

## 高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発

所 属 杏林大学医学部総合医療科

研究者 永森 静志

研究要旨 高機能保持ヒト肝細胞と新3次元バイオリクターを利用し新薬開発時薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサー作製のため肝産生蛋白・薬物代謝能、抗HCV薬の薬効評価に適したRFB/HCV実験、肝細胞特異的遺伝子発現及び発現量の確認をした。

### 分担研究者

1. 金井好克 (杏林大学医学部)
2. 本間正充 (国立医薬品食品衛生研究所)
3. 長崎幸夫 (筑波大学学際物質科学)
4. 千葉寛, 細川正清 (千葉大学大学院薬学)
5. 宮崎正博 (岡山大学大学院医歯学総合研)
6. 鈴木哲朗 (国立感染症研ウイルス2部)
7. 小田裕昭 (名古屋大学大学院生命農学科)
8. 杉山俊博 (秋田大学医学部生化学)
9. 木下春喜, 西宮一尋 (中外製薬臨床薬理部)
10. 下遠野邦忠 (京都大学ウイルス研究所)
11. 市田隆文 (順天堂大学医学部)

### A. 研究目的

永森は、ヒト肝由来細胞とラジアルフロー型バイオリクター(RFB)を用いて高密度三次元培養し、ヒト肝に近似した機能発現能を解析のため以下のことを行った。1) ラジアルフロー型バイオリクターにおける培養方法の条件検討。2) 肝細胞特異的遺伝子の発現及び発現量の確認。中外製薬木下らは、薬物の *in vitro* 肝毒性評価パラメータとして用いる

ことができるバイオマーカーを FLC 細胞と NMR を用いたメタボノミクスにより検索した。

金井は、FLC の薬物代謝特性を評価するためには、細胞内の薬物代謝酵素群の研究だけでなく、薬物およびその代謝産物の細胞膜通過を可能にする薬物トランスポーターの評価を必須とし、FLC4 の薬物輸送に関わるトランスポーターの全体像を明らかにし、加えてバイオリクター上の FLC4 のトランスポーター発現を検討し。薬物トランスポーターの観点から FLC4 の高機能保持ヒト由来肝培養細胞株としての特性を評価することを目的とした。

長崎は、ヒト由来肝細胞による構造化した細胞アレイを開発。肝臓細胞をサイズのコントロールされたスフェロイド形態でアレイ状に形成し、長期間培養するシステムを構築することにある。特に内皮細胞をフィーダー細胞とすることによって肝臓スフェロイドアレイの機能を維持することを目的とした。

千葉は、ヒト肝由来細胞を用いた検討により、スタチンであるアトルバスタチン、フルバスタチン、セリバスタチンおよびシンバスタチンが hCAR を介し

た PBREM の転写活性化を起こすことが明らかにしその活性化のメカニズムとして、これら4種のスタチンが hCAR のリガンドとなる可能性を研究。細川は、カルボキシルエステラーゼ(CES)で新たに発見した2つの遺伝子の発現調節機構の違いおよびヒト肝の分化発生過程における遺伝子発現の差異について調べた。宮崎は、骨髄細胞より肝細胞類似細胞を作成し、アルブミン高発現ヒト肝細胞株の樹立を目指した。鈴木は、高分化型ヒト肝細胞癌株 FLC4 の RFB 培養系に C 型肝炎ウイルス (HCV) ゲノム RNA をトランスフェクション、または HCV 陽性血清を添加することで HCV の増殖系を作製し抗 HCV 薬の薬効評価系に適した RFB/HCV 実験系の開発を行った。杉山は、FLC4 を用いて自然界菌類のうち、肝細胞の維持、増殖、分化を制御するペプチド性因子を培養系において検索し、その薬理作用、安全性評価を確立すること。下遠野は、C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染により肝細胞における薬物代謝が正常肝細胞に比べてどのような変化を示すかについて、HCV ゲノムの複製細胞を用いて定量及び定性的な解析をおこなう事を目的とし、HCV ゲノムが効率よく複製する細胞の樹立とその細胞を用いたウイルスゲノム複製を制御する因子に関する研究。

## B. 研究方法

永森はラジアルフローバイオリアクター (RFB) による培養方法とその肝細胞機能の検討。さらに委託研究報告書に詳細記載。木下はラジアルフロー培養した FLC 細胞に肝毒性を有するヒドラジンを添加。サンプリングとし NMR 測定用試料とした。スペクトルを数値化して主成分分析。

金井は (分担研究報告書に詳細記載) FLC の輸送系 L の機能解析。FLC4 におけるトランスポーターの発現解析。

RFB で FLC4 の肝臓特異的遺伝子の発現変化をみた。長崎は①ガラス表面の PEG 化 ②スポットターによるアルカリエッチングパタンニング ③解析電子スピン共鳴ゼータ電位測定とタンパク吸着試験。

千葉・細川は、千葉はヒト肝がん由来細胞株である FLC7 細胞を用いて、luciferase assay をおこない、細川はヒト成人肝およびヒト胎児肝より合成した cDNA を用いて、2 種類の CES HU1 および  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) の mRNA 発現量を realtime-PCR 法を用いて測定した。

宮崎は、1. 骨髄細胞培養。 2. 免疫細胞化学染色。

3. RT-PCR を用いた。鈴木は、full-length HCV genome (type 1b)及びネオマイシン耐性遺伝子を含む dicistronic RNA を Huh7 細胞へ導入し、G418 存在下培地で約3週間培養することによって、dicistronic RNA を保持した細胞株 (RCYM1) を樹立した細胞を利用した。

杉山方法： 詳細は分担研究報告書参照。

下遠野は、(1) HCV ゲノム自律複製細胞中のウイルスゲノム RNA の末端構造の解析。(2) HCV ゲノム複製を制御する細胞側因子の解析。

## C. 研究結果

永森： 第 1 回ラジアルフローバイオリアクター (RFB)培養実験。

培養結果 (1) 細胞数：1×10<sup>8</sup> 個であり、30mL 容量のリアクターにおいては適当量であると考えられる。

\* 第 2 回 RFB 培養実験。

培養結果：(1)Albumin(Alb)と  $\alpha$ フェトプロテインの発現 PCR 施行。単層培養と RFB 培養での FLC4 細胞における、コントロール遺伝子(GAPDH)及びアルブミン遺伝子と  $\alpha$ フェトプロテイン遺伝子の発現確認。GAPDH は単層培養と RFB 培養のどちらにおいても発現の確認が出来た。アルブミンは単層培養のほうが、発現量が多かった。 $\alpha$ フェトプロテインは、単層培養も RFB 培養も発現がみられなかった。protocadherin LKC 遺伝子の発現確認 PCR の結果は RFB 培養では、単層培養と比較すると発現量が少ないと考えられる。(2) RFB による培養での FLC4 の分化を肝臓特異的機能面から評価；マイクロアレイでの遺伝子発現解析。

	3D	2D	
albumin	41.17	3.534	NM_000477
AFP	0.824	A	NM_001134
Transthyretin	2.047	A	NM_000371
G	3.554	0.64	NM_002065
glutaminesynthase			
G6Pase	0.868	A	NM_000151
PEPCK2	0.736	A	NM_004563
TDO2	3.2234	A	NM_005651
HNF3 $\alpha$	2.516	0.595	NM_004496
HNF3 $\beta$	0.673	A	NM_021784
HNF3 $\gamma$	1.365	A	NM_004497
HNF1 $\alpha$	0.495	A	NM_000545

CEBP  $\alpha$  1.848 0.713 NM\_004364  
 マイクロアレイのシグナル値 (Normalized signal) A :  
 absent (シグナルが弱いため検出されなかったもの)

PCDHB3	1.879	0.903	NM_018937
PCDHB9	2.766	A	NM_019119
PCDHB13	3.396	0.861	NM_018933
MUCDHL	A	A	NM_031264
PC-LKC	A	A	NM_017675

\* 第3回/4回 RFB 培養実験。

1、培養目的：肝細胞における proto-cadherin LKC の発現；(担体：ハイドロキシアパタイト( $\Phi$ 0.5mm))

2、培養結果

(1) 肝細胞特異的遺伝子の発現確認 PCR : proto-cadherin LKC 遺伝子、 $\alpha$ フェトプロテイン遺伝子、アルブミン遺伝子の発現確認。proto-cadherin LKC は、わずかに確認できるが、 $\alpha$ フェトプロテインとアルブミンは確認できなかった。CYP3A4 遺伝子の発現確認。単層培養も RFB 培養も確認はできなかった。PCR のサイクル数を 25 サイクルにして、proto-cadherin LKC 遺伝子の確認を行った。RFB 培養は、はっきりと発現が確認できた。PCR のサイクル数を 35 サイクルにして、アルブミン遺伝子、 $\alpha$ フェトプロテイン遺伝子、glutamate-ammonia ligase(GLUL)遺伝子の確認を行った結果。全ての遺伝子に於いて、単層培養でも RFB 培養でも発現の確認ができた。phosphoenolpyruvate carboxykinase2(PCK2) 遺伝子、tyrosine aminotransferase(TAT) 遺伝子、hepatocyte nuclear factor4  $\alpha$  (HNF-4  $\alpha$ ) 遺伝子、enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP  $\alpha$ ) 遺伝子及び glucose-6-phosphatase(G6Pase) 遺伝子の発現確認。TAT 遺伝子と G6Pase 遺伝子は RFB 培養の発現量が多い。RT-PCR では Protocadherin-LKC の発現増加、今回のマイクロアレイではシグナルが検出されなかった。定量 PCR で Protocadherin-LKC と E-cadherin の発現を検討した。定量 PCR では RFB 培養により Protocadherin-LKC は約 3.7 倍、E-cadherin は約 1.9 倍の発現変化がそれぞれ見られた。

	FLC4_3D	FLC4_2D	
CDH1(E cadherin)	1.75	0.508	NM_004360
CDH17(Liver - intestine)	3.318	0.73	NM_004063
CDH6 (fetal kidney)	3.573	0.828	NM_004932
PCDH1	3.559	A	NM_002587
PCDH7	2.603	A	NM_032456
PCDH15	2.897	1.725	NM_033056
PCDHB2	11.74	3.167	NM_018936

\* 第5回 RFB 培養実験。

1、培養目的：肝細胞特異的遺伝子発現

2、培養結果：(1) 肝細胞特異的遺伝子の発現確認 PCR : 今回の RFB 培養後のサンプルを用いて、Albumin(Alb), alfa-fetoprotein(AFP), glutamate-ammonialigase(GLUL), phosphoenolpyruvate carboxykinase2(PCK2), tyrosine aminotransferase(TAT), hepatocyte nuclear factor4  $\alpha$  (HNF-4  $\alpha$ ), enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP  $\alpha$ ), glucose-6-phosphatase(G6Pase)の発現確認 PCR を行った。全ての遺伝子において、単層培養と RFB 培養の発現量を比較した場合、ほぼ同じであった。(2) RFB による培養での FLC4 の分化を肝臓特異的機能面から評価する。

\* 肝臓特異的遺伝子 9 分子による RT-PCR 結果 (プライマー: 分子名、acc#, Forward Primer sequence, Reverse Primer sequence、product size、Annealing Temp)

マイクロアレイでの遺伝子発現解析

	3D	2D	
albumin	41.17	3.534	NM_000477
AFP	0.824	A	NM_001134
Transthyretin	2.047	A	NM_000371
glutamine synthase	3.554	0.64	NM_002065
G6Pase	0.868	A	NM_000151
PEPCK2	0.736	A	NM_004563
TDO2	3.2234	A	NM_005651
HNF3 $\alpha$	2.516	0.595	NM_004496
HNF3 $\beta$	0.673	A	NM_021784
HNF3 $\gamma$	1.365	A	NM_004497
HNF1 $\alpha$	0.495	A	NM_000545
CEBP $\alpha$	1.848	0.713	NM_004364

マイクロアレイのシグナル値 (Normalized signal)

A : absent (シグナルが弱いため検出されなかったもの)

\* 第6回 RFB 培養実験。1、培養目的：肝細胞における血液凝固因子の発現

2、培養条件 (1) 細胞：JHH-7 (2)：血液凝固因子 mRNA 発現状況。10cm dish で単層培養を行った JHH7 細胞から抽出された total RNA 1 $\mu$ g を逆転写して PCR の鋳型として使用した。単層培養での結果ではあるが、JHH7 細胞は多くの凝固因子が発現していた。

\* 第7回 RFB 培養実験

1、培養目的：RFB の薬物肝毒性評価系としての有用性を NMR による評価をするため施行した。

(中外製薬報告書に詳細記載。)

培養液の NMR 測定：NMR 測定。1ppm 付近のシグナルが有意に増加していることが分かった。

木下・西宮結果：培養液中ヒドラジン濃度を 100  $\mu$ M および 4 mM 添加した両方のスペクトルにおいて、1.56 ppm の doublet のシグナルの面積値が経時的に増加する傾向が見られた。この NMR スペクトルの主成分分析では 1.56 ppm のシグナルが影響して主成分 1 で変動の 97%以上が説明される結果となった。金井は、FLC4 の輸送系 L。FLC4 を 24 穴プレート上に培養し、14C-ロイシンの取り込みを測定した。LAT3 の特性と一致し、LAT3 が FLC4 の主要なアミノ酸輸送系 L であることが明らかになった。FLC4

における薬物トランスポーターの発現：RFB により三次元培養において FLC4 を 10 日間培養し、平面培養で培養した FLC4 の遺伝子発現をマイクロアレイ解析により比較した。Tyrosine aminotransferase、Glucose-6-phosphatase、Albumin、Protocadherin-LKC、HNF4  $\alpha$  各遺伝子において、ラジアルフローバイオリアクター三次元培養で平面培養と比較して発現の上昇が観察された。これに対して、alpha fetoprotein、Glutamine synthase、Phosphoenolpyruvate carboxykinase 各遺伝子に関しては、25 サイクル以上 (25、27、30 サイクル) 変化は認められなかった。C/EBP $\alpha$  遺伝子に関しては、逆にラジアルフローバイオリアクター三次元培養において発現が減少していた。

長崎：細胞パタンニング：TES-PEG を固定化しアルカリエッチングによりパタン化した表面にウシ頸動脈正常血管内皮細胞 (HH) を播種。内皮細胞はパタン外側にまで接着・進展し、細胞パタンの実現が困難であった。両末端ビニル基を有するポリエチレングリコール (MA-PEG-MA) と光重合開始剤を用いたフォトリソグラフィーによるパタン化表面では、光重合した部分に細胞が接着。このパタン化表面に、同じく内皮細胞を播種し細胞のパタン化表面構築を確認。この内皮細胞のパタン上からヒト肝癌細胞 (HuH7) を播種し、肝癌のスフェロイドアレイが得られた。

千葉は、1. TCPOBOP および androstanol に対する mCAR および hCAR の反応性；2. 種々の薬物に対する hCAR の反応性；3. hCAR の反応性に関するスタチン添加による濃度依存性；4. スタチンによる転写活性の上昇に対する androstanol の影響；5. 変異型 hCAR による転写活性とスタチンおよび androstanol による影響；6. mCAR に対するスタチンおよび androstanol の反応。

細川は、1. ヒト肝の分化・ヒト肝がん由来細胞株における 2 つの CES HU1 遺伝子の転写活性における差異。ヒト肝がん由来細胞株における 2 つの CES HU1 の mRNA 発現量の差異を確認。培養条件の変更による CES HU1 mRNA 発現様式の変動と CES HU1 の細胞内移行性を証明した。

宮崎は、ラット骨髄細胞中に HGF の受容体である c-Met を発現する細胞が存在するか否かを免疫染色法により検索、約 3% が c-Met 陽性であった。c-Met

陽性細胞は、胎児肝細胞のマーカーである AFP 抗体に反応することも分かった。また、RT-PCR によりこれらのタンパク質の遺伝子の発現が確認。

肝細胞の最終分化マーカーである tryptophan-2,3-dioxygenase (TO) および tyrosine aminotransferase (TAT)の遺伝子発現は認められなかった。骨髄細胞を HGF および EGF を添加した HGM 培地で培養し、アルブミンのほか肝細胞の最終分化マーカーである TO および TAT を発現する肝細胞類似の細胞を誘導した。

鈴木は、Huh7/RFB 培養法の条件検討を行った。細胞増殖が速く安定した培養環境が得られにくいため長期間の三次元培養化に不適と判断した。培地を FLC4 細胞の培養に用いている ASF104 培地に換えたところ、2% FCS 存在下で至適培養条件を得ることができた。次に RCYM1 細胞をこの条件で RFB 培養し、産生される HCV-RNA、蛋白の解析を行った。単層培養の RCYM1 細胞では、細胞内での HCV 遺伝子複製、全 HCV 蛋白質の産生、プロセッシングが認められるが、このとき培養上清中からは密度 1.04-1.10 g/mL の分画に低量ながら HCV-RNA が検出された。一方、RFB 培養の培養上清からは 1.04-1.10 g/mL 分画に検出された HCV-RNA の約 10 倍量が密度 1.18 g/mL 分画をピークとして検出された。コア蛋白質の分布も同密度をピークとしていること、この 1.18 g/mL のピークは NP40 処理によって 1.23 g/mL へシフトすることがわかった。この 1.18 g/mL 分画について電子顕微鏡観察を行ったところ、直径 30-60 nm の二重構造を有するウイルス様粒子が認められた。単層培養の同密度分画、RFB 培養の 1.04-1.10 g/mL 分画からはこの粒子様構造物は検出されなかった。

杉山は、スクリーニングは XTT 法を用いた。1,123 種の放線菌の培養液をスクリーニングした。その結果 16 の陽性サンプルを見だし、さらに様々な条件で調べた結果 #675 の培養上液がもっともよく FLC4 細胞を増殖させることがわかった。2. 添加により、DNA 断片化が防がれ、カスパーズやその基質である PARP の分解が #675 の添加より濃度依存的に抑制された。

下遠野結果: HCV ゲノムの複製は二本鎖 RNA により誘導される自然免疫により強く制御されることが分かった。詳細は分担研究報告書参照。

### C. 考察

永森: ラジアルフロー型バイオリアクターにおける

培養方法の条件検討しさらに安定した培養操作の改良が望まれた。2) 肝細胞特異的遺伝子の発現及び発現量を確認したが、さらに確実な成果を目指す。木下西宮考察: NMR 測定ならびに主成分分析から、濃度依存的に増加していると考えられるシグナルを検出した。培養液の組成、NMR のシグナルから推定するとその化合物はバリン、ロイシン、イソロイシン等の分枝鎖アミノ酸ではないかと推定される。今後以下、3点の実験を行い、FLC 細胞を用いた NMR によるメタボミクスの *in vitro* 肝毒性評価システムとしての有用性を評価する予定である。

金井: FLC の薬物代謝特性を評価するためには、細胞内の薬物代謝酵素群の研究だけでなく、薬物およびその代謝産物の細胞膜通過を可能にする薬物トランスポーターの評価を行うことが必須である。FLC の薬物代謝系としての総合的な評価が可能となる。FLC4 の薬物輸送に関わるトランスポーターの全体像を明らかにし、バイオリアクター上の FLC4 を薬物トランスポーターの観点から肝細胞と比較すること。来年度以降は、培養条件のさらなる検討による最適化を行い、RFB 上の FLC4 の全薬物トランスポーターの発現量の把握と肝細胞との比較による薬物トランスポーターの観点からの FLC4 の評価を行う。またヒトゲノム上に見出される多くの機能未同定のトランスポーター (オルファントランスポーター) の機能を明らかにし、その肝細胞における役割を明らかにしていくこともポストゲノムの重要な要請事項である。

長崎: 構造化した細胞アレイ表面を構築するために、機材表面の処理法およびパタン化に関して詳細に検討した。ガラス機材上に構築した PEG ブラシをアルカリエッチングでパタン化した場合、タンパク質のパタンは明確に作製できるものの、細胞アレイには至らなかった。フォトリソグラフィーで作製されたものはきれいな内皮細胞パターンを与え、その上に株価細胞および初代細胞のパタンニングが達成された。このパターンは数週間から1ヶ月以上培養可能であり今後の展開が期待される。

千葉: 本研究では hCAR のリガンドとなる薬物を同定することを目的とし、ヒト肝がん由来細胞株である FLC7 細胞に hCAR とその活性化領域である PBREM を共発現させ、51 種の薬物についてスクリーニングをおこなった。その結果、HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるセリバスチンおよびシンバスタチンが hCAR を介した PBREM の転写活性化を引き起

こすことが明らかとなった。また、その転写活性はスタチンの濃度によるアトルバスタチン、フルバスタチン、セリバスタチンであり、さらに、スタチンによる転写活性の上昇は hCAR 依存性の不活性化リガンドである androstanol によって阻害された。これらの結果より、アトルバスタチン、フルバスタチン、セリバスタチンおよびシンバスタチンが hCAR のリガンドとなる可能性が強く示唆された。さらに、mCAR に対してもフルバスタチン、セリバスタチンおよびシンバスタチンは PBREM の転写活性化を起こし、これら3種のスタチンが mCAR のリガンドとなる可能性も示唆された。最近、ヒト初代肝細胞においてスタチンが CYP2B6 mRNA 発現の誘導を引き起こすことを報告されているが、そのメカニズムは不明であった。今回得られた結果は、アトルバスタチン、フルバスタチン、セリバスタチンおよびシンバスタチンが hCAR を活性化することを示唆するものであり、このことが CYP2B6 の誘導を引き起こしたものと推察された。本研究では hCAR の 166 番目のアミノ酸残基で、ligand binding domain (LBD) 内に存在するスレオニンをアラニンに置換したもの (T166A) およびグリシンに置換したもの (T166G) を用いてアミノ酸置換が転写活性に及ぼす影響を検討した。薬物無添加時における hCAR を介した PBREM の転写活性は、野生型が最も高く次いで T166G および T166A の順であった。hCAR の内因性リガンドの存在は明らかではないが、今回検討したアミノ酸置換が LBD 内にあることを考えると、内因性リガンドの hCAR に対する反応性が野生型で最も高く、次いで T166G および T166A の順であることが考えられる。また、スタチン添加による転写活性の上昇はスタチン無添加時とは異なり、T166G が最も大きく、次いで T166A、野生型の順であった。このことから、スタチンに対する hCAR の反応性は野生型よりもむしろ T166G あるいは T166A のほうが高いということが考えられる。また、スタチンと androstanol の同時添加による転写活性の低下は、スタチンのみを添加した時に比べて野生型で最も大きく、次いで T166G、T166A の順であった。よって、androstanol の hCAR に対する反応性が野生型で最も高く、次いで T166G および T166A の順であると考えられる。また、アトルバスタチンは野生型 hCAR に対しては転写活性化を示したが、T166A および T166G の変異型に対してはいずれも転写活性化を示さなかった。このように、hCAR の一つのアミノ酸

置換が hCAR を介した化合物反応性を変化させることが示された。また、現在までに、アミノ酸置換を伴う一塩基変異の存在が hCAR に関して発見されていることを考慮すると、これらの変異型における薬物反応性の差異が CAR を介した CYP2B6 などの誘導性に個人差を生じる原因となる可能性が示唆される。

細川: inverted duplication の結果生じたと考えられる2つの遺伝子 CES HU1a および CES HU1b のヒトの分化・発生過程における発現の差異、および CES HU1 タンパクの細胞内移行性について検討をおこなった。

CES HU1b は、ヒト肝において胎生期にはほとんど発現していないが分化に伴い発現することから、成熟期における生体外異物の解毒に大きな役割を果たしている可能性が示唆された。

宮崎: 骨髄細胞を HGF および EGF を添加した HGM 培地で培養することにより、アルブミン、AFP、CK-8、CK-18 のほか肝細胞の最終分化マーカーである TO および TAT を発現する肝細胞類似の細胞を誘導した。継代培養可能であり、111 日間に少なくとも 1,000 倍に増殖した。しかし骨髄幹細胞の十分な増殖と肝細胞への最終分化を誘導するためには、より適切な培養条件を決定しなければならないと思われた。骨髄に存在する造血幹細胞および間葉系幹細胞のいずれからも、in vivo および in vitro において成熟肝細胞を分化誘導できることが明らかとなった。従来、組織幹細胞は胚性幹細胞 (ES 細胞) のような全能性を持たず、ある限られた範囲での分化能を有すると考えられてきた。しかし、最近の研究により、組織幹細胞の分化能は予想以上に可塑性に富んでいることが分かった。この可塑性が分化転換によるのか、脱分化・再分化によるのか、あるいは全能性の幹細胞が存在するのかどうかは現在のところ不明である。鈴木: dicistronic HCV-RNA を保持する細胞株を RFB システムで三次元培養することにより HCV 様粒子の産生及び細胞外への放出が認められるようになることが示唆された。これまで、full-length dicistronic HCV-RNA を用いた発現系では、全 HCV 蛋白質の産生、遺伝子複製は効率よく行われているにも関わらずウイルス粒子の産生は確認されていなかった。このような Huh7 細胞の単層培養系では HCV 粒子の形成に必要な何らかの宿主因子が欠如している可能性が考えられてきたが、今回得られた知見から、この「宿主因子」が RFB 培養系では供給されている可能

性が考えられた。三次元培養肝細胞では細胞の極性形成、分化機能が単層培養系に比べ生体に近いことが示されているが、これらの特徴が HCV 蛋白質のアセンブリー、細胞内輸送に関連しているのかもしれない。

杉山: 肝臓に存在する幹細胞を維持・増殖する因子を数種類発見できたが、残念ながら同定までに至っていない。今後、この放線菌培養上液のペプチド性増殖因子の精製と性質を解析し、増殖活性を持ったペプチド性因子のアミノ酸構造を決定し、人工的なペプチドを合成する予定である。

下遠野: 本研究では特にウイルスゲノム複製を制御しているウイルスタンパク質からの解析と自然免疫によるウイルス複製制御について解析をおこなった。HCV複製において中心的な役割を担うのがウイルスポリメラーゼである。本ポリメラーゼはウイルス RNA を鋳型として、プラス鎖からはマイナス鎖を、マイナス鎖からはプラス鎖を産生する。本研究ではマイナス鎖から産生されるプラス鎖の末端構造を解析した。その結果、5' 末端に特別な修飾構造は存在せず、単にリン酸が付加した状態になっていると考えられる結果を得た。これまでにフラビウイルス科の中でも、フラビウイルス属に入るウイルスの 5' 末端はキャップ構造を持つものに対して、ペストウイルス属に入るものの末端構造は明らかでない。HCVはこの科の中の第3番目の属に分類されるウイルスであるが、これらの属のウイルスゲノムの末端にはキャップが付加されていないことを示唆する。また、ゲノム末端構造の解析から末端の塩基配列が冗長であることを示す結果が得られた。これはウイルスポリメラーゼの特徴なのかあるいは、別の要因により変化が生じるのか大変興味を持たれる。この結果はポリメラーゼを標的とした抗HCV剤の開発にも重要な情報を与えると期待される。HCVゲノム複製が自然免疫機構で強く抑制されることを明らかにした。すなわち、二本鎖 RNA によりプライムされるインターフェロンシグナルの初期過程が正常に働く場合にはインターフェロン効果が強く現れるが、そうでない場合には内在性のインターフェロン産生は強く抑制されその結果HCVゲノム複製を許すと考えられる。このようなことが感染患者の生体内でも生じているとするなら、インターフェロン投与に加えて自然免疫を外因的に活性化すれば一層効率よくHCVゲノム複製を抑制出来ると考えられるので、今後の治療に明るい情報になる。

#### D. 結論

永森結論: 自己樹立した FLC および JHH 系のヒト肝由来細胞と新しく開発した 3 次元培養法であるラジアルフローバイオリクター (RFB) のシステムにより、新薬開発時薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサー作製のため肝産生蛋白・薬物代謝能、抗 HCV 薬の薬効評価に適した RFB/HCV 実験、肝細胞特異的遺伝子発現及び発現量の確認をした。木下春喜、西宮一尋結論: ヒドラジンをラジアルフロー培養した FLC 細に添加し、経時的に増加するピークを検出した。金井結論: FLC4 のアミノ酸輸送特性の検討により、FLC4 で同定した肝細胞型新規アミノ酸トランスポーター LAT3 が、FLC4 の主要なアミノ酸トランスポーターであることが確認され、FLC4 の高機能保持ヒト由来肝培養細胞株としての特性がアミノ酸トランスポーターの観点からも指示された。今後全トランスポーターの網羅的解析に基づき、特に薬物トランスポーターの観点からの FLC4 の評価を行うとともに、FLC4 の三次元培養における薬物トランスポーターの特性を明らかにする。長崎結論: 細胞アレイを形成させる基板表面の処理法とパタンニング技術と構造化した細胞アレイ表面を構築するために、機材表面の処理法およびパタン化に関して詳細に検討した。ガラス機材上に構築した PEG ブラシをアルカリエッチングでパタン化した場合、タンパク質のパタンは明確に作製できるものの、細胞アレイには至らなかった。一方フォトリソグラフィで作製されたものはきれいな内皮細胞パタンを与え、その上に株価細胞および初代細胞のパタンニングが達成された。このパタンは数週間から 1 ヶ月以上培養可能であり、今後の展開が期待される。千葉結論: ヒト肝由来細胞を用いた検討により、スタチンであるアトルバスタチン、フルバスタチン、セリバスタチンおよびシンバスタチンが hCAR を介した PBREM の転写活性化を起こすことが明らかとなった。その活性化のメカニズムとして、これら 4 種のスタチンが hCAR のリガンドとなる可能性が示唆された。細川結論: ヒト肝由来細胞株を用いることにより、ヒト肝に発現する 2 つの CES 遺伝子の発現様式が肝の分化に伴っていることが推察され、2 つの CES 遺伝子の発現時期の違いが、異物代謝における役割の違いを反映するものと考えられた。

宮崎結論: 骨髄細胞を HGF および EGF を添加した HGM 培地で培養することにより、アルブミン、AFP、CK-8、CK-18 のほか肝細胞の最終分化マーカーであ

る TO および TAT を発現する継代培養可能な成熟肝細胞類似の細胞を誘導できることが明らかとなった。ヒト骨髄より肝前駆細胞を分画し、培養基質、培地、培養法などの工夫によって、増殖可能な前駆細胞を高い効率で肝細胞に分化誘導できれば、生体内移植による肝不全治療に直接使用し得る理想的な細胞になり、体外設置型人工肝臓や薬品開発研究のためのヒト肝細胞を潤沢に供給するソースとなるであろう。鈴木結論： full-length dicistronic HCV-RNA を保持した細胞株の RFB 培養系で、培養上清中 1.18 g/mL 分画に HCV-RNA、コア蛋白質のピークが認められ、直径 30-60 nm のウイルス様粒子が観察された。

杉山結論： 肝細胞(FLC4)を用いて、自然界菌類のうち、放線菌新規産生物が肝細胞の維持、増殖を制御することが判明した。FLC4 に対する#675 の増殖促進効果について、アポトーシスの抑制を介して細胞が維持されているというメカニズムが考えられた。今後ペプチド性因子を培養系において検索し、その薬理作用、安全性評価を確立する。下遠野結論： HCVゲノム自律複製細胞を用いて、ウイルスゲノムの構造を明らかにした。その結果、本細胞においてはウイルスポリメラーゼによる転写開始におけるヌクレオチド選択の冗長性が明らかになった。また、これらの情報をもとにして転写開始機構については試験管内と生体内とはかなり異なる可能性が示唆され、ポリメラーゼによる RNA 合成開始を標的にする抗HCV剤の開発には慎重を要することが示唆される。

自然免疫がHCVゲノム複製を強く制御することを示した。この成果は、HCV感染初期における樹状細胞の活性化の機構を考える上に重要な知見を与えると期待されるし、インターフェロン治療により効果が出にくい患者に対する治療法についても新たな知見を与えるものである。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

\*Miyazaki M, Sakaguchi M, Akiyama I, Sakaguchi Y, Nagamori S, and Huh N: Involvement of IRF-1 and S100C/A11 in growth inhibition by TGF- $\alpha$ 1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Research*, 64 (12), 4155-4161, 2004.

\*Akiyama I, Tomiyama K, Sakaguchi M, Takaishi M, Mori M, Hosokawa M, Nagamori S, Shimizu N, Huh N, and Miyazaki M: Expression of CYP3A4 by an

immortalized human hepatocyte line in a three-dimensional culture using a radial-flow bioreactor. *International Journal of Molecular Medicine*, 14 (4), 663-668, 2004.

\*Tsuboi S, Nouse K, Tomono Y, Nagamori S, Naito I, Watanabe T, Manabe K, Ohmori H, Nakatsukasa H, Miyazaki M, Higashi T, Shiratori Y, Namba M, and Ninomiya Y: Anti-endostatin monoclonal antibody enhances growth of human hepatocellular carcinoma cells by inhibiting activity of endostatin secreted by the transplanted cells in nude mice. *International Journal of Oncology*, 25 (5), 1267-1271, 2004.

\*Mari Tabuchi, Yoshinori Katsuyama, Kazuma Nogami, Hideya Nagata, Keisuke Wakuda, Masayuki Fujimoto, Yukio Nagasaki, Kenichi Yoshikawa, Kazunori Kataoka and Yoshinobu Baba, A design of nanosized PEGylated-latex mixed polymer solution for microchip electrophoresis, *Lab on a Chip*, 5,199-205(2005)

\*Takehiko Ishii, Masayoshi Yamada, Takumi Hirase and Yukio Nagasaki, New Synthesis of Heterobifunctional Poly(ethylene glycol) Possessing a Pyridyl disulfide at One End and a Carboxylic Acid at the Other End, *Polymer Journal*, 37(3), 221-228 (2005)

\*Hirota T, Ieiri I, Takane H, Maegawa S, Hosokawa M, Kobayashi K, Chiba K, Nanba E, Oshimura M, Sato T, Higuchi S, Otsubo K. Allelic expression imbalance of the human CYP3A4 gene and individual phenotypic status. *Hum Mol Genet*. 2004 13(23):2959-69.

\*Tsuboi S, Nouse K, Tomono Y, Nagamori S, Naito I, Watanabe T, Manabe K, Ohmori H, Nakatsukasa H, Miyazaki M, Higashi T, Shiratori Y, Namba M, and Ninomiya Y: Anti-endostatin monoclonal antibody enhances growth of human hepatocellular carcinoma cells by inhibiting activity of endostatin secreted by the transplanted cells in nude mice. *International Journal of Oncology*, 25 (5), 1267-1271, 2004.

\* Suzuki R., Sakamoto S., Tsutsumi T., Rikimaru A., Shimoike T., Mizumoto K., Matsuura Y., Miyamura T., and Suzuki T. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.*, 79: 1271-1281 (2005).

\*Suzuki T., Suzuki R., Li J., Hijikata M., Matsuda M., Li T-C., Matsuura Y., Mishiro S., and Miyamura T. Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome. *J.*

Viol., 78: 10820-10824 (2004).

\* Sugeno H., Takebayashi Y., Higashimoto M., Ogura Y., Shibukawa G., Kanzaki A., Terada K., Sugiyama T., Watanabe K., Katoh R., Nitta Y., Fukushima T., Koyama Y., Inoue N., Sekikawa K., Ogawa K., Sato Y., Takenoshita S. Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) in human hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.*, 24, 1045-1048 (2004).

\*Zhang, J., Yamada, O., Sakamoto, T., Yoshida, H., Iwai, T., Matsushita, Y., Shimamura, H., Araki, H., and Shimotohno, K.: Down-regulation of viral replication by adenoviral-mediated expression of siRNA against cellular cofactors for hepatitis C virus. *Virology*, 320; 135-143.2004

\*Shimakami T., Hijikata M., Luo H., Ma Y. Y., Kaneko S., Shimotohno K. and Murakami S.: Effect of Interaction between Hepatitis C Virus NS5A and NS5B on Hepatitis C Virus RNA Replication with the Hepatitis C Virus Replicon. *J. Virology*, 78; 2738-2748. 2004

\*Kodama Y., Hijikata M., Kageyama R., Shimotohno K. and Chiba T. : The Role of Notch Signaling in the Development of Intrahepatic Bile Ducts. *Gastroenterology*. 127; 1776-1786. 2004.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特許取得

発明の名称：高機能保持ヒト肝由来細胞樹立

発明者：Nagamori et al.

特許取得日：1995.

特許番号：U.S.A. Patent No.5.804.441)

特許出願

発明の名称：肝炎ウイルスの増殖方法及び装置

発明者：永森静志

出願人：科学技術振興事業団

特許出願日：2002年8月21日

国際出願番号：PCT/JP00/05582

特許出願

発明の名称：ハイブリッド型人工肝臓

発明者：永森静志、旭メディカル株式会社

特願平9-58650

### 2. その他

なし。