

# ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞(F-hiSIEC™)の基本性能 および消化管吸収モデル等への活用について

---

2024年2月16日

富士フイルム株式会社

バイオサイエンス&エンジニアリング研究所

諸橋 康史

NEVER  
STOP

FUJIFILM  
Value from Innovation

## ◆ F-hiSIEC™とは


概要・使用方法、細胞の特性

## ◆ F-hiSIEC™を用いた消化管吸収・代謝評価について

本細胞の特徴、Caco2細胞との比較を含めて

## ◆ F-hiSIEC™におけるその他アプリケーションについて

毒性評価、免疫・炎症評価



F-hiSIEC™とは（概要、使用方法、細胞の特性）

# F-hiSIEC™とは

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞

# F-hiSIEC™

FUJIFILM human iPS-derived Small Intestine Epithelial like Cell



2019年9月発売



iPS関連細胞技術  
×  
分化誘導技術



名古屋市立大学  
大学院薬学研究科  
臨床薬学分野  
松永 民秀 教授

F-hiSIEC™は当社が有するiPS細胞関連技術と名古屋市立大学の松永先生が  
確立した分化誘導技術を組み合わせて開発された製品

# F-hiSIEC™の概要, 使用方法

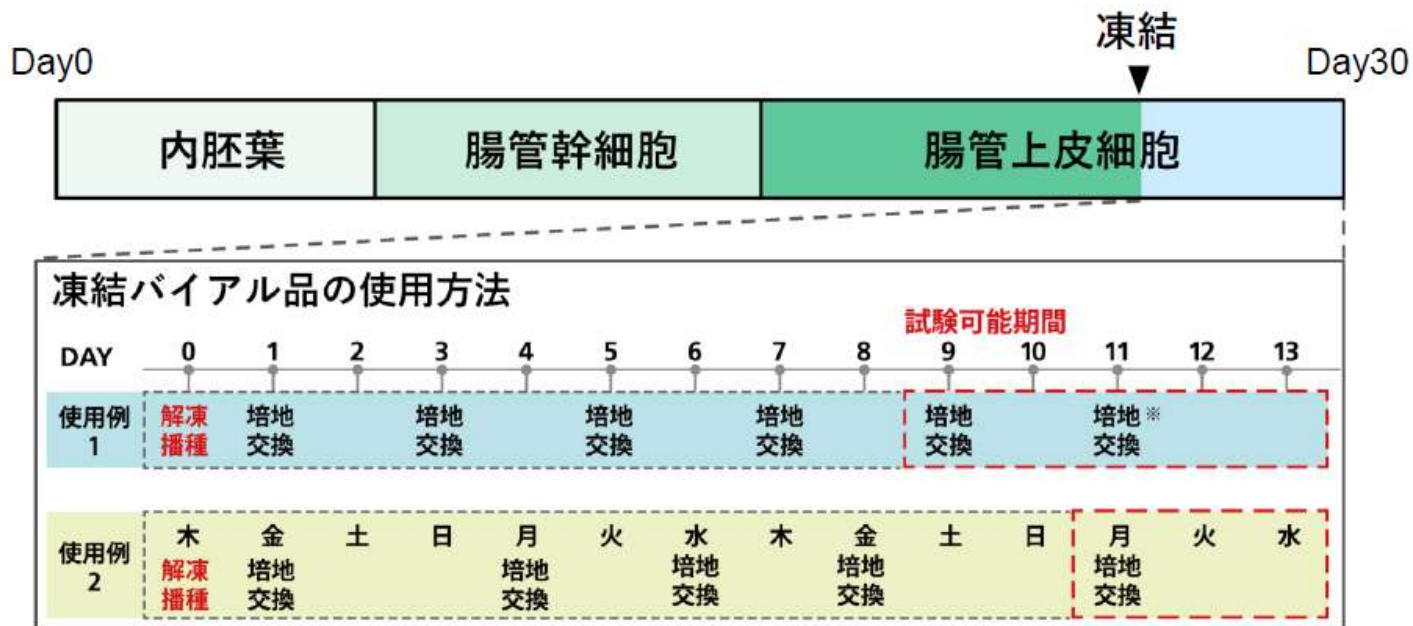
## F-hiSIEC™ 凍結細胞, 培地

- 凍結細胞 :  $1 \times 10^6$  cells/バイアル
- 播種培地 (F-hiSIEC Seeding medium)
- 培養培地 (F-hiSIEC Culture medium)
- ※ 凍結細胞1本で24well用マルチウェルプレート10well分
- ※ 培養培地は1回の培地交換で1本 (1アッセイ4-5本)

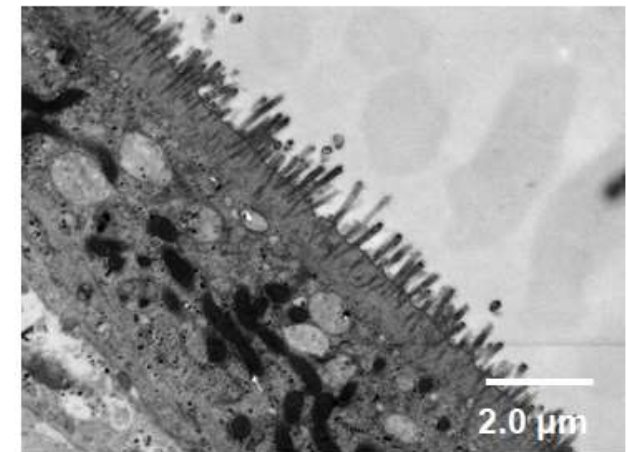
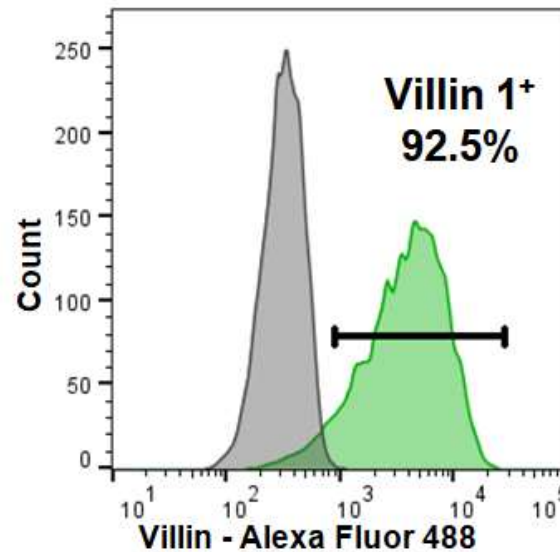
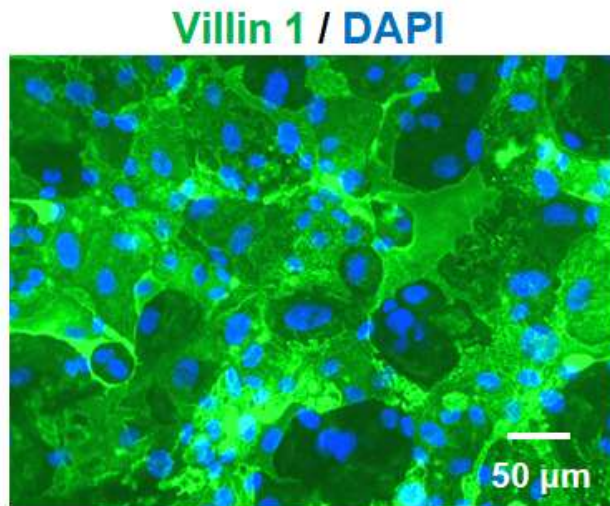
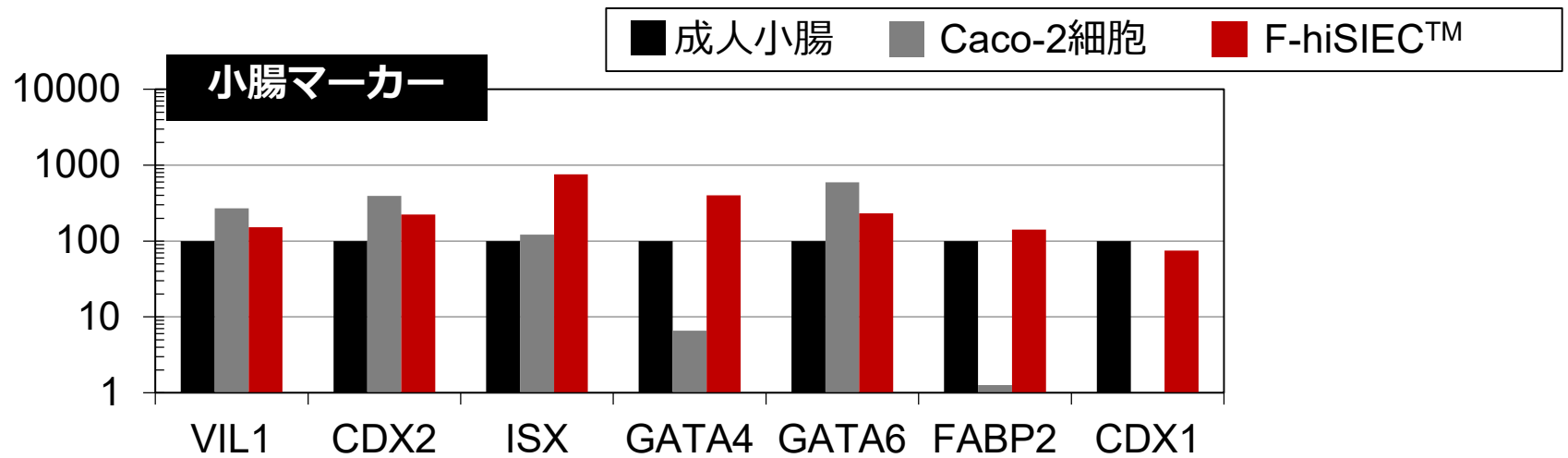


## F-hiSIEC™の分化, 培養スケジュール

iPS細胞から腸管上皮細胞へ分化途中の細胞を凍結保存し、凍結バイアル及び培地を販売。  
 解凍・播種し、約10日間培養させることで腸管上皮細胞として成熟させた後、試験に使用。

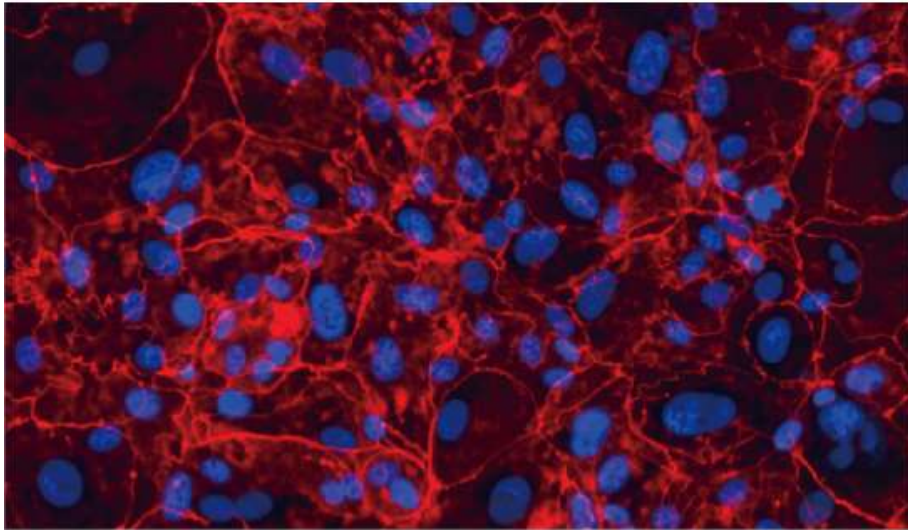


# 腸管上皮細胞としての特性：小腸マーカー、微絨毛構造



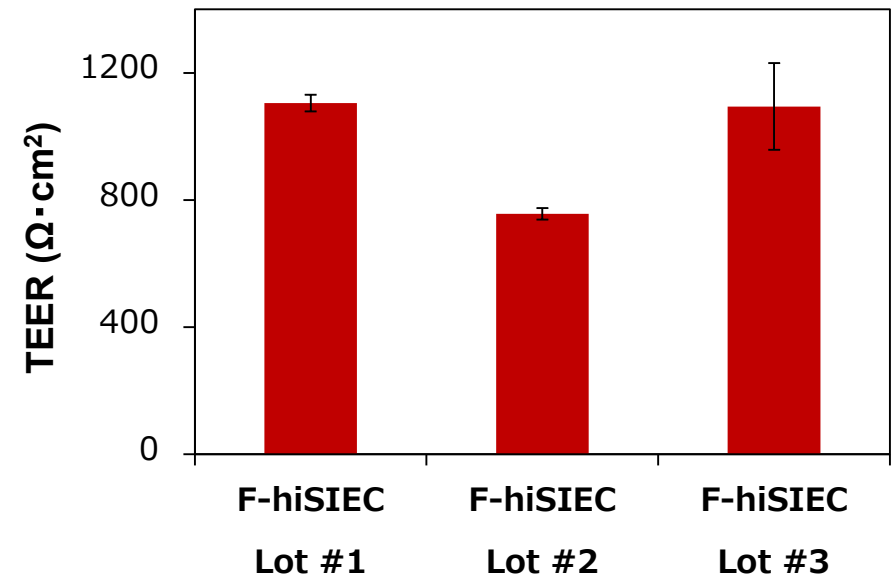
✓ 腸管上皮細胞のマーカーとなる遺伝子の発現や微絨毛の形成が確認された。

## Occludinの免疫染色像



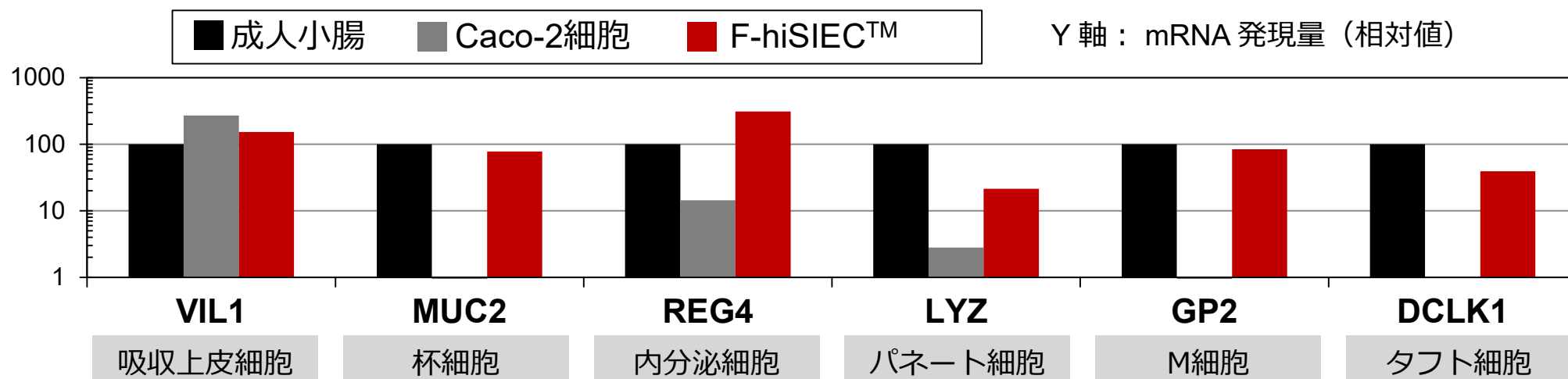
Occludin / DAPI

## 解凍播種後9日目のTEER値

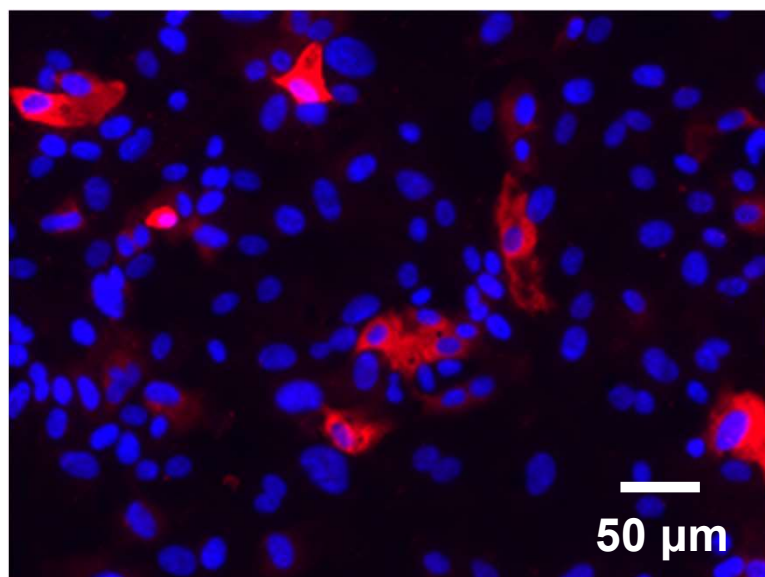


- ✓ タイトジャンクション関連蛋白質であるOccludinの発現が見られ、セルカルチャーインサート上で培養するとバリア機能を示した。

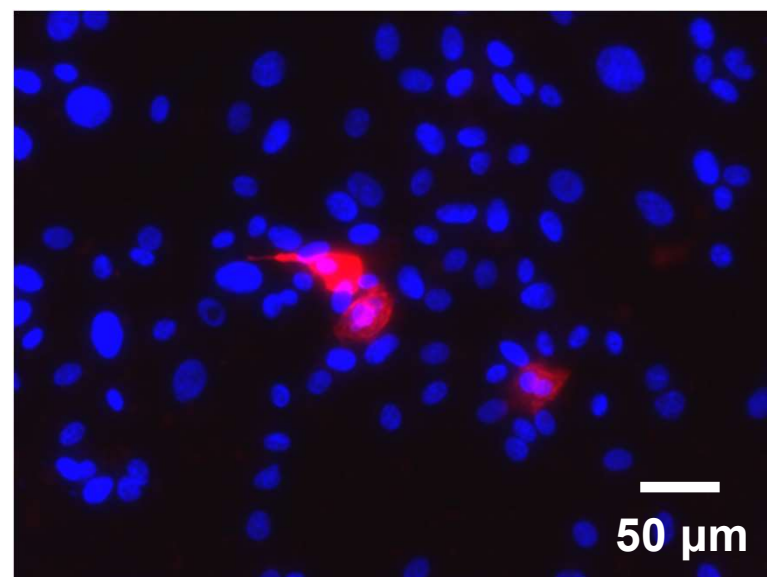
# 腸管上皮細胞としての特性：各種小腸上皮細胞の存在



**MUC2 / DAPI**



**GP2 / DAPI**



F-hiSIEC™には、吸収上皮以外にも杯細胞、M細胞、等が含まれている。



# 本日の内容

---

## ◆ F-hiSIEC™とは

概要・使用方法、細胞の特性

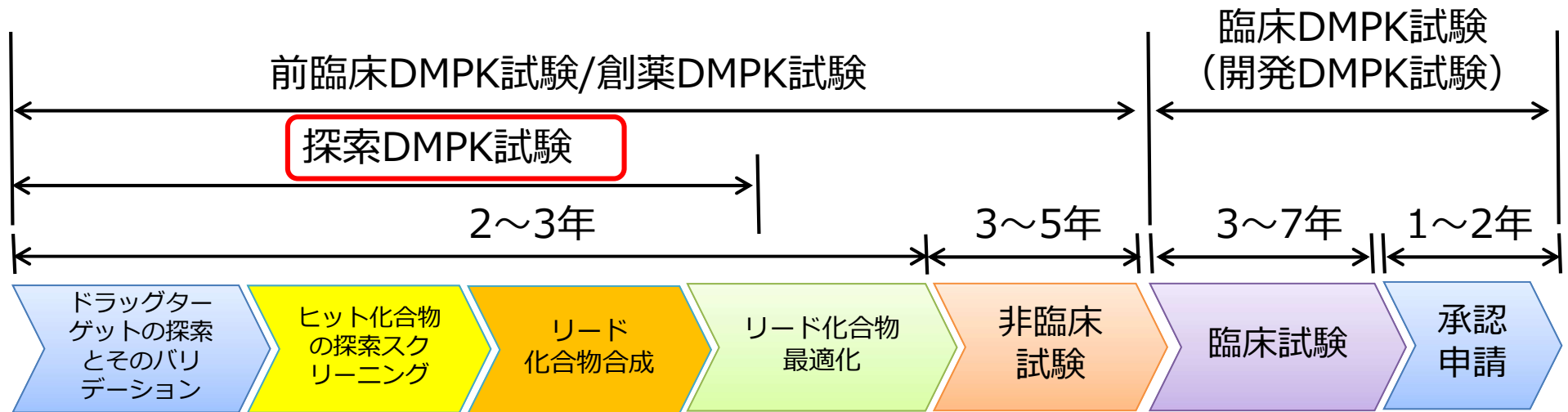
## ◆ F-hiSIEC™を用いた消化管吸収・代謝評価について

本細胞の特徴、Caco2細胞との比較を含めて

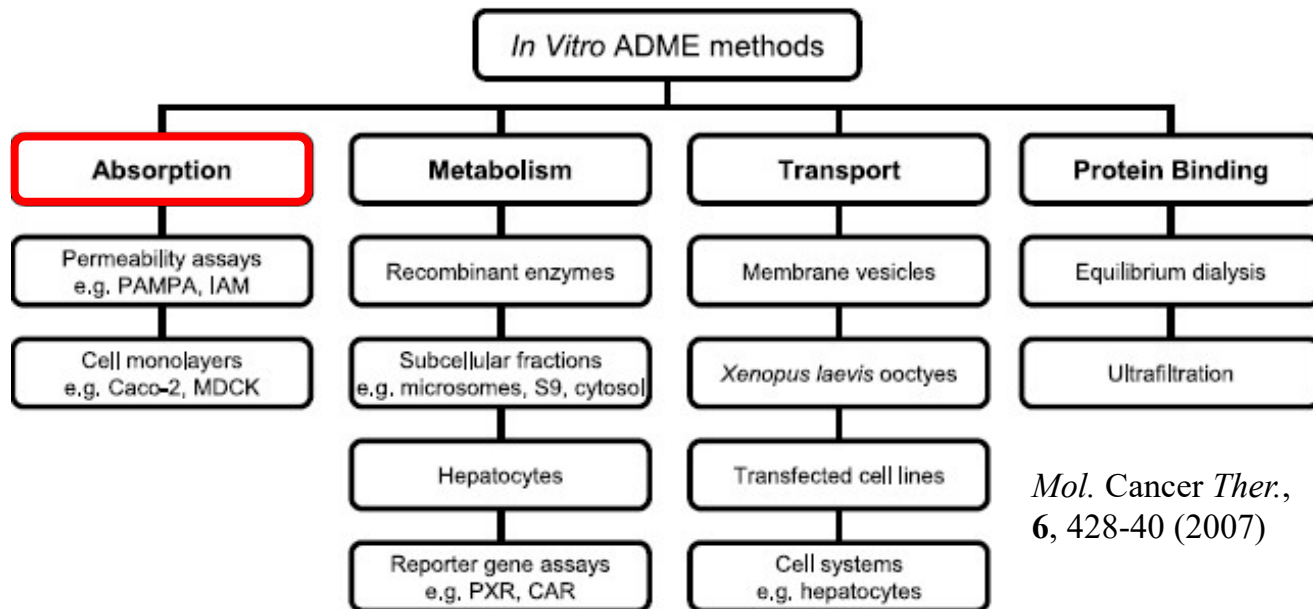
## ◆ F-hiSIEC™におけるその他アプリケーションについて

毒性評価、免疫・炎症評価

# 創薬の薬物動態研究における吸収評価



「薬物動態試験実践資料集 第1刷 (情報機構)」のP6の図1を基に作成



## PAMPA

トランスポーター、代謝酵素活性の評価ができない

## Caco-2

CYP3A4代謝酵素活性の評価ができない

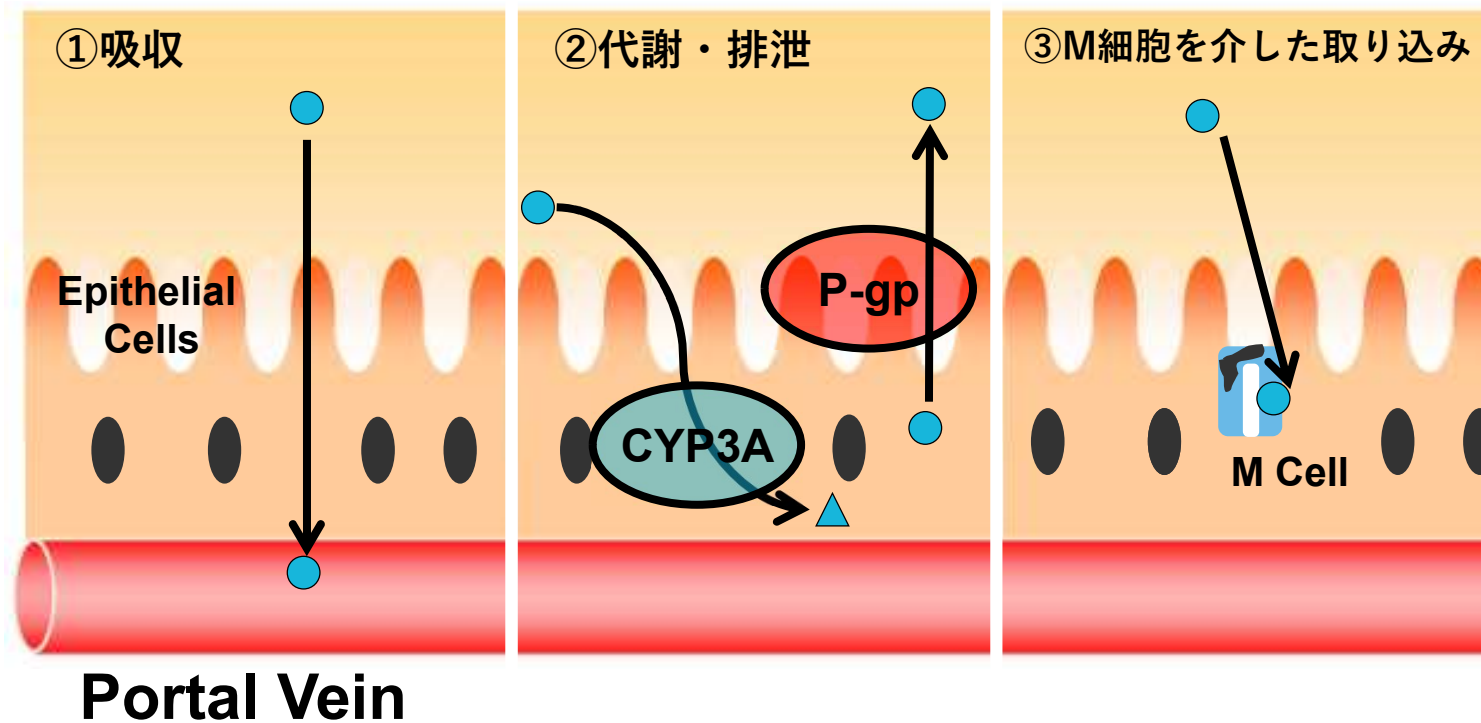
*Mol. Cancer Ther.*, 6, 428-40 (2007)

✓ *In vitro* 評価として PAMPA/Caco-2 は有用であり、汎用されているが、それぞれ課題がある

## In vitroでの消化管吸収・代謝に関する評価

- ①消化管からの薬物吸収性の評価
- ②消化管での代謝・トランスポーターによる排泄評価
- ③M細胞を介した取り込み（抗原となる物質、腸内細菌などの取り込み）

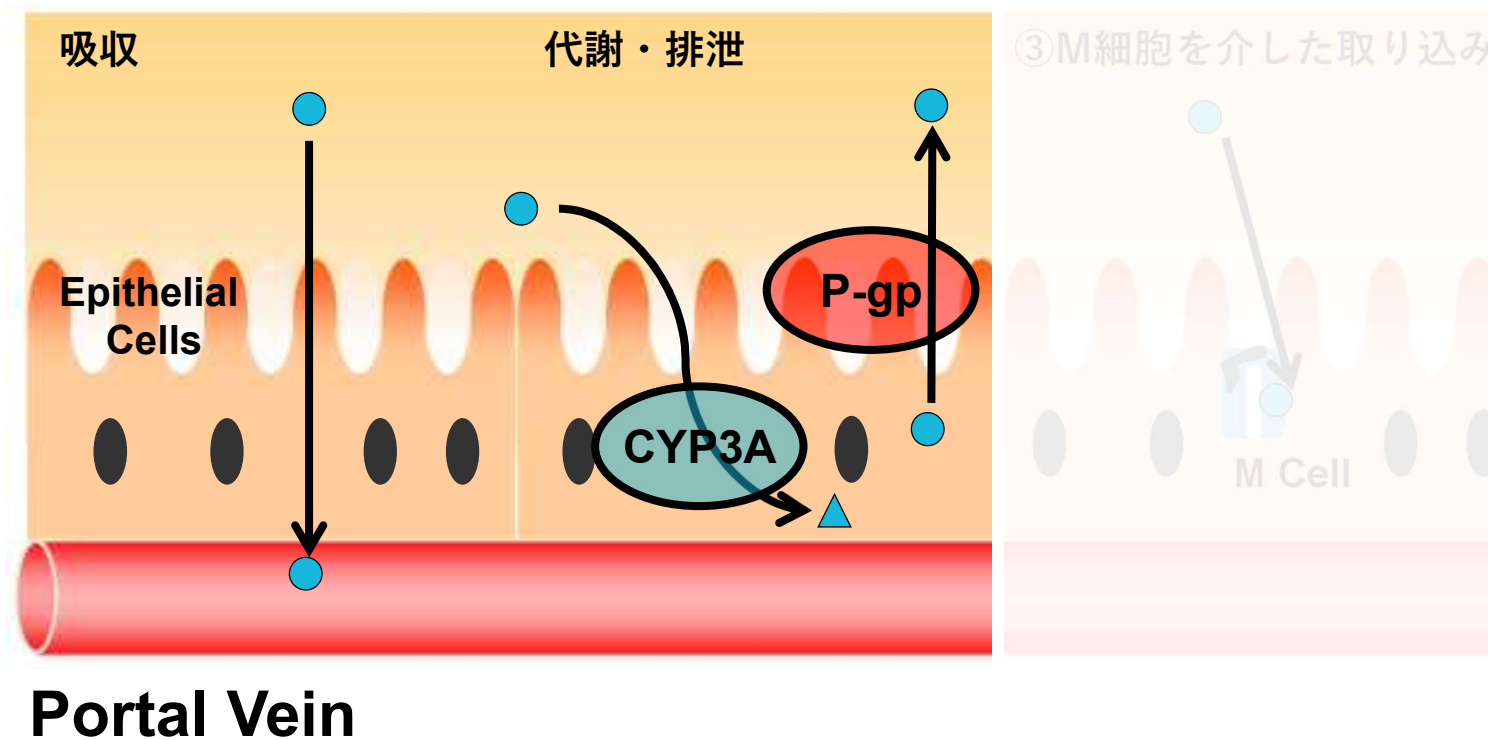
### Intestinal Lumen



✓ よりヒト生体に近い性質を有する*in vitro*評価系が望まれている

# 消化管からの吸収・代謝評価について

## Intestinal Lumen



# 薬物の消化管吸収・代謝のプロセス

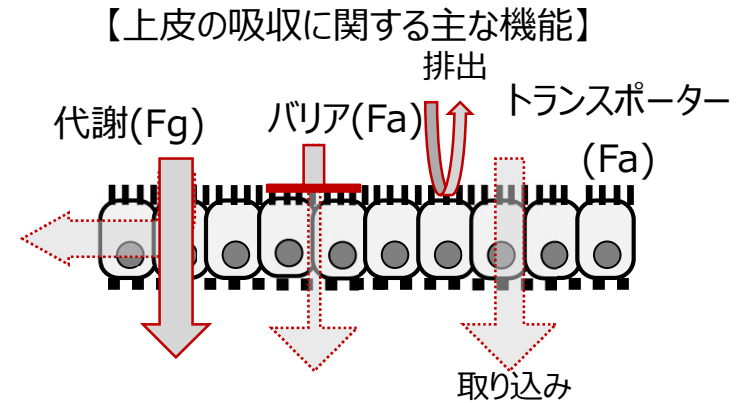
Bioavailability (F or BA)

$$= F_a \times F_g \times F_h$$

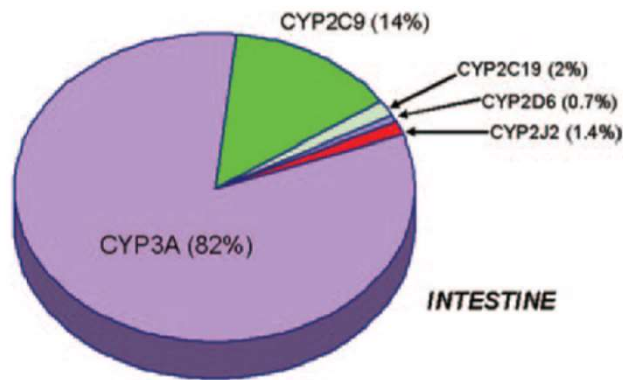
F<sub>a</sub>: 経口吸収率

F<sub>g</sub>: 消化管代謝を回避する割合

F<sub>h</sub>: 肝初回通過効果を回避する割合

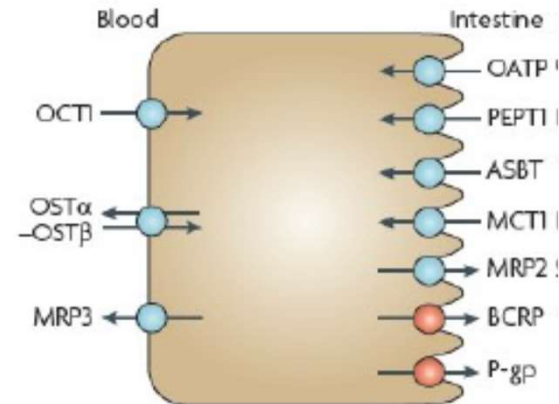


【小腸におけるCYPの発現割合】



*Drug Metab Dispos.*, 34(5), 880-886 (2006)

【小腸において機能しているトランスポーター群】



*Nat Rev Drug Discov.*, 9(3), 215-236 (2010)

✓ 有用な *in vitro* 消化管吸収評価モデルの要件 =  
代謝(CYP3A4), バリア, トランスポーターの機能を有すること

## in vitroでの消化管吸収（透過性）の評価系比較

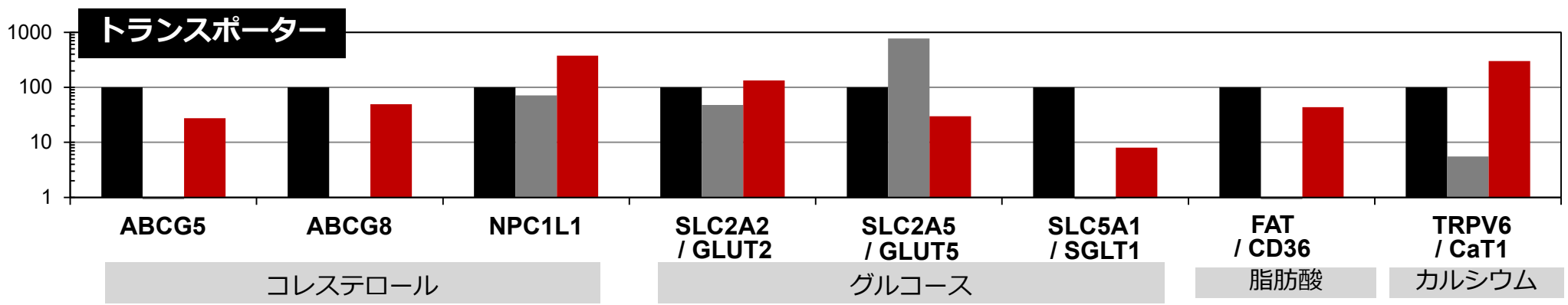
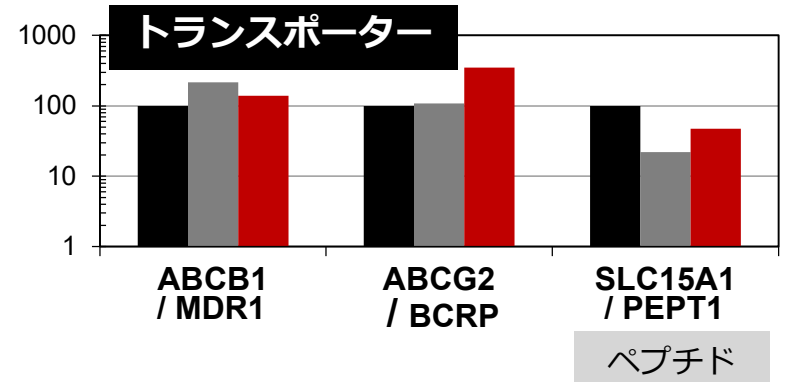
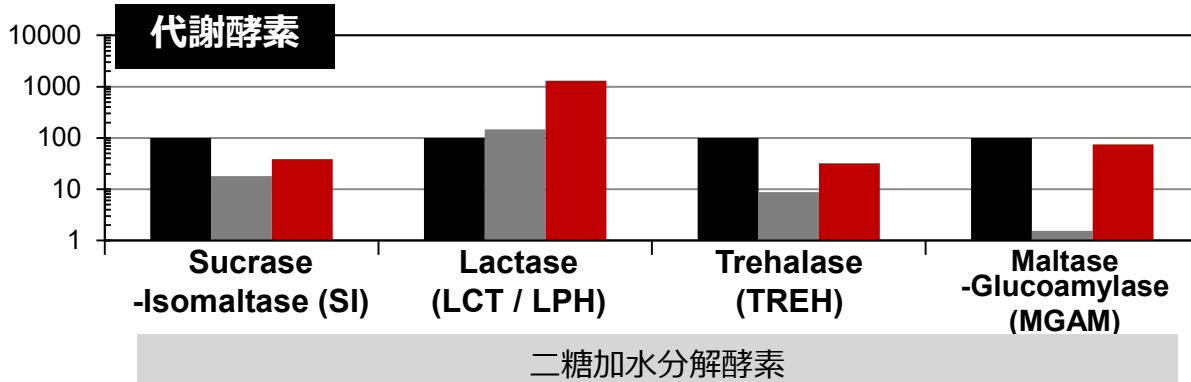
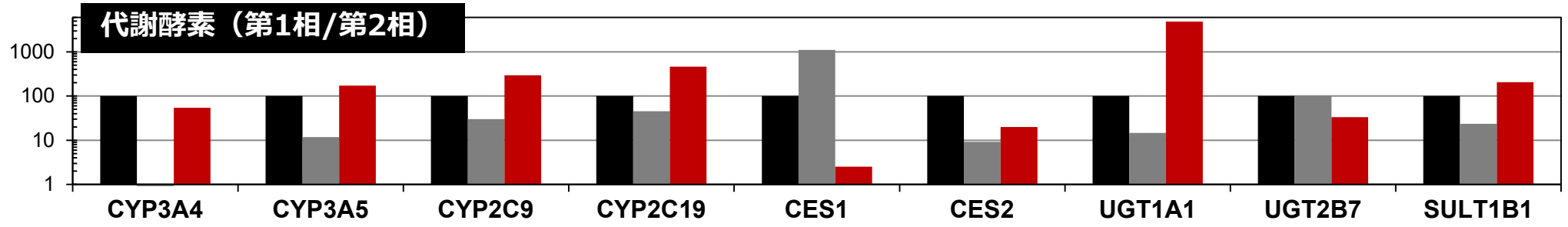
| 評価系              | PAMPA          | Caco2<br>(結腸がん細胞株)      | F-hiSIEC™<br>(ヒトiPS由来細胞)    |
|------------------|----------------|-------------------------|-----------------------------|
| 概要               | 人工膜を介した薬物透過性評価 | 細胞シートでの薬物透過性評価          | 細胞シートでの薬物透過・代謝評価            |
| 使用目的             | 膜透過の初期スクリーニング  | 膜透過の予測                  | 膜透過の予測<br>小腸代謝の予測           |
| 吸収予測<br>(Fa予測)   | △<br>(受動拡散のみ)  | △~○<br>(一部のトランスポータは不十分) | ○<br>(ヒト生体小腸類似のトランスポータ発現)   |
| 小腸代謝予測<br>(Fg予測) | ×              | △<br>(CYP3A等を介した代謝は不可)  | ○<br>(改良法により予測可能)           |
| 培養期間             | なし             | 約20日                    | 約10日                        |
| 特徴               | 高スループット、安価     | 背景データ豊富                 | ヒト小腸に類似<br>(トランスポータ/代謝活性など) |

✓ F-hiSIEC™は、Caco2よりもトランスポータ、代謝酵素の発現がヒトに近く薬物の吸収・代謝がより精度高く評価できることが期待される

# 代謝酵素・トランスポーターの遺伝子発現

■ 成人小腸細胞   ■ Caco-2細胞   ■ F-hiSIEC™

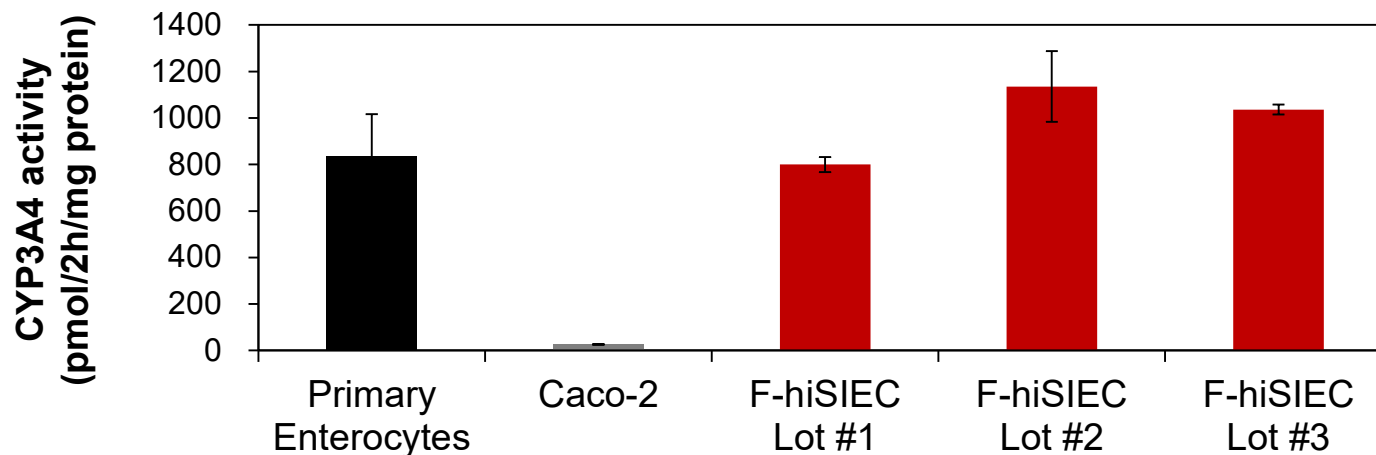
Y軸： mRNA 発現量（相対値）



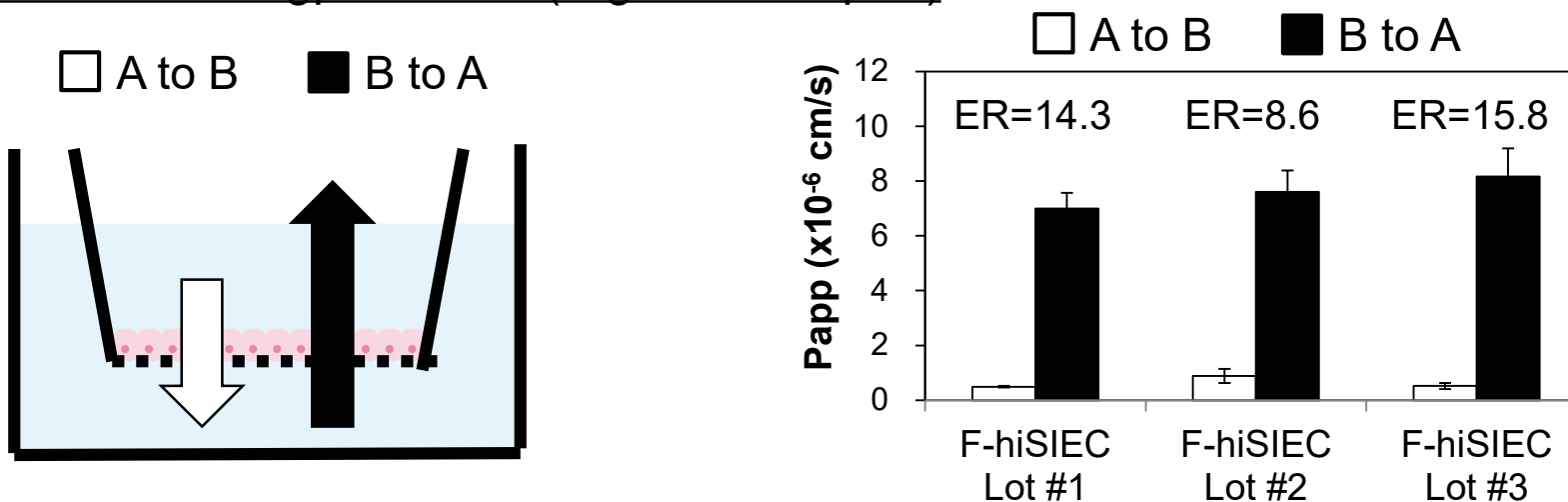
✓ ヒト小腸細胞に類似した代謝酵素・トランスポーターの遺伝子発現を示す

# 代謝酵素・トランスポーターの活性評価

## 代謝酵素 (CYP3A4) の活性 (Midazolam 1'-hydroxylation)



## トランスポーター (P-gp) の活性 (Digoxin transport)



✓ 代謝酵素 (CYP3A4) とトランスポーター (P-gp) について、複数のロット間で安定した活性を示すことが確認された



日清食品HD様より、食品由来成分の吸収・代謝に関して、以下の報告がなされています。

- F-hiSIEC™において、Caco2細胞よりもヒトに近い吸収予測ができる
- F-hiSIEC™において、UGTによる代謝をより正確に評価できる

Supplemental material to this article can be found at <http://dmd.aspetjournals.org/content/suppl/2021/10/20/dmd.121.000605.DC1>

1521-009X/20/17-2335.00  
 DRUG METABOLISM AND DISPOSITION  
 Copyright © 2021 by The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics

<https://doi.org/10.1124/dmd.121.000605>  
 Drug Metab Dispos 50:17-23, January 2022

## Simultaneous Evaluation of Membrane Permeability and UDP-Glucuronosyltransferase-Mediated Metabolism of Food-Derived Compounds Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Small Intestinal Epithelial Cells<sup>®</sup>

Takashi Kitaguchi, Taisei Mizota, Mina Ito, Katsutoshi Ohno, Kazuhiro Kobayashi, Isamu Ogawa, Shimeng Qiu, Takahiro Iwao, Nobumitsu Hanioka, Mitsuru Tanaka, and Tamihide Matsunaga

Global Food Safety Institute, Nissin Foods Holdings Co., Ltd., Hachioji, Japan (T.K., T.M., M.I., K.O., K.K., M.T.); Department of Clinical Pharmacy, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Nagoya, Japan (I.O., S.Q., T.I., T.M.); and Department of Health Pharmacy, Yokohama University of Pharmacy, Yokohama, Japan (N.H.)

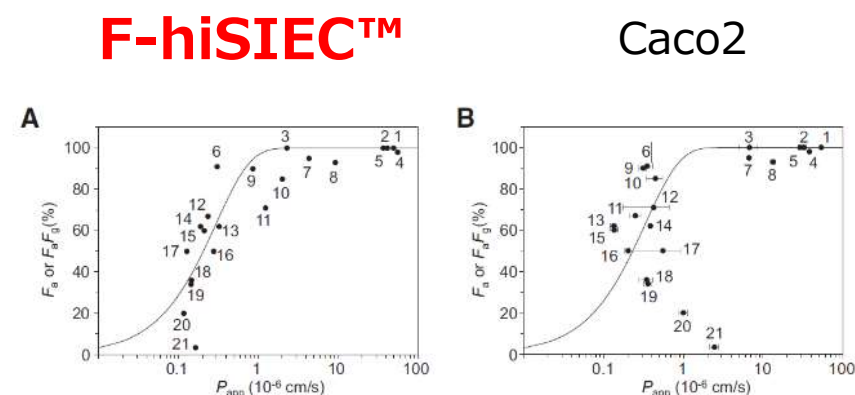
Received July 1, 2021; accepted October 18, 2021

**ABSTRACT**  
 Pharmacokinetic prediction after oral ingestion is important for quantitative risk assessment of food-derived compounds. To evaluate the utility of human intestinal absorption prediction, we compared the membrane permeability and metabolic activities of human induced pluripotent stem cell-derived small intestinal epithelial cells (hiPSC-SIECs) with Caco-2 cells or human primary enterocytes (hPECs). We found that membrane permeability in hiPSC-SIECs had better predictivity than that in Caco-2 cells against 21 drugs with known human intestinal availability ( $r = 0.830$  and  $0.401$ , respectively). Membrane permeability in hiPSC-SIECs was only 0.019–0.25-fold as compared with that in Caco-2 cells for 7 in 15 food-derived compounds, primarily those that were reported to undergo glucuronidation metabolism. The metabolic rates of the glucuronide conjugate were similar or higher in hiPSC-SIECs as compared with hPECs but lower in Caco-2 cells. Expression levels of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) isoform mRNA in hiPSC-SIECs were similar or higher as compared with hPECs. Therefore, hiPSC-SIECs could be a useful tool for predicting human intestinal absorption to simultaneously evaluate membrane permeability and UGT-mediated metabolism.

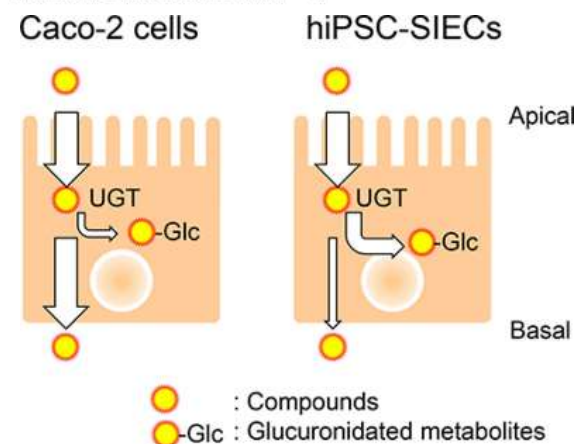
**SIGNIFICANCE STATEMENT**  
 Gastrointestinal absorption is an important step for predicting the internal exposure of food-derived compounds. This research revealed that human induced pluripotent stem cell-derived small intestinal cells (hiPSC-SIECs) had better predictivity of intestinal availability than Caco-2 cells; furthermore, the metabolic rates of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) substrates of hiPSC-SIECs were closer to those of human primary enterocytes than those of Caco-2 cells. Therefore, hiPSC-SIECs could be a useful tool for predicting human intestinal absorption to simultaneously evaluate membrane permeability and UGT-mediated metabolism.

Downloaded from [dmd.aspetjournals.org](http://dmd.aspetjournals.org) at ASPET Journals

Kitaguchi, T. *et al.*: Drug Metabolism and Disposition January 2022, 50 (1) 17-23



**Fig. 1.** Relationship between  $P_{app}$  values and intestinal availability ( $F_a$  or  $F_a F_g$ ) for 21 drugs. hiPSC-SIECs (A) or Caco-2 cells (B) were incubated with transport buffer containing each of the 21 different drugs for 90 minutes at 37°C. The regression curves between the  $P_{app}$  and  $F_a$  or  $F_a F_g$  of these 21 drugs were fitted to the following formula in accordance with previous reports (Takenaka *et al.*, 2016; Amidon *et al.*, 1988):  $F_a$  or  $F_a F_g = 1 - e^{-P_{app} / P_{app, 50}}$ . Compounds used were as follows: 1, piroxicam; 2, carbamazepine; 3, verapamil; 4, warfarin; 5, antipyrine; 6, cephalixin; 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. Data are presented as means for hiPSC-SIECs ( $n = 2$ ) and means  $\pm$  S.D. for Caco-2 cells ( $n = 3$ ).



## 消化管におけるFa、Fgについて

---

Bioavailability (F or BA)

$$= Fa \times Fg \times Fh$$

Fa: 経口吸収率

Fg: 消化管代謝を回避する割合

Fh: 肝初回通過効果を回避する割合

} 小腸に関わる部分

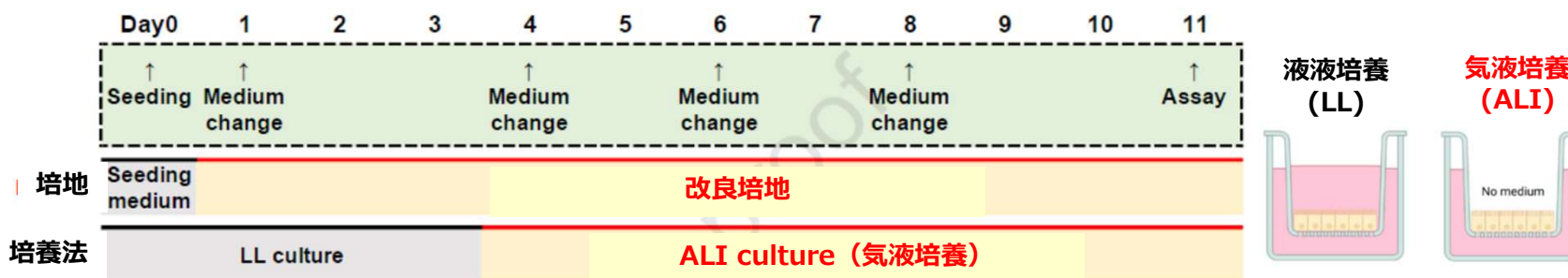
✓ *In vitro*の消化管吸収モデルにおいては、  
FaおよびFgを正確に予測することが求められる



## 改良法 = 改良培地 × 気液培養 (新培養法)

|            | 細胞                | 播種培地              | 培養培地              | 培養法  |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|--|
| 現行法        | F-hiSIEC™<br>凍結細胞 | F-hiSIEC™<br>播種培地 | F-hiSIEC™<br>培養培地 | 0-11日: LL culture                                    |
| <b>改良法</b> |                   |                   | <b>改良培地</b>       | <b>0-4日: LL culture</b><br><b>4-11日: ALI culture</b> |

## 改良法プロトコル

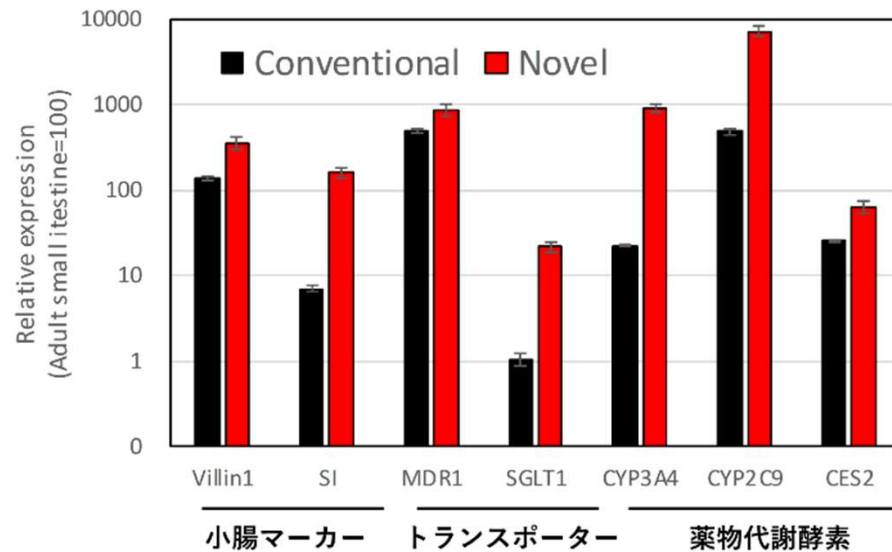


Shirai et al., *Drug Metab pharmacokinet*, Accepted  
<https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2023.100994>

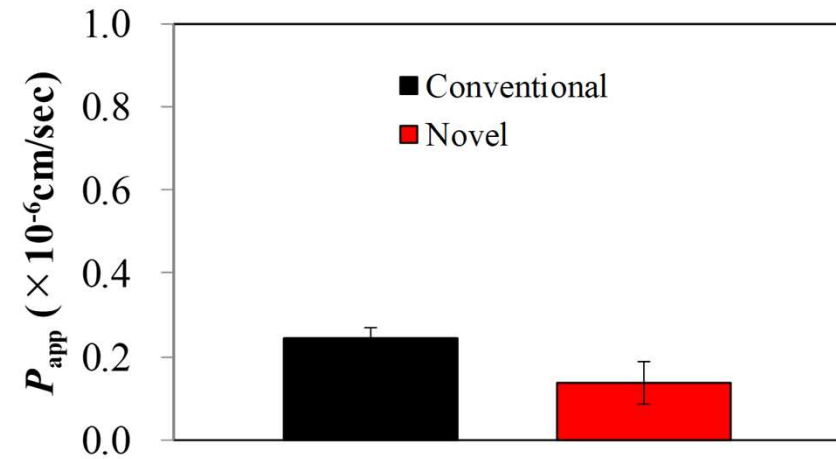
✓ F-hiSIEC™の代謝機能を向上させる改良法を開発した。

# F-hiSIEC™改良法：遺伝子発現・バリア機能の評価

## 遺伝子発現

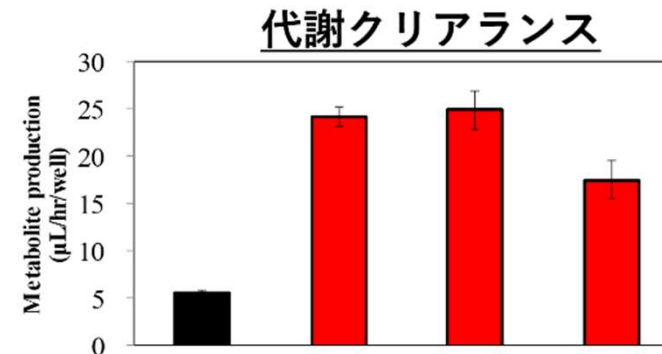
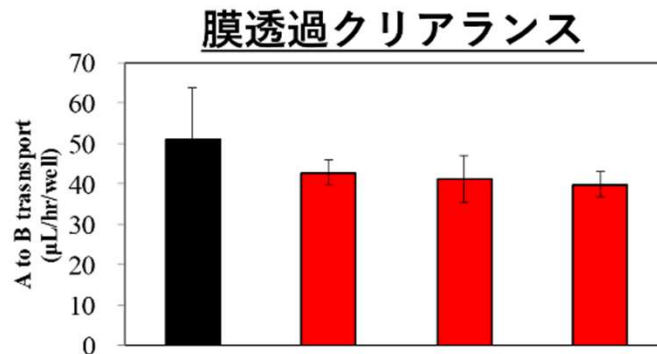
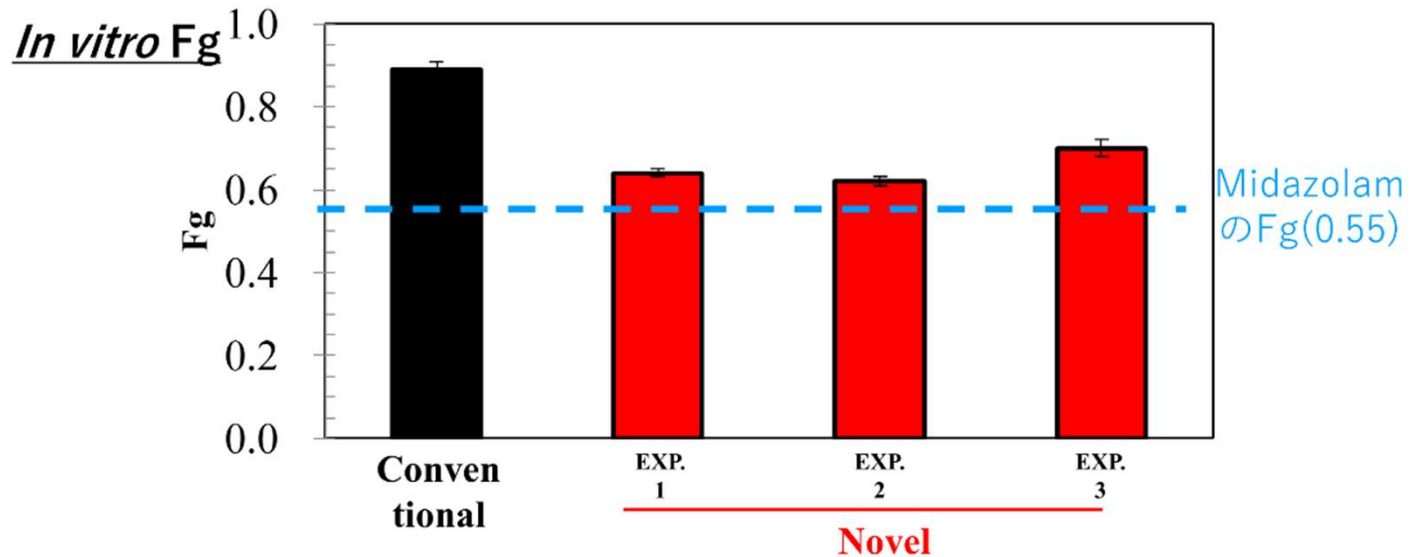


## バリア機能評価 (Lucifer yellow膜透過性)



- ✓ 改良法により、腸管マーカーや薬物動態関連遺伝子の発現が上昇し、バリア機能も維持されていた。

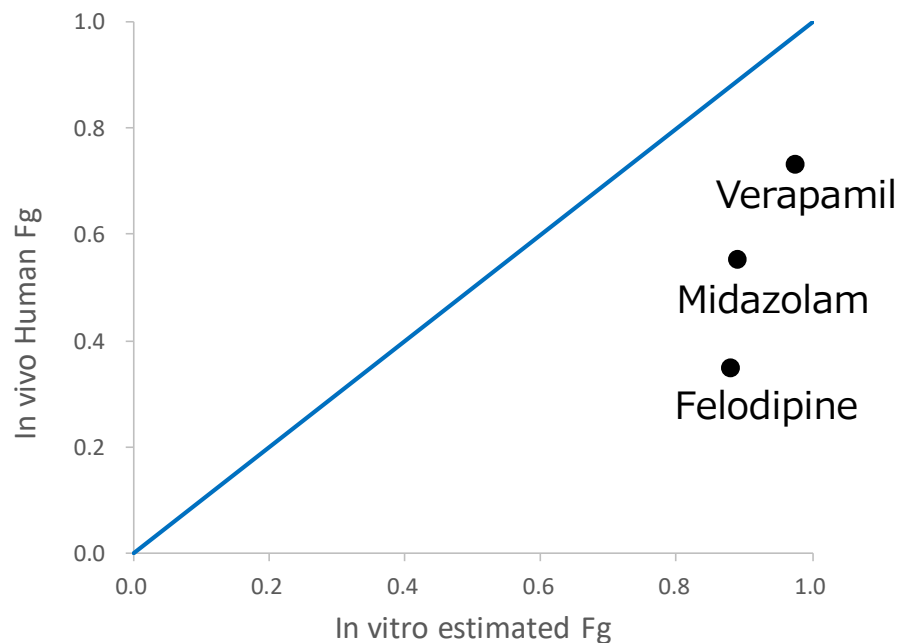
# 改良法での Fg値の予測 (ミダゾラム)



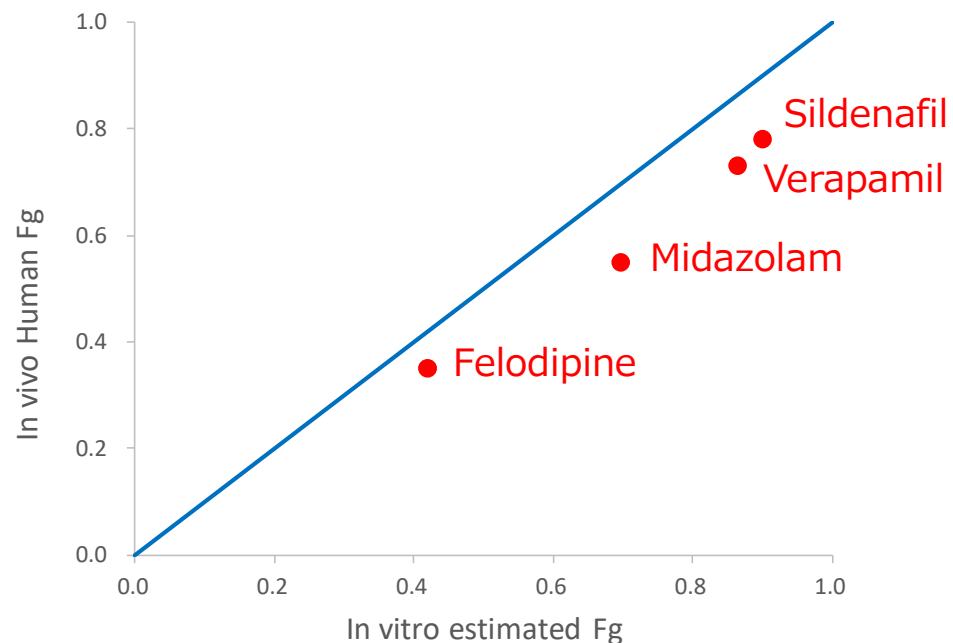
✓ Midazolamの改良法における*In vitro* Fgの試験間誤差を確認した。Fgの値は0.62~0.70とよりヒトFg値に近い値を示した。

# 改良法でのCYP3A4基質のFg予測

## 通常法



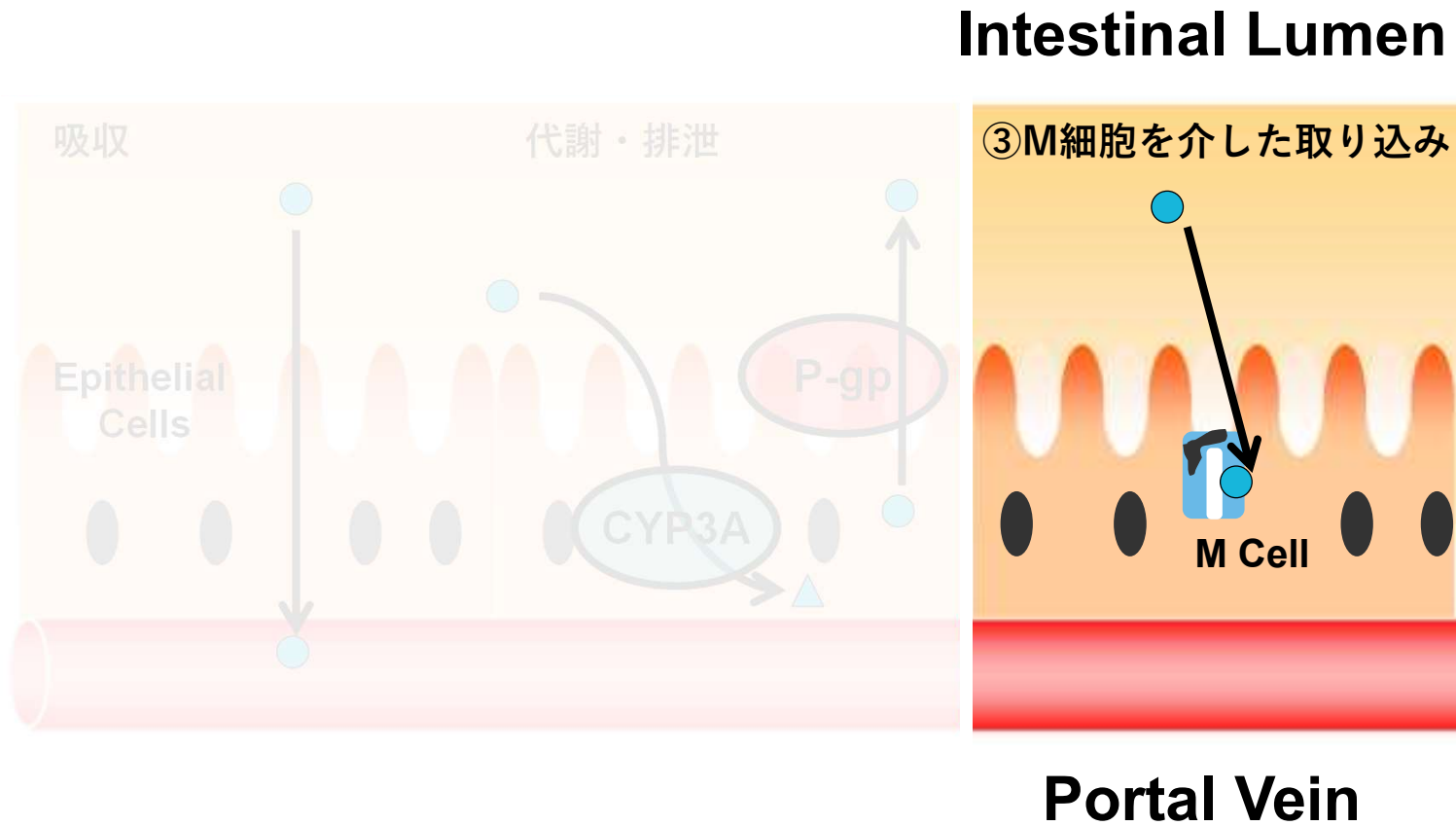
## 改良法



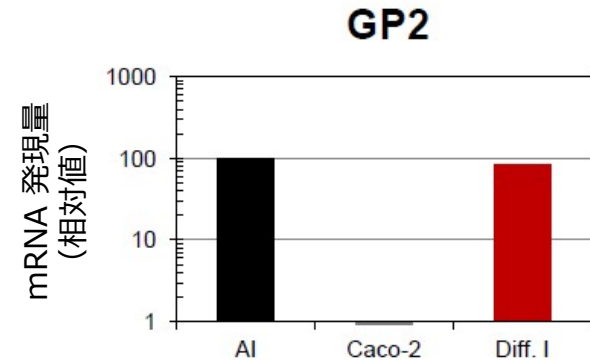
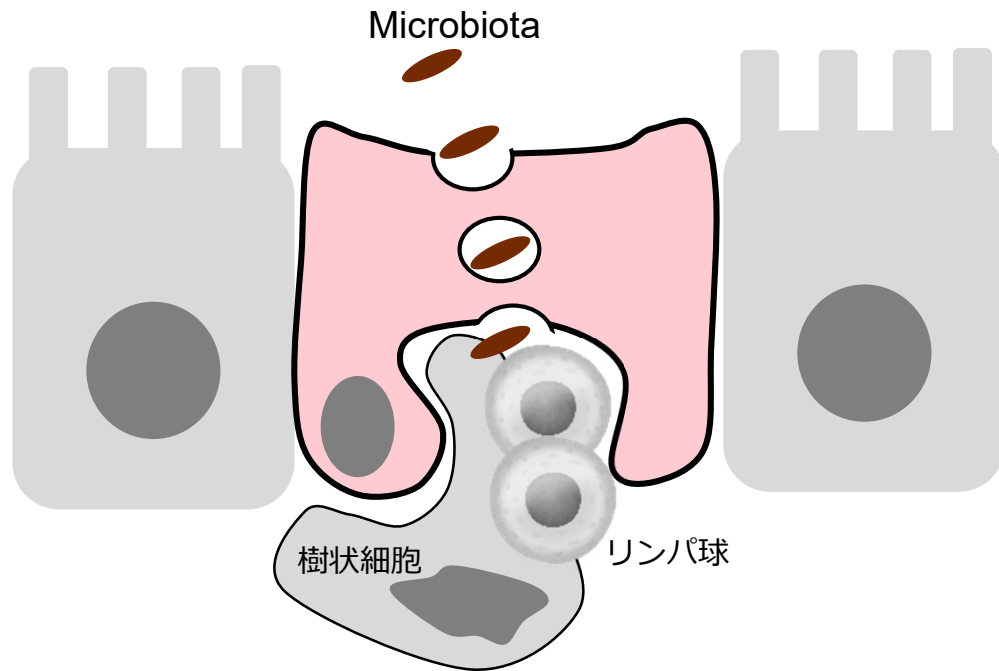
$$F_g = \frac{\text{A to B transport}}{\text{(A to B transport)} + \text{(Metabolite production)}}$$

✓ 改良法によって予測されたFg値は実測値と良好な相関を示した。

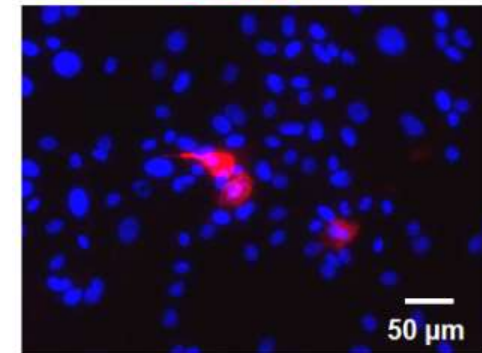
# M細胞を介した取り込み評価について



# F-hiSIEC™にはM細胞が存在する



M cell marker GP2 / DAPI

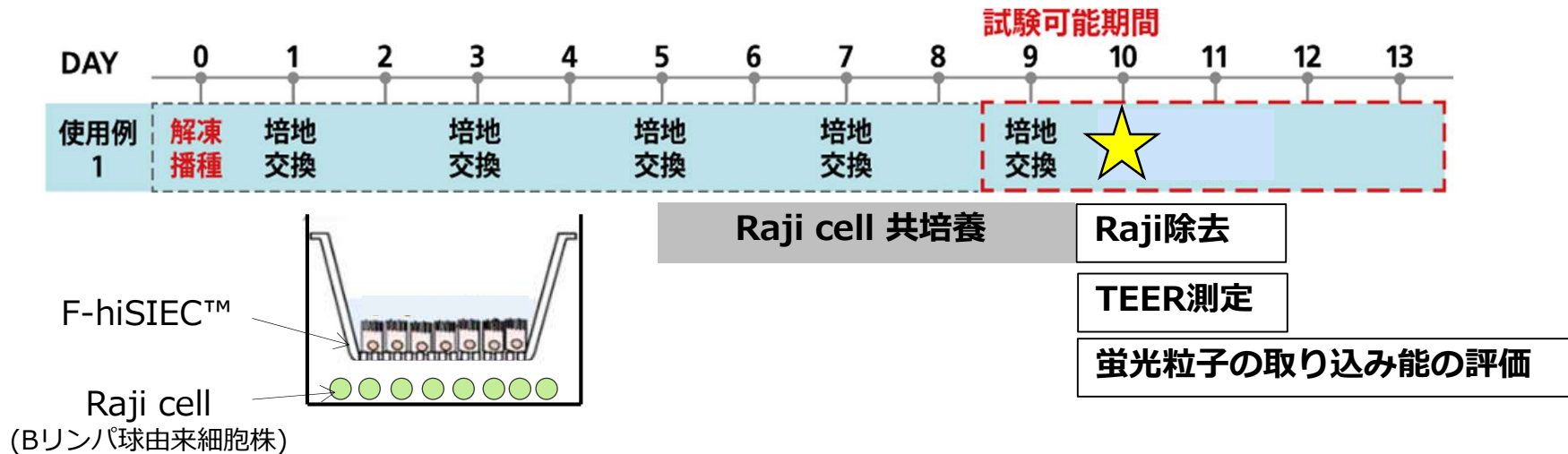


- M細胞は腸管幹細胞より分化した上皮細胞の一種
- 細菌・ウイルス・微粒子などの抗原の取り込み(トランスサイトーシス)機能を有する

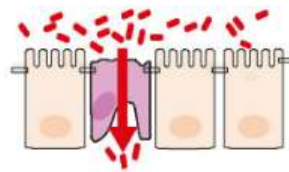
F-hiSIEC™における抗原取込み能を評価した



# 実験方法：M細胞による蛍光粒子取り込み評価

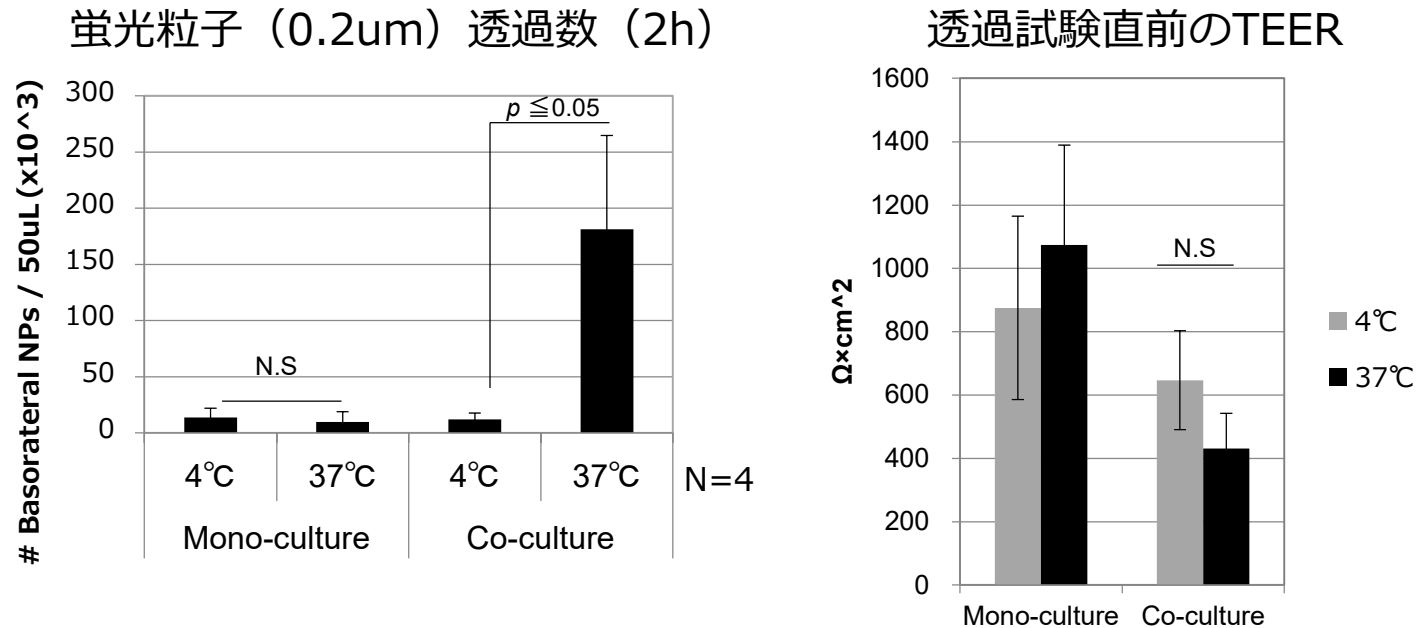


蛍光粒子(FluoSphere 0.2um) 透過試験



フローサイトメトリーにて透過能を評価

## 【結果】 蛍光粒子透過能とバリア機能



- F-hiSIEC™単培養の場合、エンドサイトーシス阻害条件 (4°C) と 37°Cでの透過能に差がなかった
- F-hiSIECとRajiの共培養の場合、37°Cでのみ蛍光粒子の透過が確認された
- 4°Cと37°C条件下で、F-hiSIEC™のTEER値には差がなかった

✓ Raji細胞との共培養により粒子の透過能を評価することができた  
⇒腸内細菌、マイクロプラスチック、ワクチン抗原等の取り込み評価に活用  
できる可能性がある

## 小括：F-hiSIEC™を用いた消化管吸収・代謝評価について

---

- ✓ F-hiSIEC™はヒトに類似したトランスポータ、代謝酵素を発現しており、Caco2細胞よりも高い精度で消化管からの薬物吸収予測が可能である。
- ✓ F-hiSIEC™改良法（新規培地×新規培養法）により、CYP3A4基質のヒトFg予測精度を改善できた。
- ✓ F-hiSIEC™にはM細胞が存在し、M細胞を介した抗原等の取り込み評価に活用できる可能性がある。

F-hiSIEC™は、*in vitro*における医薬品・食品成分等の消化管吸収・代謝評価モデルとして、有用であると考えられる

# 本日の内容

---

## ◆ F-hiSIEC™とは

概要・使用方法、細胞の特性

## ◆ F-hiSIEC™を用いた消化管吸収・代謝評価について

本細胞の特徴、Caco2細胞との比較を含めて

## ◆ F-hiSIEC™におけるその他アプリケーションについて

毒性評価、免疫・炎症評価

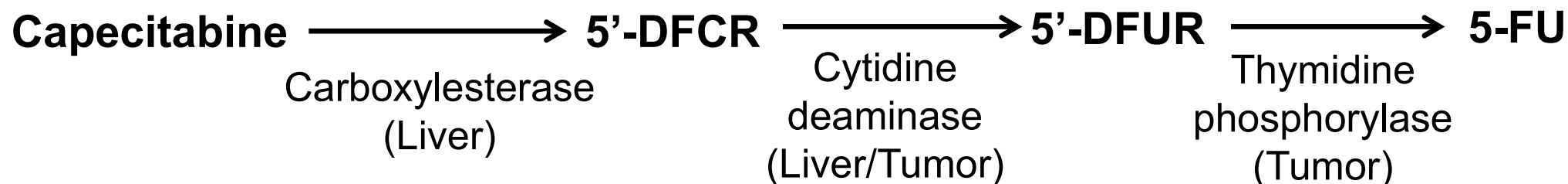


# 毒性評価モデル

抗がん剤の評価、分化異常の評価

## 消化管毒性モデル①：抗ガン剤の評価（5-FU及びそのプロドラッグ）

cytotoxic

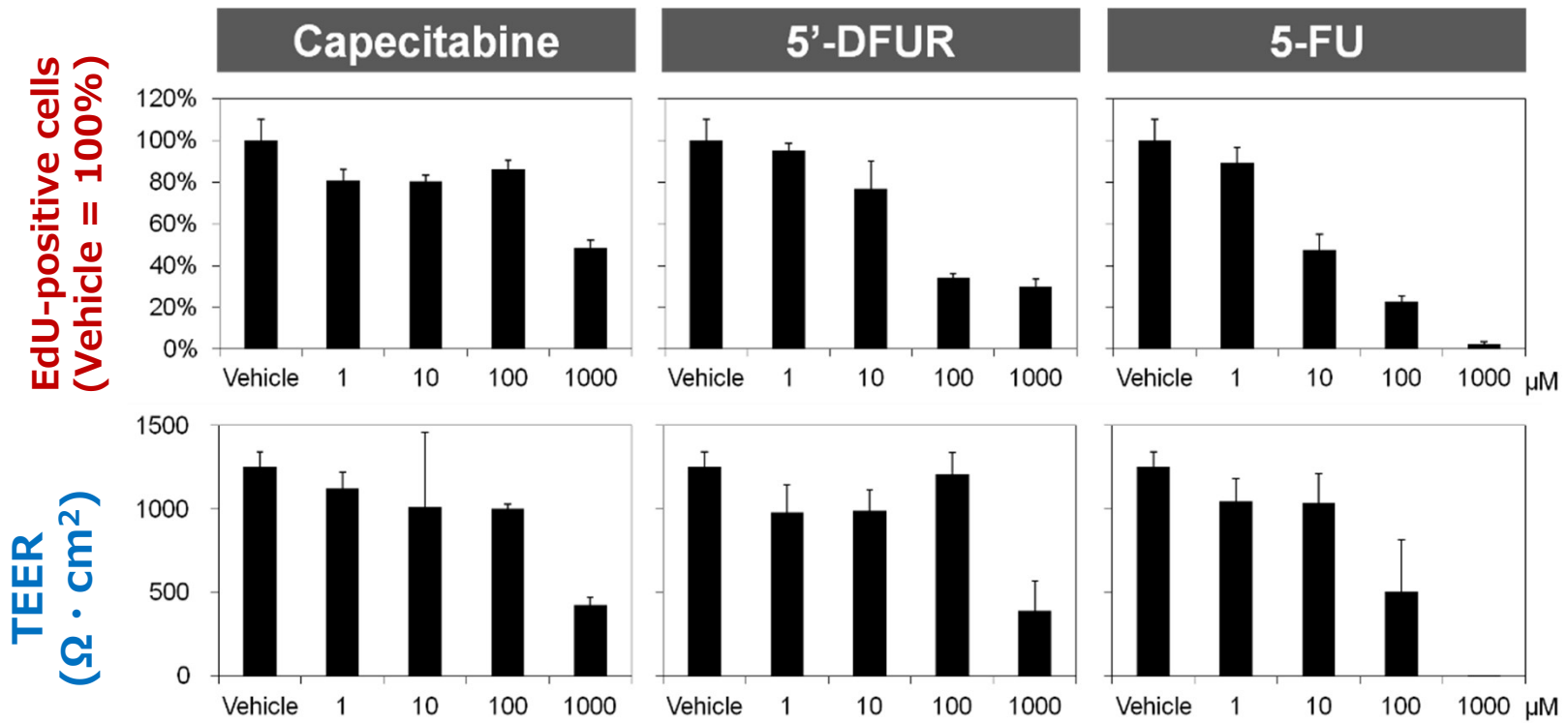
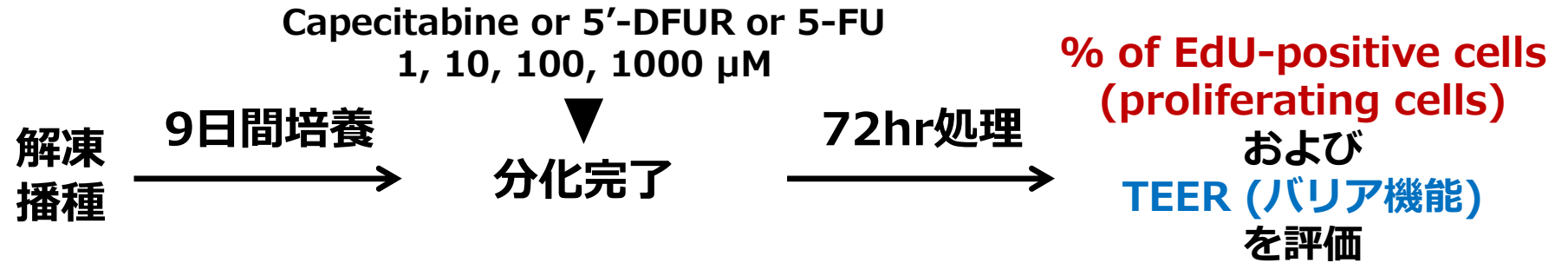


### (1) 作用部位・作用機序<sup>44, 45)</sup>

本薬は消化管より未変化体のまま吸収され、肝臓でカルボキシルエステラーゼにより 5'-deoxy-5-fluorocytidine (5'-DFCR) に代謝される。次に主として肝臓や腫瘍組織に存在するシチジンデアミナーゼにより 5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR) に変換される。さらに、腫瘍組織に高レベルで存在するチミジンホスホリラーゼ (TP) により活性体である 5-FU に変換され抗腫瘍効果を発揮する。

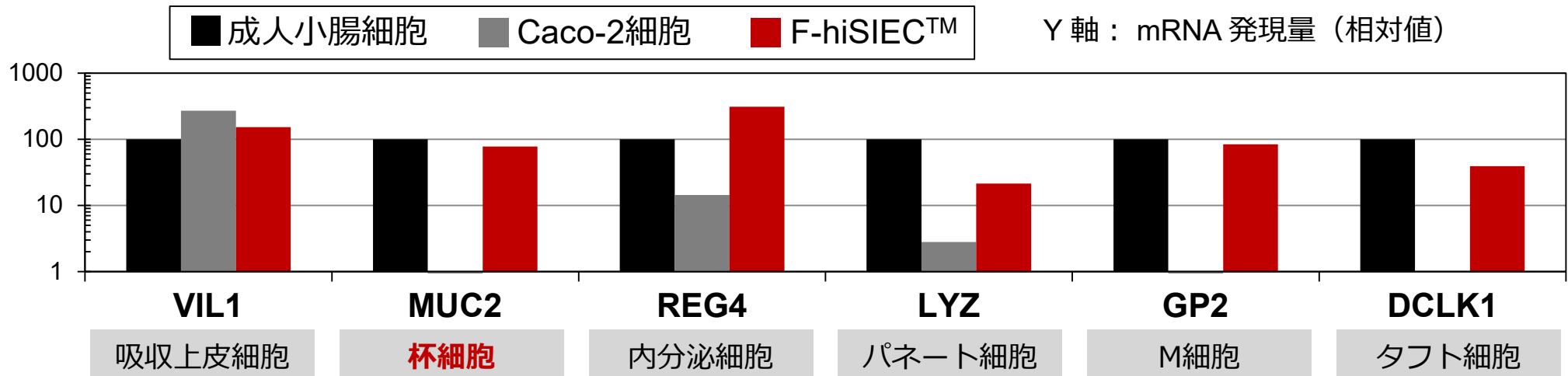
ゼロータ錠 医薬品インタビューフォームより抜粋

# 消化管毒性モデル①：抗ガン剤の評価（5-FU及びそのプロドラッグ）

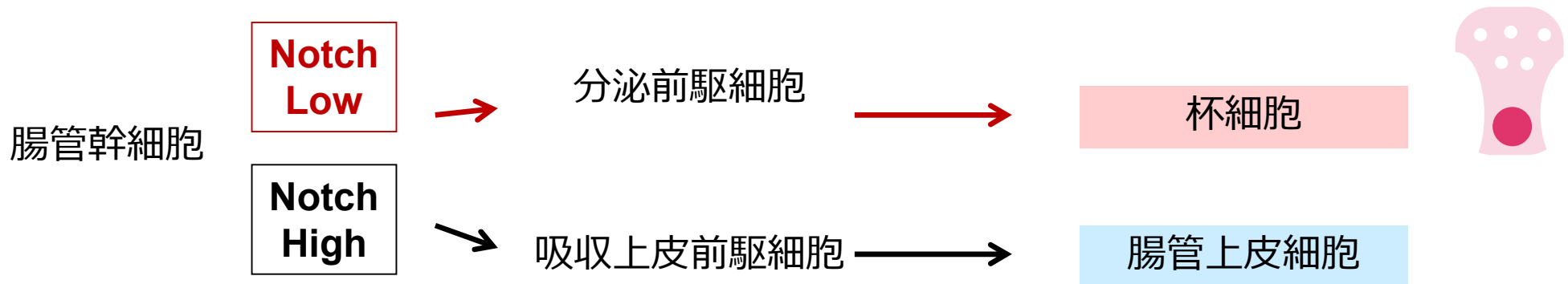


✓ 抗がん剤による増殖細胞の割合の減少とバリア機能の破綻が観察された生体小腸での障害と同様の序列で消化管毒性を評価できた

## 消化管毒性モデル②：Notchシグナル阻害による杯細胞分化促進



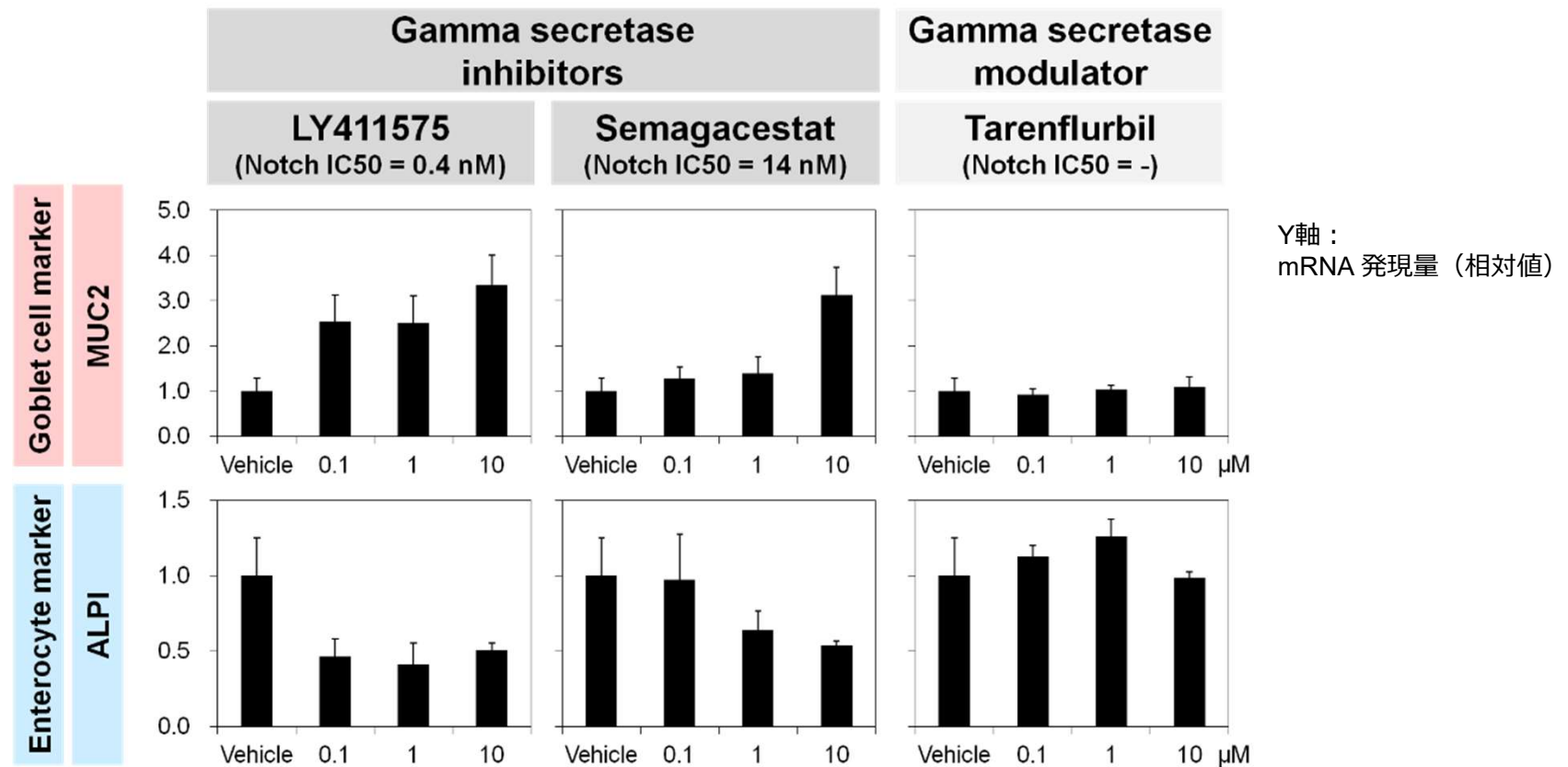
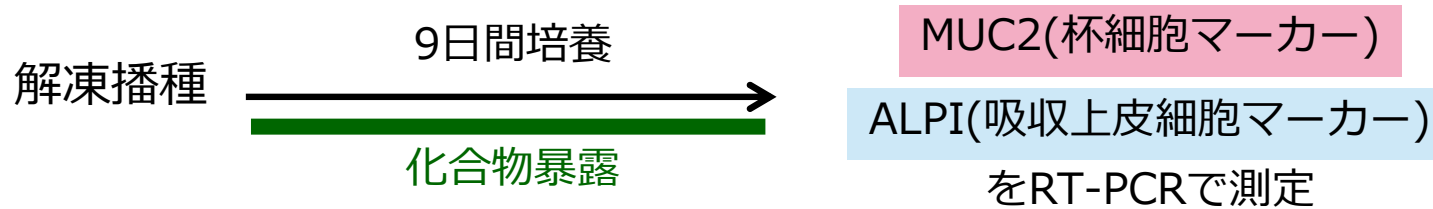
### Notchシグナルは腸管上皮の分化を調節している




✓ Notch阻害剤によって杯細胞への分化進み、下痢などの消化管毒性を起こすことが知られている。



## 消化管毒性モデル②：Notchシグナル阻害による杯細胞分化促進



✓ Notch阻害剤により、杯細胞マーカーの増加，吸収上皮細胞マーカーの低下が認められた。  
 γセクレターゼモジュレーター (Notch阻害活性なし) では、マーカーに変化はなかった。

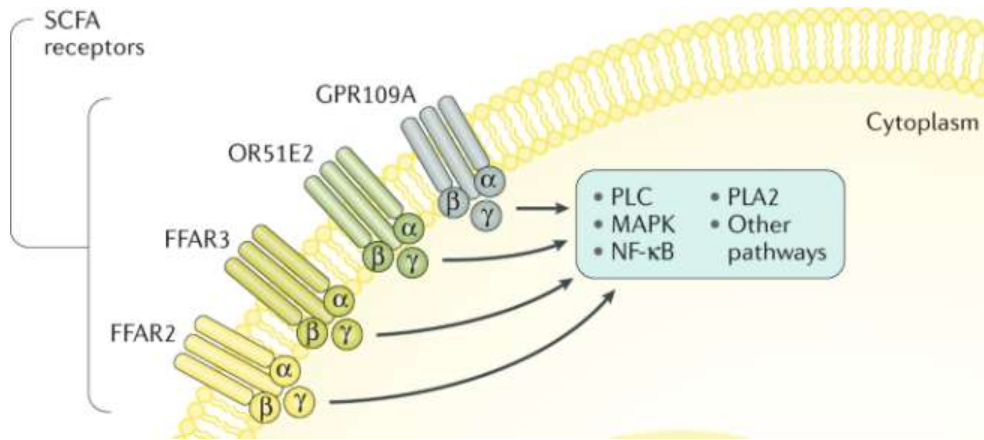


## 免疫・炎症モデル

腸管炎症モデル、短鎖脂肪酸による炎症抑制評価

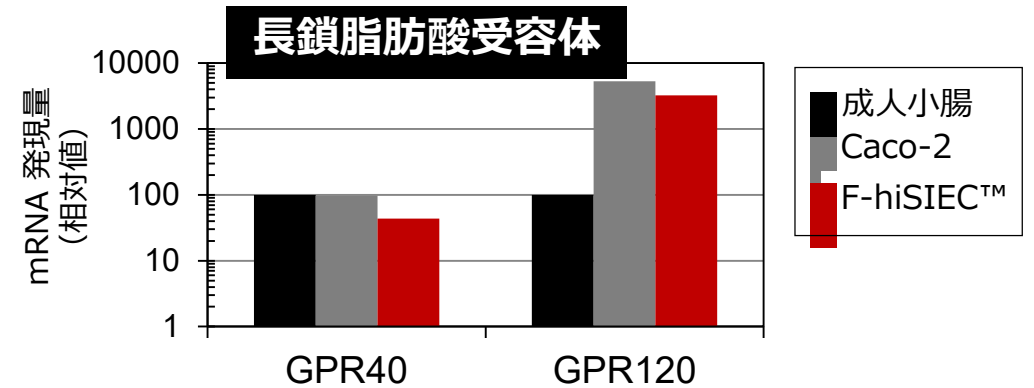
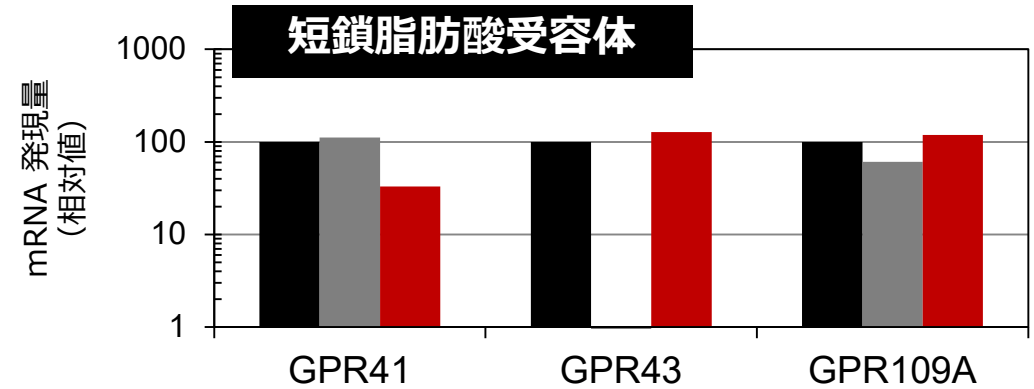
# F-hiSIECにおける短鎖脂肪酸の受容体の発現

## 短鎖脂肪酸の受容体



Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology (2019)

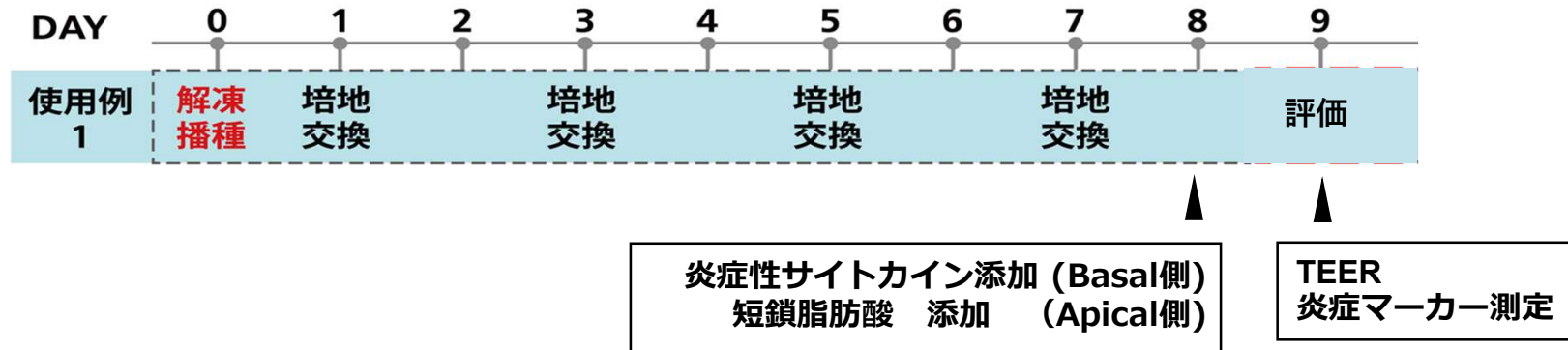
| Receptor | SCFA substrate |             |
|----------|----------------|-------------|
| FFAR2    | GPR43          | Ac, Pro     |
| FFAR3    | GPR41          | Ac, Pro, Bu |
| HCAR2    | GPR109A        | Bu          |



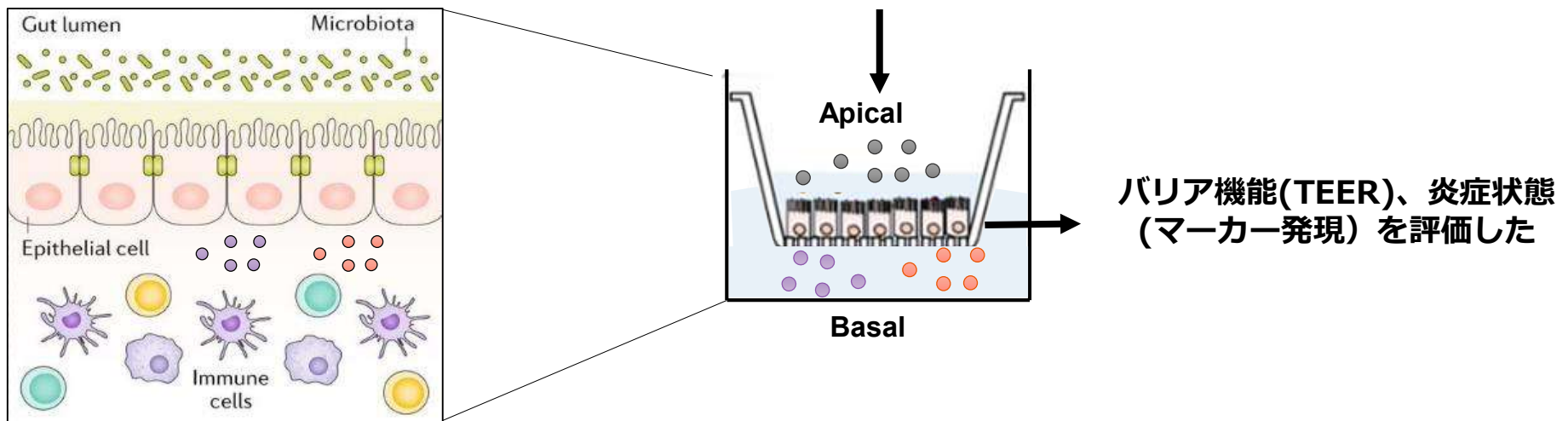
✓ 腸管上皮の主要な脂肪酸受容体は、生体小腸と同程度の発現量を示した

# 実験方法：腸管炎症モデルでの短鎖脂肪酸の影響評価

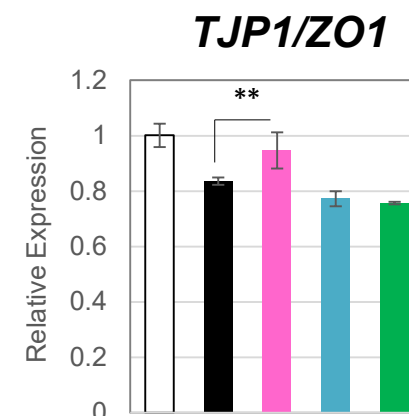
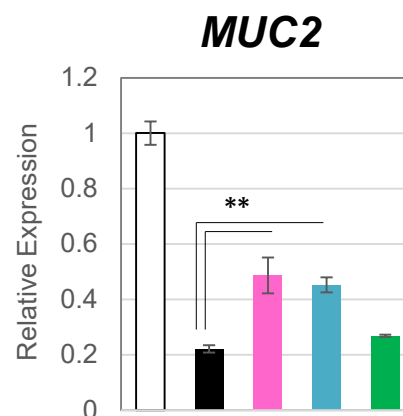
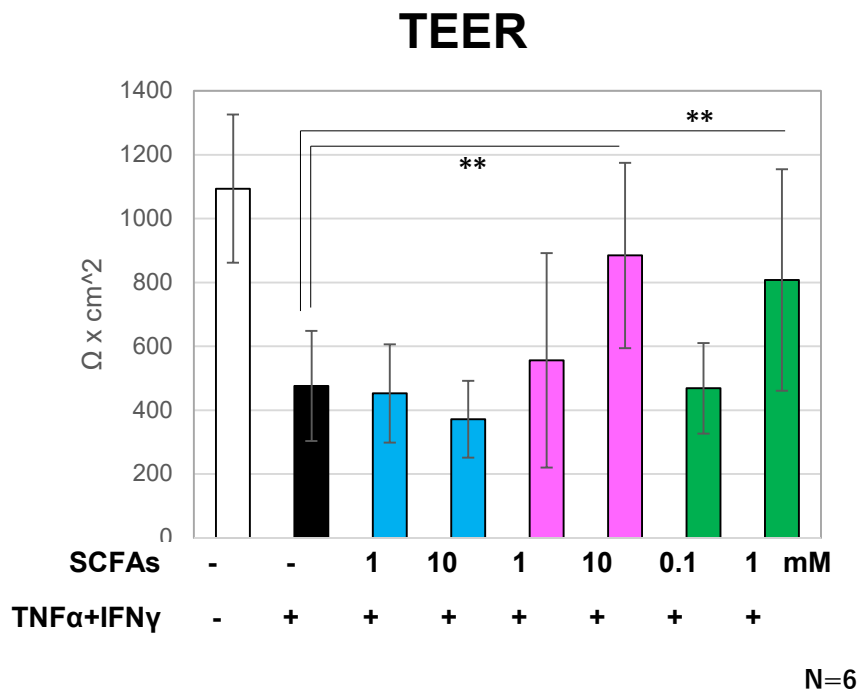
炎症性サイトカイン(IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ )添加により、バリアが損傷し炎症状態が誘導される（炎症モデル）。同時に短鎖脂肪酸を添加し、バリアと炎症状態への影響を評価した。



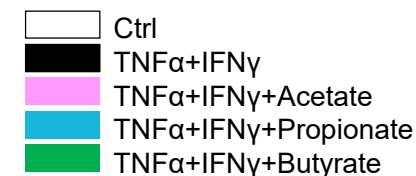
## 腸内細菌から産生される短鎖脂肪酸



# 【結果】 バリア機能の変化

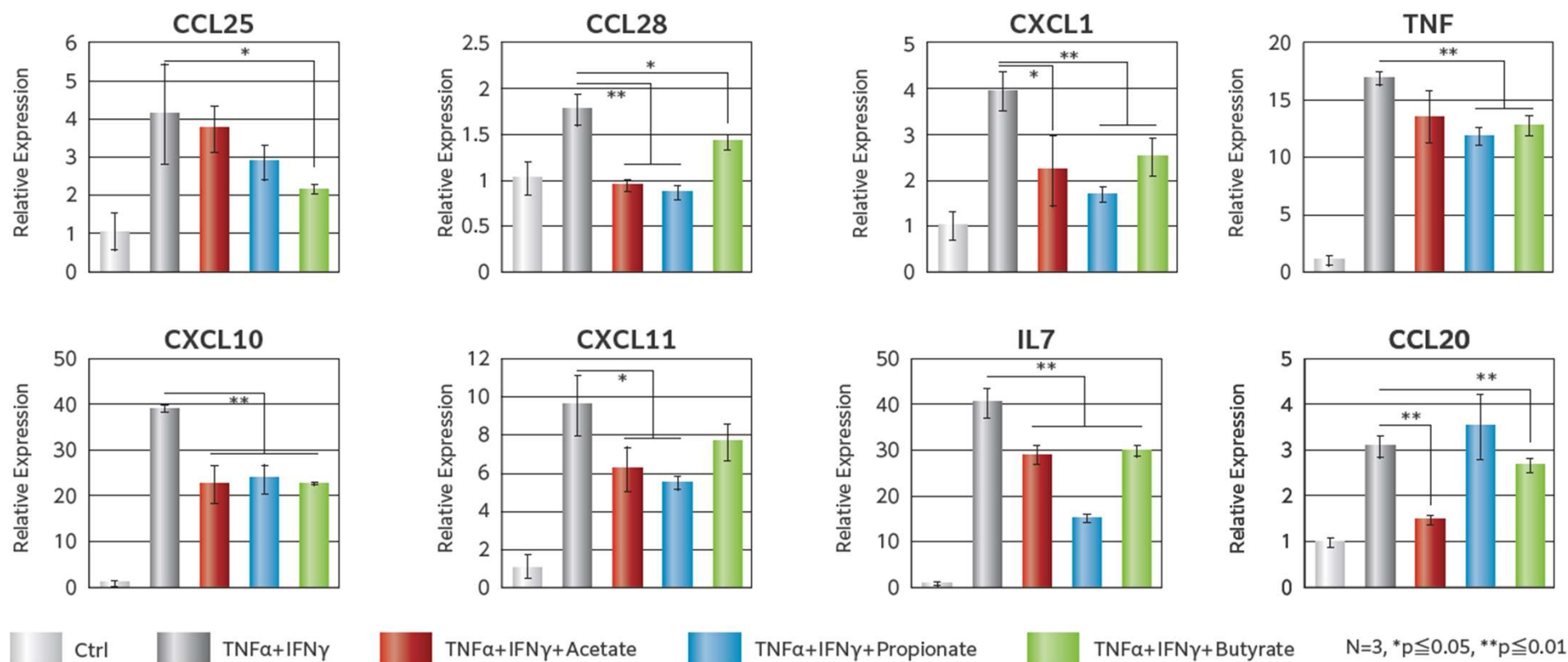


N=3 \*\*p ≤ 0.05



- TNFα+IFNγ添加によりTEERの低下、MUC2、TJP1の発現が低下した
- TEERの低下は、同時にプロピオン酸や酪酸を添加すると抑制した
- MUC2とTJP1/ZO1の発現低下は、酢酸添加により部分的に抑制した

## 【結果】 炎症性サイトカインの遺伝子発現変化



✓ TNFα+IFNγ添加による炎症性サイトカイン遺伝子の発現上昇は、同時に短鎖脂肪酸を添加することにより抑制された。

## 本日の内容まとめ

---

- ◆ F-hiSIEC™は、ヒト生体小腸に類似した特性を保持している。
- ◆ F-hiSIEC™は、各種トランスポーターや代謝酵素の発現がみられ、Caco2細胞よりも精度高くヒト消化管吸収を予測でき、in vitro評価系として有用である。
- ◆ F-hiSIEC™改良法により、CYP3A4等の代謝活性が向上し、ヒトFg値をより精度高く予測できるようになった。
- ◆ F-hiSIEC™では、吸収・代謝評価に加えて、毒性評価、免疫・炎症評価、腸内細菌共培養、ノロウイルス培養等、様々なアプリケーションでの活用が可能である。

F-hiSIEC™を皆様のご研究に活用いただけますと幸いです。

**FUJIFILM**  
Value from Innovation