

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞における 輸送担体及び代謝機能のCaco-2細胞との比較

○山川 達也, 中山 桂子, 望月 修征, 加藤 寛, 水永 真吾
(富士フイルム富山化学株式会社)

要旨

方法

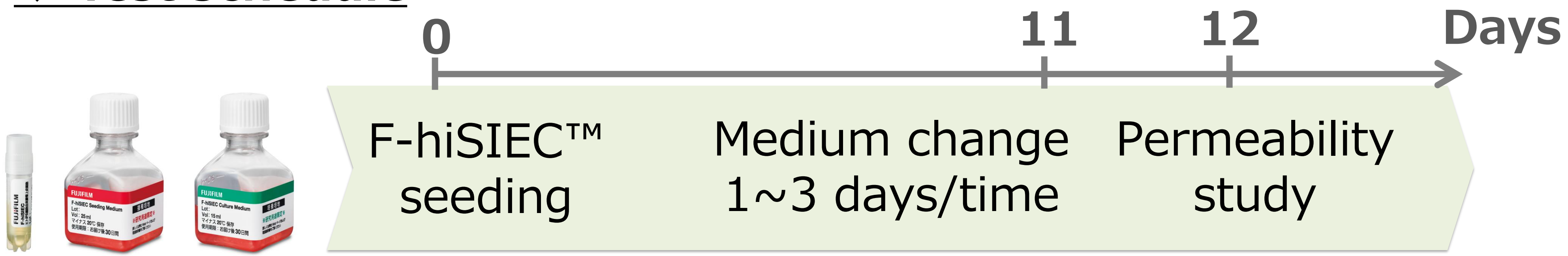
【背景・目的】

小腸は経口摂取された食品や薬剤の吸収や代謝を担う消化器官である。近年、ヒト小腸における吸収性評価のin vitroモデルとして、ヒトiPS細胞から分化誘導した腸管上皮細胞(F-hiSIEC)の利用が報告されており、同評価に汎用されているCaco-2細胞と比較して輸送担体及び代謝酵素の発現がヒト生体に近いことが示されている。一方で、その機能については不明な部分が多い。本研究では、スループット性を向上し、輸送担体や代謝酵素の機能についてCaco-2細胞と比較した。

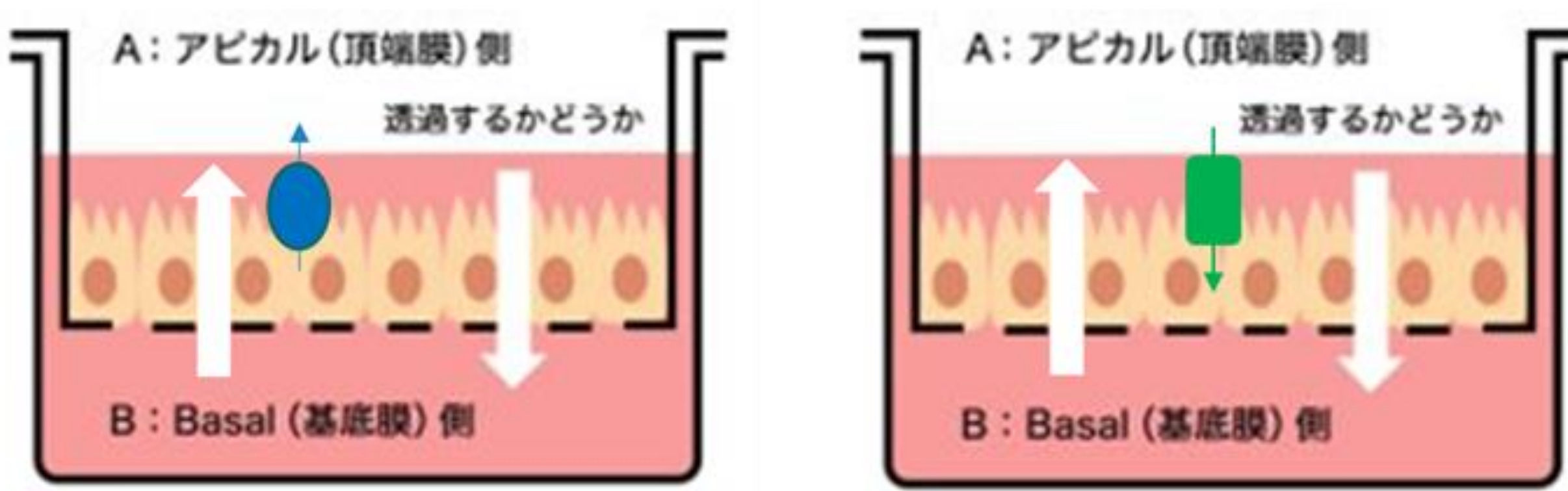
【方法】

96 well型transwell上に培養したF-hiSIEC及びCaco-2細胞を用い、モデル化合物の Apical to Basal (AtoB) 及びBasal to Apical (B to A)方向の細胞膜透過性を評価し、同時に代謝物生成を確認した。

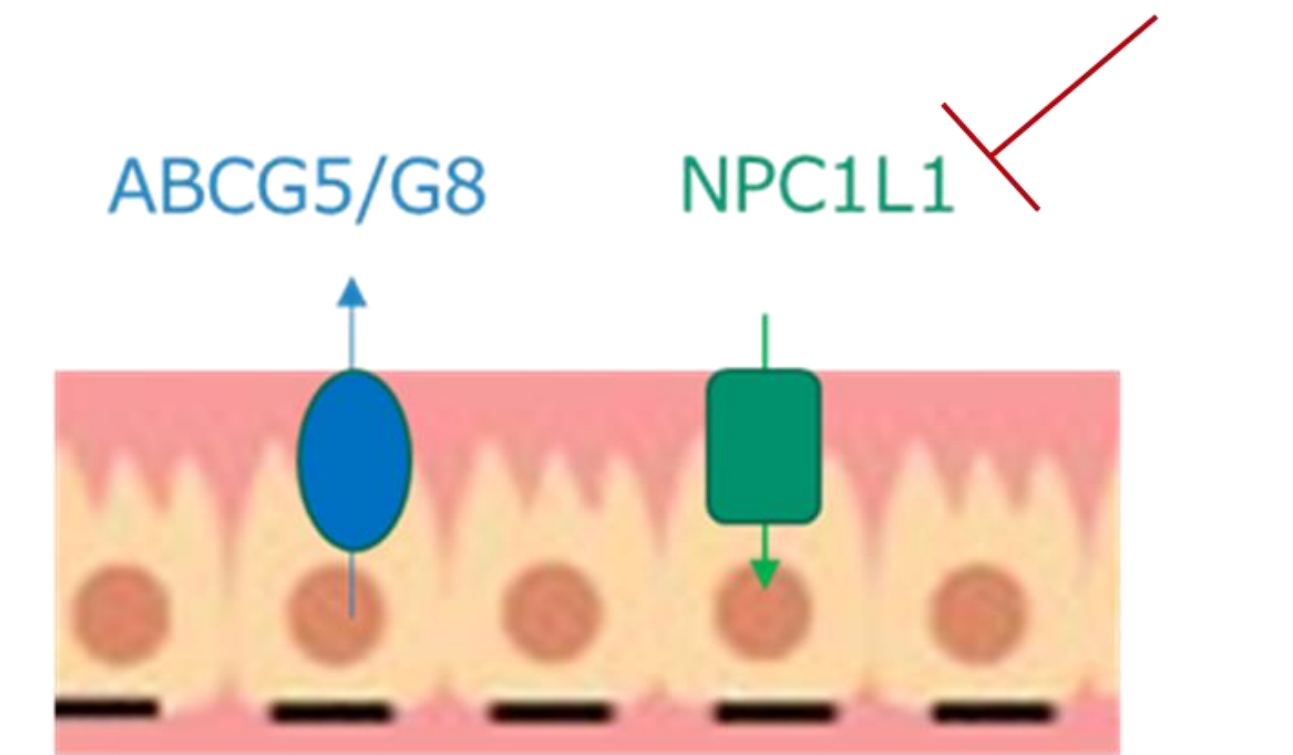
◆ Test schedule



◆ Permeability/Transporter study

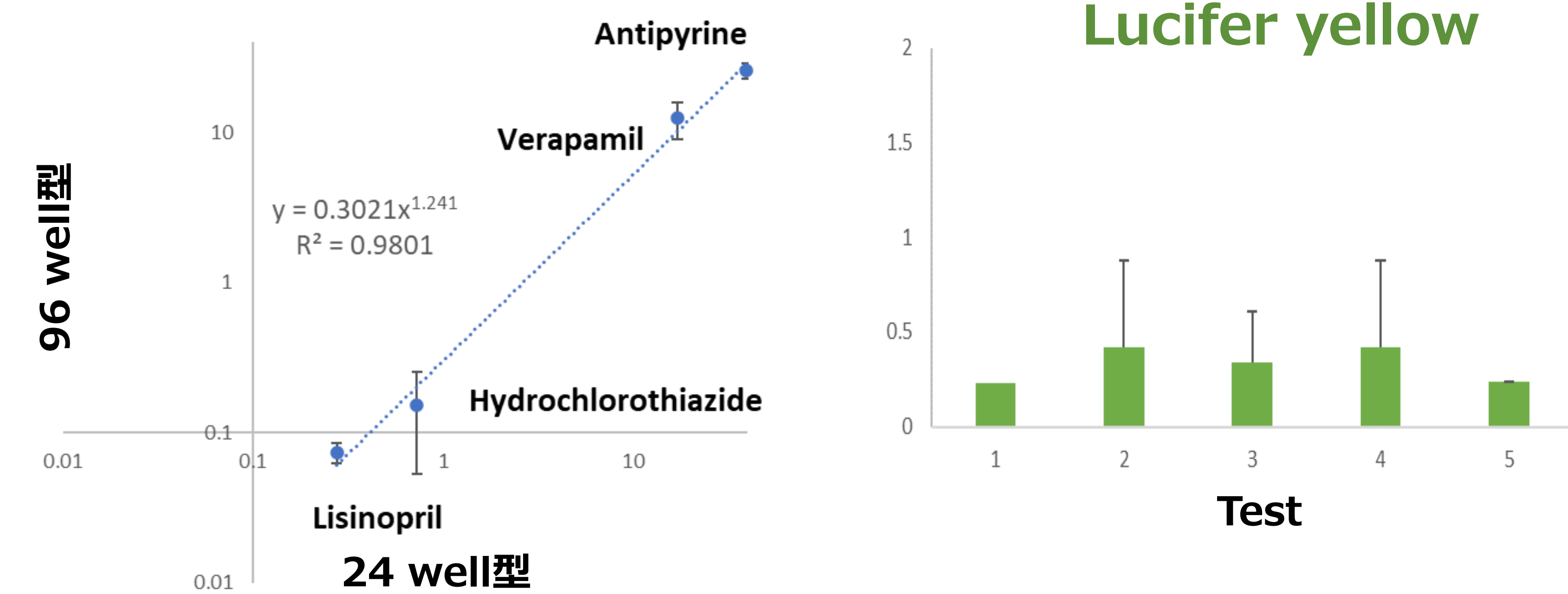


◆ Cholesterol transport



96 well型transwellを用いた評価

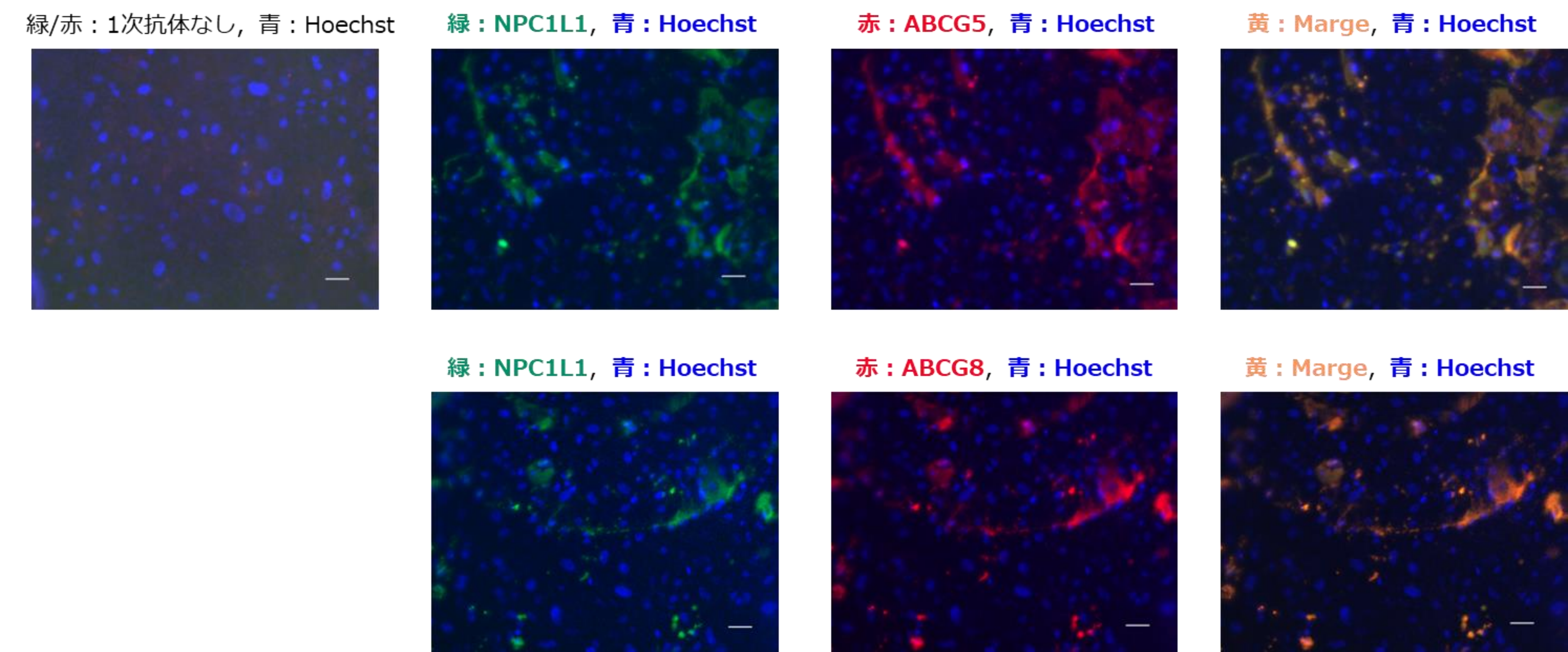
◆ A to B (みかけの透過係数(Papp)) : x10⁻⁶ cm/sec



Left : F-hiSIEC™ was cultured on the cell culture insert with 24 or 96 well plate for 12 days. Permeability study (apical to basal) was conducted with 10 or 50 μM each compound. Right : Barrier function of F-hiSIEC after permeability study (96 well plate) was checked using lucifer yellow. Each bar and error bar represent the mean and SD.

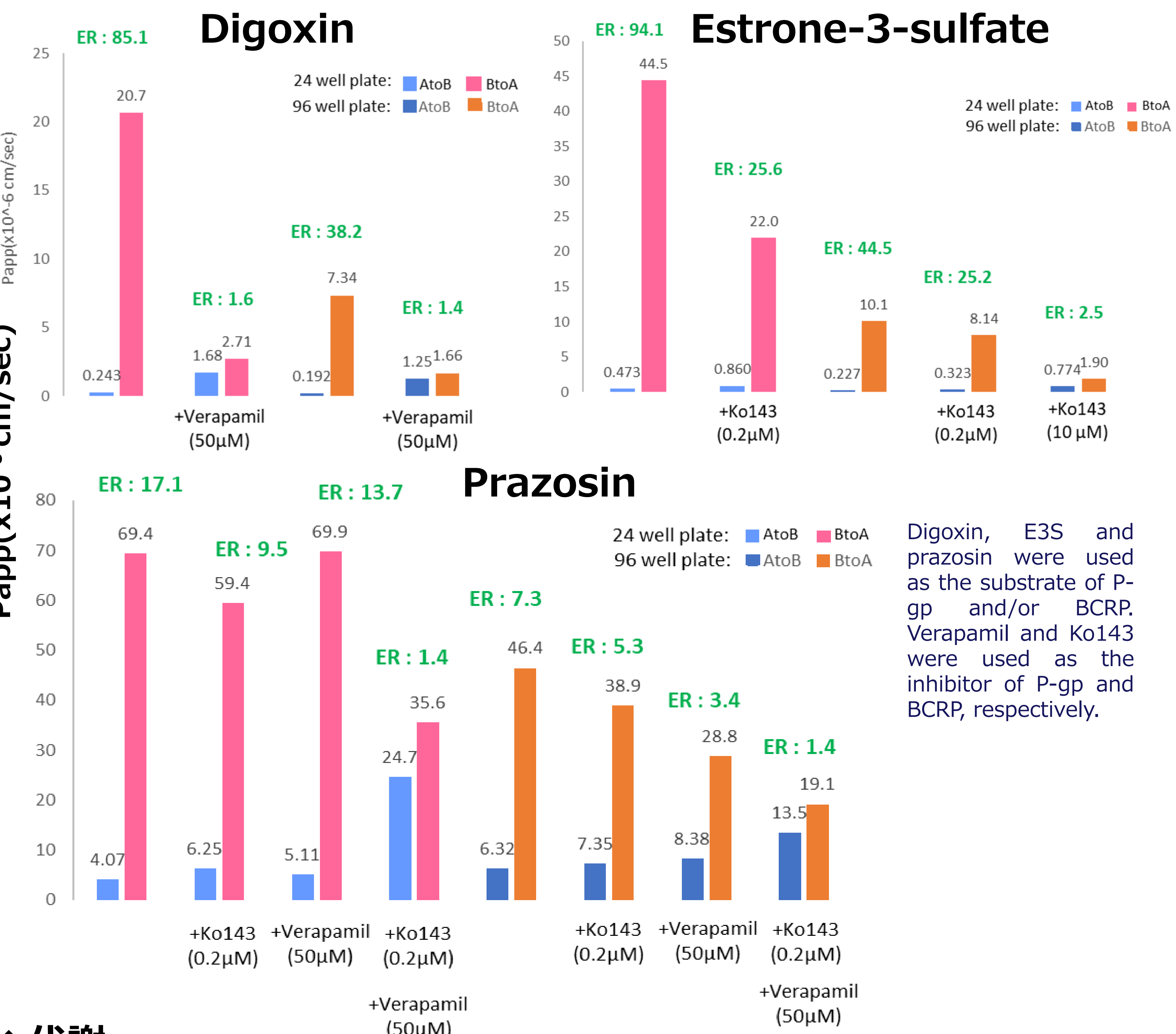
コレステロールトランスポーター

◆免疫染色



F-hiSIEC™ were cultured on the cell culture insert. Fixed, 4% paraformaldehyde; Permeabilised, 0.1% Tween/PBS; blocking, 1%BSA/PBS, primary antibody, mouse anti NPC1L1, rabbit anti ABCG5, or G8; secondary antibody, anti mouse IgG-Alexa647, anti rabbit IgG-Alexa 594, nuclear staining, Hoechst33342. Scale bar: 50 μm.

◆ Transporter (P-gp/BCRP)



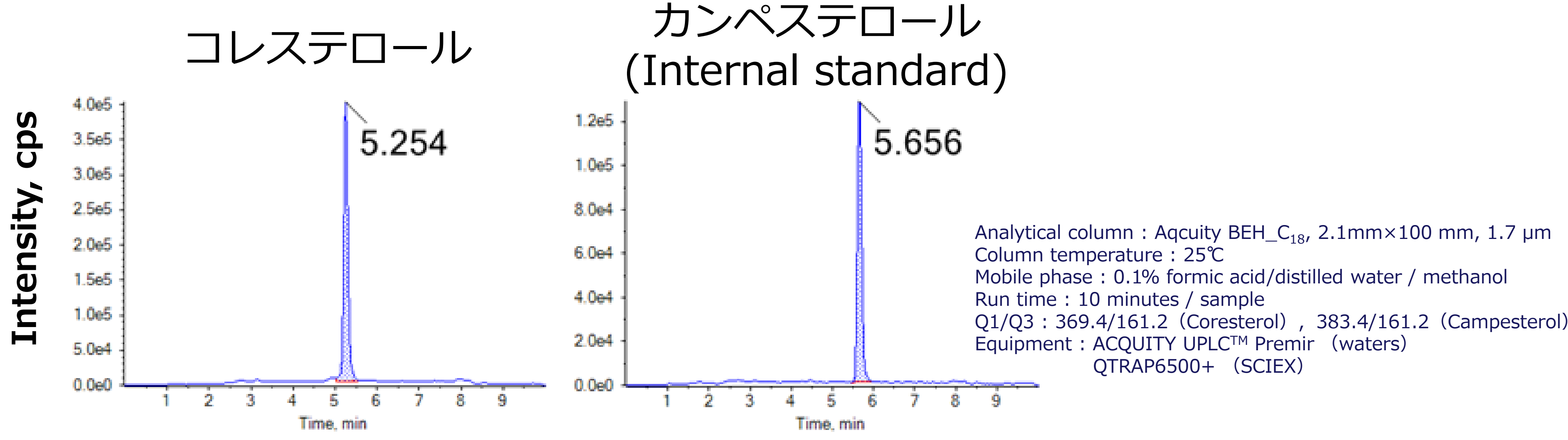
◆代謝

ID	Amount of metabolite (pmol or peak area ratio×μL)					
	1'-hydroxymidazolam		Norverapamil		Raloxifene-glucuronide	
	F-hiSIEC	Caco-2	F-hiSIEC	Caco-2	F-hiSIEC	Caco-2
0 min_Apical	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
120 min_Apical	0.0256	0.00	0.00	0.00	0.676	0.0942
120 min_Basal	0.540	0.00	0.116	0.00	18.8	1.26

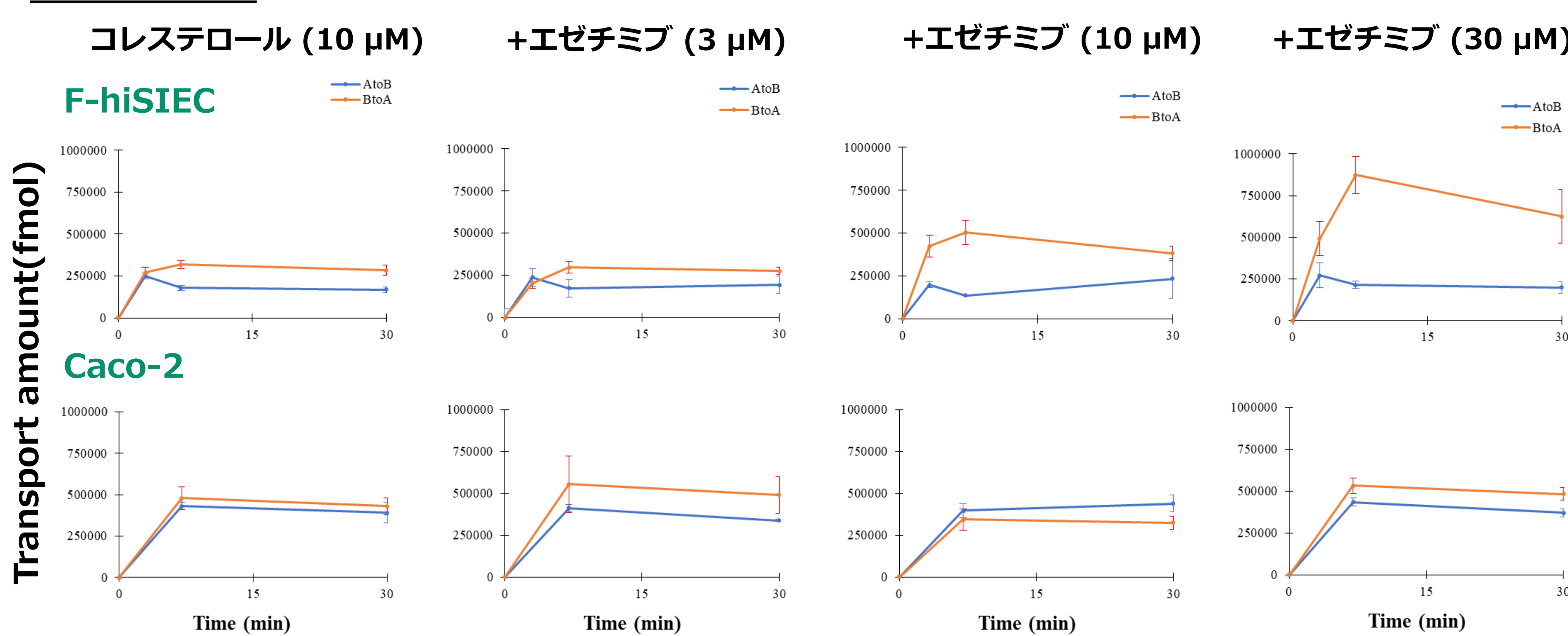
Metabolic activity of F-hiSIEC and Caco-2 were evaluated in permeability study using midazolam, verapamil and raloxifene as substrate of CYP or UGT. Each metabolite (1'-hydroxymidazolam, norverapamil and raloxifene-glucuronide) were quantitated or detected by LC/MS/MS.

- 1) 96 well型と24 well型transwell間で同様の結果を取得
- 2) A to B方向の吸収性, P-gp及びBCRPに対する基質性及び阻害能を評価可能
- 3) Caco-2と比較して細胞膜透過試験における代謝活性が高い

◆ LCMS測定



◆輸送機能



Cholesterol transport activity of F-hiSIEC™ and Caco-2 were evaluated using esetimib as an inhibitor of NPC1L1, which is uptake transporter of cholesterol. Each time point and error bar represent the mean and SD (n=3).

- 1) F-hiSIECにおいて, ABCG5/G8のタンパク質発現を確認
- 2) F-hiSIECでは, エゼチミブ濃度依存的にコレステロール排出が亢進

結語 :

F-hiSIECは, Caco-2細胞にない輸送担体及び代謝機能を有し, 医薬品のみならず, コレステロール等の食品成分の消化管吸収評価の代替モデルとして活用が期待される。

