

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

ヒト肝3次元培養系、マウス・ヒト肝細胞融合系による
新規医薬品毒性評価系に関する基盤研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小澤 正吾

平成18(2006)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
ヒト肝3次元培養系、マウス・ヒト肝細胞融合系による新規医薬品毒性評価系に関する基盤研究	1
小澤正吾	
II. 分担研究報告	
1. In vitro 細胞系の遺伝子発現解析	10
石田誠一	
2. 遺伝子発現調節機構の解析	21
宮島敦子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	34

ヒト肝3次元培養系、マウス・ヒト肝細胞融合系による新規医薬品

毒性評価系に関する基盤研究

主任研究者 小澤 正吾 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部

研究要旨 肝薬物代謝活性と医薬品安全性・有効性との関連を試験する系は薬事行政の重要な部分であるが、現時点では供給が著しく困難なヒト肝初代培養細胞に全面的に依存している。この状況を打破するため、ヒト肝機能を模倣するヒト肝由来細胞の *in vitro* 培養系を、近來の新技术を用いて構築する。具体的には、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞をラジアルフローバイオリアクターで三次元培養し、多くの薬物の代謝に関与する CYP3A4 のリファンピシンによる誘導率を平面培養でのそれと比較した。結果、三次元培養系において、増殖期の細胞における誘導率は、平面培養に比し、最高で 6 倍程度高いことを見出した。また、増殖期、定常期の遺伝子発現を調べ、定常期の発現が増殖期に比較して 3 倍以上高い遺伝子を 18 種見出したが、そのうち 8 種類は発がんに関連するものであり、Grb10、ATR1、vascular cell endothelial growth factor (VEGF) が含まれていた。VEGF タンパク質の産生も亢進し、さらに、培養上清にはヒト血管内皮細胞に対する血管新生活性が認められた。以上のことより、本系の細胞の遺伝子発現解析を通じて、薬物代謝酵素遺伝子発現調節機構の一端を明らかにできる可能性があると考えられた。さらに、本三次元培養系を用いると、細胞の生理状態を制御することが可能であることが示され、今後ヒト肝機能を模倣する目標に近づけることが期待される。

石田 誠一・国立医薬品食品衛生
研究所主任研究官、
宮島 敦子・国立医薬品食品衛生
研究所主任研究官

A. 研究目的

医薬品による有害事象発現に影響を
する重要な因子として薬物代謝能の著明な
低下あるいは著しい酵素誘導が考えられ
ている。その原因となる代謝酵素の欠損
変異遺伝子も知られており、遺伝因子に
よることもあるが、遺伝子異常が認めら
れない大きな薬物代謝能の個体間変動が
認められることもある。また、環境因子
や代謝動態に関わるタンパクの発現調節
因子のレベルが低下する場合もあり、体
内動態関連遺伝子それ自体だけでは説明
ができない事象も多い。実際、研究者ら
は、遺伝子異常が見られない患者に、な
お、薬物動態能の著しい個体差が存在す
ることから、遺伝因子のみならず、環境
因子による薬物代謝を始めとする肝機能
に影響を及ぼす機構を解明する必要性に
ついて認識しているが、本研究におい
ても、近年入手可能になったヒト肝組織
を用いて、今年度は各種薬物動態関連遺
伝子の mRNA レベルを測定し、基礎的デー
タを取得する。薬物代謝において主要な役
割を果たす CYP3A4 には大きな個体差が存
在することが知られているので、*CYP3A4*
遺伝子の発現調節機構の解析を目指し、ま
ずは、ヒト肝における、CYP3A4 蛋白、
CYP3A4 遺伝子の発現量について検討する。

さらに主要な CYP 遺伝子の発現量および、
関連受容体、転写因子遺伝子の発現量につ
いても解析を進める。ヒト肝薬物代謝動態
能は低分子化合物による誘導の影響を受
けるため、ヒト肝初代培養細胞を用いた
薬物代謝動態能の評価が常時行われてい
る。しかし、薬物代謝酵素誘導能を有す
る肝初代培養細胞の入手は容易ではなく、
信頼できる評価系とは言い難い。この問
題を克服するため、生体に近い肝機能を
再現する *in vitro* 細胞培養系の構築が有
用な方策の一つと考えられる。培養系と
しては、3次元培養、スフェロイド培養、
プレート培養の条件を種々検討すること
が考えられる。本研究では、近年の新規
細胞培養基材や培養方法を採用しヒト肝
癌細胞を種々の新規培養環境に置くこと
により、健常ヒト肝 mRNA の遺伝子発現
を模倣する安定培養系の確立を目指す。
近年、遺伝子発現調節に、低分子
RNA(non-coding RNA, ncRNA)が関与す
ることが知られてきた。本研究の細胞培
養系での薬物代謝酵素遺伝子の ncRNA
による発現調節に関し、tiling array の設
計による新たな検討を加えたいと考えて
いる。また、遺伝子発現パターンの解析
と平行してタンパクの発現を二次元電気
泳動等のプロテオミクス的手法での解析
にも着手する。最終的には、実際に各種
医薬品および、一般化学物質の毒性評価
を行い、系の有用性を評価する。このよ
うに、本研究の主眼は、ヒト肝由来細胞
培養法に様々な改変を加えることで、安
定かつ再現性の高い新規医薬品の安全性
評価系の構築を通じて、厚生労働行政に
資することである。また、本研究を通じ

て、肝機能維持に必要な遺伝子発現を明らかにすることも可能であると考えられるので、科学的な価値が高い研究を展開できることが期待される。

B. 研究方法

細胞培養

実験に用いた HepG2 は ATCC より購入した。

平面培養：直径 10 cm の細胞培養用シャーレ(Corning)で、DMEM (Sigma) + 10 % FBS (Invitrogen)培地中、5 % CO₂を含む気相下 37°Cで培養した。

三次元培養：エイブル社製ラジアルフローバイオリアクター(RFB; 5 ml 容)を用いて行った。細胞の支持体は hydroxy apatite (Pentax Corporation)、及び、PVA (Muromachi Kagaku)を用いた。シャーレ上で培養している HepG2 細胞をトリプシン処理により回収し、リアクター内の細胞密度が 5×10^6 cells/ml になるように播種した。培地は high glucose DMEM (Invitrogen) + 10 % FBS を用い、播種後細胞がハイドロキシアパタイトビーズに生着するまで培地は循環させた。その後は、一定量の新鮮な培地を供給し培養した。培地中のグルコース消費量をバイオセンサー (model BF-4: Oji Scientific Instruments) でモニターし換算することで、細胞数の推定を行った。また、培地中の溶存酸素、pH、培地温度はリアクターの培地流出部で連続的にモニターし、一定になるようコントロールした。

スフェロイド形成：シャーレ上で培養している HepG2 細胞をトリプシン処理により回収した後、セルタイト スフェロイド

(Sumilon)に各種細胞濃度で播種し、通常の CO₂ インキュベータ内で静置培養した。培地は一定量 (100 μ l)毎日交換した。

細胞切片の作成及び染色

RFB より細胞を回収し、10 % フォルマリンを含む緩衝液にて固定した。その後、常法に従いトルイジンブルーでの染色を行った。

薬剤による酵素誘導試験

三次元培養下、対数増殖期 (growth phase)にある細胞の培養液中に rifampicin 100 μ M を添加し、3 日間暴露した。この間培地は RFB を循環させ、薬剤を含む新鮮な培地と 1 日毎に交換した。

RNA 調製

RFB より細胞を回収し、RNeasy Mini Total RNA preparation kit (Qiagen)にて RNA を調製した。

Real-time PCR

調製した RNA を TaqMan Reverse Transcription Reagent (Applied Biosystems Inc.)により、添付の方法に従い逆転写した。*CYP3A4* 特異的プライマーと TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc.)を用い、Prism 7700 real time PCR system 又は Prism 7900 real time PCR system (Applied Biosystems Inc.)により *CYP3A4* の発現量を測定した。*GAPDH* の発現量をコントロールとし各サンプルの *CYP3A4* の発現量を規格化した。

網羅的遺伝子解析

一定期間(播種後 7 日目：増殖期、播種後 17 日目：定常期)HepG2 細胞を三次元培養した RFB カラム下部三箇所より total RNA を回収し、常法に従いラベル後 Affymetrix

社 Human Genome U133A GeneChip にて遺伝子発現量を網羅的に定量した。増殖期と定常期の発現量を t -検定により比較し、有意差のあった遺伝子のうち、定常期の発現量が増殖期の三倍以上あった遺伝子を“定常期で誘導された遺伝子”として、遺伝子情報を取得・解析した。

VEGF 産生量の定量

培地上清をシャーレ(平面培養)又は培地調整槽(RFB)より回収し、96-wells-VEGF Human Assay kit (Amersham Biosciences)を用いて定量した。

血管新生アッセイ

血管新生は血管新生定量キット (Kurabo Industries)により、回収した培地上清を添付の培地と 1:1 に混合して行った。コントロールには VEGF-A (Kurabo)を用いた。新生された血管を染色後、血管長を Angiogenesis Image Analyzer (Kurabo)で定量した。

ヒト肝組織における細胞下分画、および RNA 画分の調製と薬物代謝酵素の定量

ヒト肝組織より、細胞下分画および RNA 画分を調製し、各遺伝子の mRNA 量を TaqMan probe を用いた real time-PCR 法により測定した。また Western blot 法により CYP3A4, 3A5 蛋白含量を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究においてはヒト肝癌由来樹立培養細胞を始め種々のヒト肝組織由来のサンプルを使用するが、それらは、ヒト肝組織提供者の不利益、危険性を排除するために、提供者の個人情報と連結不可能匿名化されている。このことから、提供者の人権が損なわれる恐れはほとんどな

い。より慎重を期して、本研究は、「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」(平成 10 年厚生科学審議会答申)を遵守して遂行する。さらに、用いる細胞株の遺伝情報を解析する可能性があることから、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)を遵守する。実験動物に対する動物愛護の観点から、実験動物には無用の苦痛を与える実験計画を避ける。研究の実施に際しては、国立医薬品食品衛生研究所の研究倫理審査委員会に計画を申請し、審査を受けた上で研究を進める。また、遺伝子実験に関しては、国立医薬品食品衛生研究所組換え DNA 実験安全管理規則に則って行い、必要に応じて所内の関連委員会に計画を申請、審査を受けた上で研究を進める。

C. 研究結果

三次元培養

三次元培養はエイブル社製ラジアルフローバイオリアクター(RFB; 5 ml 容)を用いて行った。今年度は細胞にヒト肝癌由来培養細胞株 HepG2 を用いて種々の検討を行った。本装置はカラム内に充填した細胞支持担体に細胞を生着させた後、培養状態をモニターしつつ、溶存酸素、pH 等が調整された培養液をカラム外周から中心に向かって循環させることで、細胞の三次元的高密度培養を可能にしている。細胞の種類にもよるが、今回用いた HepG2 細胞は、前記条件で一週間以上良好な増殖を示した。

担体の種類による細胞の性質の変化

三次元培養において、単体の種類により

細胞の増殖性及び薬剤に対する応答性に差異があるかを検討した。今回は hydroxy apatite と PVA を用いた。1日あたりの培地中のグルコース濃度消費量を測定することで相対的な細胞数を計測した。その結果、播種後の lag phase は PVA が長いものの、その後、増殖期に入った後には PVA の方が細胞はよく増殖し、PVA のほうがより高い最終到達細胞密度を示した。細胞播種 7 日後に細胞の切片を作成しトルイジンブルーにより細胞を染色し、顕微鏡下観察したところ、細胞の重層状態、及び細胞間腔の形成に差異があった。播種後 3 日目から 7 日目までの増殖期にある細胞を 100 μ M rifampicin に曝露し、total RNA を回収して、*CYP3A4* の発現量を測定した。vehicle に用いた DMSO を同濃度培地に加えた細胞をコントロールとした。細胞培養用シャーレを用いた平面培養での結果も含めた観察結果が得られた。今回用いた HepG2 細胞では、平面培養では 2.4 倍の *CYP3A4* の誘導が認められたのに対して、hydroxy apatite を担体とすると、誘導倍率は 4 倍強から 14 倍弱となり、hydroxy apatite を担体として三次元培養することにより、HepG2 細胞における *CYP3A4* 誘導能は改善した。一方、PVA を担体とした場合は誘導倍率は 3.6 倍と 1.9 倍(平均 2.8 倍)で、平面培養とほぼ同程度であった。

三次元培養における遺伝子発現の変化の網羅的解析

今年度は、HepG2 細胞を RFB で三次元培養した際、増殖期と定常期での遺伝子発現を Affymetrix 社 human genome U133A gene chip により網羅的に定量し、定常期で特異的に誘導された遺伝子の解析を行った。

定常期の発現量と増殖期の発現量を *t*-検定により検定し、統計的有意差の認められた遺伝子のうち、定常期の発現が増殖期に比べて 3 倍以上あった遺伝子の 18 種類の内訳を調べた。そのうち、8 遺伝子が発がんに関連するものであった(例: Grb10, ATR1 など)が、その中でも vascular endothelial growth factor (VEGF) に注目し、以下の解析を行った。

定常期における VEGF 産生の亢進

GeneChip による解析の結果、定常期では増殖期に比べて VEGF の発現が 3.4 倍亢進していた。そこで、実際に VEGF の産生量が増加しているかどうかを調べるため、細胞上清を培地調整槽より回収し、その中に含まれる VEGF 量を ELISA 法により定量した。定常期と増殖期の細胞間で、一日あたりの VEGF 産生量を算出することにより比較検討した。その結果、定常期では、増殖期に比べ約 3 倍の一日あたりの産生量の増加が認められた。更に、この上清をヒト臍帯血由来内皮細胞の培地上清に 1:1 で混合し血管新生能を観察した。新生された血管の長さを画像解析ソフトにより定量すると、増殖期より得た培養上清より、定常状態より得た培養上清を用いた場合においてより多くの血管の新生が認められた。

HepG2 細胞によるスフェロイド形成

RFB による培養は、高密度三次元状態を効率よく維持できるが、専用の装置が必要であり、またカラム容積が 5 ml と大きいため多くの細胞を必要とするので、多くの細胞株を用いた比較を行うことは容易ではない。細胞を三次元的に培養する方法として、従来よりスフェロイドを形成する方法が用いられてきた。しかしながら、その場合に

はスフェロイドを維持するための特殊な培養環境が必要であった。しかしながら、近年培養器の表面加工の処理により細胞の吸着性を低くし、かつ、培養 well の形状を U 字状にすることで容易にスフェロイドの形成を行えるようになった。そこで、そのような培養器の一つである、セルタイト スフェロイド(Sumilon) 96 well culture plate による HepG2 細胞のスフェロイド形成を試みた。

平面培養で培養していた HepG2 細胞をトリプシン処理により回収し、種々の細胞濃度(1×10^4 cell/well $\sim 1 \times 10^6$ cell/well)でセルタイト スフェロイド plate に播種し、スフェロイドの形成の経過を観察した。いずれの濃度でも播種後 1 日目で既にスフェロイドの形成が認められ、3 日目にはほぼ完全なスフェロイドが形成された。細胞の播種密度が上昇するに従い、スフェロイドを形成できない細胞集団の存在も認められたが、 1×10^5 cell/well 程度まででは、播種した細胞のほぼ 100 %がスフェロイドを形成していた。

日本人肝組織における薬物動態関連遺伝子の発現レベルの測定

日本人 24 検体の肝組織を用いて、CYP および関連薬剤反応性遺伝子の発現量の個体差について検討した結果、*CYP1A1*, *1A2*, *2B6*, *2C9*, *3A4*, *3A5*, *3A43* の mRNA 量の個体差は 16-107 倍、*AHR*, *PXR*, *CAR*, *GR* では 5-40 倍、CYP3A4, 3A5 蛋白の個体差はそれぞれ 9, 1560 倍であった。CYP3A5 の発現量は 2 相性を示し、蛋白発現量と mRNA 発現量は高い相関を示した。24 検体のうち、3A5 の発現量が低いものは 11 検体 (0.478) で、日本人における 3A5 *3/*3 の頻

度にほぼ対応していた。

CYP1A1, *1A2* mRNA 発現量は強く相関していたが、これら *CYP1A* と *AHR* mRNA 発現量との相関は比較的弱かった。*CYP2B6*, *2C9*, *3A4* mRNA 発現量は互いに相関し、*PXR*, *CAR* 両受容体の発現量とも相関していた。核内受容体と複合体を形成する *RXR α* の発現量と *PXR* や *CAR* の発現量との相関が観察された。

D. 考察

in vitro 培養系 (三次元培養、スフェロイド培養、プレート培養) の評価

1. 三次元培養 ヒト肝癌由来培養細胞株 HepG2 の解析結果を参考にして、他の培養細胞株 Huh-7 について培養を試験的に行った。しかし、HepG2 細胞の 3 次元培養で用いた支持担体ハイドロキシアパタイトは必ずしもあらゆるヒト肝癌由来培養細胞株に適用できるわけではなく、細胞の種類により培養基材や培養条件を調整する必要があった。HepG2 は、ハイドロキシアパタイト以外の支持担体でも培養が可能な細胞であった。培養条件の確立と平行して、細胞の増殖状態の変化を BrdU 取り込み試験により解析した。HepG2 細胞では 3 次元培養系で薬物動態関連遺伝子 CYP3A4 の発現及び誘導を確認すると共に、肝特異的な遺伝子発現を Affymetrix 社 GeneChip による網羅的解析で検出できた。薬物代謝酵素 CYP3A4 の誘導の観点からは、HepG2 の三次元培養系では hydroxy apatite が有利であると考えられた。HepG2 の培養条件はほぼ確立されたので、本年度及び次年度に行う Affymetrix 社 GeneChip による網羅的

遺伝子発現解析に供するサンプルを調製し、順次解析を開始している。Huh7 についても同様である。

2. スフェロイド培養 HepG2 細胞について、Sumilon の Spheroid 形成用細胞培養システムでスフェロイドの形成を認めた。同一細胞について培養条件を変化させたとき CYP3A4 等の薬物代謝酵素遺伝子発現や誘導に差異が認められるか、否かにつき検討を開始した。種々の培養条件で、肝特異的なものばかりでなく、網羅的に HepG2 細胞の遺伝子発現を調べ、薬物代謝酵素遺伝子発現レベルと関連するものを拾い上げることにより、薬物代謝酵素遺伝子発現調節の分子機構をも解明できる。その知見を基に培養条件の最適化を図ることもでき、医薬品の安全性あるいは有害事象を評価・予測するための安定供給可能で、良好な再現性を有する細胞系が確立できると思われる。

三次元培養における遺伝子発現の変化の網羅的解析

今年度は、HepG2 細胞を RFB で三次元培養した際、増殖期と定常期での遺伝子発現を Affymetrix 社 human genome U133A gene chip により網羅的に定量し、定常期で特異的に誘導された遺伝子の解析を行った。その結果、細胞を三次元培養すると培養後期の細胞増殖定常期において特異的に発現誘導される合計 18 の遺伝子中に、細胞の癌化にともない発現が上昇する遺伝子が複数認められた。18 種の遺伝子に含まれる Grb10 及び ATR1 は細胞癌化のマーカーとして知られており、これら以外にも 6 遺伝子が細胞の癌化との関連が知られている遺伝子であった。その中でも VEGF は癌にお

ける血管新生で重要な働きをする因子であり、実際に定常期にある三次元培養から回収した培養上清には、血管新生を促進する作用が認められた。以上、今回行われた遺伝子発現の網羅的解析の結果から、少なくともヒト肝癌由来 HepG2 細胞では、RFB による三次元高密度培養環境に細胞が置かれると、その他の培養環境に比較して細胞が腫瘍の特性を示す指標を発現するという興味深いことが明らかになった。

日本人肝組織における薬物動態関連遺伝子の発現レベルの測定

日本人 24 検体を用いて検討した結果、関連核内受容体遺伝子の発現量の個体差に比べ、その制御下にあると考えられる CYP 遺伝子の発現量の個体差の方が大きかった。CYP1A 遺伝子では、CYP1A1, 1A2 mRNA 発現量は強く相関していたが、AHR mRNA 発現量との相関は比較的弱く、AHR と複合体を形成する Arnt との相関は観察されなかった。これらの結果より、CYP1A1, 1A2 mRNA の発現制御には、AHR が関与しているが、それ以外の因子も関与している可能性が示唆された。CYP2B, 2C, 3A 遺伝子の発現については、CYP2B6, 2C9, 3A4 mRNA 発現量は互いに相関し、PXR, CAR 両受容体の発現量とも相関していた。核内受容体と複合体を形成する RXR α の発現量は PXR, CAR と相関が観察された。以上より CYP2B6, 2C9, 3A4 の発現量の個体差には、核内受容体 PXR, CAR の発現量の個体差が関与していることが示唆された。

また、本年の研究において、ヒト接着型凍結肝細胞を数ロット購入し、細胞の回収、接着、生存率のスコアがよく、CYP1A1, 1A2 および 3A4 の誘導が十分観察される細

胞を同定した。今般このような細胞をまとめて購入することができたので、今後の研究に利用する予定である。

E. 結論

本年度の研究により以下の点を明らかにした。

① RFBによる三次元培養において、用いる担体により細胞機能に変化していた。本年度の検討では、薬物代謝酵素の誘導系という観点からは、HepG2細胞を三次元培養するためには hydroxy apatite が有利であると判断される。

② HepG2を hydroxy apatite を担体として三次元培養をすると、細胞増殖が定常期にいたると細胞が腫瘍の特性を維持することが、Affymetrix社 GeneChipを用いた遺伝子発現の網羅的解析より示唆され、本装置が細胞の生理状態の変化を誘起することが明らかとなった。

③ 近年開発された細胞低吸着性の培養器を用いることで、HepG2のような肝癌由来の培養細胞でスフェロイドの形成が容易に行えることが確認できた。

来年度以降の課題としては、以下のものが挙げられる。

ア) より生体における肝臓の薬物代謝能に近い培養系を確立する。そのためには、本年度の結果をふまえると、RFBによる三次元培養では用いる培養細胞と担体の組み合わせを検討する必要があると考える。スフェロイド培養に関しては、培養条件の確立と、薬物代謝関連遺伝子の発現及び薬剤による誘導能の検討が必要である。イ) 薬物代謝能を生体に近づけるために必要な遺伝子発現調節機構の解明を行う。今年度の

三次元培養の増殖期と定常期の遺伝子発現の網羅的解析により、三次元培養により細胞が平面培養とは異なる生理状況におかれていることが判明した。ア)の検討と併せて、遺伝子発現の網羅的解析を行い、より生体の肝機能に近づけるために必要な遺伝子の探索をする。その結果に基づき、それら遺伝子を細胞内で強制発現または RNAi などで発現抑制することで、積極的に細胞機能を改変することが可能であると考ええる。

ウ) 発現調節機構の解明に関しては、②に挙げた遺伝子発現の網羅的解析の結果から、イ)の解析だけでは不十分である可能性がある。そこで、イ)の網羅的遺伝子発現解析と併せて、近年徐々に実態が判明されてきている non-coding RNA による薬物動態関連遺伝子の発現調節機構の解析を行う必要があると考える。

④ヒト肝における薬物代謝動態関連遺伝子の発現レベルについての基礎検討を、特に *CYP3A4* および関連薬物反応性遺伝子の発現量の個体差を中心に検討した。*CYP3A4* の発現量の個体差には、関連核内受容体遺伝子 *PXR*, *CAR* の発現量の個体差が関与していることが示唆され、*CYP3A4* の構造遺伝子多型の既知の知見のみでは説明できないことが裏付けられる結果を得た。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

T. Hongo, M. Kajikawa, S. Ishida, S. Ozawa, Y. Ohno, J. Sawada, Y. Ishikawa and H. Honda: Gene expression property of high density three-dimensional tissue

of HepG2 formed in radial-flow bioreactor.

J. Biosci. Bioeng., in press, 2006

2. 学会発表

Atsuko Miyajima-Tabata, Shogo Ozawa,
Hiromasa Tanaka, Kenya Nakai,
Momoko Sunouchi, Jun-ichi Sawada,
Yuichiro Kamikawa, Keiichi Kubota,
Hiroyasu Ogata, Yasuo Ohno The
Crosstalk of Nuclear Receptors on the
Expression of CYP Isoforms in Japanese
Liver Tissue. ISSX/JSSX Meeting
(Maui, Hawaii), Oct. 26, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

ヒト肝3次元培養系、マウス・ヒト肝細胞融合系による新規医薬品毒性評価系に関する基盤研究

in vitro 細胞系の遺伝子発現解析

分担研究者 石田 誠一 国立医薬品食品衛生研究所薬理部 主任研究官

研究要旨：ヒト肝癌由来細胞 HepG2 を高密度三次元培養条件下に置くことで、*CYP3A4* の誘導能の亢進や、VEGF(血管内皮増殖因子)の発現誘導が認められ、細胞の生理機能が変化することが明らかとなった。生理機能の変化は、三次元培養に用いる培養支持担体に依存した。平行して、HepG2 細胞によるスフェロイド形成の検討を行った。

A. 研究目的

肝薬物代謝活性と医薬品の安全性・有効性との関連を試験する系は薬事行政上重要である。簡便な系としては、ヒト肝癌由来樹立培養細胞株を用いる系での試験系の構築が望まれる。しかし、ヒト肝癌由来樹立培養細胞株を通常の平面培養にて培養した場合、*CYP3A4* のような遺伝子の発現及び薬剤による誘導が困難であるため、現時点では試験系として適当とは言いがたい。そのため、ヒト肝初代培養細胞を用いた試験系が広く用いられている。しかしながら、ヒト肝実質細胞の供給はほとんどを海外に依存しており、入手は容易ではなくまた安定していない。また、ドナーに由来する個人差も存在するため、信頼できる評価系とはなっていない。そこで、本研究では近年開発されてきた新規細胞培養基材や培養方法を検討し、ヒト肝がん細胞を新規培養環

境におくことにより、健常ヒト肝における遺伝子発現を模倣する安定培養系の確立を目指す。

B. 研究方法

細胞培養

実験に用いた HepG2 は ATCC より購入した。

平面培養：直径 10 cm の細胞培養用シャーレ(Corning)で、DMEM (Sigma) + 10 % FBS (Invitrogen)培地中、5 % CO₂を含む気相下 37℃で培養した。

三次元培養：エイブル社製ラジアルフローバイオリアクター(RFB; 5 ml 容)を用いて行った。細胞の支持体は hydroxy apatite (Pentax Corporation)、及び、PVA (Muromachi Kagaku)を用いた。シャーレ上で培養している HepG2 細胞をトリプシン処理により回収し、リアクター内の細胞

密度が 5×10^6 cells/ml になるように播種した。培地は high glucose DMEM (Invitrogen) + 10 % FBS を用い、播種後細胞がハイドロキシアパタイトビーズに生着するまで培地は循環させた。その後は、一定量の新鮮な培地を供給し培養した。培地中のグルコース消費量をバイオセンサー (model BF-4: Oji Scientific Instruments) でモニターし換算することで、細胞数の推定を行った。また、培地中の溶存酸素、pH、培地温度はリアクターの培地流出部で連続的にモニターし、一定になるようコントロールした。

スフェロイド形成：シャーレ上で培養している HepG2 細胞をトリプシン処理により回収した後、セルタイト スフェロイド (Sumilon) に各種細胞濃度で播種し、通常の CO₂ インキュベータ内で静置培養した。培地は一定量 (100 μ l) 毎日交換した。

細胞切片の作成及び染色

RFB より細胞を回収し、10 % フォルマリンを含む緩衝液にて固定した。その後、常法に従いトルイジンブルーでの染色を行った。

薬剤による酵素誘導試験

三次元培養下、対数増殖期 (growth phase) にある細胞の培養液中に rifampicin 100 μ M を添加し、3 日間暴露した。この間培地は RFB を循環させ、薬剤を含む新鮮な培地と 1 日毎に交換した。

RNA 調製

RFB より細胞を回収し、RNeasy Mini Total RNA preparation kit (Qiagen) にて RNA を調製した。

Real-time PCR

調製した RNA を TaqMan Reverse

Transcription Reagent (Applied Biosystems Inc.) により、添付の方法に従い逆転写した。CYP3A4 特異的プライマーと TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc.) を用い、Prism 7700 real time PCR system 又は Prism 7900 real time PCR system (Applied Biosystems Inc.) により CYP3A4 の発現量を測定した。GAPDH の発現量をコントロールとし各サンプルの CYP3A4 の発現量を規格化した。

網羅的遺伝子解析

一定期間 (播種後 7 日目：増殖期、播種後 17 日目：定常期) HepG2 細胞を三次元培養した RFB カラム下部三箇所より total RNA を回収し、常法に従いラベル後 Affymetrix 社 Human Genome U133A GeneChip にて遺伝子発現量を網羅的に定量した。増殖期と定常期の発現量を *t*-検定により比較し、有意差のあった遺伝子のうち、定常期の発現量が増殖期の三倍以上あった遺伝子を“定常期で誘導された遺伝子”として、遺伝子情報を取得・解析した。

VEGF 産生量の定量

培地上清をシャーレ (平面培養) 又は培地調整槽 (RFB) より回収し、96-wells-VEGF Human Assay kit (Amersham Biosciences) を用いて定量した。

血管新生アッセイ

血管新生は血管新生定量キット (Kurabo Industries) により、回収した培地上清を添付の培地と 1:1 に混合して行った。コントロールには VEGF-A (Kurabo) を用いた。新生された血管を染色後、血管長を Angiogenesis Image Analyzer (Kurabo) で定量した。

(倫理面への配慮)

本年度は該当事項なし

C. 研究結果

三次元培養

三次元培養はエイブル社製ラジアルフローバイオリアクター(RFB; 5 ml 容)を用いて行った。今年度は細胞にヒト肝癌由来培養細胞株 HepG2 を用いて種々の検討を行った。RFB のシステム構成を Fig. 1 A に示す。同装置はカラム内に充填した細胞支持担体に細胞を生着させた後、培養状態をモニターしつつ、溶存酸素、pH 等が調整された培養液をカラム外周から中心に向かって循環させることで、細胞の三次元的高密度培養を可能にする装置である(RFB 内の培地の流れ: Fig. 1 B、三次元高密度培養の様子: Fig. 1 C)。

担体の種類による細胞の性質の変化

三次元培養において、単体の種類により細胞の増殖性及び薬剤に対する応答性に差異があるかを検討した。今回は hydroxy apatite と PVA を用いた。Fig. 2 A に細胞の増殖性を示す。細胞数は、1 日あたりの培地中のグルコース濃度消費量を測定することで相対的に計測した。その結果、播種後の lag phase は PVA が長いものの、その後の増殖期における増殖性は PVA が高く、最終到達細胞密度も PVA のほうが高い結果となった。細胞播種 7 日後に細胞の切片を作成しトルイジンブルーにより細胞を染色し、顕微鏡下観察した(Fig. 2 B)。細胞の重層状態、及び細胞間腔の形成に差異があった。次いで、播種後 3 日目から 7 日目までの増殖期にある細胞を 100 μ M rifampicin に曝露し、total RNA を回収し

て、*CYP3A4* の発現量を測定した。vehicle に用いた DMSO を同濃度培地に加えた細胞をコントロールとした。細胞培養用シャーレを用いた平面培養での結果と併せて、Table 1 に結果を示す。今回用いた HepG2 では、平面培養では 2.4 倍の *CYP3A4* の誘導が認められたのに対して、hydroxy apatite を担体とすると、誘導倍率は 4 倍強から 14 倍弱に上昇し、hydroxy apatite を担体とした三次元培養が HepG2 細胞における *CYP3A4* 誘導能の改善に寄与していた。一方、PVA を担体とした場合は誘導倍率は 3.6 倍と 1.9 倍(平均 2.8 倍)で、平面培養とほぼ同程度であった。

三次元培養における遺伝子発現の変化の網羅的解析

今年度は、HepG2 細胞を RFB で三次元培養した際、増殖期と定常期での遺伝子発現を Affymetrix 社 human genome U133A gene chip により網羅的に定量し、定常期で特異的に誘導された遺伝子の解析を行った。定常期の発現量と増殖期の発現量を *t* 検定により検定し、統計的有意差の認められた遺伝子のうち、定常期の発現が増殖期に比べて 3 倍以上あった遺伝子のリストを Table 2 に示す。18 の遺伝子が、該当した。その中で、8 遺伝子が発がんに関連するものであった(例: Grb10, ATR1 など)が、その中でも vascular endothelial growth factor(VEGF)に注目し、以下の解析を行った。

定常期における VEGF 産生の亢進

GeneChip による解析の結果、定常期では増殖期に比べて VEGF の発現が 3.4 倍亢進していた。そこで、実際に VEGF の産生量が増加しているかを、細胞上清を培地調

整槽より回収し、その中に含まれる VEGF 量を ELISA 法により定量し、一日あたりの産生量を算出することにより比較検討した。その結果を Fig. 3 A に示す。定常期では、増殖期に比べ約 3 倍の一日あたりの産生量の増加が認められた。更に、この上清をヒト臍帯血由来内皮細胞の培地上清に 1:1 で混合し血管新生能を観察した。結果を Fig. 3 B に示す。新生された血管の長さを画像解析ソフトにより定量すると、増殖期より得た培養上清より、定常状態より得た培養上清を用いた場合においてより多くの血管の新生が認められた。

HepG2 細胞によるスフェロイド形成

RFB による培養は、高密度三次元状態を効率よく維持できるが、専用の装置が必要であり、またカラム容積が 5 ml と大きいため多くの細胞を必要とする点で、多くのサンプルを処理する際など不利である。細胞を三次元的に培養する方法として、従来よりスフェロイドを形成する方法が用いられてきた。しかしながら、その場合にはスフェロイドを維持するための特殊な培養環境が必要であった。しかしながら、近年培養器の表面加工の処理により細胞の吸着性を低くし、かつ、培養 well の形状を U 字状にすることで容易にスフェロイドの形成を行えるようになった。そこで、そのような培養器の一つである、セルタイト スフェロイド(Sumilon) 96 well culture plate による HepG2 細胞のスフェロイド形成を試みた。

平面培養で培養していた HepG2 細胞をトリプシン処理により回収し、種々の細胞濃度(1×10^4 cell/well $\sim 1 \times 10^6$ cell/well)でセルタイト スフェロイド plate に播種し、

スフェロイドの形成の経過を観察した。いずれの濃度でも播種後 1 日目で既にスフェロイドの形成が認められ、3 日目にはほぼ完全なスフェロイドが形成された。細胞の様子を Fig. 4 に示す。細胞の播種密度が上昇するに従い、スフェロイドを形成できない細胞集団の存在も認められたが、 1×10^5 cell/well 程度まででは、播種した細胞のほぼ 100 %がスフェロイドを形成していた。

D. 考察

担体の種類による細胞の性質の変化

今年度は、RFB の担体として、hydroxy apatite と PVA の 2 種を比較検討した。その結果、細胞培養の増殖曲線と細胞組織染色像で若干の差異を認めた(Fig. 2)。更に、rifampicin による *CYP3A4* 誘導能を比較すると、hydroxy apatite では平面培養に比べ顕著な誘導能の改善が認められたが、PVA では平面培養とほぼ同程度の誘導能しか認めなかった(Table 1)。増殖曲線及び染色増で認められた差異がごくわずかであることを考えると、rifampicin による *CYP3A4* 誘導能の差は予想を越えるものであり、今後より一層の培養条件の検討が必要であることを示唆すると考えられる。

三次元培養における遺伝子発現の変化の網羅的解析

今年度は、HepG2 細胞を RFB で三次元培養した際、増殖期と定常期での遺伝子発現を Affymetrix 社 human genome U133A gene chip により網羅的に定量し、定常期で特異的に誘導された遺伝子の解析を行った。その結果、細胞を三次元培養すると培養後期の細胞増殖定常期において特異的に発現誘導される合計 18 の遺伝子中に、細胞の癌

化にともない発現が上昇する遺伝子が複数認められた(Table 2)。Grb10 及び ATR1 は細胞癌化のマーカーとして知られており、これら以外にも 6 遺伝子が細胞の癌化との関連が知られている遺伝子であった。その中でも VEGF は癌における血管新生で重要な働きをする因子であり、実際に定常期にある三次元培養から回収した培養上清には、血管新生を促進する作用が認められた(Fig. 3)。以上の遺伝子発現の網羅的解析の結果は、RFB による培養は、細胞の置かれた三次元高密度状態という特殊な状況により、細胞が腫瘍の特性を維持するという興味深い系であることを示唆していた。

HepG2 細胞によるスフェロイド形成

RFB による培養は上に述べたように細胞を三次元高密度状態という特殊な環境におくことで、細胞の生理的変化により、平面培養では得られない遺伝子の発現や細胞機能の獲得が期待される培養方法である。しかしながら、その培養維持のためには専用の装置が必要であり、また、現在ではカラム容が 5 ml と大きいため、相当数の細胞が必要である。特に、増殖性のない肝実質細胞を充填・培養しようとする 5×10^8 細胞以上を必要とし、実際の実施は困難である。そこで、近年開発されてきた、細胞低吸着性の素材を培養器材にした培養器による、スフェロイドの形成を検討した。用いた培養器は、細胞低吸着性素材を U 字型の well に成型した 96 well plate (セルタイトスフェロイド: Sumilon) で、ここに、各種の細胞濃度でトリプシン処理した HepG2 細胞を播種した。播種後、通常のインキュベーターに静置し培養を行い、スフェロイドの形成を顕微鏡下で観察すると、播種後 1

日目で既にスフェロイド様の細胞塊が認められ、3 日後にはほぼ完全なスフェロイドが形成された(Fig. 4)。播種する細胞数が 1 well あたり 1×10^5 を超えると、一部の細胞がスフェロイドにならなかったが、用いたいずれの濃度でも十分なスフェロイドの形成が認められた。本方法は、RFB による三次元培養に比べ、特殊なものは培養器のみであり、細胞は種後通常の CO_2 インキュベーターに静置するだけで、スフェロイドの形成が可能であった点で、簡便性が高いと考える。今後は、スフェロイド形成に至的な細胞濃度と、1 well に満たせる培地が $150 \mu\text{l}$ と播種細胞数に対し限られているため、細胞の維持に必要な培地交換の検討などが必要である。

E. 結論

本年度の研究により以下の点が明らかとなった。

- ① RFB による三次元培養において、用いる担体により細胞機能が変化していた。本年度の検討では、薬物代謝酵素の誘導系という観点からは、HepG2 細胞を三次元培養するためには hydroxy apatite が有利であると判断される。
- ② HepG2 を hydroxy apatite を担体として三次元培養をすると、細胞増殖が定常期にいたると細胞が腫瘍の特性を維持することが、Affymetrix 社 GeneChip を用いた遺伝子発現の網羅的解析より示唆され、本装置が細胞の生理状態の変化を誘起することが明らかとなった。
- ③ 近年開発された細胞低吸着性の培養器を用いることで、HepG2 のような肝癌由来の培養細胞でスフェロイドの形成が容易に

行えることが確認できた。

来年度以降の課題としては、以下のものが挙げられる。

ア) より生体における肝臓の薬物代謝能に近い培養系を確立する。そのためには、本年度の結果をふまえると、RFBによる三次元培養では用いる培養細胞と担体の組み合わせを検討する必要があると考える。スフェロイド培養に関しては、培養条件の確立と、薬物代謝関連遺伝子の発現及び薬剤による誘導能の検討が必要である。

イ) 薬物代謝能を生体に近づけるために必要な遺伝子発現調節機構の解明を行う。今年度の三次元培養の増殖期と定常期の遺伝子発現の網羅的解析により、三次元培養により細胞が平面培養とは異なる生理状況におかれていることが判明した。ア)の検討と併せて、遺伝子発現の網羅的解析を行い、より生体の肝機能に近づけるために必要な遺伝子の探索をする。その結果に基づき、それら遺伝子を細胞内で強制発現またはRNAiなどで発現抑制することで、積極的に細胞機能を改変することが可能であると考える。

ウ) 発現調節機構の解明に関しては、②に挙げた遺伝子発現の網羅的解析の結果から、イ)の解析だけでは不十分である可能性がある。そこで、イ)の網羅的遺伝子発現解析と併せて、近年徐々に実態が判明されてきている non-coding RNA による薬物動態関連遺伝子の発現調節機構の解析を行う必要があると考える。

G. 研究発表

1. 論文発表

T. Hongo, M. Kajikawa, S. Ishida, S.

Ozawa, Y. Ohno, J. Sawada, Y. Ishikawa and H. Honda: Gene expression property of high density three-dimensional tissue of HepG2 formed in radial-flow bioreactor. J. Biosci. Bioeng., in press, 2006

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

Table 1 担体の違いによるCYP3A4の誘導倍率の違い

system	sacffold	growth phase	exp. no	sampling	induction fold
plate	-	-	1	n=2	2.35
RFB	hydroxy apatite	stable	1	lower 3 portions	0.59
				upper 3 protions	1.35
RFB	hydroxy apatite	growing	1	lower 3 portions	13.99
				upper 3 protions	4.23
RFB	hydroxy apatite	growing	2	lower 3 portions	7.34
				upper 3 protions	5.67
RFB	PVA	growing	1	2 protions	3.64
RFB	PVA	growing	2	2 protions	1.87

(100 μ M rifampicin 3日間 処理)

Table 2 定常期で誘導された遺伝子リスト

Gene	Accession no.	Fold
Insulin-like growth factor binding protein 3	BF340228	11.09
Growth factor receptor-bound protein 10	U66065	5.11
Angiotensin II receptor, type 1	NM_000685	4.65
B cell RAG associated protein	NM_014863	3.97
Apolipoprotein L, 1	AF323540	3.89
A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	AB003476	3.83
Sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats-containing	AV728268	3.64
Vascular endothelial growth factor	AF022375	3.43
Basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	BG326045	3.41
Adrenomedullin	NM_001124	3.34
Family with sequence similarity 13, member A1	NM_014883	3.34
Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	NM_006931	3.32
KIAA1199 protein	AB033025	3.28
Lysyl oxidase	NM_002317	3.27
Ribonuclease T2	NM_003730	3.15
Mitochondrial ribosomal protein S6	AI867198	3.14
Carbonic anhydrase IX	NM_001216	3.10
Solute carrier organic anion transporter family, member 4A1	NM_006342	3.00

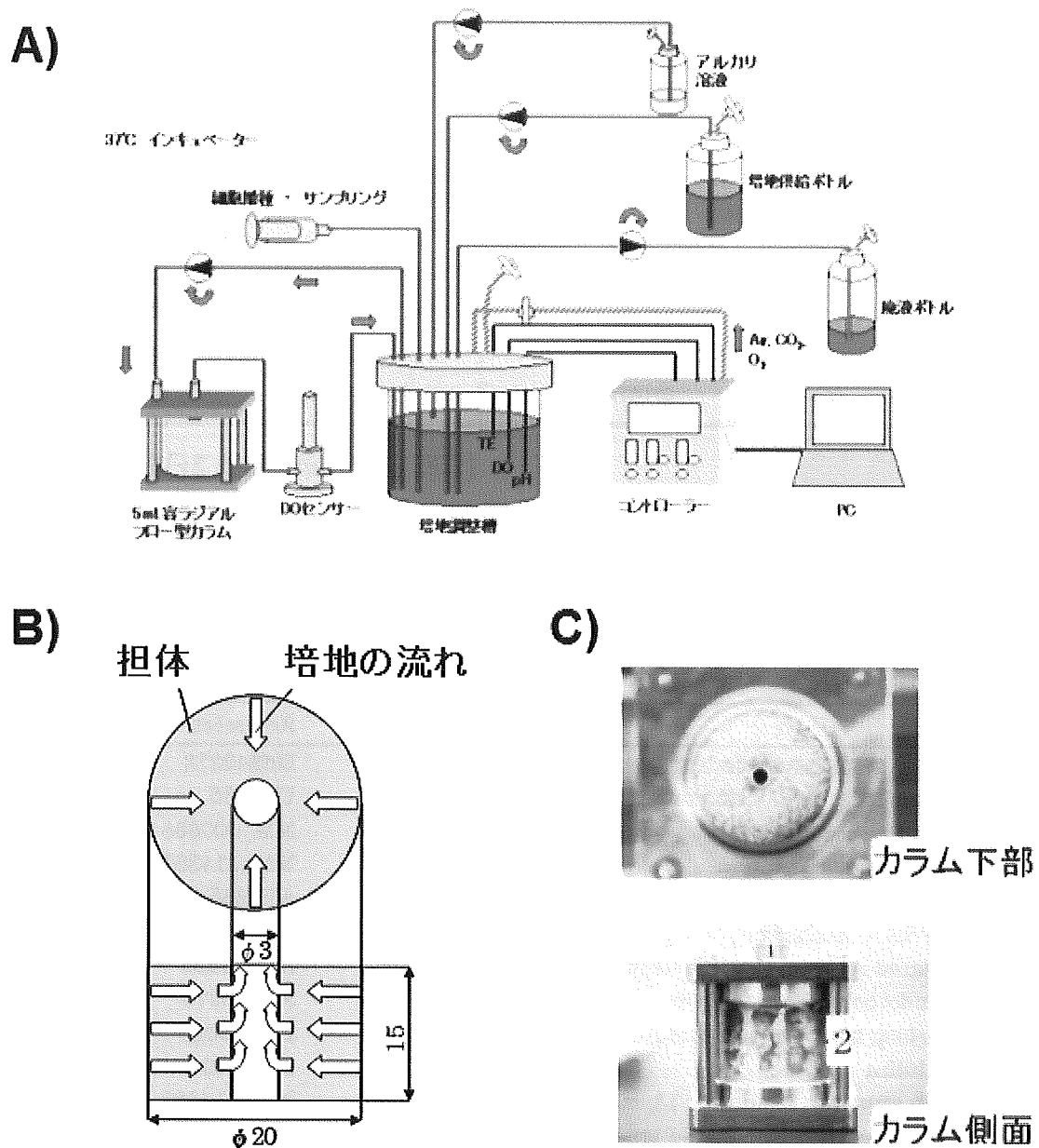


Fig. 1 ラジアルフローバイリアクター (RFB) 装置

A) 細胞培養装置のシステムフロー図。B) RFB内の培地の流れ C) 5 ml RFBにおける細胞培養の様子

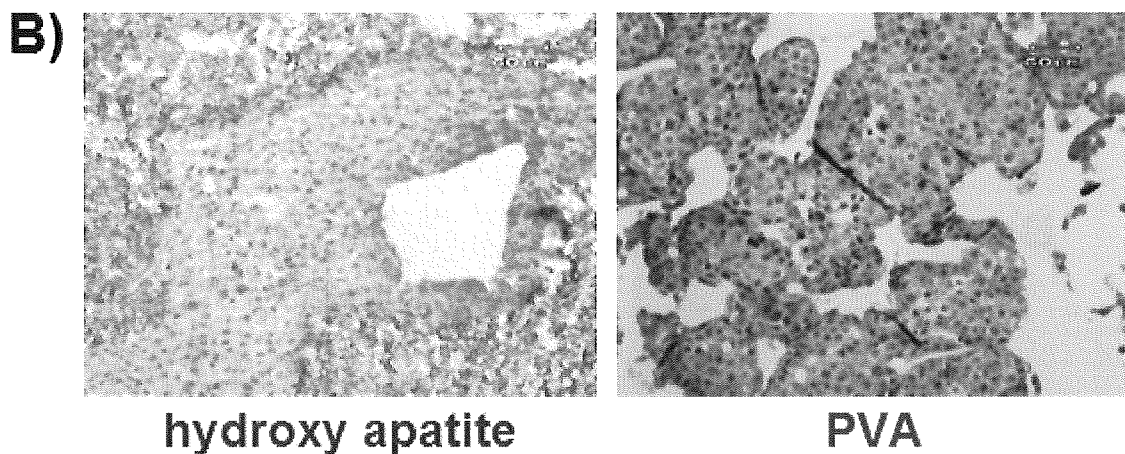
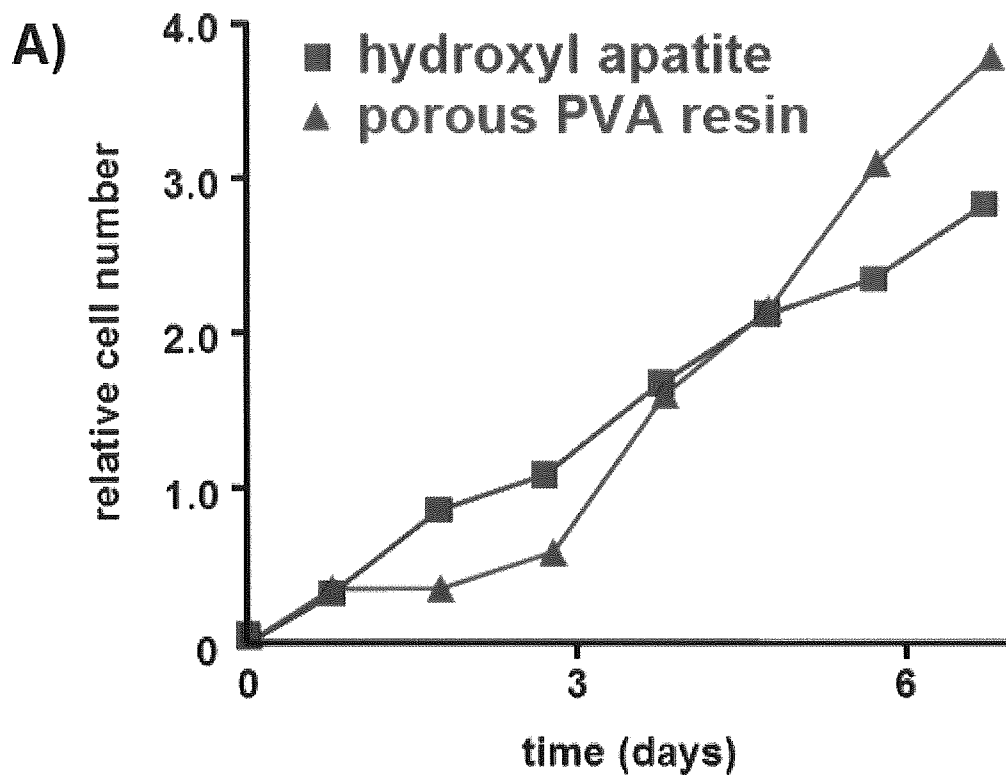


Fig. 2 異なる担体による細胞増殖の違い

HepG2細胞を二種の担体(hydroxy apatiteとPVA)で培養した。A) 細胞増殖曲線。B) RFB内の細胞増殖の様子。切片を作成後、トルイジンブルーで染色した。