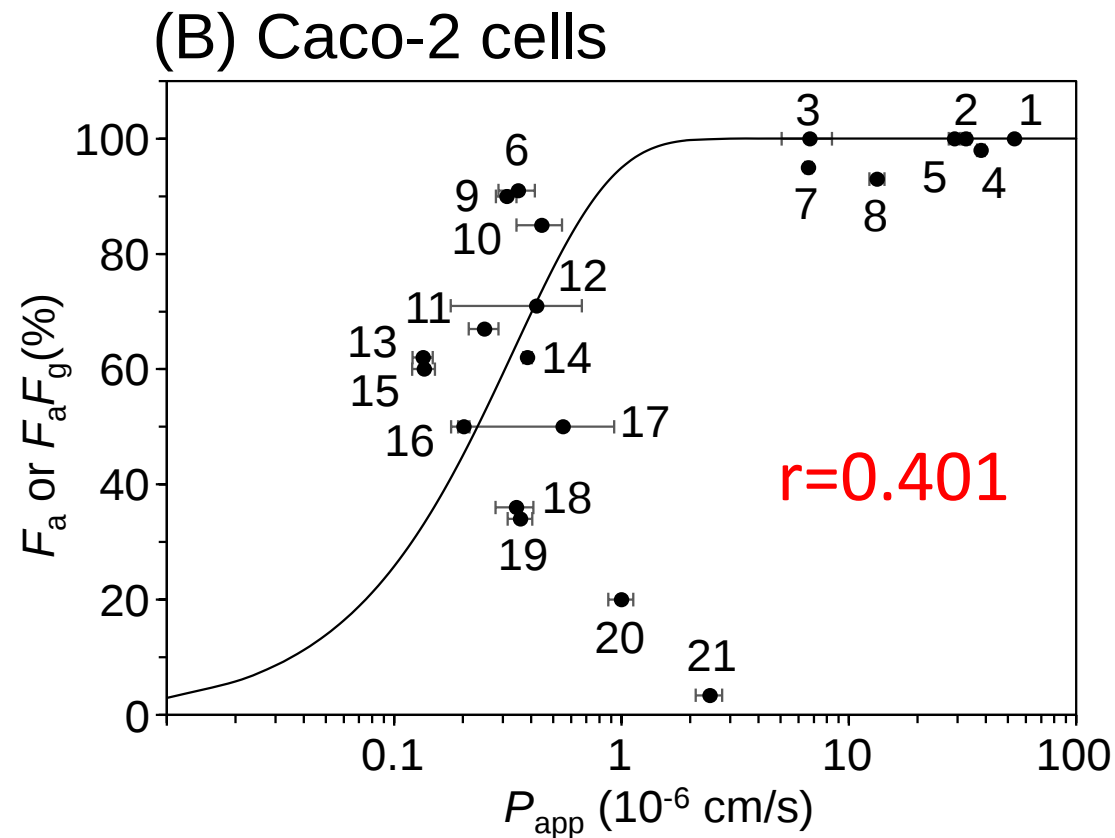
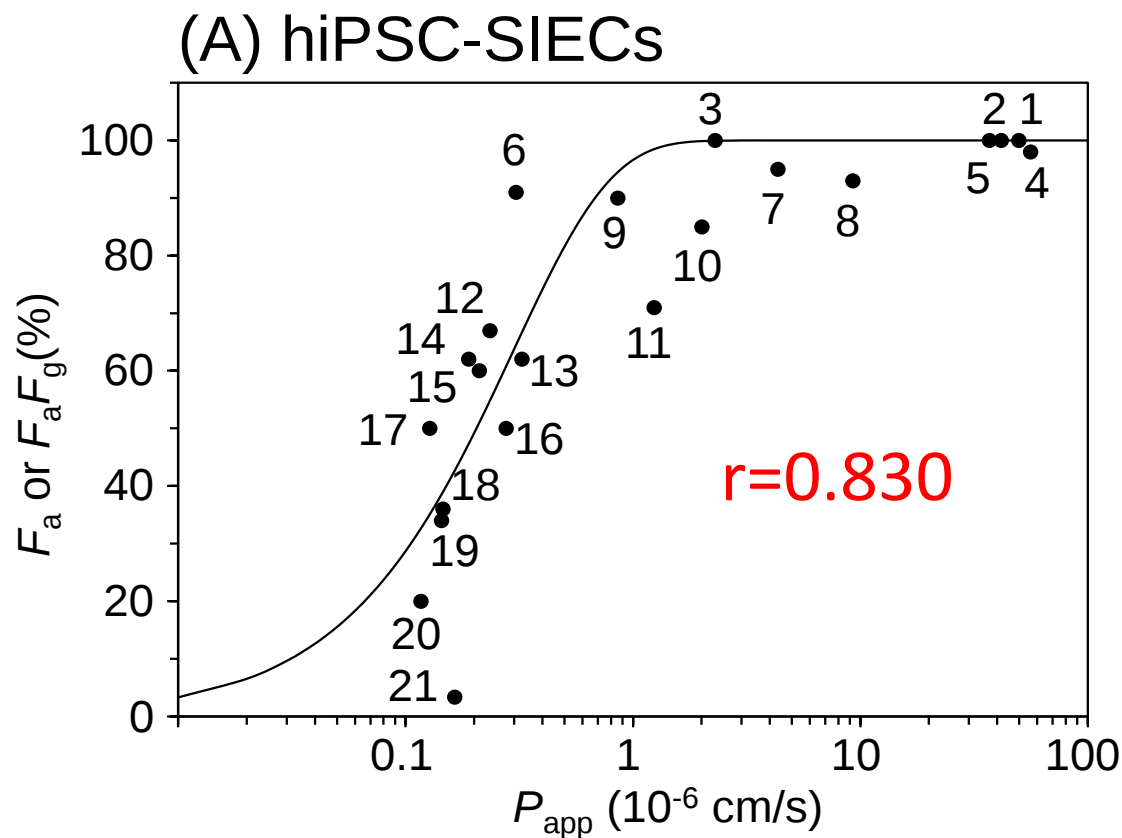


2009年9月 富士フイルムより上市

All data are presented as means $\pm$ standard deviation (n = 3). SI = Sucrase-isomaltase.

成人小腸とほぼ同じ遺伝子発現を示す細胞をヒトiPS細胞から作製することに成功

Relationship between apparent permeability coefficients (P_{app}) and intestinal availability (F_a or $F_a F_g$) for 21 drugs.



Compounds used were as follows: 1, Piroxicam; 2, Carbamazepine; 3, Verapamil; 4, Warfarin; 5, Antipyrine; 6, Cephalexin; 7, Metoprolol; 8, Propranolol; 9, Acebutolol; 10, Ribavirin; 11, Metformin; 12, Hydrochlorothiazide; 13, Terbutaline; 14, Cimetidine; 15, Enalapril; 16, Ranitidine; 17, Atenolol; 18, Sulpiride; 19, Pravastatin; 20, Methotrexate; and 21, Raloxifene.

hiPSC-SIECs: 富士フイルム F-hiSIEC

Caco-2細胞と比較しhiPSC-SIECsにおいて高い相関が認められたことから、膜透過の予測が優れていることが示唆された。

(A) Papp of food-derived compounds in human iPS cell-derived small intestinal epithelial cells (hiPSC-SIECs) and Caco-2 cells.

Compound	P _{app} (10 ⁻⁶ cm/s)			
	hiPSC-SIECs	Caco-2 cells		
Daidzein	1.6	36.8	±	1.6
Genistein	2.7	33.7	±	1.0
Quercetin	0.46	9.49	±	0.64
Curcumin	0.07	3.50	±	0.81
Epicatechin	0.13	0.12	±	0.08
Epigallocatechin	0.34	0.29	±	0.06
Epigallocatechin gallate	0.16	0.12	±	0.03
Caffeic acid	1.03	0.18	±	0.05
Gallic acid	0.41	0.24	±	0.05
Bisphenol A	4.3	29.7	±	2.2
Bisphenol S	5.9	23.4	±	0.7
MeIQx	1.36	7.59	±	0.15
Acrylamide	23.3	32.3	±	0.8
Fenitrothion	34.0	25.4	±	1.3
Picloram	3.88	2.98	±	0.15

hiPSC-SIECs: 富士フイルム F-hiSIEC

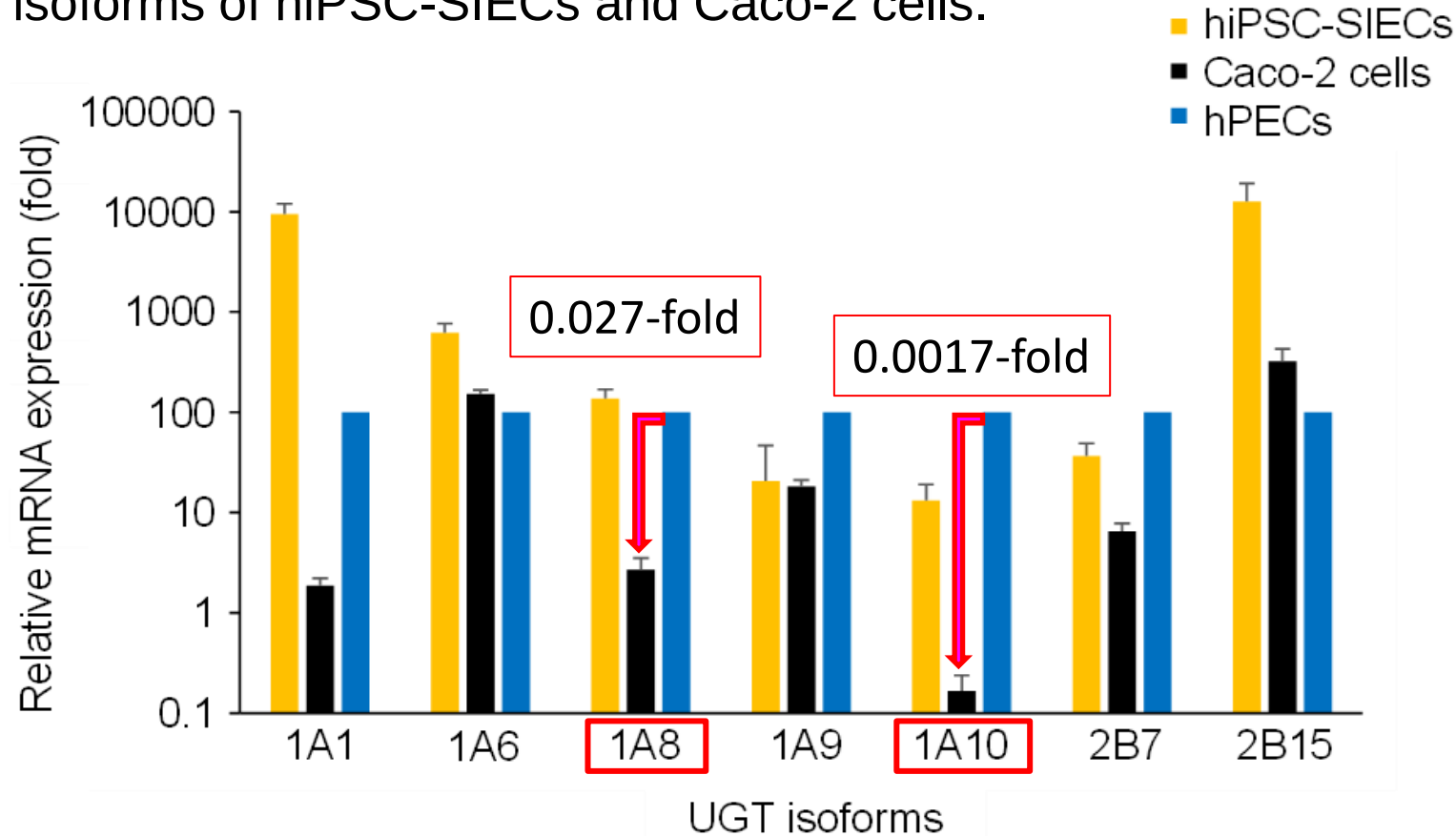
Kitaguchi T. et al., Drug Metab. Dispos., **50**(1): 17-23, 2022.

(B) The amounts of unchanged compounds and metabolites after the membrane permeability assays in human iPS cell-derived small intestinal epithelial cells (hiPSC-SIECs) and Caco-2 cells.

Compounds		Amounts (pmol/1.5 h)	
		hiPSC-SIECs	Caco-2 cells
Raloxifene	Unchanged (Basal)	2.6	38.2 ± 5.2
	Glucuronide (Apical)	27.0	7.3 ± 0.5
	Glucuronide (Basal)	68.6	7.5 ± 0.4
Daidzein	Unchanged (Basal)	49	504 ± 31.4
	Glucuronide (Apical)	238	8.3 ± 0.64
	Glucuronide (Basal)	202	2.8 ± 0.07
Genistein	Unchanged (Basal)	167	450 ± 14.0
	Glucuronide (Apical)	221	23.7 ± 1.3
	Glucuronide (Basal)	158	3.5 ± 0.24
Bisphenol A	Unchanged (Basal)	111	325 ± 48
	Glucuronide (Apical)	65.1	16.4 ± 2.0
	Glucuronide (Basal)	879	26.4 ± 3.5
	Sulfate (Apical)	77.0	53.7 ± 2.5
	Sulfate (Basal)	21.7	10.2 ± 1.1

Caco-2細胞における化合物の透過速度がhiPSC-SIECsと比較して速いのは、抱合体生成量が少ないことに起因することが示唆された。

Relative expression levels of genes encoding UGT isoforms of hiPSC-SIECs and Caco-2 cells.



1A8: small intestine-specific UGT isoforms

UGT : UDP-glucuronosyltransferase

hiPSC-SIECs: 富士フィルム F-hiSIEC

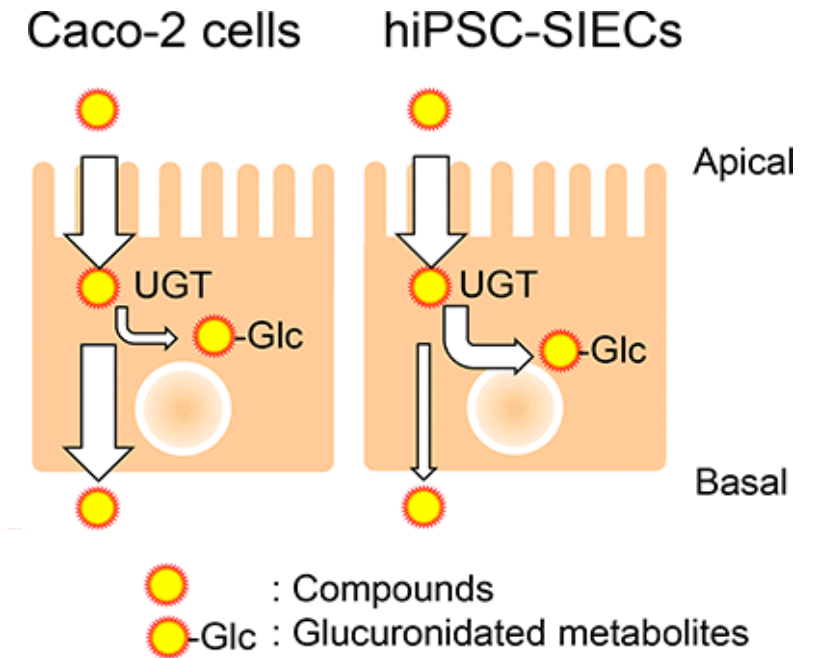
Caco-2細胞は初代ヒト小腸上皮細胞やhiPSC-SIECsと比較して、腸管特異的なUGT分子種の発現が顕著に低く、代謝を受けないため見かけの透過量が多くなっていることが示唆された。

Caco-2細胞

UGT, SULTの活性が低く、代謝を受けずに未変化体として透過（吸収）大
見かけの透過係数 (P_{app}) : 大

hiPSC-SIECs

UGT, SULTにより代謝を受け、未変化体の透過（吸収）が減少
見かけの透過係数 (P_{app}) : 小

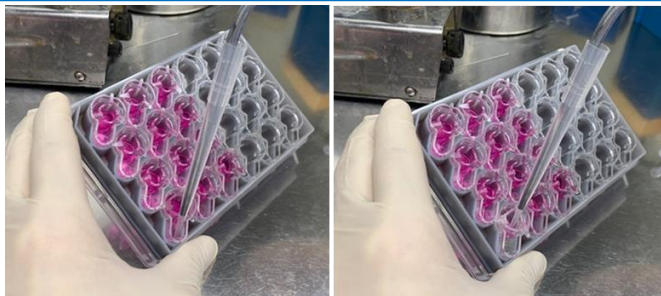


本日の内容

- 1 小腸－肝臓連結デバイス（MS-plate）開発の経緯
- 2 ヒトiPS細胞の腸管上皮細胞への分化誘導とその性質
- 3 小腸－肝臓連結デバイス（MS-plate）を用いた結果
- 4 初回通過効果の評価以外の利用

Microphysiological System (MPS) : 小腸-肝臓連結デバイスの構造と特徴

特徴2 : 新規コンパニオンプレート開発 :
操作の簡便化、リスク低減、自動装置適応

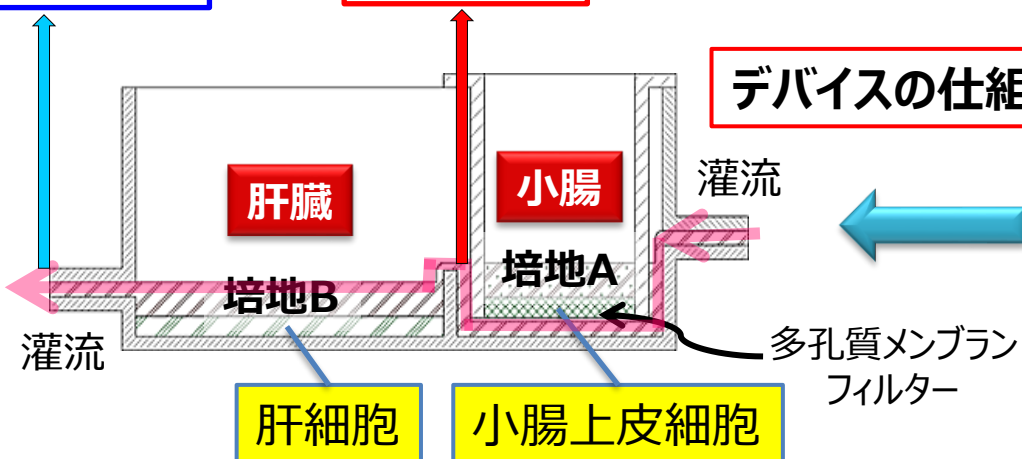


- 通常のマルチウェルプレート感覚で操作
- インサーター内の培地も装着したまま吸引
- インサーターのぐらつき無し

肝静脈血相当
(小腸 ⇒ 肝臓)

門脈血相当
(小腸)

特徴3 : コンパートメント間に隔壁 (最適培地が異なる複数の細胞を同時に長期培養可能)



デバイスの仕組み

特徴1 :
カセット式小腸培養部



② 多孔質メンブランフィルター



カセット式小腸培養部
デバイス本体にセット

培養本体
(肝細胞培養部)

④

蓋

培養部装着後
デバイス本体

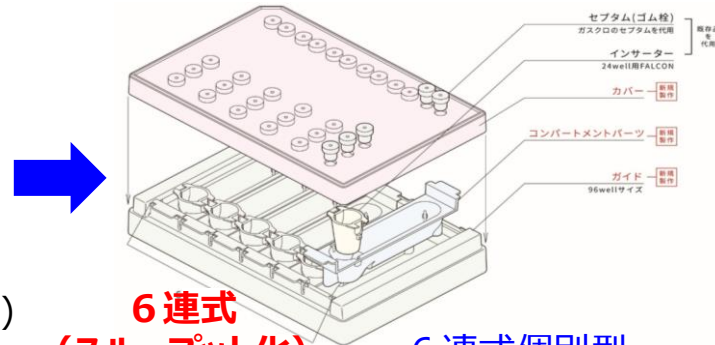
小腸-肝臓連結デバイス



Microphysiological System (MPS) : 小腸-肝臓連結デバイスの改良の推移



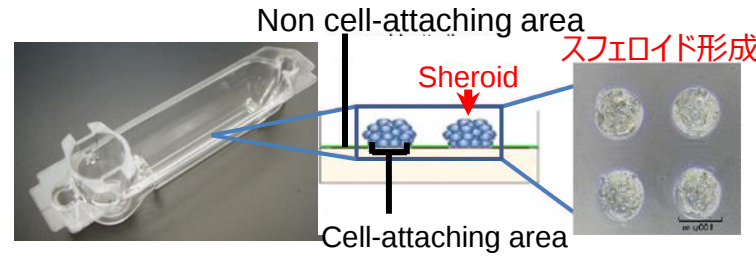
単式（第一世代）



6 連式
(スループット化)

6 連式個別型
(第二世代)

課題：各社のインサーターへの対応



特徴

- 肝臓コンパートメントの表面加工
(共培養と3次元培養の組合せ効果)
- 肝臓部分の培地の深さ2~3 mm
(O₂供給増加)

表面加工：東洋合成工業(株)

培地の乾燥防止と準備の簡素化



MS-plate

6 連式一体型
(第三世代)

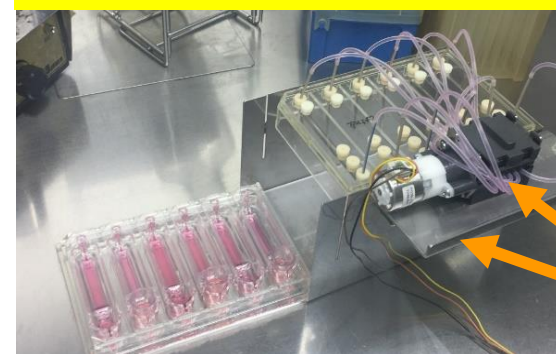


ケース本体にアダプターをセットした状態



アダプターにインサーターをセットした状態

ホルダーにセット状態のデバイス



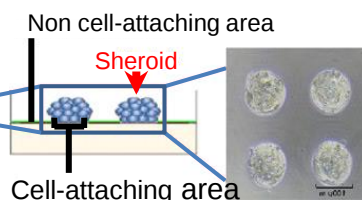
初心者も比較的容易に操作習得可能

外部ホルダー
開発
↓
操作性向上 +
コンタミ防止

6 連ポンプ
外部ホルダー



乾燥防止のプール付き（青い部分）



スフェロイド形成



デバイスの仕組み

- ①：小腸相当部分
- ②：門脈相当部分
- ③：肝静脈相当部分

単臓器としても使用可能

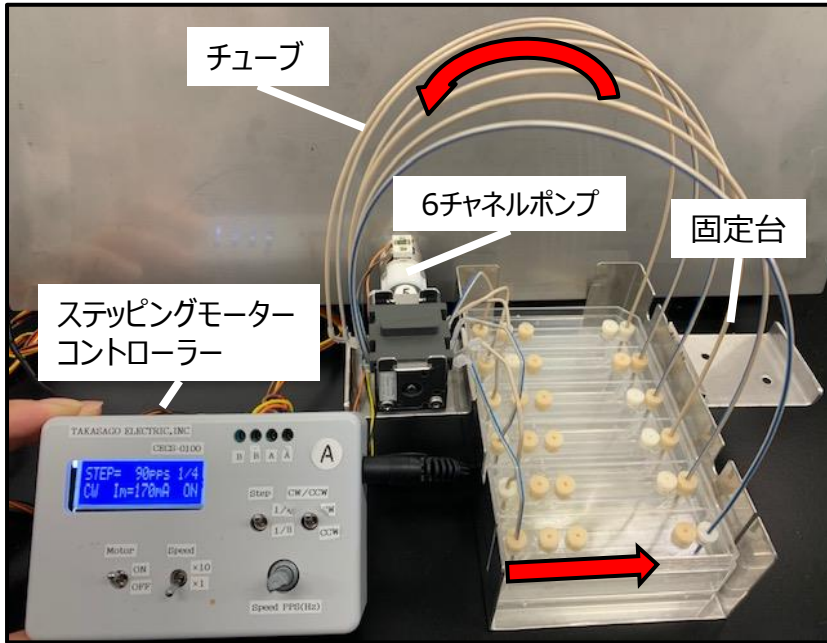
小腸-肝臓連結デバイス (MS-plate) における培地の灌流

MPSの第1期AMED事業にて開発 (2017~2021年度)

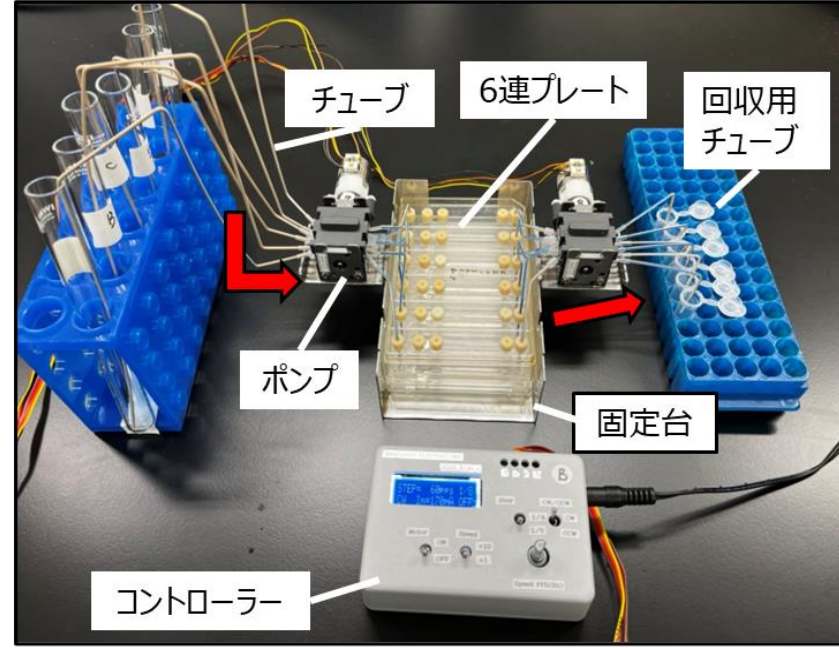
- ① 薬物の添加：医薬品の経口投与を想定
- ② サンプル採取：門脈血を想定
- ③ サンプル採取：肝静脈血を想定

サンプル添加・採取：200 μ Lピペット使用

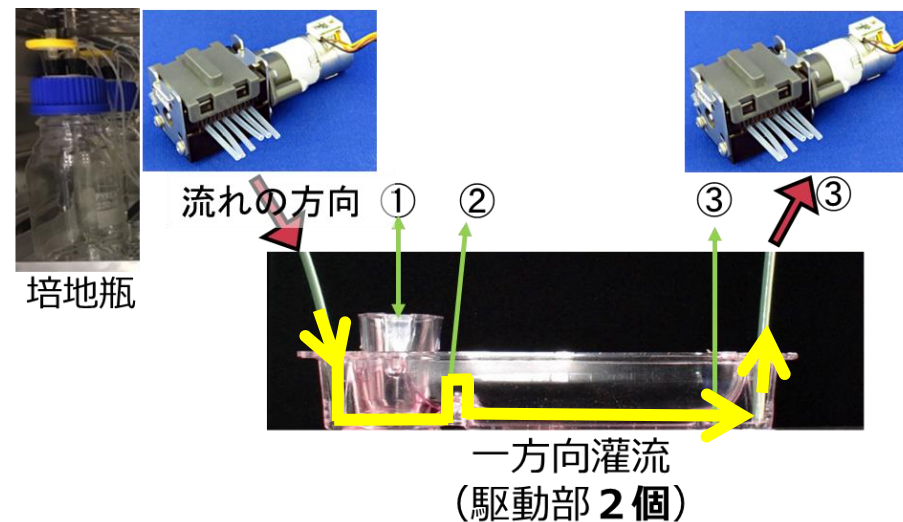
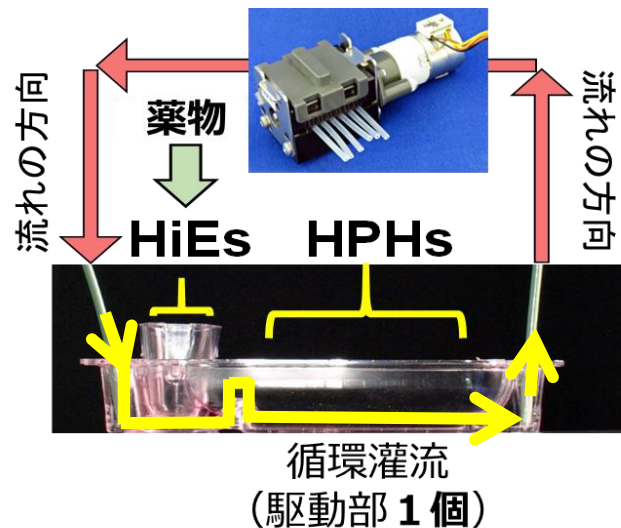
HiEs：ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞
HPHs：ヒト初代肝細胞



培地の循環：慢性毒性等の長期曝露実験



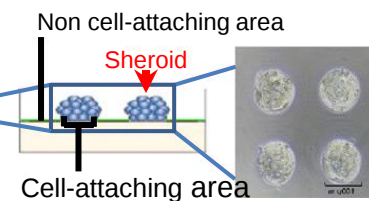
一方向灌流培養：短期暴露、初回通過効果



肝細胞：2Dと3D培養の2タイプ



6 連式一体型

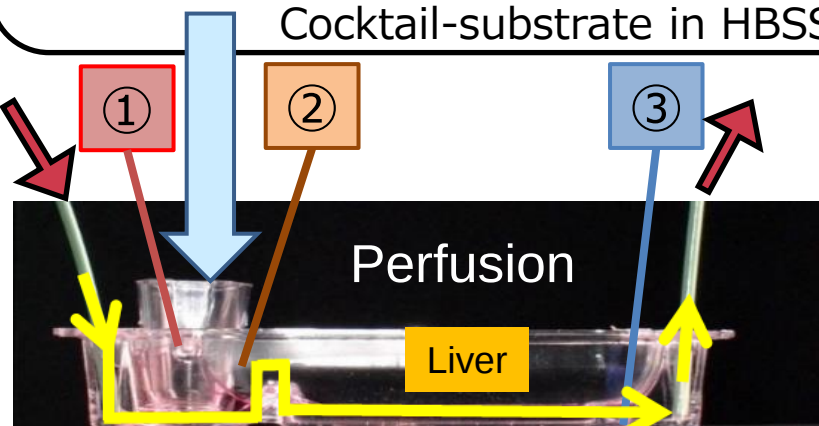


スフェロイド形成

小腸-肝臓連結デバイス (MS-plate) による吸収と代謝の評価

Enzymes	Substrates	Conc. (μM)	Metabolites
CYP1A	Phenacetin	50	Acetaminophen
CYP2C9	Diclofenac	5	4'-Hydroxy diclofenac
CYP2C19	S- Mephenytoin	50	4'-Hydroxy S- mephenytoin
CYP2D6	Bufuralol	10	1'-Hydroxy bufuralol
CYP3A	Midazolam	5	1'-Hydroxy midazolam

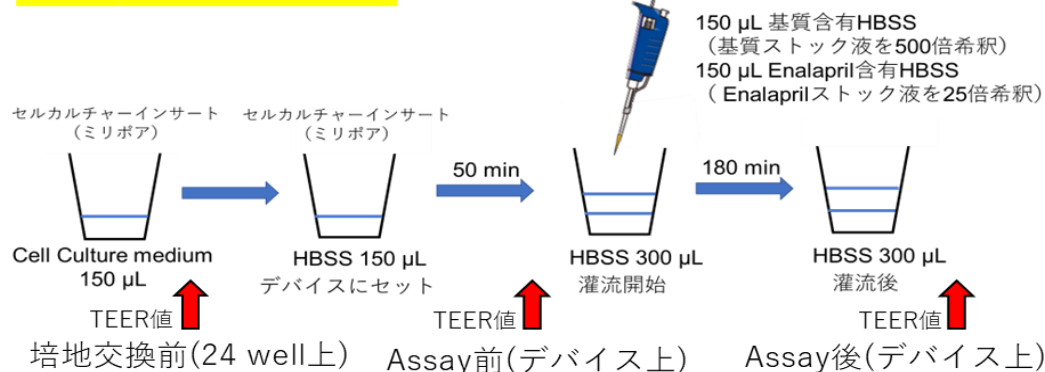
Cocktail-substrate in HBSS



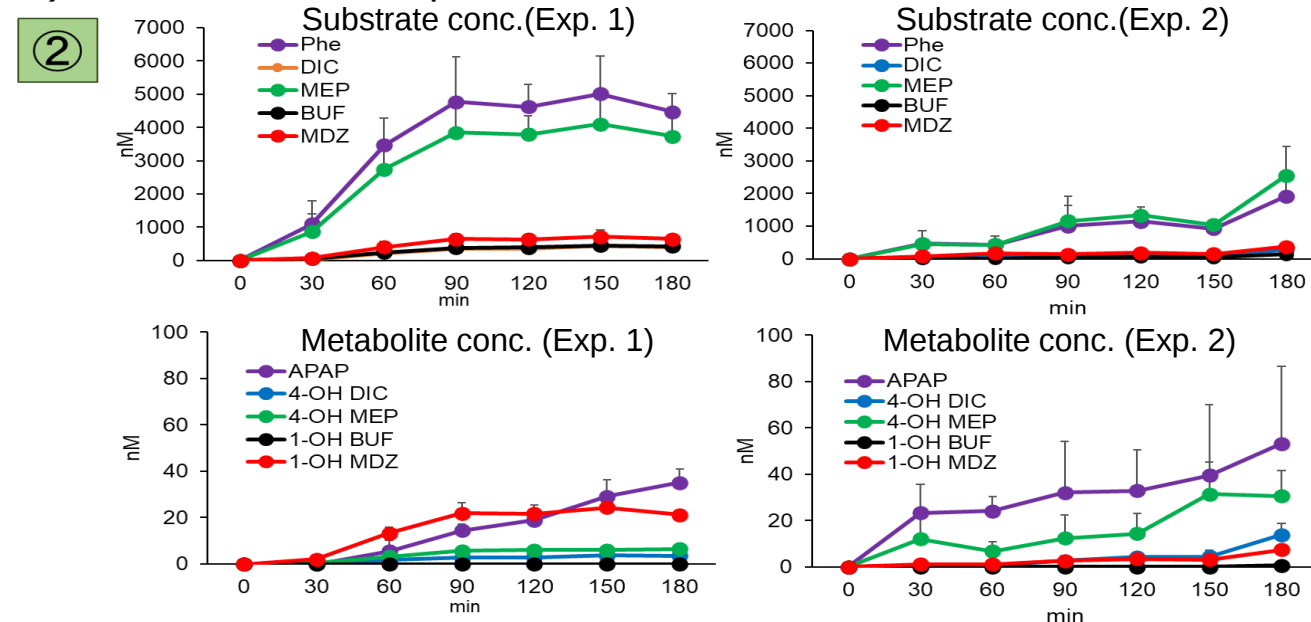
Small intestine

Flow rate: 678 μL/hr

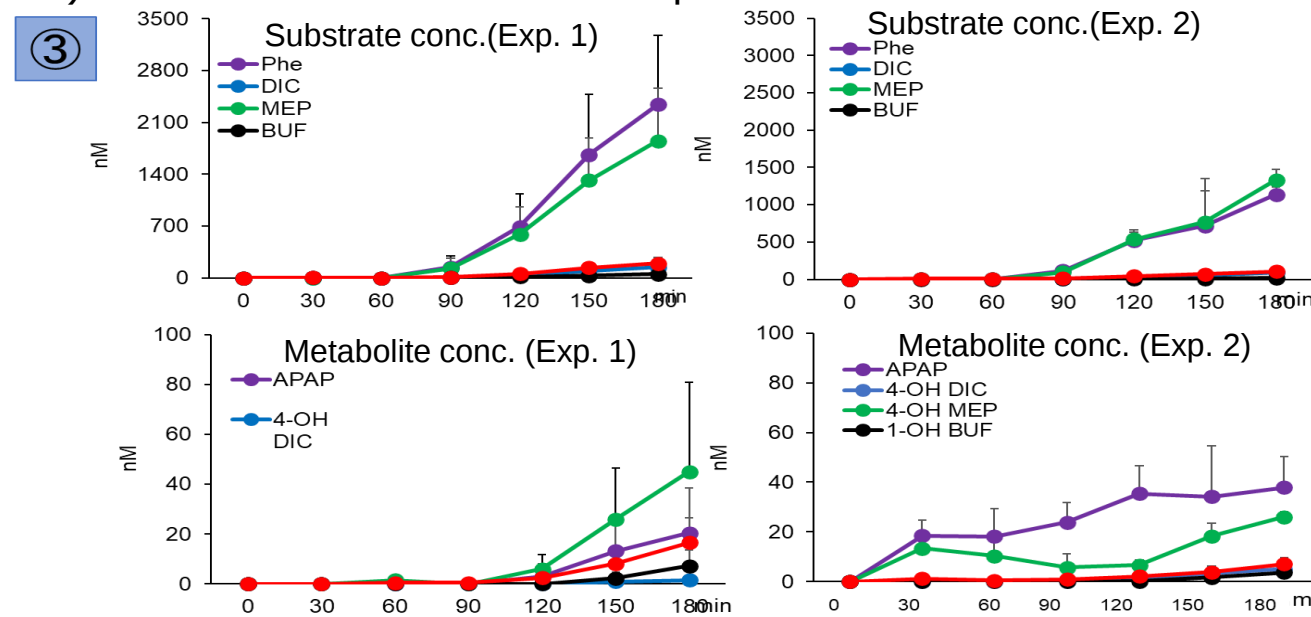
TEER測定タイミング



A) Small intestine (portal vein blood)



B) Small intestine ⇒ Liver (hepatic vein blood)



食品と薬物の相互作用：初回通過効果評価系の構築

◆ DMSO
 ◆ Bergamottin
 ◆ 6',7'-Dihydroxybergamottin
 ◆ Grapefruit juice

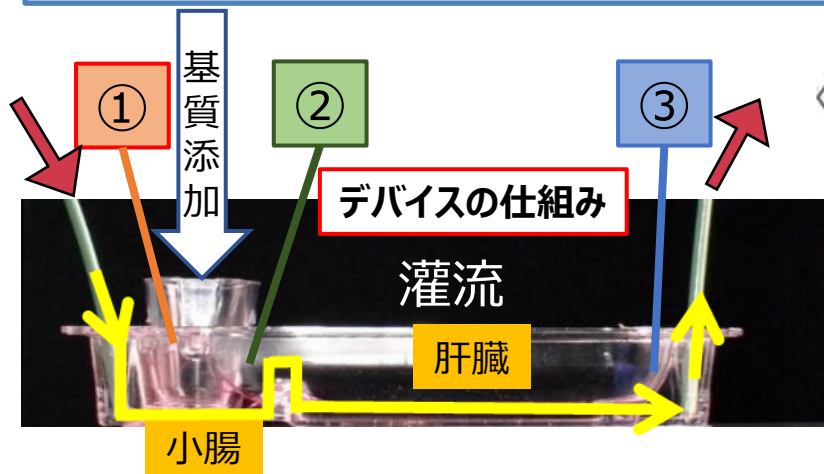
ヒト凍結肝細胞を播種したデバイス上にインサートをセット

インサート **(F-hiSIEC)** 内に添加
(HBSS+MES, pH6.0)

- **DMSO**
- **ベルガモチン (30 μM)**
- **ジヒドロキシベルガモチン (12.5 μM)**
- **グレープフルーツジュース (50%)**

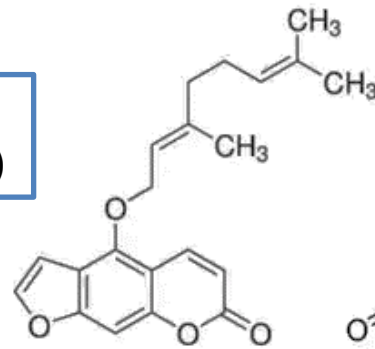
30分間後培地除去

フェロジピン (25 μM, 300μL HBSS)添加
5時間灌流：流速180pps (2052 μL/hr)

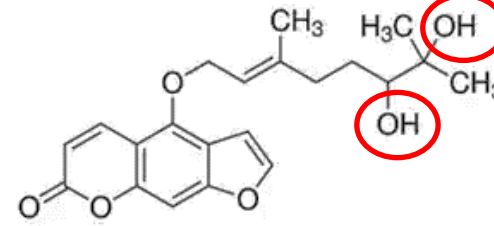


グレープフルーツに含まれるフラノクマリン類

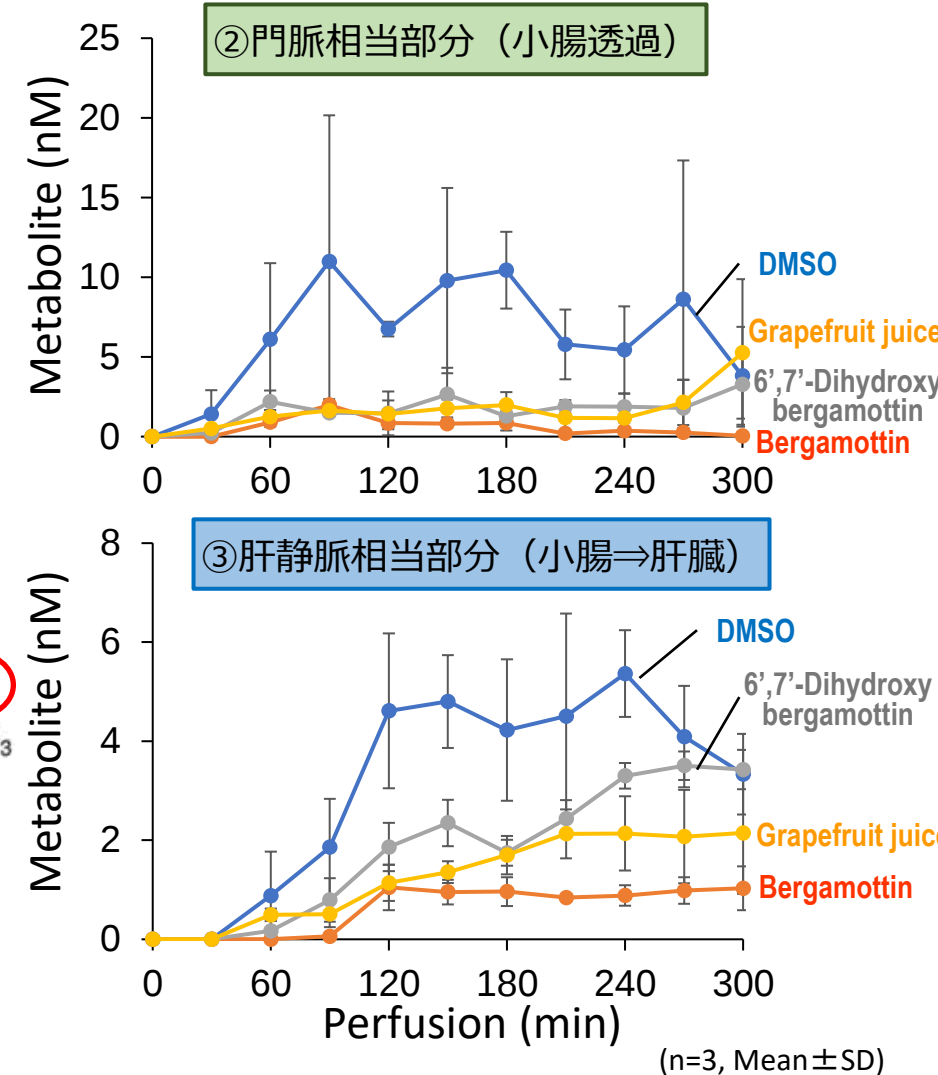
CYP3A4を阻害



ベルガモチン



6',-7'-ジヒドロキシ
ベルガモチン



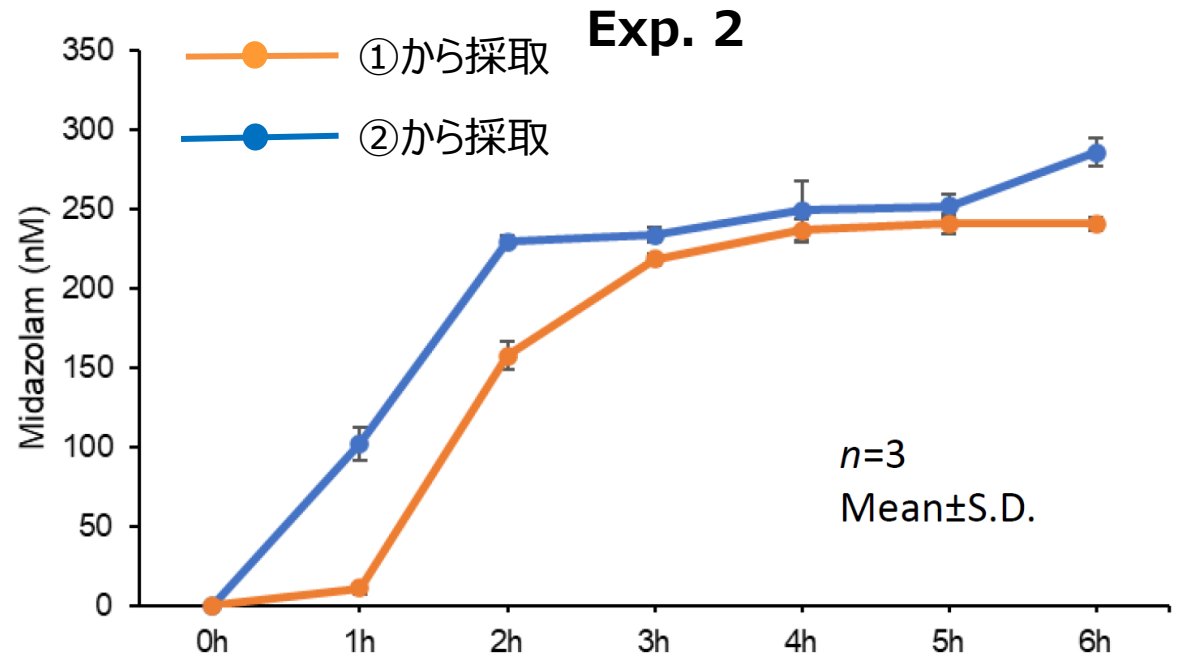
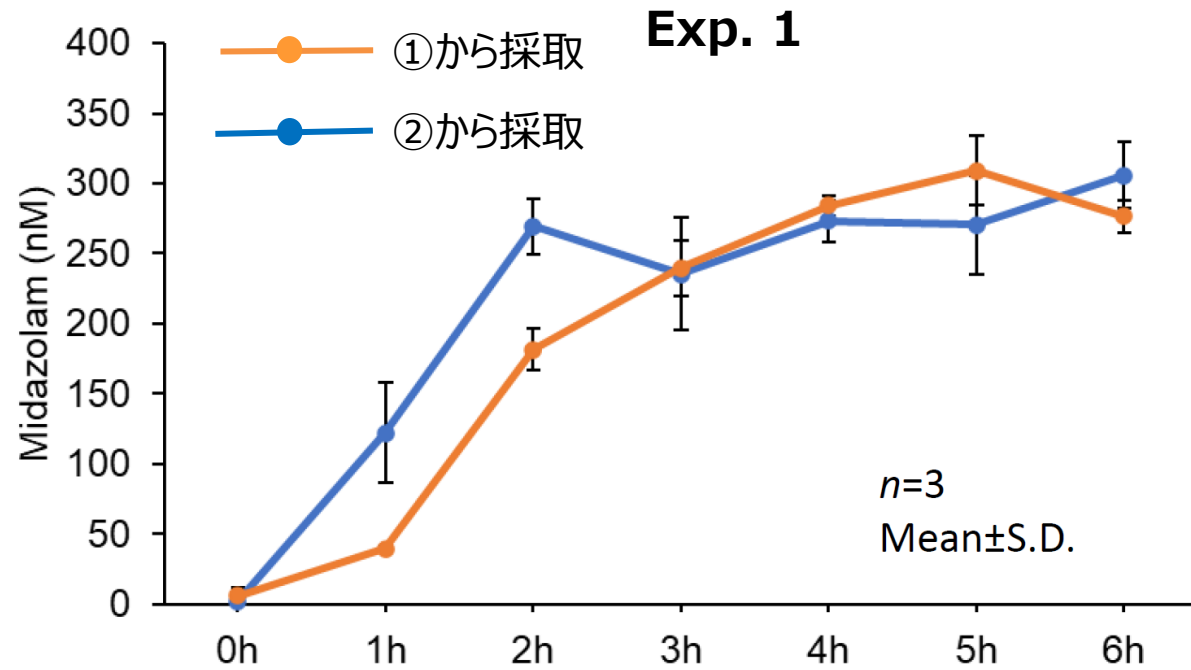
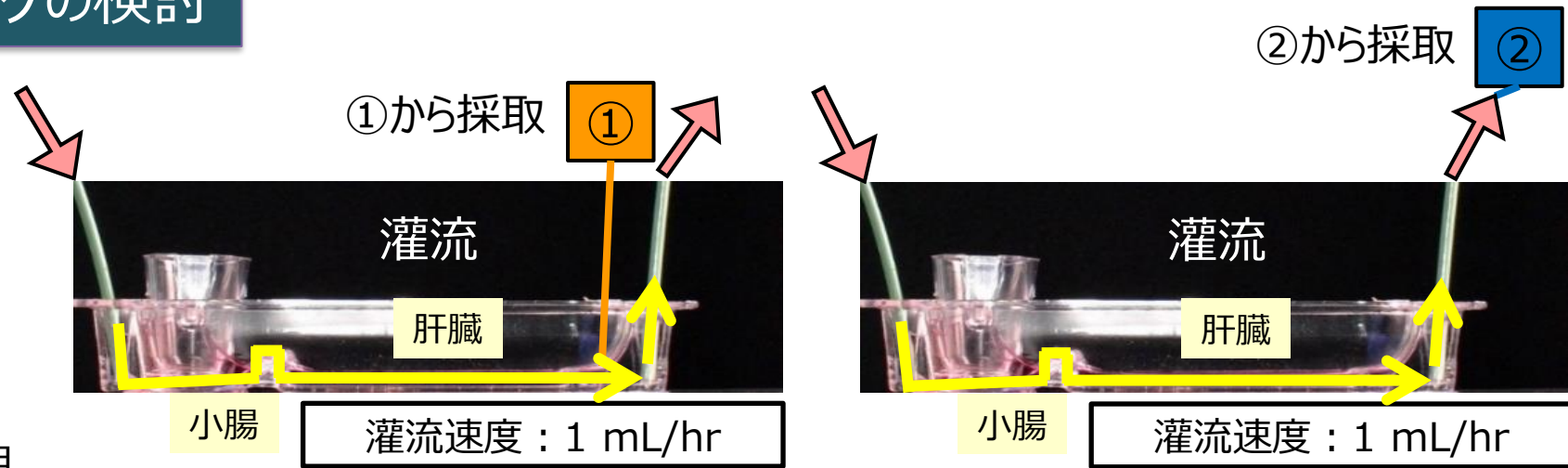
- ①：小腸内相当部分
- ②：門脈相当部分
- ③：肝静脈相当部分

◆ 小腸の代謝活性の低下が確認された。

◆ 肝静脈相当部分において、阻害作用に差が確認された。

一方向灌流培養時のサンプリングの検討

<方法>
肝臓細胞：GS-HepG2 3A4 細胞
(5.0×10^5 cells/lane)
小腸細胞：無し
流速：1mL/hr
勾配：2度
基質：Midazolam (500nM)
サンプリング：①又は②から採取
※シリコンチューブ部分には低収着チューブ使用



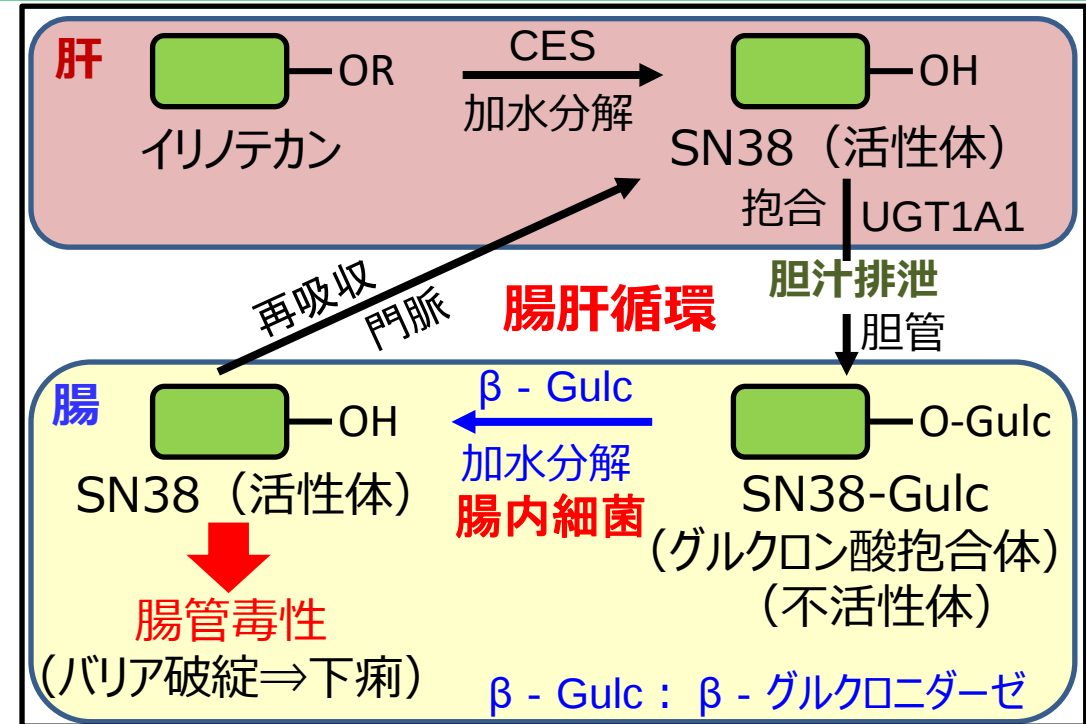
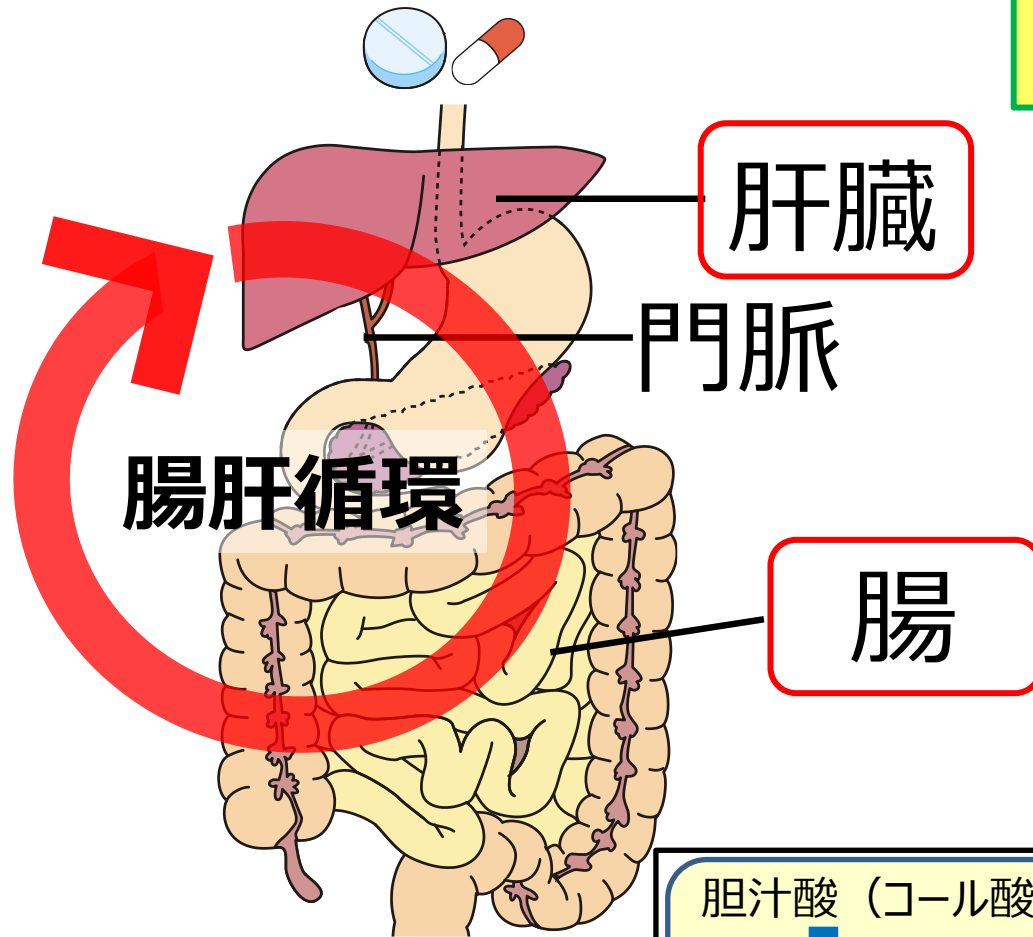
①と比較し、②の位置からサンプリングすることで濃度のばらつきが減少した。

本日の内容

- 1 小腸－肝臓連結デバイス（MS-plate）開発の経緯
- 2 ヒトiPS細胞の腸管上皮細胞への分化誘導とその性質
- 3 小腸－肝臓連結デバイス（MS-plate）を用いた結果
- 4 初回通過効果の評価以外の利用

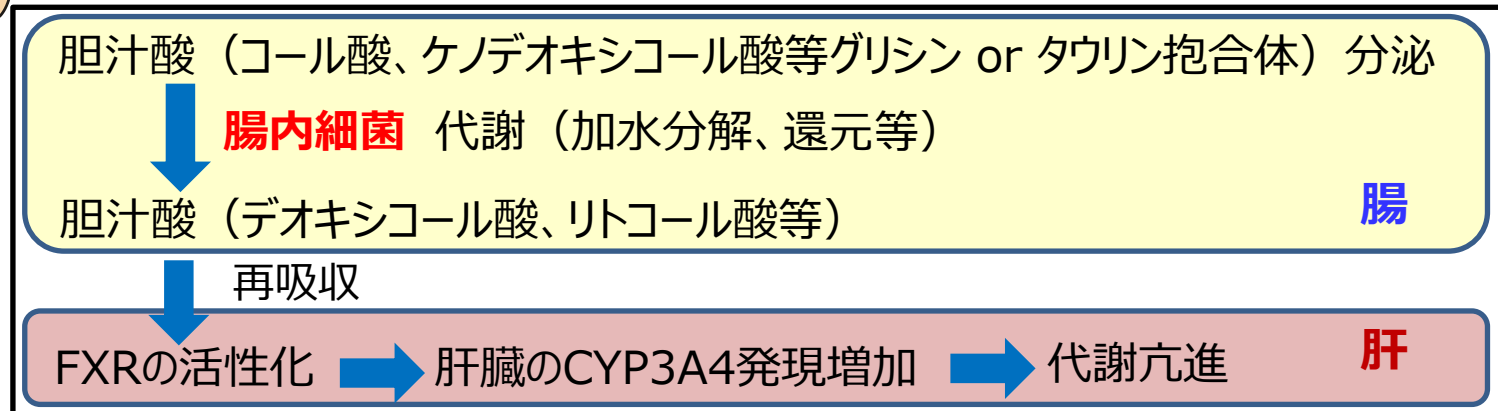
腸肝循環と薬物動態：腸内細菌叢の役割

臓器間相互作用：Gut-Liver Axis (腸肝軸) a)
腸肝循環は薬物の血中濃度維持や副作用に関与



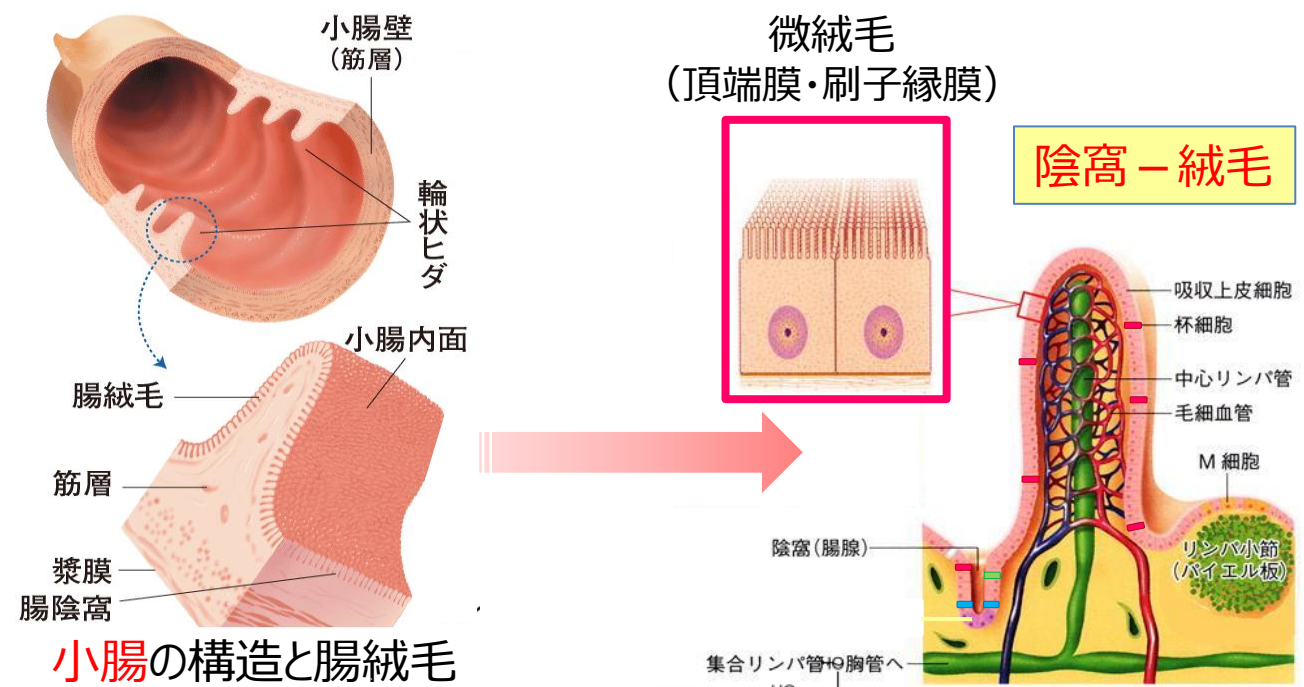
- 腸管バリア破綻
- 腸内細菌生成物 (LPS、短鎖脂肪酸等)

a) : Solga & Diehl: Hepatology, 2004.



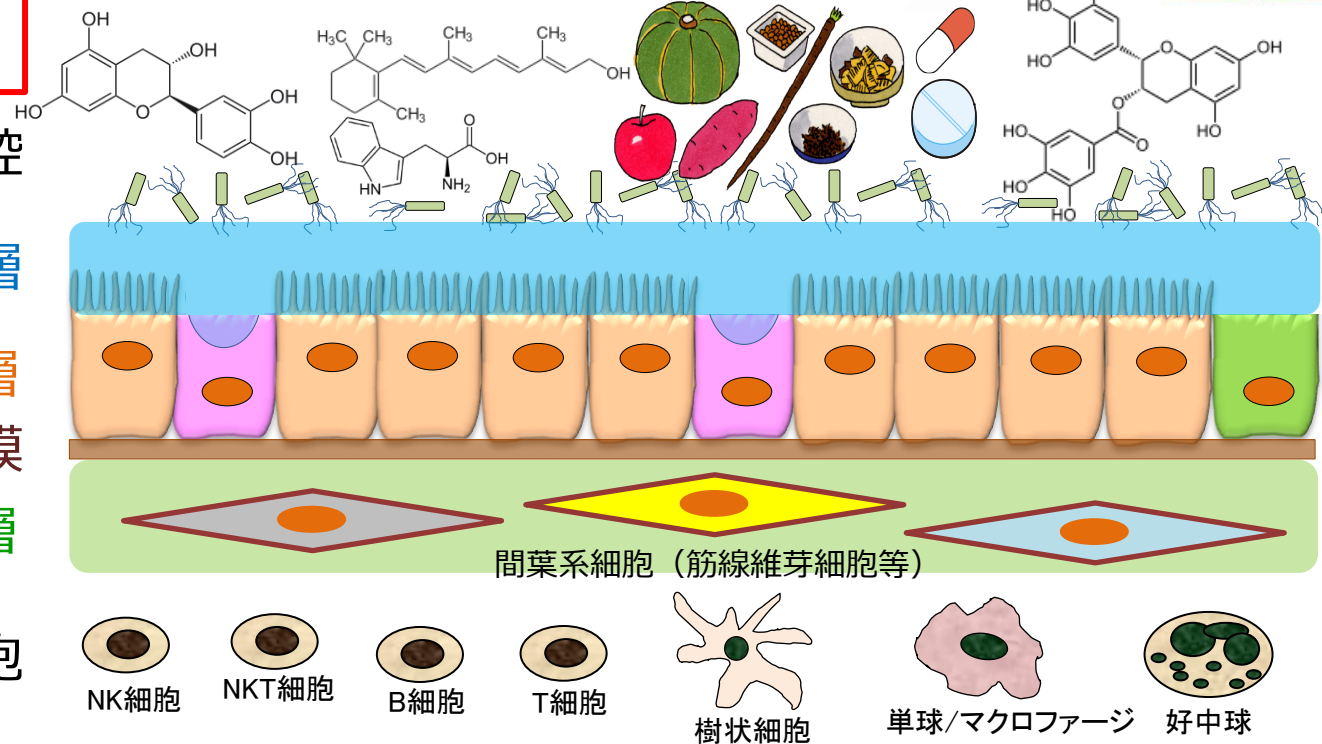
小腸組織と管腔内環境

- 食品成分（糖質、脂質、タンパク質（アミノ酸）、ビタミン、ミネラル、サプリメント、いわゆる健康食品）、食物等（接触刺激・流体剪断応力）
- 腸内細菌叢（菌体成分・低分子化合物）
- 腸内細菌叢（乳酸菌、ビフィズス菌、菌体成分、低分子産生化合物）

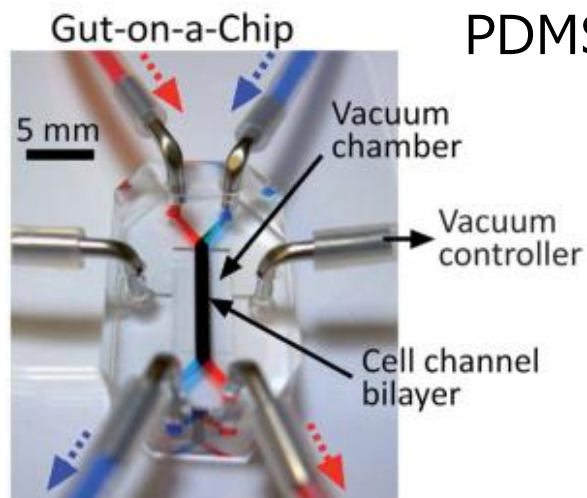


模倣した培養法とデバイスの開発

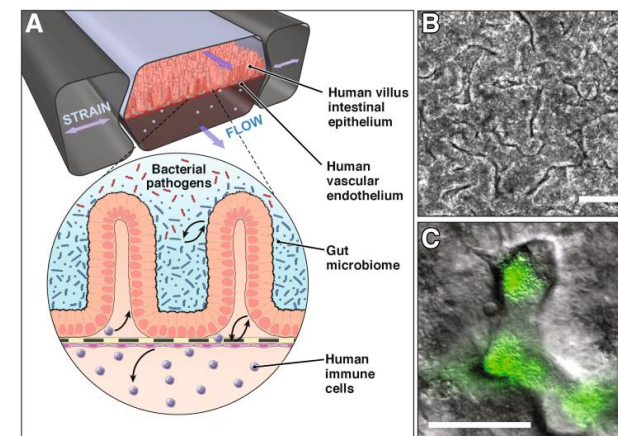
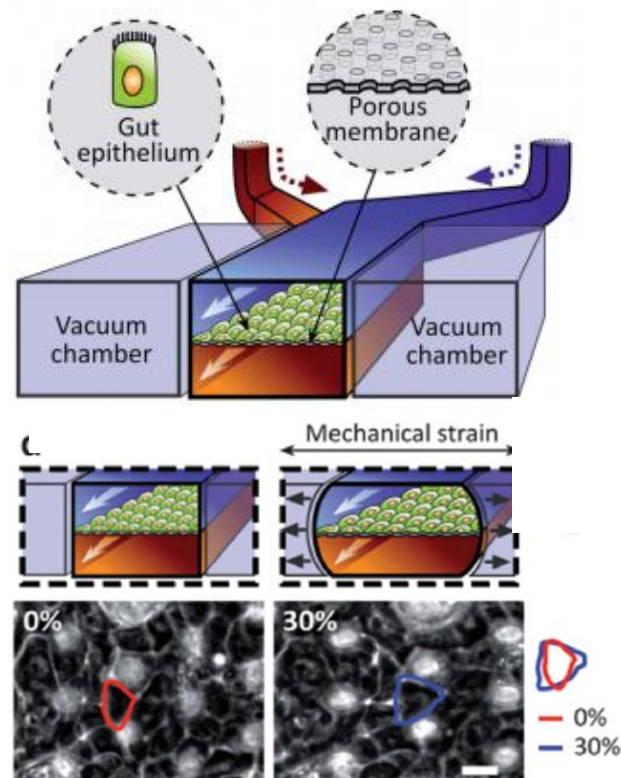
腸管腔
粘液層
腸上皮細胞層
基底膜
粘膜固有層
免疫担当細胞



Gut-on-a-Chip



PDMS



➤ Bein A et al, Cell Mol Gastroenterol Hepatol. **5**: 659–668, 2018.

Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering at Harvard University
Kim HJ and Ingber DE

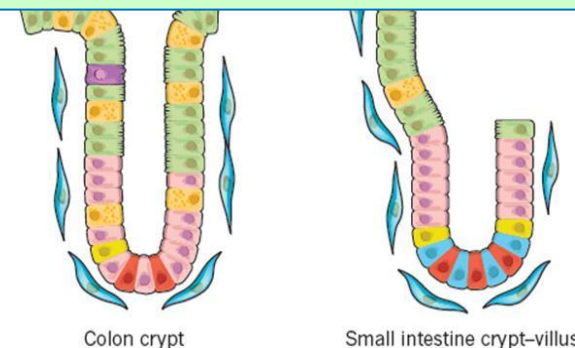
- Kim HJ et al, Lab Chip. **12**: 2165–2174, 2012.
- Caplin JD et al, Adv. Healthcare Mater. **4**: 1426–1450, 2015.

細胞に関する疑問：

- 遺伝子発現とタンパク質発現（機能）の上昇率は一致しない
- 小腸粘液物質ムチン2は盃細胞（goblet cell）が分泌
- Caco-2細胞のMUC2発現は殆ど認められない
- Caco-2細胞で最適化したデバイスが正常細胞に応用可能？

伸展機能を負荷する意義：

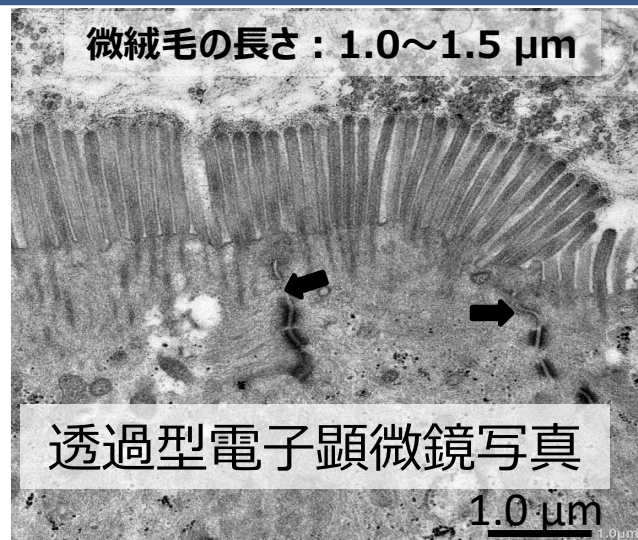
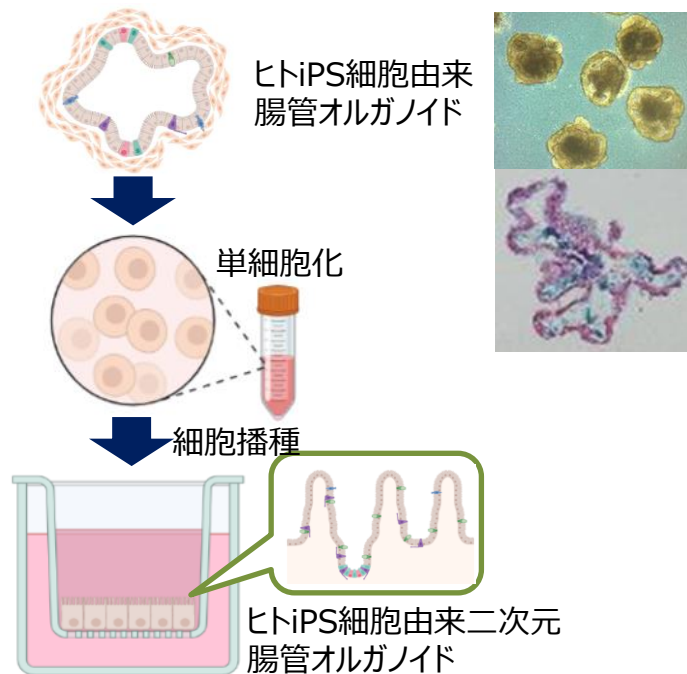
- 伸展することで生体に近い機能を獲得できるか？
- 伸展運動は蠕動運動を模倣しているのか？
- 周辺装置のコストパフォーマンスは？



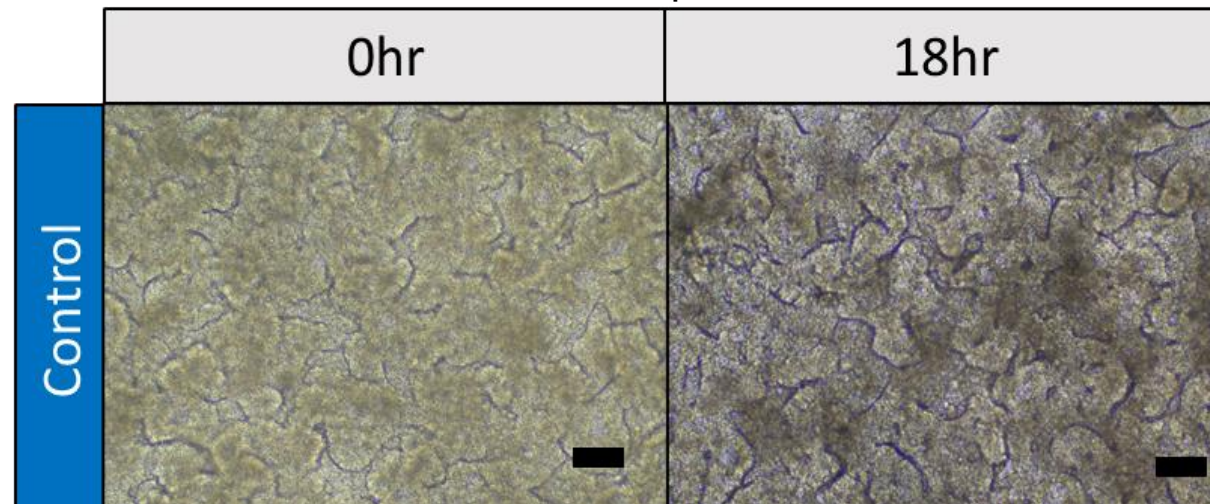
➤ Medema JP, Vermeulen L, Nature, **474**: 318–326, 2011.

ヒトiPS細胞由来二次元腸管オルガノイドの開発

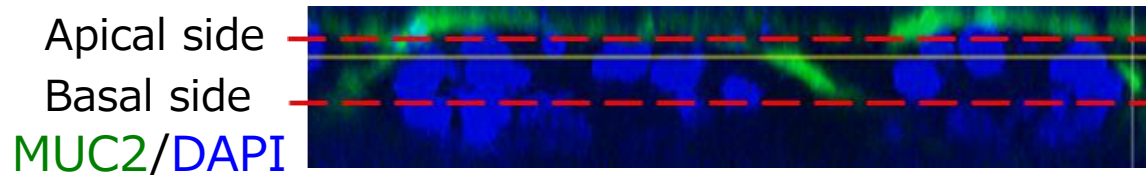
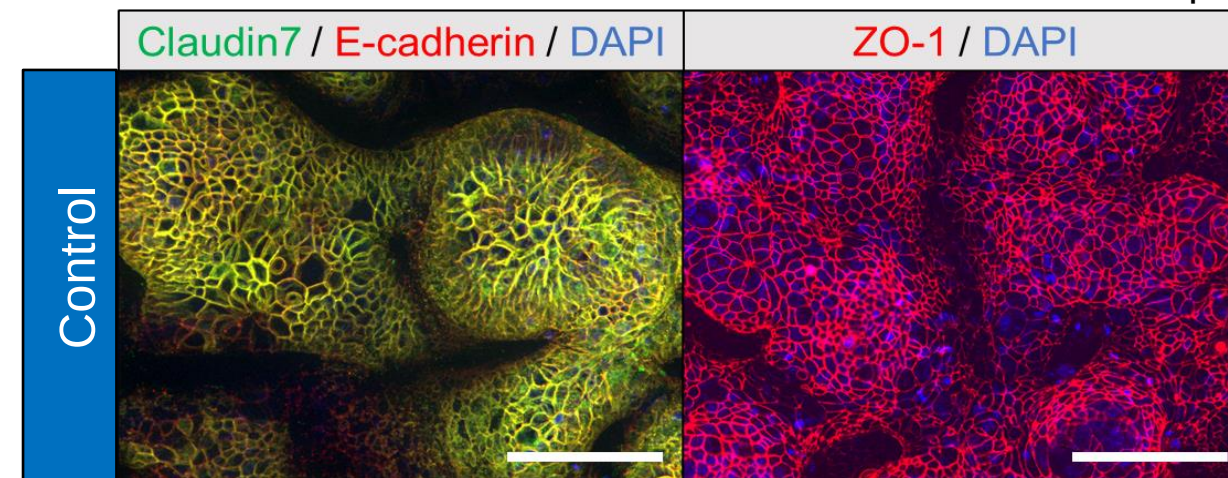
ヒトiPS細胞由来二次元腸管オルガノイド



明視野観察 (Scale bars = 100 μm)

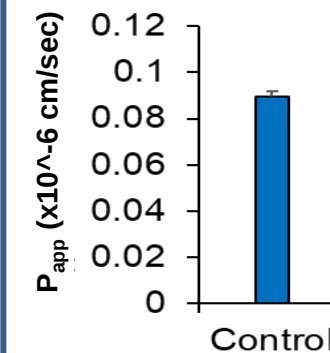


タイトジャンクションマーカータンパク質発現 (Scale bar = 100 μm)

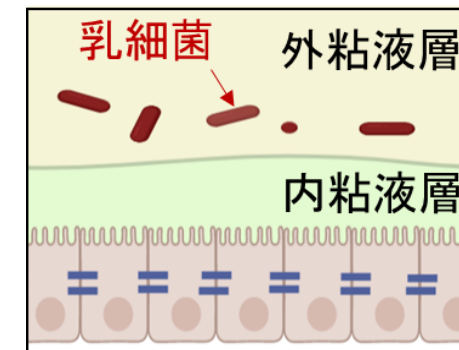
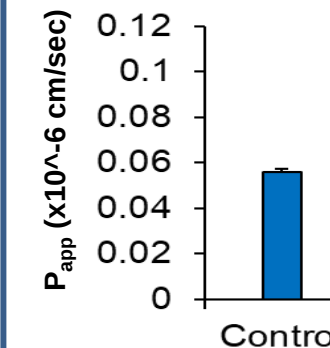


バリア機能

LY膜透過試験



FD-4膜透過試験



今後の課題

1. 薬物動態パラメータの予測モデルの構築
2. 周辺装置の開発：取り扱いの簡素化
3. 再現性の担保
4. 汎用性の向上：薬物動態、安全性、小腸
－肝臓以外の利用法開発への取り組み

共同研究者・謝辞（敬称略）

ヒトiPS細胞提供

国立成育医療研究センター研究所：

梅澤明弘、豊田雅士、清河信敬、大喜多 肇、
宮川世志幸、阿久津英憲

富士フイルム株式会社

小腸上皮細胞への分化・機能解析

富士フイルム株式会社：美馬伸治、山田忠範、
今倉悠貴、小椋 泉

日清食品ホールディングス株式会社：北口 隆ら

小腸-肝臓連結デバイス作製・システム開発

伸晃化学株式会社：山田秀樹、土井淳史、
大友和三

名古屋市立大学

薬学部臨床薬学教育研究センター・
大学院薬学研究科臨床薬学分野
教員、学生、研究員

研究費

AMED：

再生医療・遺伝子治療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業（再生医療技術を応用した
創薬支援基盤技術の開発）

『生体模倣小腸－肝臓チップ：バイオアベイラビリティ予測と安全性評価in vitroモデルの開発』

科研費 基盤B

『ヒトiPS細胞由来小腸細胞・組織を用いた薬物動態及び毒性予測モデル系の創製』

『腸と肝臓の臓器間相互作用（腸肝軸）in vitroモデルの構築とその評価』

