

# ヒトiPS細胞由来腸管上皮モデル作製用培地 ciKIC® IEC Maturation Medium

本製品は、ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞を成熟化させ、生体小腸と類似したヒト腸管上皮モデルの作製を可能とします。



## 特長

### ■ 高性能なヒト腸管上皮モデルを作製可能

本培地を用いて作製されたヒト腸管上皮モデルは、生体小腸と薬物動態学的に近い性質・機能を示します（生体小腸に近い細胞形態、各種遺伝子発現プロファイル、CYP3A代謝活性、バリア機能など）。

### ■ 幅広いアプリケーション

経口薬・機能性食品・栄養成分の吸収・代謝・安全性予測、薬物間相互作用試験、腸内細菌による腸管免疫研究など、様々な利用が期待されます。

## 製品情報

製品名	構成 / 保管温度	包装	希望価格 (¥)	製品番号
サイケック ciKIC® IEC Maturation Medium	基礎培地: 2~8℃ サプリメントセット: -20℃	125 mL	¥29,500	08374-67

※本製品は、東京工業大学 生命理工学院 桑教授との共同研究にて開発されました。

※本製品は試験研究用です。ヒトや動物を対象にした医療や臨床診断の目的では使用しないでください。

本パンフレットの掲載データは、下記細胞・播種培地・細胞培養用インサートを使用して、指定のプロトコールに従って作製したヒトiPS細胞由来腸管上皮モデルの性能を示しております。ご使用の際は、下記製品を別途ご準備下さい。

- ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞・播種培地「StemRNA Entero」 (リプロセル社製品)
- 細胞培養用インサート「ad-MED ビトリゲル®2 (24ウェル)」 (関東化学製品)

詳しいプロトコールは、当社製品ページに掲載されている取扱説明書をご確認ください。

製品ページはこちらから→



### ■ 医薬品開発における課題

医薬品の開発フェーズでは、候補化合物の薬効や安全性を確認する種々の試験があり、副作用等の問題がみられた場合、開発中止に追い込まれてしまいます。特に臨床試験段階でのドロップアウトとなると、それまでの莫大なコスト（研究費と時間）の損失は計り知れないものです。更に医薬品の開発難易度は年々上昇しており、製薬企業の研究開発費は世界的に増加傾向にあります。将来ドロップアウトする候補化合物に莫大な資源を注ぐことのないよう、開発の初期段階（非臨床試験段階）では生体内での挙動を精度高く予測することが重要です。

### ■ 非臨床試験

非臨床試験には、実験動物を用いた試験と、組織モデルを用いた試験があります。動物実験のメリットは、薬物の体内動態を一個体として調査できる点が挙げられますが、デメリットとして、種差が大きくヒトへの外挿が難しい点が挙げられます。つまり、動物実験をクリアしたとしても、臨床試験段階において人に投与した際に所期の薬効が認められなかったり、予期しない副作用が発生したりする恐れがあります。また、近年では、動物愛護の観点から実験動物の3Rの原則、すなわち削減 (Reduction), 苦痛軽減 (Refinement), 置換 (Replacement) に対する意識が高まり、動物実験の代替法が求められています。一方で、組織モデルを用いた試験では、種差の問題のないヒトのプライマリー細胞や株化細胞が用いられますが、前者は安定的に入手することが極めて困難で、後者は生体本来の性質・機能が再現できていない課題があります。腸管上皮モデルでは、Caco-2細胞（ヒト結腸がん由来細胞）がこれに当たります。

### ■ Caco-2細胞の問題点

小腸における薬物吸収予測では、これまでCaco-2細胞がゴールドスタンダードのモデルとして用いられてきました。Caco-2モデルのメリットは、培養操作が容易で、ヒト腸管上皮の機能を部分的に再現している点です<sup>1)</sup>。しかし、デメリットとして、ヒト腸管上皮関連遺伝子を一部発現できていないこと、主要な薬物代謝酵素（CYP3A4）の活性が不十分であること、バリア機能を司るタイトジャンクションの形成が生体小腸よりも強固であることから、薬物の吸収・代謝を精度高く評価することが難しいという課題があります。そのため、ヒト生体小腸に類似した性質・機能を持つ新しい腸管上皮モデルの開発が強く望まれていました。

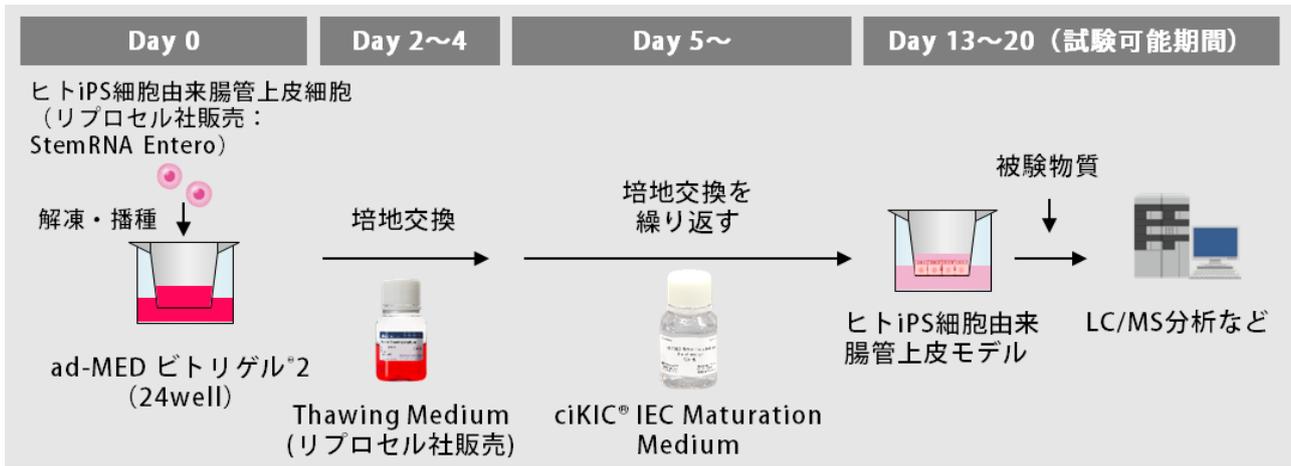
▶ このような背景から、関東化学は東京工業大学 生命理工学院 桑教授との共同研究を行い、生体小腸に近い性質・機能を持つヒトiPS細胞由来腸管上皮モデルの作製に成功しました<sup>2)</sup>。この成果をもとにヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞の成熟化に寄与する本培地が開発されました。

参考文献

1) M. Shimizu, *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 56, 251-255(2003).

2) S. Yoshida, *Stem Cell Reports*, Vol. 16 (2021) 1-14.

## プロトコール概要



リプロセル社が販売しているヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞「StemRNA Entero」をad-MEDビトリゲル®2 (24well) に播種します。Day 5以降、本培地で培養するとヒト腸管上皮モデルを作製でき、最短13日目から試験が可能になります。詳しいプロトコールは、当社製品ページ掲載の取扱説明書または、プロトコール動画をご参照ください。製品ページはこちらから→



### ■ プロトコール動画



プロトコール動画① 試薬の準備

▶ Day 0に行うThawing Mediumの調製方法、ad-MEDビトリゲル®2 (24well) の準備方法が確認できます。



プロトコール動画② 細胞の解凍・調製

▶ Day 0に行うStemRNA Enteroの解凍方法・Thawing Mediumでの細胞懸濁液の調製方法が確認できます。



プロトコール動画③ 細胞の播種

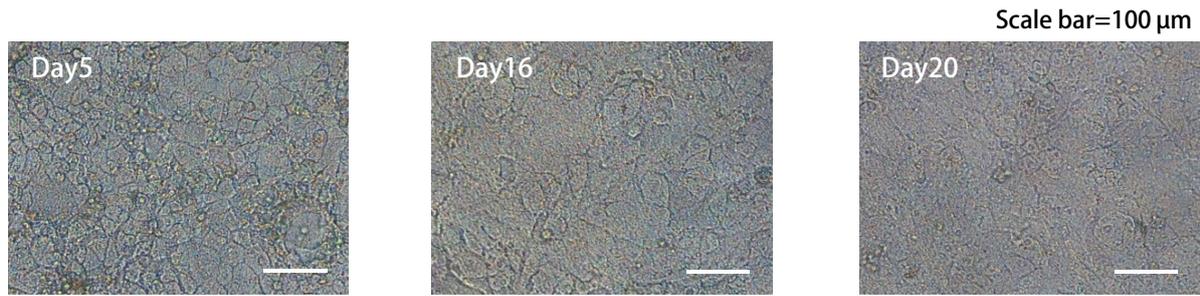
▶ Day 0に行うStemRNA Entero細胞懸濁液のad-MEDビトリゲル®2 (24well) への播種方法が確認できます。



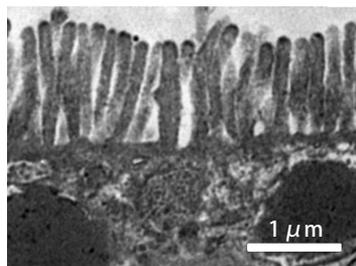
プロトコール動画④ 培地交換

▶ Day 2以降に行う培地交換方法、ciKIC® IEC Maturation Mediumの調製方法が確認できます。

## 細胞形態



▶ 作製モデルは、位相差顕微鏡観察が可能です。敷石状の細胞輪郭が確認できます。



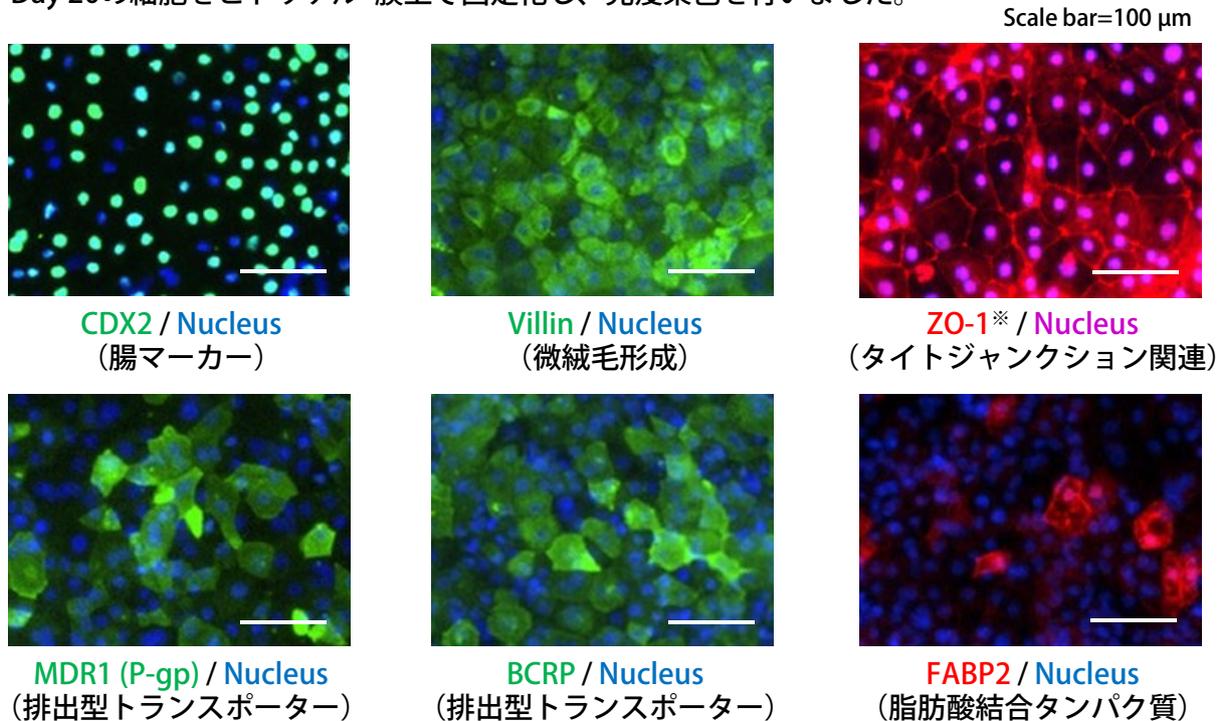
微絨毛

▶ 作製モデルは、管腔側（Apical側）にヒト生体小腸と同程度の長さの微絨毛（1~1.5 μm）を形成します。

透過型電子顕微鏡写真 (Day14)

## 免疫染色像

Day 20の細胞をビトリゲル®膜上で固定化し、免疫染色を行いました。



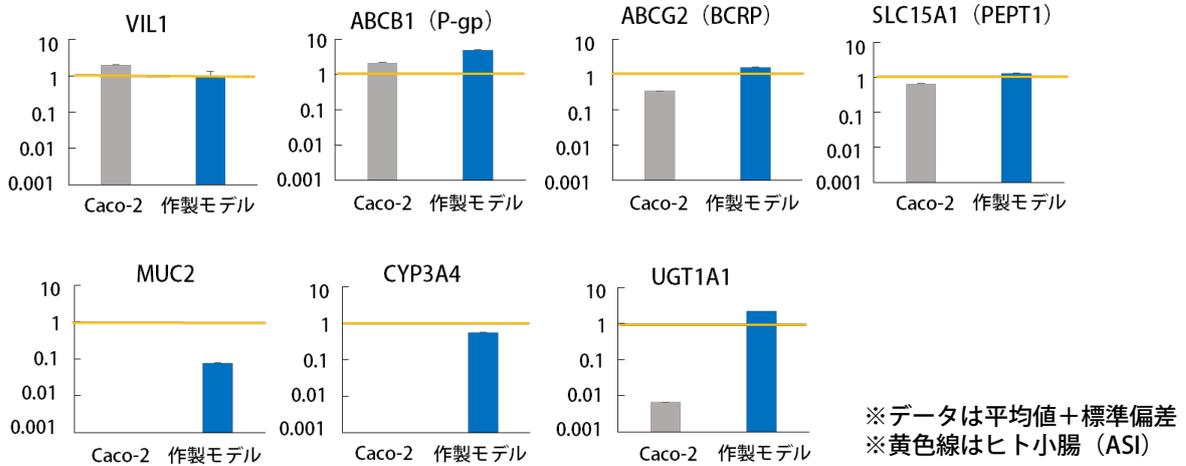
※ ZO-1の免疫染色データは、東京工業大学 生命理工学院 桑教授よりご提供いただきました。

▶ 各種腸管上皮細胞関連マーカー・トランスポーターの発現を確認しています。

## 作製モデルの性能

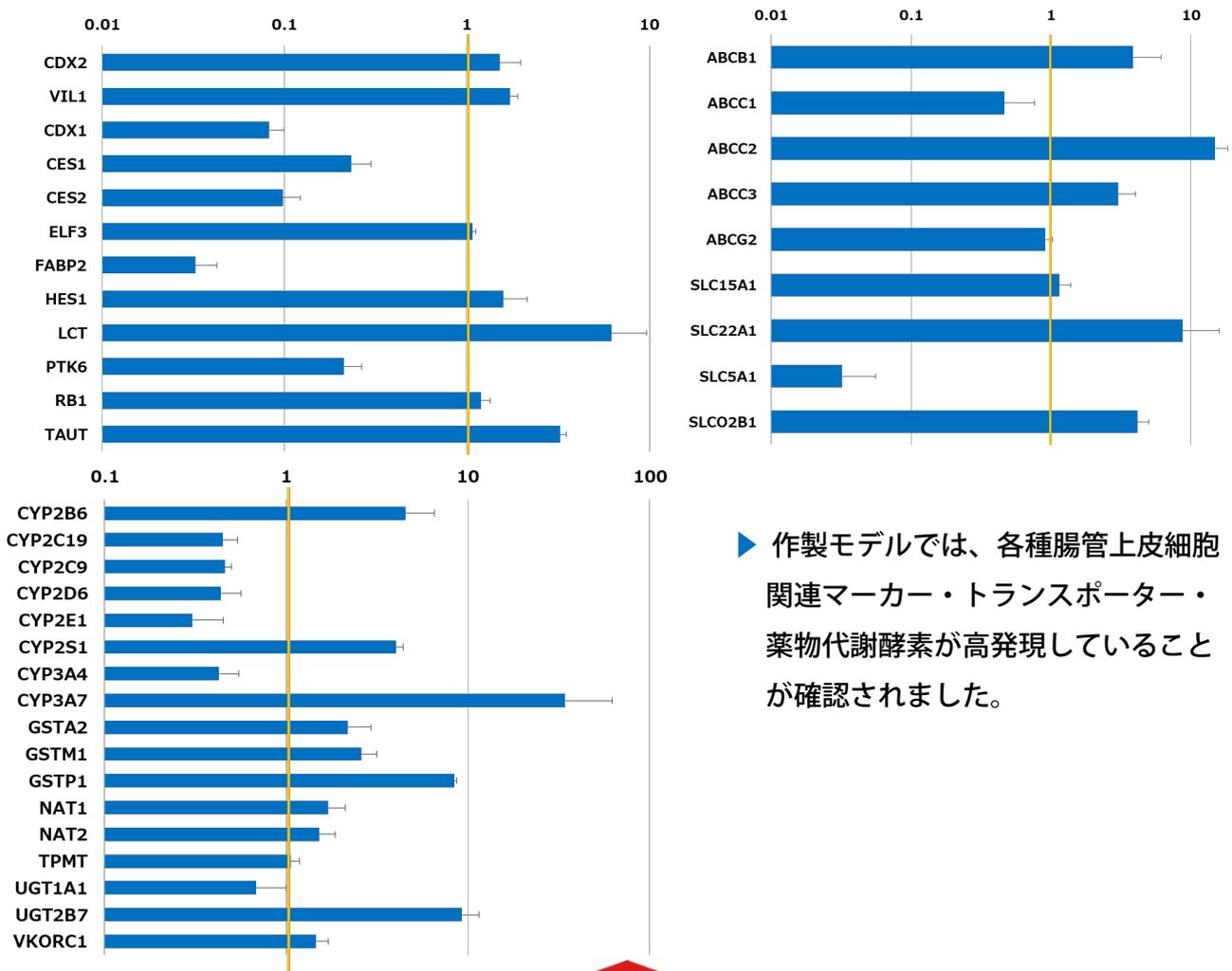
### ■ 遺伝子発現 (Caco-2モデルとの比較)

作製モデルとCaco-2モデルから取得したTotal RNAを逆転写し、各プライマーを用いてReal time PCRを行いました。ヒト生体小腸 (市販のTotal RNA) の各種遺伝子発現量を1として、相対値として算出しました。



### ■ 各種遺伝子発現プロファイル

上記と同様に作製モデルの網羅的な遺伝子発現情報をヒト生体小腸と相対的に比較しました。データはリプロセル社よりご提供いただきました。

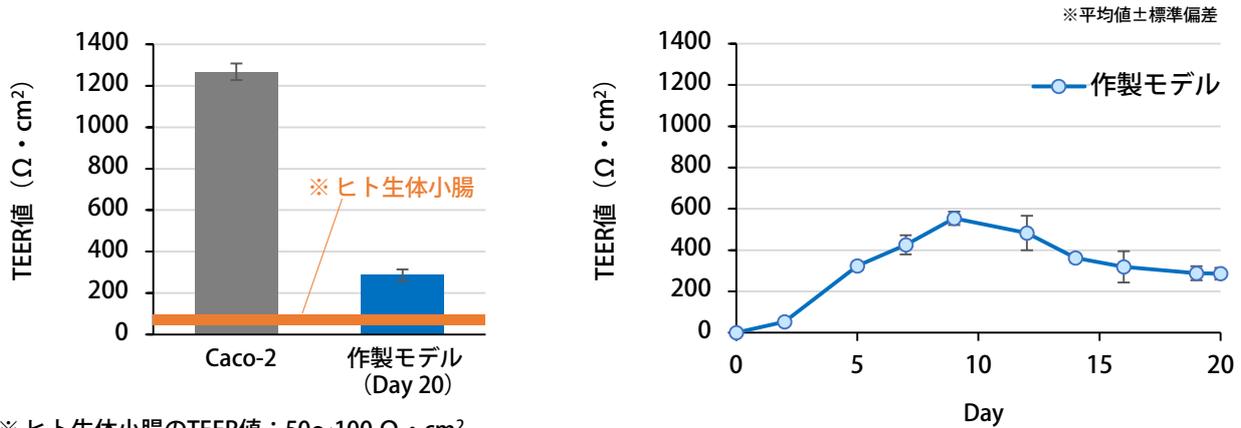


▶ 作製モデルでは、各種腸管上皮細胞関連マーカー・トランスポーター・薬物代謝酵素が高発現していることが確認されました。

## 作製モデルの性能

### ■ バリア機能

作製モデルとCaco-2モデルについて、Millicell-ERS2を用いてTEER値を測定しました (n=3)。また、作製モデルでは、Day 0~20までのTEER値の経時変化を確認しました。



※ ヒト生体小腸のTEER値：50~100 Ω・cm<sup>2</sup>  
Srinivasan, Balaji, et al. "TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems." *Journal of laboratory automation* 20.2 (2015): 107-126.

- ▶ 本製品により作製したモデルは、Caco-2モデルと比べて生体小腸に近いバリア機能を有し、安定したTEER値を長期間保持することが確認されました。

### ■ CYP3Aの代謝活性測定・薬物間相互作用試験

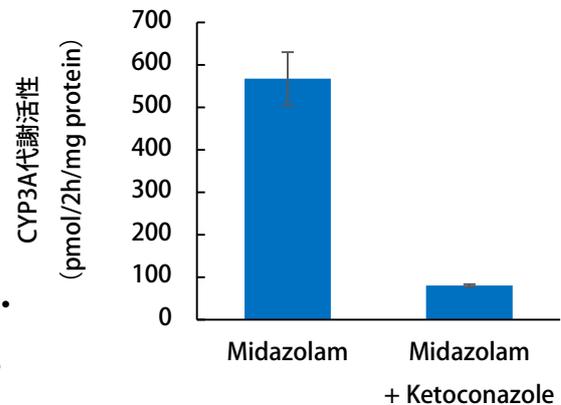
作製モデル：Day 20

基質：Midazolam

阻害剤：Ketoconazole

代謝物：1'-OH Midazolam

- ▶ 作製モデルではCYP3Aの高い活性と、典型基質・阻害剤による薬物間相互作用が確認されました。



### ■ 薬物間相互作用試験 (P-gp)

作製モデル：Day 13

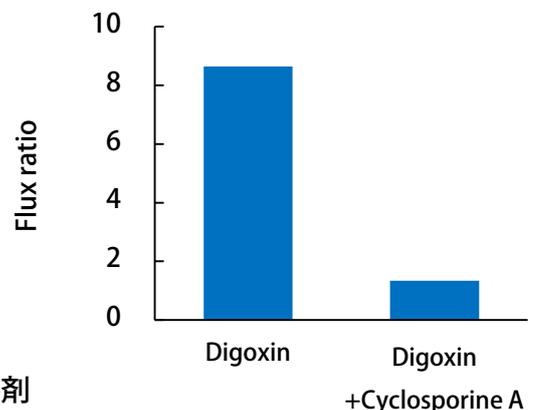
基質：Digoxin

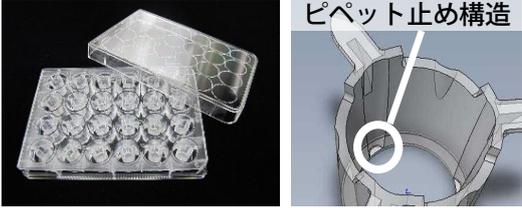
阻害剤：Cyclosporine A

上記をA側のみまたは、B側のみに添加します。

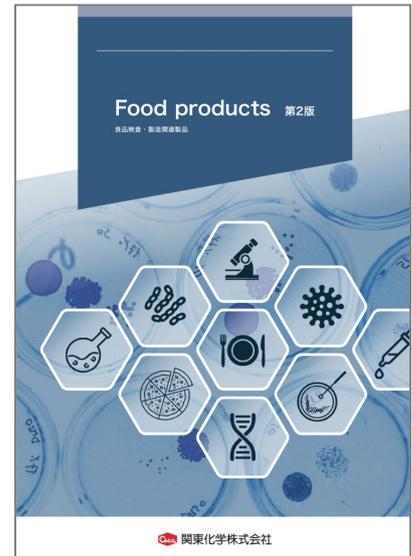
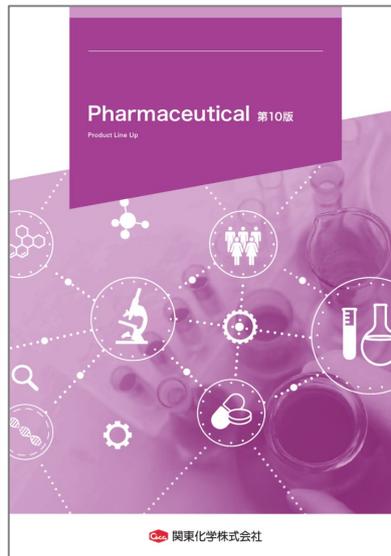
37°C, 2 hのインキュベーション後、A to B, B to Aの透過係数 (Papp) を算出し、Papp比率をFlux ratio としました。

- ▶ 作製モデルではP-gpの活性を示し、典型基質・阻害剤による薬物間相互作用が確認されました。



製品名	包装	保管条件	希望価格 (¥)	製品番号
ad-MED ビトリゲル®2 (24ウェル)	24個/set	冷蔵 0°C~6°C	¥26,500	08364-96
<p>▶ 本製品と組み合わせて使用する細胞培養用インサート。培地交換時にはインサート内のピペット止め構造を利用することで、培養細胞への物理的なダメージを最小限に抑えることが可能です。位相差顕微鏡観察にも対応。</p>				
StemRNA Entero	凍結細胞 $1.8 \times 10^6$ cells/vial × 2 vial	液体窒素	御見積	49033-00
	Entero Thawing Medium 80 mL × 1	冷凍 -20°C以下		
<p>▶ メーカー：株式会社リプロセル、メーカーコード：RCDE001N 本製品と組み合わせて使用するヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞。細胞はドライシッパー容器にて発送されます。</p>				
Y-27632 dihydrochloride	10 mg	冷凍 -20°C以下	¥26,000	49030-06
<p>▶ メーカー：APExBIO社、メーカーコード：A3008-10 幹細胞をシングルセル継代する際などに細胞死を防ぐために培地へ添加するROCK阻害剤。 Day0にStemRNA Enteroの細胞を融解・播種する際、Entero Thawing Mediumには、こちらのY-27632を終濃度: 10 μMとなるよう添加してください。</p>				
シカジーニラス® RNA プレップキット(組織用)	50回分	室温 15°C~25°C	¥33,500	08057-96
<p>▶ 培養細胞中のRNAを簡便に抽出・精製できるスピнкаラムタイプのキットです。作製したヒトiPS細胞由来腸管上皮モデルの各種遺伝子発現量解析にご利用ください。</p>				

## 関連製品



▶ LC/MS関連製品として、溶媒、カラム、ガードカラム、標準物質、重水素化合物などの取扱い、細胞培養用機材として、ピペット、チップ、電動ピペッターなどの取扱いがごございます。お探しの試薬・機材などございましたら下記までお問い合わせください。

- 本記載の製品は、試薬（試験、研究用として用いる化学薬品）としての用途にご利用ください。 ● 本記載価格に、消費税等は含まれておりません。
- 本記載の製品情報は予告なく変更する場合があります。最新情報は、弊社ホームページ「Cica-Web」をご確認ください。

# Cica 関東化学株式会社

## 試薬事業本部

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号  
 TEL : 03-6214-1090  
 HP : <https://www.kanto.co.jp>