

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第6分野

医用材料及び製剤設計技術の開発に関する研究

## ヒト肝特異的有機アニオントランスポーター遺伝子 LST-1 およびLST-2 導入肝細胞を用いたハイブリ ッド型人工肝臓組織の開発

所 属 東北大学・大学院医学系研究科

研究者 松野 正紀

### 分担研究者

- (1) 東北大学・大学院医学系研究科 海野 倫明
- (2) 東北大学・大学院医学系研究科 阿部 高明

### 要旨

ヒト肝癌細胞株 HepG2 は正常肝細胞と比較して胆汁酸等の基質取込み能が約 2 桁劣っている。この HepG2 細胞に我々が単離した肝特異的有機アニオントランスポーターLST-1、LST-2 遺伝子を導入し、基質取込み能を向上させた細胞を作製した。

### 1. 研究目的

肝臓は生体の中最も多様な代謝機能と血中から内・外因性物質を胆汁へ排除する機構をつかさどり、生体の恒常性維持に欠くべからざる重要な役割を果たしている。現在、急性および慢性肝機能障害の治療は不完全ながら肝臓機能を代行する血漿交換治療あるいは肝臓移植しかないのが現状であるが、医療経済学的問題や深刻なドナー不足により広く普及するに至っておらず、効果的な人工肝臓の開発が強く望まれていた。また、ブタやヒヒなどの異種動物を使用した人工肝臓は、ブタ内因性レトロウイルスに代表されるように新たな感染症や免疫原性などの理由より、現時点では困難な状況である。本研究では申請者らが単離した新規ヒト特異的有機アニオントランスポーターLST-1 と LST-2 を株化した培養肝細胞に遺伝子導入し、組み合わせて使用することにより、これまで解毒機能の点で生体肝に比べて 2 桁劣っていた肝細胞培養システムの欠点を改良し、選択的透過性を保持したヒト肝細胞モデル系を確立して肝不全物質の排出評価を行い、細胞外マトリックスでコートしたホロファイバー大量培養系と組み合わせることで生体肝臓に代替する肝不全物質排出システムである再構築人工肝臓を作製することを目的とする。

平成 13 年度では、まず肝特異的有機アニオントランスポーターである LST-1、LST-2 遺伝子を肝由来培養細胞株 HepG2 細胞に導入した遺伝子導入株を得ることを目的とした。そのため、分担研究者の阿部高明は主に組み替え adenovirus vector の作製とこれを用いた遺伝子導入細胞株の作製を遂行した。また分担研究者海野倫明は、このようにして得られた LST-1 または LST-2 遺伝子導入細胞を用いて培養モデルを確立し、様々な基質の取り込み実験を遂行し、遺伝子導入培養細胞の機能を明らかにすることを

目的とした。

## 2. 研究方法

我々は 1999 年に肝特異的有機アニオントランスポーター-liver-specific organic anion transporter, LST-1 を、2001 年にはこのサブタイプである LST-2 を世界に先駆けて単離に成功した。この LST-1 cDNA、LST-2 cDNA を E1a, E1b, E3 を欠失した pAxCawt の CAG プロモーター下流に組み替えた cosmid vector を作製した。この cosmid と adenovirus vector を HEK293 細胞に co-transfection することにより、LST-1 または LST-2 遺伝子を有した adenovirus vector, AdLST-1 および AdLST-2 を作製し、大量調整した。肝癌由来培養細胞株 HepG2、または HT17、PLC/PRF-5 細胞にこれら LST-1 および LST-2 を種々の MOI (multiplicity of infection)にて感染させ、感染細胞から膜蛋白を調整し LST-1 および LST-2 に対する特異抗体を用いてウエスタンブロット法を施行した。さらに感染細胞を Triton-X 100 添加の有無の条件で蛍光免疫染色法を施行した。LST-1 または LST-2 を感染させた HepG2 細胞を用いて、放射性標識された taurocholate (TCA), prostaglandin D1 (PGD1) , prostaglandin E1 (PGE1), prostaglandin E2 (PGE2), methotrexate (MTX), dehydroepiandrosteron sulfate (DHEAS), retinoic acid (RA), triiodothyronine (T3), thyroxin (T4), chenodeoxycholic acid (CDCA)などを基質として、細胞外液に添加し、細胞内の放射能活性を測定することにより細胞内への取り込み能を検討した。

## 3. 研究成果

CAG プロモーター下流に LST-1 cDNA, LST-2 cDNA を組み替えた cosmid vector と adenovirus vector を co-transfection することにより、組み替え adenovirus, AdLST-1, AdLST-2 の作製に成功した。肝癌由来培養細胞株 HepG2 に感染させ、ウエスタンブロットを施行すると、LST-1 蛋白は約 90kDa、LST-2 蛋白は約 110kDa のバンドとして検出された。また同一の抗体を用いた蛍光免疫染色にて、感染細胞は Triton-X 100 存在下のみ、細胞膜が強く染色された。我々が用いている抗体は細胞内ドメインに対するペプチド抗体であり、Triton X 100 を使用せず膜が可溶化されていないときは蛍光のシグナルは認められないことより、膜トポロジーは肝臓と同一であると考えられた (図 1 参照)。

## Western blot and Immunohistochemistry of AdLST-1 and AdLST-2 infected HepG2

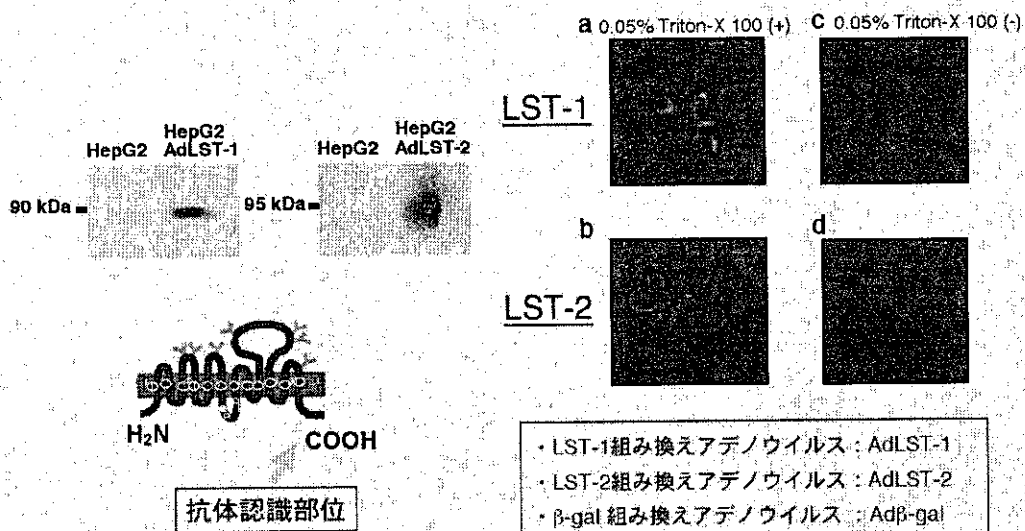


図 1

感染細胞の細胞外液に $^3\text{H}$  taurocholate を添加し、細胞内の取り込みを観察すると、HepG2, HT17, PLC/PRF-5 細胞はいずれも、対照群とした Adb-Gal 感染細胞の約 10 倍から 50 倍もの $^3\text{H}$  taurocholate を取り込みが見られた (図 2 参照)。

## 1 $\mu\text{M}$ of $^3\text{H}$ -TCA uptake by AdLST-1 or AdLST-2 infected HepG2, PLC/PRF-5, and HT17

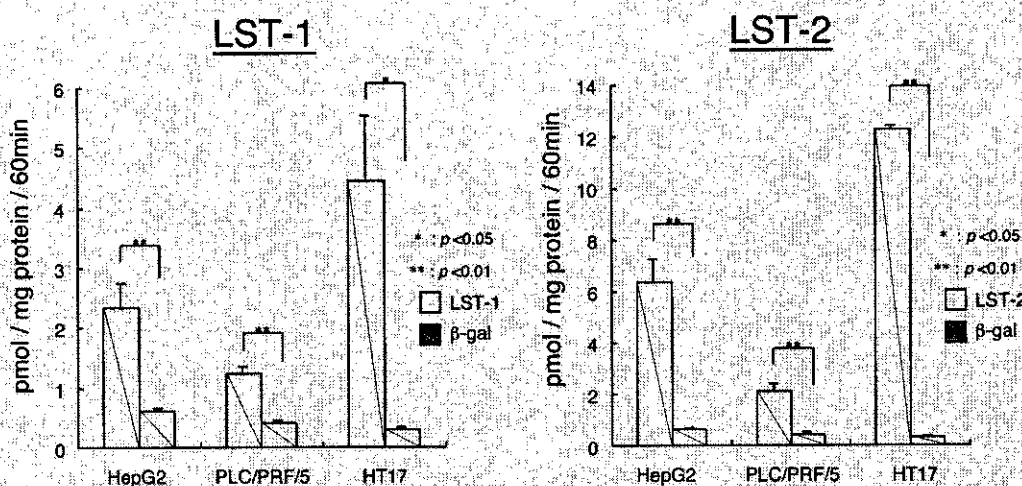


図 2

この取り込みは $^3\text{H}$  taurocholate の濃度に依存しており、また飽和的であった。さらに Michaelis-Menten

の式から Michaelis 定数(Km)を算出すると、LST-1 が  $4.1 \pm 1.2$  microM、LST-2 が  $4.4 \pm 1.7$  microM とほぼ肝臓の値と同一であった。この取り込みは温度を  $4^{\circ}\text{C}$  にすることにより見られなくなったことより、トランスポーターにより触媒されたものと考えられた。さらに様々な基質について取り込み能を検討した。LST-1、LST-2 ともに TCA, PGD1, PGE1, PGE2, MTX, DHEAS, T3, T4 を取り込んだ (表 1, 2 参照)。

**Uptake of various compounds by AdLST-1 infected HepG2**

substrate	Uptake by expressed HepG2		Uptake ratio
	Ad $\beta$ -gal	AdLST-1	
(fmol / mg protein / 10 min)			
Prostaglandin D <sub>2</sub> (18nM)	18.3 ± 0.8	68.3 ± 9.2	3.7 **
Prostaglandin E <sub>1</sub> (33nM)	20.8 ± 1.0	91.0 ± 14.2	4.4 **
Prostaglandin E <sub>2</sub> (15nM)	10.9 ± 0.9	36.7 ± 6.4	3.4 **
(pmol / mg protein / 10 min)			
TCA (1 $\mu$ M)	0.7 ± 0.1	5.2 ± 0.2	7.0 **
MTX (1 $\mu$ M)	1.1 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.0 **
DHEAS (0.44 $\mu$ M)	0.3 ± 0.02	4.8 ± 0.5	14.2 **
Retinoic acid(2 $\mu$ M)	836.9 ± 51.2	1030.8 ± 75.1	1.2
PAH (7.5 $\mu$ M)	4.2 ± 0.4	6.8 ± 0.7	1.6
T3 (1 $\mu$ M)	108.8 ± 5.6	452.4 ± 50.5	4.2 **
T4 (1 $\mu$ M)	27.1 ± 1.3	214.9 ± 21.5	8.0 **

\*\* :  $p < 0.01$

表 1

**Uptake of various compounds by AdLST-2 infected HepG2**

Substrate	Uptake by expressed HepG2		Uptake ratio
	Ad $\beta$ -gal	AdLST-2	
(fmol / mg protein / 10 min)			
Prostaglandin D <sub>2</sub> (18nM)	18.3 ± 0.8	49.2 ± 7.8	2.7 **
Prostaglandin E <sub>1</sub> (33nM)	20.8 ± 1.0	34.8 ± 3.0	1.7 *
Prostaglandin E <sub>2</sub> (15nM)	10.9 ± 0.9	28.4 ± 5.0	2.6 **
(pmol / mg protein / 10 min)			
TCA (1 $\mu$ M)	0.7 ± 0.1	9.3 ± 1.0	12.6 **
MTX (1 $\mu$ M)	1.1 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.5 **
DHEAS (0.44 $\mu$ M)	0.3 ± 0.02	1.7 ± 0.3	5.0 **
Retinoic acid(2 $\mu$ M)	836.9 ± 51.2	595.2 ± 19.9	0.7
PAH (7.5 $\mu$ M)	4.2 ± 0.4	18.5 ± 2.6	4.4 **
T3 (1 $\mu$ M)	108.8 ± 5.6	179.9 ± 21.1	1.7 *
T4 (1 $\mu$ M)	27.1 ± 1.3	146.2 ± 9.7	5.4 **

\* :  $p < 0.05$     \*\* :  $p < 0.01$

表 2

一方、LST-2 のみで輸送される基質も明らかとなった。近年、核内レセプター-FXR と結合し、転写因子として活性を有することが明らかとなった CDCA は LST-2 のみにより輸送され、LST-1 は CDCA を基質としないことを明らかにした (図 3)。これまで CDCA の輸送担体は不明であったことより、大変重要な知見と考えられる。

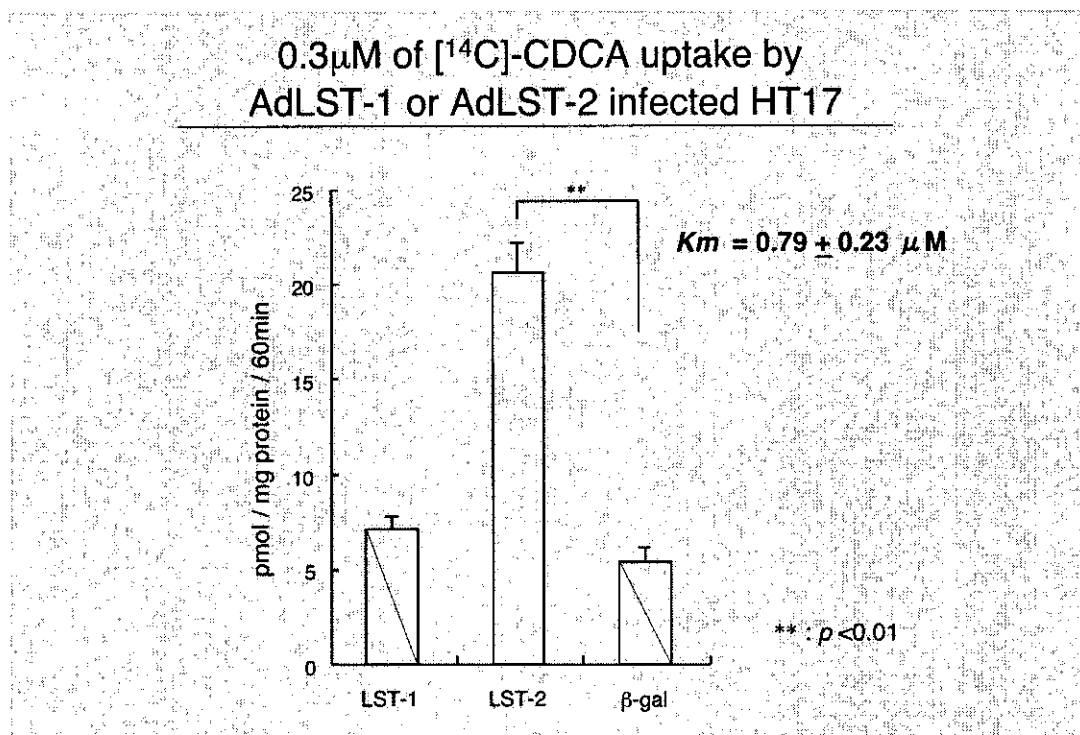


図 3

#### 4. 考察

肝癌由来培養細胞株 HepG2 はアルブミン産生や尿素サイクルの存在があることから、異種動物を用いず、ヒト由来培養細胞を用いたハイブリッド型人工肝臓のリアクターとして期待されている細胞株である。しかしながら、胆汁酸などの基質取り込み能はヒト肝細胞と比較すると 2 桁劣っていることより、トランスポーターの発現の低下が考えられていた。人工肝臓のリアクターとして用いるためにはこの取り込み能を改善させ、ヒト肝細胞と同様に様々な両親媒性物質を血中から除去し細胞内へと輸送させる機序が必要である。そこで我々は、我々独自が世界に先駆けて単離し構造を決定した、肝特異的有機アニオントランスポーター-LST-1 と LST-2 に着目し、これを遺伝子導入することにより様々な基質を細胞内に取り込む能力が回復するのではないかと考え、以下の実験を行った。遺伝子導入法として現在もっとも効率良く肝細胞に遺伝子を導入することが可能な adenovirus vector を使用することとした。このようにして作製された AdLST-1、AdLST-2 はともに肝癌由来培養細胞株に感染させると強く発現していることが明らかとなった。このような強制発現系はしばしば膜トポロジーの変化を来すことが知られているが、我々の vector を用いた発現系では蛍光抗体染色法により、膜トポロジーの異常がないと考えられた。さらにこの adenovirus を感染させた細胞は約 10 倍から 50 倍もの TCA の取り込みが見られ、ま

たこの取り込みの Km 値はヒト肝細胞とほぼ同一であったことから肝細胞と同様な性質を有した細胞株に変化したことを表している。我々は以前に LST-1 および LST-2 蛋白の機能解析法としてアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて検討してきたが、この adenovirus 発現系での基質特異性を検討すると、ほぼアフリカツメガエル卵母細胞系と同一の結果が得られた。近年、chenodeoxycholate はこれまで機能が不明であった、核内レセプター-FXR と結合し、多くの遺伝子発現を調節していると考えられている。

この CDCA は LST-1 では輸送されず、LST-2 でのみ細胞内に輸送されることを明らかにした。今後この AdLST-1 および AdLST-2 を用いて様々な基質特異性の検討や、輸送メカニズムの検討に使用することが可能である。また、AdLST-1、AdLST-2 感染細胞は TCA の取り込み能力を指標とするとヒト肝細胞に近い輸送能をもっており、ハイブリッド型人工肝臓への応用が可能になると考えられ、今後平成 14 年度、15 年度に引き続き研究を遂行する所存である。

## 5. まとめ

ヒト LST-1 および LST-2 遺伝子を組み換えた adenovirus vector, AdLST-1, AdLST-2 を作製した。これら adenovirus に感染した HepG2 培養細胞は膜表面に LST-1 蛋白または LST-2 蛋白を発現していた。様々な基質の取り込みを検討すると、TCA, PGD1, PGE1, PGE2, T3, T4 を細胞内に輸送した。このように感染 HepG2 細胞はヒト肝臓とほぼ同等の基質取り込み能があることから、この遺伝子導入 HepG2 を用いたハイブリッド型人工肝臓の開発へと応用されていくものと考えられ、我々も引き続き平成 14 年度、平成 15 年度に、研究を遂行する。

## 6. 研究発表

Abe T, Unno M, Onogawa T, Tokui T, Kondo TN, Nakagomi R, Adachi H, Fujiwara K, Okabe M, Suzuki T, Nunoki K, Sato E, Kakyō M, Nishio T, Sugita J, Asano N, Tanemoto M, Seki M, Date F, Ono K, Kondo Y, Shiiba K, Suzuki M, Ohtani H, Shimosegawa T, Iinuma K, Nagura H, Ito S, Matsuno S. LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers.

*Gastroenterology*. 2001 Jun;120(7):1689-99.

Ito A, Yamaguchi K, Onogawa T, Unno M, Suzuki T, Nishio T, Suzuki T, Sasano H, Abe T, Tamai M. Distribution of Organic Anion-Transporting Polypeptide 2 (oatp2) and oatp3 in the Rat Retina.

*Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002 Mar;43(3):858-63.

海野倫明、近藤典子、阿部高明、小野川徹、藤原耕、安達尚宣、鈴木正徳、松野正紀  
胆汁酸トランスポーター機構の変化－LST/OATP ファミリーの機能と転写調節－  
*肝胆膵* 2001, 43: (6): 1021-7

## 7. 知的所有権の取得状況

なし

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第6分野

医用材料及び製剤設計技術の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社