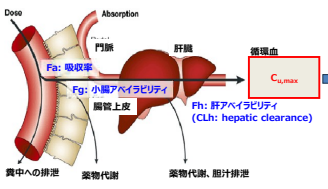
高度化における研究背景・目的

薬物動態に関連する主要な組織のヒトin vitroモデル細胞の状況

肝臓（肝細胞）	小腸（吸収上皮細胞）	腎臓（近位尿細管）	脳毛細血管内皮細胞（血液脳関門）
評価内容：薬物代謝・輸送	評価内容：薬物代謝・輸送	評価内容：薬物輸送	評価内容：薬物輸送
凍結肝細胞（遺伝子導入） ミクロソーム	Caco-2細胞 ミクロソーム F-hISEC（iPS由来細胞）	RPTEC（薬物輸送開始は限定的?） Emulate社製デバイスでの共培養システムでは薬物の分泌能を示す	不死化細胞（バリア機能は比較的低い） iPS由来内皮細胞（一部の物質を再現するに至っていない） ラット・ウサギ初代培養細胞（ファーマコセル社）

経口薬のバイオアベイラビリティの決定要因

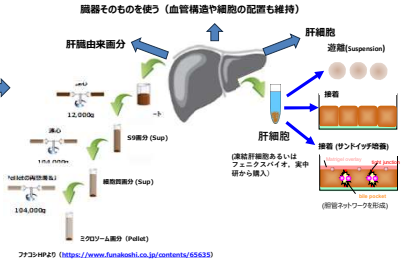


バイオアベイラビリティ＝Fa×Fg×Fh

Hetal, T., Bindesh, P., & Sneha, T. (2010). A REVIEW ON TECHNIQUES FOR ORAL BIOAVAILABILITY ENHANCEMENT OF DRUGS.

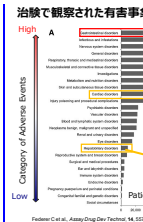
ADME試験の目的にあわせた肝臓画分および肝細胞の培養フォーマット

臓器そのものを使う（血管構造や細胞の配置も維持）



ファコスHP2.0（https://www.funakoshi.co.jp/contents/65633）

治験で観察された有害事象の頻度



Federec Cel al., Nature Drug Dev Technol. 14, 557-566 (2016)

医薬品開発での評価の現状
消化管毒性：治験有害事象の1位
用量制限毒性となる
In vitro検証実験報告が少なく、世界的にもあまり研究は進んでいない

心毒性：致命的
iPS心筋 → 動物に代わるDDTとして検証が進んでいる

肝毒性：開発中止の原因
Liver chip → FDA(LOI (letter of interest) accept

消化管障害の機序の一例：薬物誘発性ー悪心・嘔吐



Navari RM & Aapro M, *N Engl J Med*, **374**(14), 1356-1367 (2016)

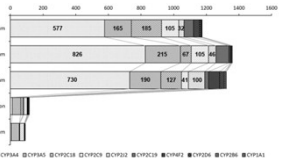
小腸上皮の構成細胞と陰窩由来オルガノイドの利点



- **吸収細胞**：内腔側に微絨毛を有し、内腔から栄養を吸収する。
- **バネット細胞**
  細菌を殺傷するなどを分泌する。
- **杯細胞**：ムチンを主とした粘液を分泌することでバリア機能を担う。
- **腸管内分泌細胞**：セロトニンやペプチドホルモンを分泌する。
  Ex) EC細胞(セロトニン)、L細胞(GLP-1)、K細胞(GIP)
- **M細胞**：リンパ濾胞を覆う腸管上皮細胞に存在し、抗原を腸管の免疫細胞に提示する。
- **タフト細胞**：頭頂部に刷毛のような微細構造を持つ。IL-25を産生し2型免疫応答に関与する。

- 未分化細胞を増殖させつつ、必要に応じてヘテロな分化細胞集団に転換できる。
- 動物種を超えて類似の作製法・培養法を適用することができる
- 未分化細胞は増殖性を有しており、遺伝子導入・ゲノム編集が可能
- 陰窩を単離した部位の遺伝子発現パターンを分化細胞が再現可能

小腸上皮に発現する薬物代謝酵素の発現量比



Murata M, Fujioka H, Yokota J, et al. Mol Pharm. 2023;20(6):2876-2890.

・吸収上皮細胞には様々な代謝酵素が発現しており、経口投与時の初回通過効果を定量的に評価する方法の開発が必要とされる。

薬物代謝による小腸初回通過効果の定量的評価方法

	阻害剤を利用した法	物質収支に基づいた推定法
計算	$Fg = \frac{1}{1 + \frac{CL_{int}}{PS}} = \frac{1}{2\frac{CL_{A\to B}(+inh)}{CL_{A\to B}(-inh)} - 1}$	$Fg = \frac{X_{parent}}{X_{parent} + X_{metabolite}}$ X_{parent}:基底膜側に移行した薬物量 X_{parent}:総代謝物量
Pros	• 親化合物の細胞透過性を測定することで推定可能	• 選択的阻害剤は不要です • 同じwell内でのデータ解析で推定可能
Cons	• 代謝酵素用の選択的阻害剤が必要 • 複数のフェルにまたがるデータ取得が必要(+阻害剤によるCLwell間差が小さいことを前提 • 阻害剤が膜の透過性(阻害剤の特異性)を改化させると、精度に影響を与える可能性がある	• 主要な代謝物を同定し、定量するための標準化合物の合成が必要 • アセイ中に二次代謝がなじると初回通過効果を過小評価する可能性がある

Michiba K, et al. Drug Metab Dispos. 2021 Jan;49(1):84-93.

本方法を適用し、主要な薬物代謝酵素が経口通過効果に与える影響を定量化する

目的：
- ヒトおよび実験動物種由来の小腸陰窩オルガノイドについて、培養形式や培地組成を最適化し、吸収上皮細胞をはじめとする各細胞集団の割合と成熟度を調節できる分化条件を確立する。
- 各分化条件における薬物代謝酵素、トランスポーター、バリア関連分子の発現および機能を解析し、薬物の膜透過、取り込み、排出および代謝を定量的に評価できるアッセイ系を構築する。
- ヒト、イヌ、マウスなどの動物種間で共通の培養条件と評価指標を整備し、小腸におけるADME関連特性の種差とその要因を明らかにする。
- 既知薬物を用いてin vivoの消化管吸収および小腸初回通過代謝との対応関係を検証し、シーズ化合物の小腸ADME特性とその種差を予測するための評価プラットフォームを構築する。

目的：
- 多様な毒性病理画像を学習した表現学習モデルを構築する。
- 構築した基盤となるモデルを用いてWSIの数値化を行う。
- 対象組織を拡充する。
- 異なる施設の画像の解析時に出やすい施設間差など、使用にあたっての交絡要因を検証する。

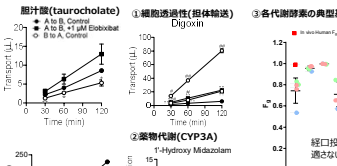
目的：
- 薬物誘発性消化管障害に関連する表現型を探索するため、小腸陰窩由来オルガノイドを用いて、未分化細胞、吸収上皮細胞、分泌系細胞などの割合を最適化した培養系を構築し、細胞増殖・細胞死、上皮構造・バリア機能、細胞分化および栄養吸収機能を定量的に評価する方法を確立する。
- ヒト、イヌおよびマウス由来の小腸オルガノイドを用いて、消化管毒性を示す薬物に対する反応を比較し、動物で認められる消化管毒性に対応するin vitro表現型との種差を明らかにする。
- In vitroで得られた毒性表現型の濃度反応関係と、実験動物における血中・消化管組織曝露および毒性所見との対応関係を解析し、in vitroデータからin vivoにおける消化管毒性の発現および発現用量を予測する方法を構築する。
- 得られた表現型と薬物曝露との関係に基づき、シーズ化合物の消化管毒性リスクの早期検出、作用機序の推定およびヒトへの外挿を支援できるin vitro評価基盤を構築する。

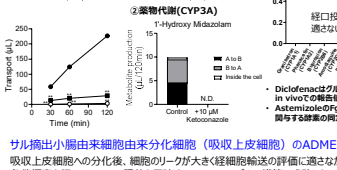
高度化の成果

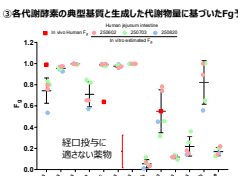
小腸陰窩由来分化細胞を用いたADME特性評価方法の開発

ヒト摘出小腸由来細胞由来分化細胞（吸収上皮細胞）のADME機能および分化条件の検討

①領域特異的機能を再現　②ADME機能（薬物輸送および薬物代謝）の確認



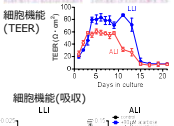


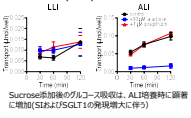


- **Diclofenacはグルクロン抱抱合体の生成も考慮することで、in vivoでの報告値と同程度の推定値を得た**
- **Astemizoleのfgが極めて小さいのは想定外であるため、関与する酵素の同定を進める**

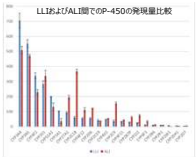
③気液界面培養(ALI)の効果







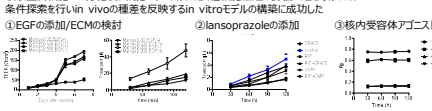
Sucrose添加後のグルコース吸収は、ALI培養時に調査に増加(SIおよびSGLT1の発現増大に伴う)



サル摘出小腸由来細胞由来分化細胞（吸収上皮細胞）のADME機能および分化条件の検討

吸収上皮細胞への分化後、細胞のリークが大きく経細胞輸送の評価に適さなかった。
条件探索を行い vivoの種差を反映するin vitroモデルの構築に成功した

①EGFの添加/ECMの検討　②lansoprazole20添加　③核内受容体アゴニストの添加

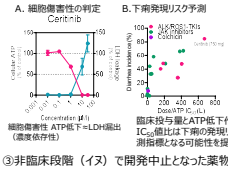


イヌ摘出小腸由来細胞分化細胞はサルとは異なり、ヒト細胞と同じプロトコルで単層膜を形成し、ADME試験を実施可能であることを確認した。

小腸陰窩由来細胞を用いた消化管障害リスク評価方法の開発

①拡大培養条件の細胞傷害性の評価と下痢リスク予測方法の構築

A. 細胞傷害性の判定　B. 下痢発現リスク予測



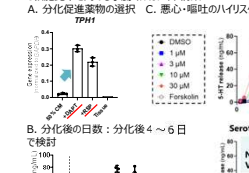
細胞傷害性 ATP低下=LDH漏出（濃度依存性）

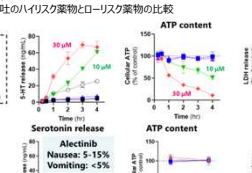
臨床投与量とATP低下作用のIC_{50}値比は下痢の発現リスク予測指標となる可能性を提案

②薬剤誘発性悪心・嘔吐リスク予測方法の構築（薬物誘発性セロトニン放出の評価系）

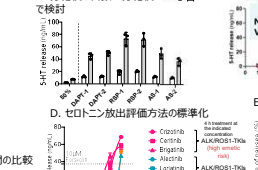
EC細胞比率を高める小腸オルガノイド構築

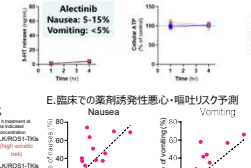
A. 分化促進薬物の選択　C. 悪心・嘔吐のハイリスク薬物とローリスク薬物の比較





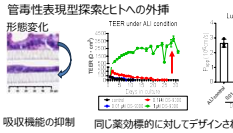
B. 分化後の日数：分化後４～６日で検討



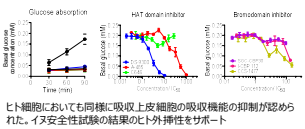


③非臨床段階（イヌ）で開発中止となった薬物の消化管毒性表現型探索とヒトへの外挿

形態変化



吸収機能の抑制　同じ薬効標的に対してデザインされた薬物間の比較

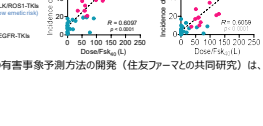


ヒト細胞においても同様に吸収上皮細胞の吸収機能の抑制が認められた。イヌ安全性試験の結果のヒト外挿性をサポート

D. セロトニン放出評価方法の標準化



E. 臨床での薬剤誘発性悪心・嘔吐リスク予測



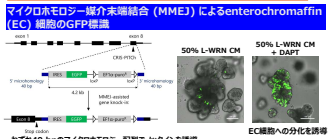
悪心・嘔吐の陽性・陰性の判別に加えて、陽性化合物利用について、薬効用量をすること、簡便に発現リスクを予測する指標を提案した

イヌ細胞を利用した非臨床動物試験の有害事象予測方法の開発（住友ファーマとの共同研究）は、創薬基盤研究推進事業（R7年度）に採択

小腸陰窩由来細胞のゲノム編集方法の開発（レポーター細胞、ノックアウト細胞作製）

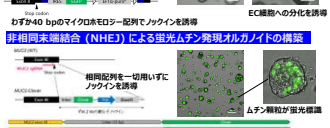
蛍光タンパク質のノックインによるレポーターオルガノイドの作製

マイクロホモロジー媒介末端結合（MMEJ）によるenterochromaffin (EC) 細胞のGFP標識



わずか40 bpのマイクロホモロジー配列でノックインを誘導

非相同末端結合（NHEJ）による蛍光ムチン発現オルガノイドの構築



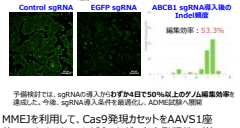
方法	Pros	Cons
MMEJ	短い相同配列で標的挿入が可能NHEJより接合部を制御しやすい	配列欠失を伴いやすい標的配列に依存する 主にS/G2期で働き、非分裂細胞では効率が低い
NHEJ	高効率で相同配列が不要G0/G1期にも働き、非分裂細胞にも適用可能	接合部が不均一挿入方向や配列を制御しにくい

相同組換え修復（homology-directed repair; HDR）を利用したノックインを検討したが、相同アームを含むドナーDNAの構築が煩雑であり、オルガノイドにおけるノックイン効率も低かった。そこで、MMEJまたはNHEJを利用したノックイン法へ移行した。

遺伝子ノックアウトの高効率化に向けたCRISPR-Readyオルガノイドの構築

PiggyBacトランスポゾン法を用いて、spCas9およびEGFPを安定発現するヒト腸管オルガノイドを作製

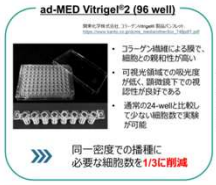




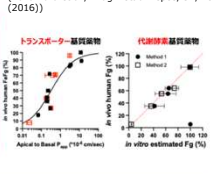
予備検討では、sgRNAの導入から**わずか4日で50%以上のゲノム編集効率**を達成した。今後、sgRNA導入条件を最適化し、ADME試験へ展開

MMEJを利用して、Cas9発現カセットをAAVS1座位にノックインすることを試みたが、安定発現株の樹立には至らなかった。次に、挿入位置を特定のゲノム座位に限定しないレンチウイルスベクターによるCas9導入を行い、薬剤耐性クローンを取得した。しかし、十分なCas9活性が得られなかった

小腸陰窩由来細胞を用いたADME特性のhigh-throughput評価



(Nakamura et al., Drug Metab Dispos, 54, 100306 (2016))

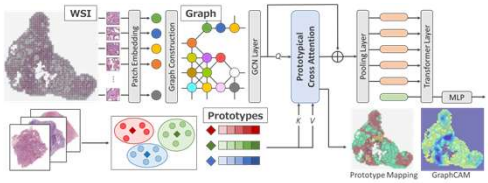


同等の活性を保持したままスケールダウン可能であった

小腸陰窩由来細胞を用いた新規指標に基づく消化管毒性の予測系



WSIとパッチを結びつける病理画像解析モデルの開発



Model	BRACS		CPTAC	
	Bal. acc.	F1	Bal. acc.	F1
ResNet-50				
CLAM-SB [13]	0.583±0.030	0.660±0.033	0.913±0.011	0.913±0.011
CLAM-MB [13]	0.617±0.061	0.694±0.060	0.918±0.013	0.919±0.012
TransMIL [17]	0.612±0.069	0.659±0.069	0.909±0.015	0.911±0.014
PAMIL [12]	0.531±0.040	0.589±0.052	0.880±0.025	0.882±0.024
PANTHER [18]	0.502±0.043	0.555±0.059	0.908±0.012	0.909±0.012
GTP [21]	0.662±0.038	0.757±0.055	0.933±0.011	0.933±0.012
WiKG [10]	0.630±0.029	0.710±0.026	0.927±0.016	0.927±0.016
ProtoGTX	**0.673±0.074**	**0.761±0.062**	**0.942±0.008**	**0.942±0.008**
UNI				
CLAM-SB [13]	0.726±0.034	0.788±0.025	0.981±0.007	0.981±0.008
CLAM-MB [13]	0.716±0.065	0.777±0.051	0.984±0.006	0.985±0.006
TransMIL [17]	0.649±0.039	0.729±0.036	0.983±0.006	0.984±0.006
PAMIL [12]	0.682±0.076	0.746±0.050	0.977±0.010	0.977±0.010
PANTHER [18]	0.594±0.040	0.676±0.046	0.977±0.006	0.977±0.006
GTP [21]	0.744±0.040	0.816±0.021	0.977±0.011	0.977±0.011
WiKG [10]	0.715±0.057	0.787±0.040	0.977±0.016	0.977±0.015
ProtoGTX	**0.816±0.062**	**0.846±0.023**	**0.985±0.009**	**0.985±0.009**

代表パッチを少ないノイズでマッピング可能になるとともに、既存手法よりも高い精度でのWSIに付帯したラベルを予測可能に。論文投稿準備中。

今後の発展

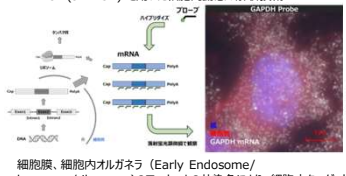
①創薬・非臨床開発における意思決定を支援するin vitroモデルの開発
- FDAは、New Approach Methodologies（NAMs）について、動物試験への依存を低減するとともに、非臨床試験のヒト予測性を向上させ、臨床試験の安全性向上に寄与することを期待している。2026年3月に公表されたドラフトガイダンスでは、NAMsを医薬品開発に利用するために、Context of Useの明確化、ヒト生物学的妥当性、技術的特性および目的適合性の検証が重視されている。
- ヒト生体機能を再現するin vitroモデルの構築に加え、その高機能化と予測性能の検証が不可欠である。ADME評価に加えて、in vitro毒性表現型を動物における組織曝露・毒性所見およびヒト臨床安全性情報と関連づけ、消化管毒性の発現、作用機序、種差およびヒトへの外挿性を予測できるNAMs評価基盤へ発展させる。
  肝細胞：凍結肝細胞に加えて、PXB cellsやHepa-SHなどヒト肝移植キメラマウスなどソースが拡充し、接着性の肝細胞が利用可能になっている。また、酸素透過プレート、Cegluなど化学合成された足場、培地成分の最適化により長期間の機能維持も可能になっている。
  腎上皮細胞（近位尿細管）：3次元培養から調製することで短時間(12時間)であれば一部の機能評価が可能。機能拡張と長期間の維持が課題
  血液脳関門（脳毛細血管内皮細胞）：ヒトモデルで細胞透過性（中枢移行性を）を評価する段階にはない。iPS由来細胞に期待

②In silico／AIを活用したPBPK・PK/PD解析の高度化
- **データ基盤の整備**
  公開情報とBINDS支援で得られた標準化in vitroデータを蓄積する。
- **ADMEパラメータの推定**
  化学構造から予測可能な項目と、実測が必要な項目を整理する。
- **PBPKモデルへの統合**
  予測値を初期値や範囲として用い、実測データにより補正してヒト曝露を予測する。
- **PK/PD解析への展開**
  標的組織曝露と薬効データを関連づけ、投与条件や有望化合物の選択を支援する。

実現のための課題：
- 公開データの化合物数が限られ、測定条件やデータ品質も統一されていない
- 陰性データや予測が外れた化合物の情報が公開されにくい
- 同じ化合物でも、評価系（細胞や酵素発現系）、基質濃度、評価系のバッチ間差や細胞であれば培養条件によって測定値が異なる
- 構造からの結合・相互作用予測に加え、代謝回転、輸送速度、膜透過性などの速度論的パラメータを予測する必要がある

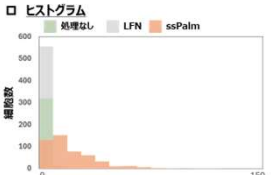
③核酸医薬等の細胞内ターゲットエンゲージメントの定量法開発

RNA Fish (smFISH) を用いた細胞内動態の解析技術



細胞膜、細胞内オルガネラ（Early Endosome/lysosome/ribosome）のマーカーとの共染色により、細胞内ターゲットへの到達度の定量化に挑戦中

DDSの性能比較：細胞あたりのmRNA数の比較



COIの開示:本研究に関して、開示すべきCOI関係にある企業はありません。