

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) 東北大学医学系研究科 海野倫明

(2) 東北大学医学系研究科 阿部高明

要旨

ヒト肝由来培養細胞は LST-1, LST-2 の発現を欠いておりビリルビン・胆汁酸・ホルモン等の除去能が低下している。LST-1, LST-2 を強制発現させた細胞を作製し、基質除去能を検討し、肝機能補助装置への応用を目指す。平成 14 年度は蛍光標識体を用いた基質特異性の検討を行った。

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。

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。

今年度は、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の基質特異性を解析するため、蛍光標識体を使用した解析を行い、蛍光標識体を用いた簡便かつ汎用性高いトランスポーター機能評価系の有用性が示されたので報告する。

2. 研究方法

本年度は、肝臓で発現している liver-specific organic anion transporter, LST-1 および LST-2 の詳細な機能を明らかにすることを目的に、その基質特異性について検討を加えた。

従来は、放射性同位体を用いた基質取込み実験を行なってきたが、放射性同位体 (RI) を用いた解析では、一般に標識体の入手が困難でかつ効果であることから、蛍光標識体に着目した。蛍光標識体は合成可能であり、また特殊な施設を必要としない。蛍光物質を変えることにより複数の化合物を一斉に検討することが出来、また可視的に化合物の移動や局在を解析することができるという特徴を有している。そこで、コール酸側鎖に nitrobenzofururan (以下 NBD) を導入した化合物を作製し、平成 13 年度に作製した adenovirus により遺伝子導入した HepG2 細胞を用いて蛍光物質を用いた基質特異性の検討を行った。

3. 研究成果

我々は、平成 13 年度の成果として、LST-1 および LST-2 を組み込んだ、組み換えアデノウイルス、AdLST-1, AdLST-2 の作製に成功した。この AdLST-1, AdLST-2 を感染させた HepG2 細胞を用いて、まず蛍光標識体の骨格である cholic acid の取込み能を検討した。 ^3H cholic acid を AdLST-2 感染細胞の培養液に加え、20 分間インキュベートし、細胞を洗浄した後、細胞を融解し細胞内に取り込まれた ^3H cholic acid を測定した。Fig.1 左図のように LST-2 感染細胞は、対象である β -ガラクトシダーゼ感染細胞に比して約 20 倍もの細胞内への cholic acid の取込みが観察された。Fig.1 右図に示されたように、この取込みは濃度依存的かつ飽和的であり、Eadie-Hofstee plot により直線となり、算出されたミカエリス定数 (Km) は、 $85.3\mu\text{M}$ であった。これまで taurocholate, chenodeoxycholate が LST-2 の基質であることが知られていたが、cholic acid も LST-2 の基質の一つであり、能動的に細胞内に取り込まれることが明らかとなった。

この cholic acid の側鎖に蛍光標識体である NBD を導入した化合物を研究協力者である東北大学薬剤部後藤順一先生に作製して頂き以下の検討を行った。

まず、NBD 基を導入した NBD labeled cholic acid (CA-NBD) (構造式: Fig.2 右上図参照) が非標識体 cholic acid (CA)と同様に LST-2 の基質であるかどうかを検討した。CA-NBD は、Fig.2 左図のように LST-2 感染細胞にのみ約 8 倍取り込まれた。一方、胆汁酸骨格を有さない Gly-NBD (構造式: Fig.2 右下図) は LST-2 感染細胞にはほとんど取り込まれなかった。また、この蛍光標識体の取込みは、非標識 cholic acid の添加により濃度依存的に阻害されることから (Fig.3)、CA-NBD は NBD 基

ではなく胆汁酸骨格が認識され細胞内に輸送されることが判明した。

さらに、NBD により蛍光標識したケノデオキシコール酸(CDCA-NBD)、ウルソデオキシコール酸(UDCA-NBD)、デオキシコール酸(DCA-NBD)、リトコール酸(LCA-NBD)を用いて同様の検討を行った。Fig.4 に示すように CDCA-NBD, UDCA-NBD, DCA-NBD, LCA-NBD は、有意に LST-2 発現細胞に取り込まれることから、CDCA-NBD, UDCA-NBD, DCA-NBD, LCA-NBD はすべて LST-2 の基質となりえるものと考えられた。

4. 考察・まとめ

コール酸が LST-2 の基質となること、そのミカエリス定数(Km)が $85.3\mu\text{M}$ であることを明らかにした。また、NBD を結合した胆汁酸、CA-NBD, CDCA-NBD, UDCA-NBD, DCA-NBD, LCA-NBD は、LST-2 により細胞内に輸送されることが明らかとなった。これらの結果より、本系においては NBD ではなく、胆汁酸の構造に由来する取り込みが示唆され、蛍光標識体を用いた簡便かつ汎用性高いトランスポーター機能評価系の有用性が示された。

LST-2 は癌細胞に異所性に発現していることが我々の研究から明らかにされている。また一方、LST-2 は抗癌剤である methotrexate を輸送基質としていることから、LST-2 を標的分子とした新しい抗癌剤治療が考えられている。すなわち、LST-2 に特異的に輸送される抗癌剤を明らかにすることにより、癌細胞のみに細胞殺傷効果を有する薬剤開発が可能となる。本研究のように蛍光標識体による基質検索が可能となったことにより、多くの抗癌物質を容易にスクリーニングすることが可能となり、LST-2 の基質になる薬剤探索に極めて有用であると考えられた。

5. 研究発表

Abe T, Suzuki T, Unno M, Tokui T, Ito S. Thyroid hormone transporters: recent advances. Trends Endocrinol Metab 2002;13:215-20.

Ito A, Yamaguchi K, Onogawa T, Unno M, Suzuki T, Nishio 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;43:858-63.

Sato K, Sugawara J, Sato T, Mizutamari H, Suzuki T, Ito A, Mikkaichi T, Onogawa T, Tanemoto M, Unno M, Abe T, Okamura K. Expression of Organic Anion Transporting Polypeptide E (OATP-E) in Human Placenta. Placenta 2003;24:144-8.

Suzuki T, Onogawa T, Asano N, Mizutamari H, Mikkaichi T, Tanemoto M, et al. Identification and characterization of novel rat and human gonad specific organic anion transporters. Mol Endocrinol 2003.

6. 知的所有権の取得状況

1) 特許取得

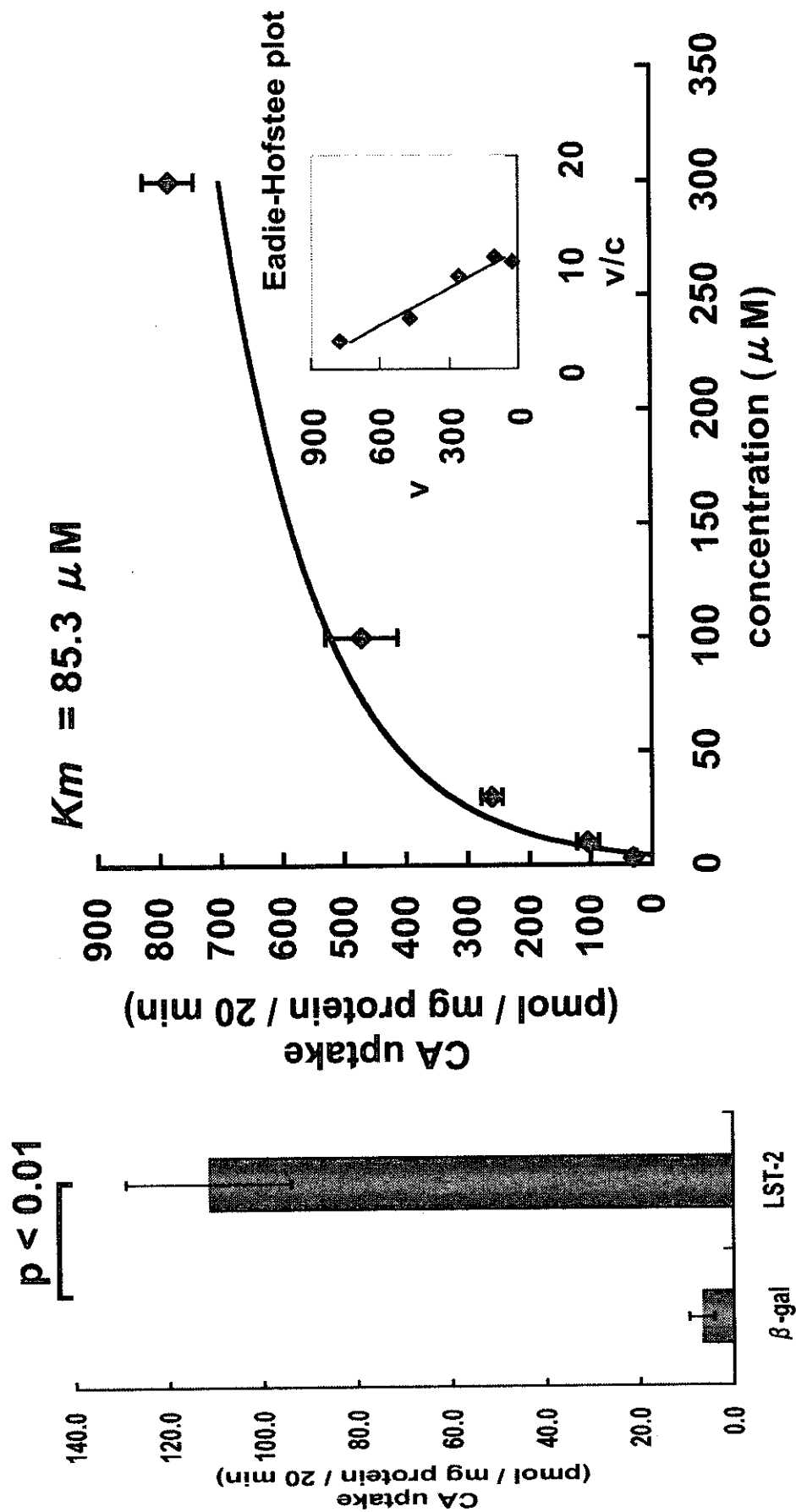
なし

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし



LST-2 : LST-2 overexpressed HepG2, β -gal : β -galactosidase overexpressed HepG2

Fig.1 LST-2-mediated cholic acid uptake in overexpressed HepG2

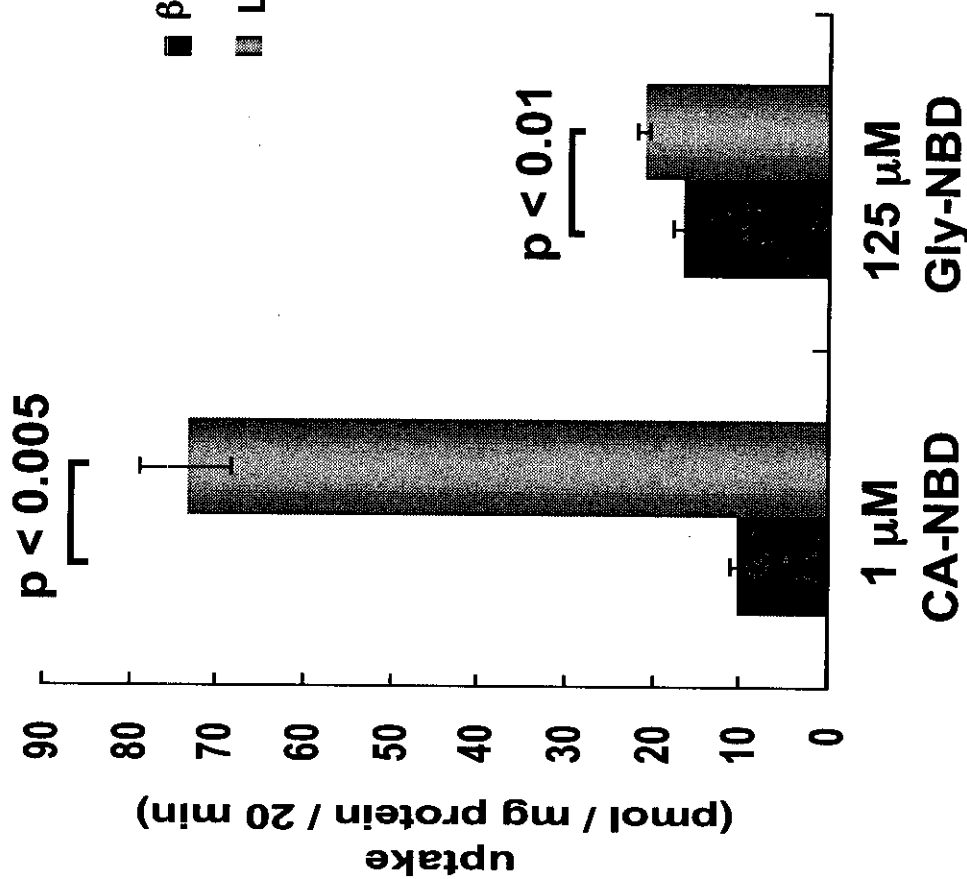
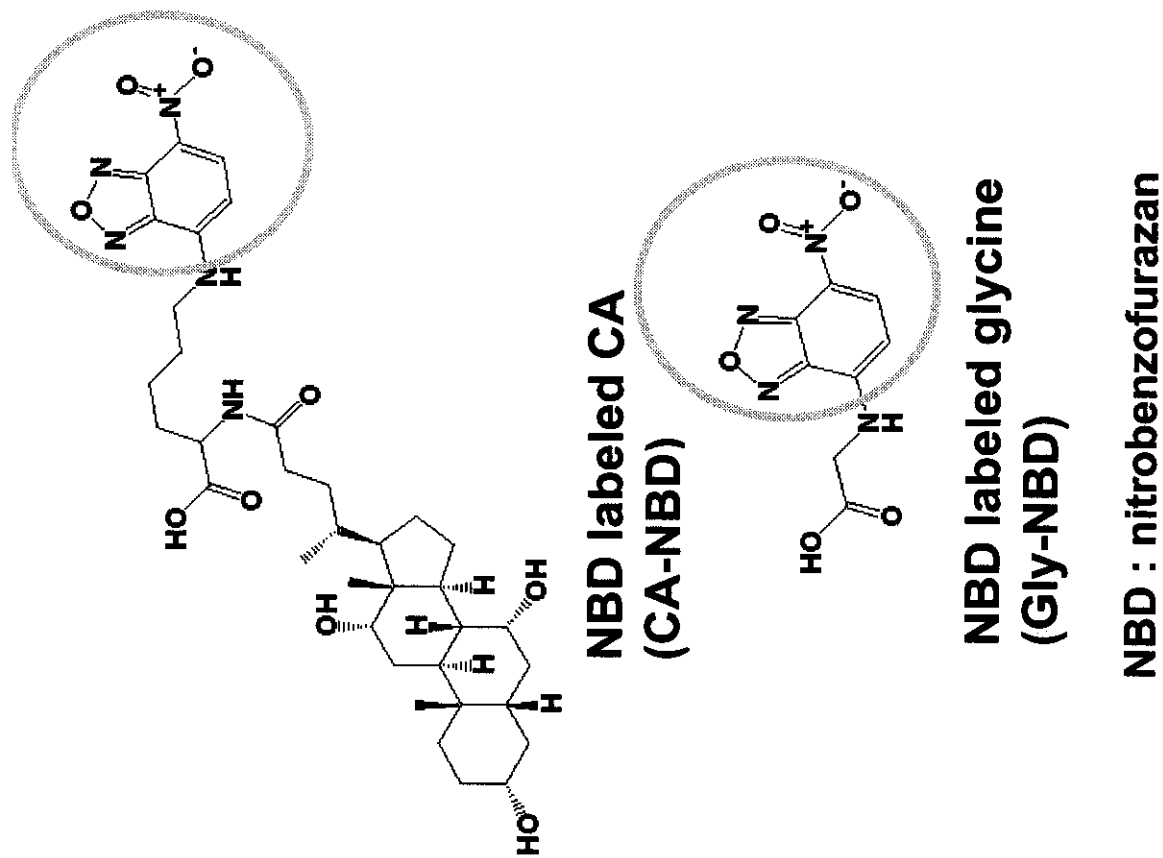


Fig.2 Uptake of NBD-labeled compounds in LST-2 overexpressed HepG2

1 μ M CA-NBD

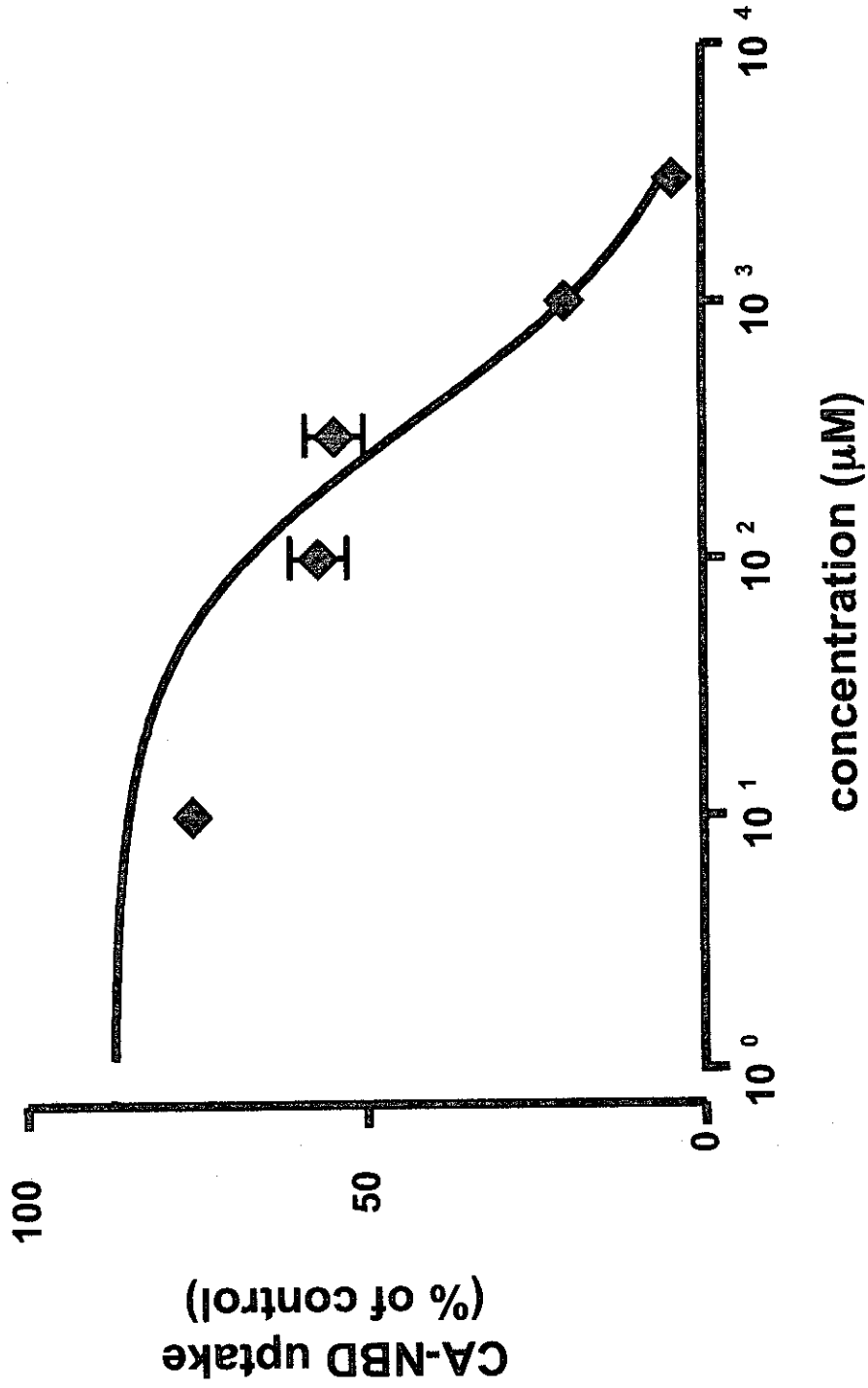


Fig.3 Dose dependent inhibition of cholic acid on fluorescence labeled cholic acid uptake via LST-2

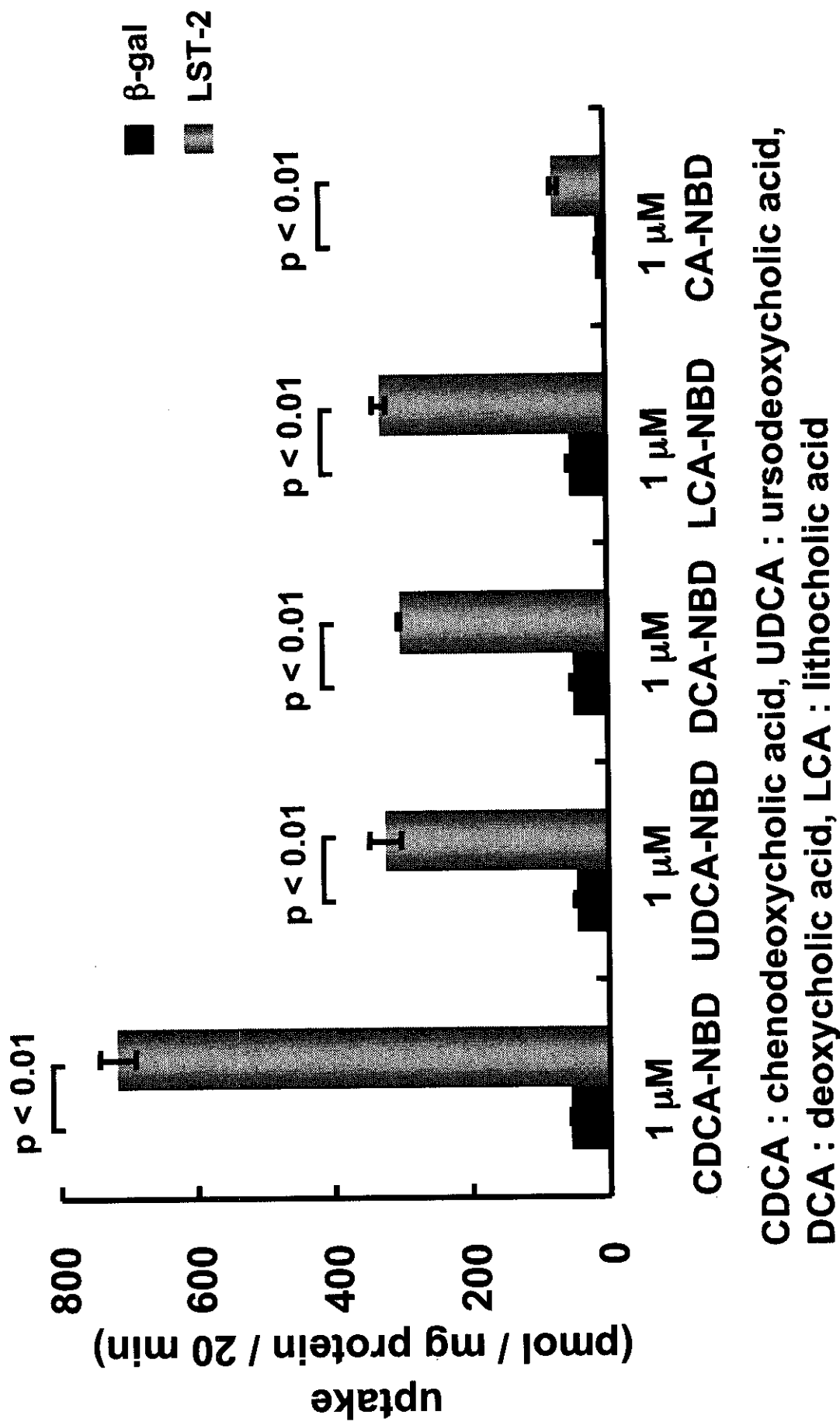


Fig.4 Uptake of NBD-labeled bile acids in LST-2 overexpressed HepG2