

2021年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	ゲノム編集技術を用いた創薬応用可能な腸管モデルの作製
キーワード	①ゲノム編集 ②消化管代謝 ③消化管毒性

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ネゴロ リョウスケ 根来 亮介
配付時の所属先・職位等 (令和3年4月1日現在)	立命館大学 薬学部 助教
現在の所属先・職位等 (令和4年7月1日現在)	立命館大学 薬学部 助教
プロフィール	2015年3月 摂南大学薬学部薬学科(6年制)卒業 2019年3月 大阪大学大学院薬学研究科博士課程医療薬学専攻(4年制博士)修了 薬学博士 2019年4月立命館大学薬学部分子薬物動態学研究室 助教 現在に至る。 分子生物学的な手法を駆使して、創薬研究に役立つ細胞モデルを開発しています。

1. 研究の概要

医薬品候補化合物のヒトでの消化管吸収・代謝・毒性を予測するために、マウスやラットなどを用いた *in vivo* 試験、ヒト結腸癌由来細胞株であるCaco-2細胞を用いた *in vitro* 試験が汎用されているが、いくつかの問題を抱えている。まず、実験動物を用いた評価系では種差の問題がある。Caco-2細胞は、消化管吸収性 (F_a) をある程度予測できるものの、薬物代謝酵素であるCYP3A4及びUGT1A1がほとんど発現していないため薬物代謝特性 (F_g) 及び薬物代謝に起因する毒性を予測することはできない。

本研究では、ヒト成人小腸の薬物代謝能に匹敵するCaco-2細胞を作製するために、ゲノム編集技術を用いて、セーフ・ハーバー部位にCYP3A4及びUGT1A1発現カセットをノックインすることで、薬物吸収・代謝・毒性を予測可能なモデルを構築する。さらに、遺伝子組換え技術を駆使して個人差(遺伝子多型)の影響を加味したモデルの構築にも取り組む。本モデルが開発できれば、従来のモデルよりも、経口投与薬を効率的かつ安全に開発できると期待される。

2. 研究の動機、目的

医薬品の多くは経口投与され、小腸において吸収・代謝され肝臓を経由して全身へと移行する。そのため、ヒト小腸における医薬品の吸収・代謝を精度良く予測できるモデルの構築は有用である。また、抗がん剤(イリノテカン、フルオロウラシルなど)による、腸管毒性に起因した激しい下痢のため薬物治療が中止されることも問題となっており、医薬品候補化合物の腸管毒性を創薬研究段階で評価することも重要である。

現在、ヒト消化管吸収・代謝・毒性予測・評価モデルとして実験動物を用いた *in vivo* 評価系やCaco-2細胞などの細胞株を用いた *in vitro* 評価系がある。しかしながら、実験動物を用いた評価系では種差の問題がある。Caco-2細胞を用いた評価系では、消化管吸収性 (F_a) はある程度予測できるものの、小腸の薬物代謝に中心的な役割を果たすシトクロム P450 3A4

(CYP3A4) やUDP グルクロン酸転移酵素 1A1 (UGT1A1) などの発現量が低く薬物代謝特性 (*Fg*) を評価することはできない。そのため、幅広いがん種に処方されるイリノテカンのような CYP3A4 や UGT1A1 の代謝能に起因する毒性を予測することもできない。また、UGT1A1 には遺伝子多型 (SNP) が存在することが知られている。中でも、UGT1A1*6 (UGT1A1 Exon1 における 211G→A の変異) はグルクロン酸抱合能が低下し、イリノテカン投与時において、腸管毒性による激しい下痢などの重篤な副作用の発現頻度が高くなることが報告されている。また UGT1A1*6 の頻度は、日本をはじめとするアジア人種では 11~23% と高いが、欧米人ではほとんど認められない。そのため、日本ではイリノテカン投与前の患者において、UGT1A1 の遺伝子多型検査は保険適応である。そこで本研究では、ゲノム編集技術である CRISPR-Cas9 システムを用いて、ヒト成人小腸に匹敵する CYP3A4 及び UGT1A1 代謝能を有する Caco-2 細胞を作製し、SNP による影響も評価可能な消化管吸収・代謝・毒性評価モデルを構築することで上記の問題の解決を試みる。

3. 研究の結果

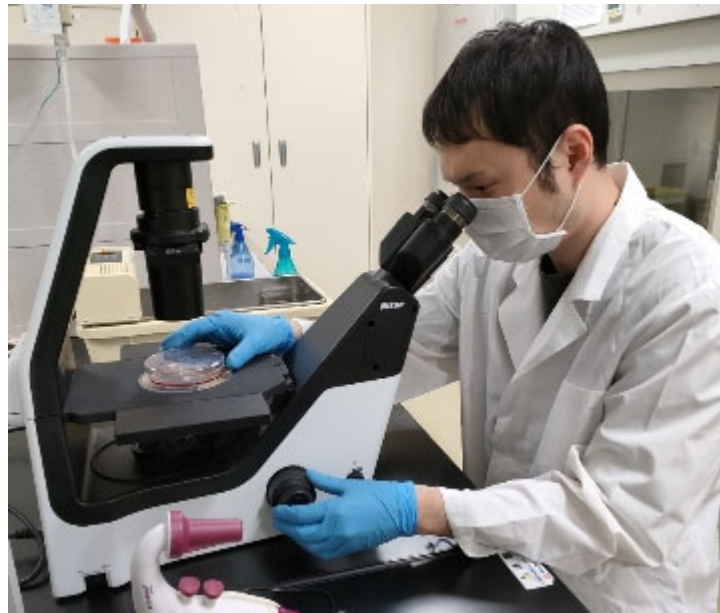
複数薬物代謝酵素を発現させるため、セーフ・ハーバー座位を標的とした gRNA、Cas9 共発現プラスミドベクターおよび薬物代謝酵素遺伝子発現カセット挿入用ドナープラスミドベクターを Caco-2 細胞に遺伝子導入することで、CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞及び CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞を作製した。CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞及び CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞がゲノム編集実験により、ネガティブな影響を受けていないか評価するために、腸管マーカーである *VILI*、*SI* 及び *ISX* の遺伝子発現量を解析した。CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞及び CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞における *VILI*、*SI* 及び *ISX* の遺伝子発現量は、野生型 (WT)-Caco-2 細胞とほぼ同程度発現していた。次に、ゲノム編集した遺伝子である *CYP3A4* および *UGT1A1* が高発現しているか評価するために、遺伝子発現量を解析した。CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞及び CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞における *CYP3A4* および *UGT1A1* 遺伝子発現量は、ヒト成人小腸に匹敵する発現量であった。

CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞及び CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞における CYP3A4 および UGT1A1 代謝能を評価するために、それぞれの薬物代謝酵素特異的基質を用いて評価した。前述の遺伝子発現量の結果と一致して、CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞及び CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞における CYP3A4 代謝能は、WT-Caco-2 細胞に比べ極めて高い活性を示した。興味深いことに、CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞における UGT1A1 代謝活性は、CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞比べ高い活性を示した。

以上の結果より、CYP3A4-UGT1A1 安定発現 Caco-2 細胞及び CYP3A4-UGT1A1*6 安定発現 Caco-2 細胞を作製することに成功した。今後は、腸管毒性試験やヒト消化管吸収・代謝を予測できるか詳細な検討を行う必要がある。なお、本研究開発成果の一部は、論文掲載済みである (Negoro R., *et al.*, *Arch. Toxicol.*, 2022. PMID:34654938)。

4. 研究者としてのこれからの展望

薬学研究者として、引き続き新薬開発に貢献できるような研究を展開する。研究方針としては、基礎研究に留まらないように、社会実装を目指した研究開発課題を提案し実行する。また、自身が作製した細胞を、学術機関や製薬企業をはじめとする営利機関にも使用していただけるよう様々な研究者のニーズを聞きながら、研究に取り組みます。



5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

この度は、2021年度 若手研究者奨励金に採択して頂き誠にありがとうございます。大学院を修了して間もないため、試薬や実験装置を何も所有していない状況で研究活動を開始しました。しかし、本研究助成により必要な試薬類を購入することができ、スムーズに研究に取り組むことができ、本研究課題の一部を論文化することもできました。本論文は、私が助教としては初めての論文であるため、大変思い入れのある仕事になりました。本研究助成を含め様々な財団が若手研究者育成を目的とした研究助成を行っておりますが、競争は激しく、採択はかなり狭き門となっております。そのため、良い研究アイデアがあっても、予算の問題で実験できない若手研究者が身近にたくさんいます。大変恐縮ではございますが、大勢の若手研究者が研究助成を賜れるよう、引き続きご支援の程何卒お願い申し上げます。最後になりますが、本研究助成により、研究成果を出せたものと実感しております。重ねてお礼申し上げます。