

平成15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

目 次

課題番号		
文献NO 20030933A KH61061	医薬品製造におけるプロセスバリデーションと科学的品質保証に関する研究	森川 馨 …… 1
KH61062 954A	生体適合性・機能性に優れた材料と評価技術の開発に関する研究	土屋利江 …… 20
KH61063 955A	標的指向型DDS製剤を用いた腎疾患治療方法の開発	名取泰博 …… 29
KH61064 956A	新規体外循環システムの創製と評価技術の開発	渋谷統寿 …… 32
KH61065 957A	健康被害をもたらす有害生物の制御・処理技術に関する研究	高鳥浩介 …… 36
KH62080 958A	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	松野正紀 …… 44
KH62083 959A	活性タンパク利用技術としての新規ドラッグ・デリバリー・システムの開発研究	五十嵐理慧 …… 47

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

研究要旨

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。

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

はアデノウイルス発現系の作製および遺伝子導入細胞の作製、および LST-2 遺伝子の転写調節について分担し研究を遂行した。

A. 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面で生体肝に比べて 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。

本年度は分担研究者：海野には培養モデルの確立の一環として、蛍光標識体を用いた基質検索の可能性を分担させ、分担研究者：阿部に

B. 研究方法

これまでに、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 のアデノウイルスを用いた強制発現系を確立し、その機能や発現を検討した。本年度は、分担研究者の海野倫明に、LST-1, LST-2 の機能を検討するため、蛍光標識体を用いた基質検索をテーマとして分担させ、研究を遂行した。また、分担研究者阿部高明には、アデノウイルスベクターの作製および有機アニオントランスポーター遺伝子導入 HepG2 細胞の作製を分担させた。また同時に、内因性の遺伝子発現を上昇させることは、肝補助装置として有用であることが考えられたため、LST-2 遺伝子の転写調節機構を解明し、発現が高まるメカニズムを明らかにすることを目的とした。具体的にはヒト LST-2 遺伝子上流域約 1500bp を単離しこれを luciferase 遺伝子と結合したレポータープラスミドを作製、これを種々の細胞株に導入し luciferase 活性を測定した。さらに核蛋白質を調整し Electrophoresis mobility shift assay を施行し、核酸-蛋白質複合体を検出した。また培養液中に胆汁酸を添加した際の luciferase 活性を測定し、胆汁酸による転写活性の変化を検討した。

C. 研究成果

LST-2 発現細胞では NBD 標識グリシンの取り込みは認められなかった。これより、LST-2 では NBD を認識した取り込みのないことが考えられた。また、LST-2 発現細胞ではコール酸及び、これまで輸送の報告がないケノデオキシコール酸、リトコール酸等の蛍光標識体の取り込みが認められた。さらに、蛍光標識コール酸の取り込みに対する非標識コール酸による阻害効果を検討すると、非標識体の増加に伴う蛍光標識体取り込み量の減少が認められた。

また、LST-2 遺伝子の発現調節に関しても多くの成果を得た。すなわちヒト肝細胞での LST-2 の発現は、HNF1、HNF3b、FXR の 3 つの転写因子により調節されていると考えられた。このうち、HNF1、HNF3b は肝特異的発現に重要であり、さらに FXR により自身の基質である胆汁酸により発現調節を受けていると考えられた。

D. 考察

肝臓の類洞側細胞膜上に局在している LST-1、LST-2 の 2 つのトランスポーターは肝機能の重要な役割を担っていると考えられる。肝臓由来培養細胞株を用いたハイブリッド型人工肝臓が考案されているが、我々の実験では肝由来培養細胞株 (HepG2 など) では LST-1、LST-2 の発現を欠いていることが明らかとなった。そこで、これらのトランスポーターを補完した細胞を使用することによりハイブリッド型人工肝臓の機能向上を目指した。

まずこれらトランスポーターの機能の詳細を明らかにすることを目的に基質特異性の検討を行った。従来は放射線化合物 (RI) を用いた検討しかされていなかったが、多くの非放射線標識体を用いた検討は困難であった。我々はアデノウイルスによる強制発現系および NBD 標識体による蛍光標識体での基質特性の検討に成功した。このことにより CDCA、DCA、LCA、UDCA が基質であることが明らかになった。本法を用いることによりさらに多くの基質特異性が明らかになることが予想される。

さらに肝細胞での転写調節機構を明らかにし、FXR、HNF1、HNF3b の 3 種の転写因子が重要であることを明らかにした。肝臓での、臓器特異的な遺伝子の発現には、数種類の肝臓に豊富に存在する転写因子 (Liver Enriched transcriptional families; LETFs) が深く関与

することが言われている。HNF1 と HNF3b はいずれも LETFs の転写因子とされており、これら 2 つの転写因子が、LST-2 の肝臓における特異的な発現にきわめて重要である可能性が示唆された。また FXR を介して CDCA、DCA などの胆汁酸が LST-2 遺伝子の転写を上昇させることが明らかとなった。本結果から胆汁うっ滞時、細胞外胆汁酸濃度が高い環境下で LST-2 の発現は増加すると考えられるが、これは取り込み側のトランスポーターとして、きわめて特徴的な LST-2 の性質と考えられる。他の取り込み側のトランスポーターが down regulate される中で、LST-2 の発現が増加することがどのような意味をもつのか、大変興味深い。

E. 結論

コール酸が LST-2 の基質となること、そのミカエリス定数が $85.3 \mu\text{M}$ であることを明らかにした。同時に CDCA、DCA、LCA も LST-2 の基質となる可能性が示された。またヒト肝細胞での LST-2 の発現は、HNF1、HNF3b、FXR の 3 つの転写因子により調節されていると考えられた。このうち、HNF1、HNF3b は肝特異的発現に重要であり、さらに FXR により自身の基質である胆汁酸により発現調節を受けていると考えられた。以上の結果より肝由来培養細胞株を用いたハイブリッド型人工肝臓を作製する際に、これらトランスポーターの機能を評価し、転写活性を向上することにより発現を高めることが可能であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

大塚英郎, 海野倫明, 片寄友他: ヒト肝細胞における Liver-Specific Organic Anion Transporter LST-2 の転写調節機構. 薬理と臨床 31 巻 Suppl.1, S89-93

Adachi, H., Suzuki, T., Abe, M., et al (2003) Molecular characterization of human and rat organic anion transporter OATP-D. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285, F1188-1197.

Suzuki, T., Onogawa, T., Asano, N., et al (2003) Identification and characterization of novel rat and human gonad-specific organic anion transporters. *Mol Endocrinol*, 17, 1203-1215.

2. 学会発表

海野倫明：胆汁酸による cyclooxygenase-2 の誘導と胆汁酸トランスポーターの役割：2003年8月：第10回消化管分子機構研究会（東京）
安藤敏典，海野倫明，溝井賢幸ら：癌細胞における有機アニオントランスポーターLST1・LST-2 強制発現による MTX 感受性増加：2003年6月：第103回日本外科学会（札幌）
大塚英郎，海野倫明，小野川徹ら：ヒト肝細胞における有機アニオントランスポーターLST-2 の転写調節機構：2003年6月：第103回日本外科学会（札幌）
大塩 博，海野倫明，大塚英郎ら：胆汁酸による cyclooxygenase-2 の誘導と胆汁酸トランスポーターの役割：2003年6月：第103回日本外科学会（札幌）
佐藤武揚，海野倫明，小野川徹ら：胆汁酸の腸肝循環を担う有機アニオントランスポーター：OATP-E の腸管における発現と細胞内局在：2003年6月：第103回日本外科学会（札幌）

F. 知的所有権の取得状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

平成15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16年9月30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