

1. 論文発表

1) Enosawa S, Miyashita T, Saito T, Omasa T, Matsumura T. The significant improvement of survival times and pathological parameters by bioartificial liver with recombinant HepG2 in porcine liver failure model. *Cell Transplantation* 15(10); 873-880, 2006

3) Takahashi M, Sakurai M, Enosawa S, Omasa T, Tsuruoka S, Matsumura T. Double-compartment cell culture apparatus: construction and biochemical evaluation for bioartificial liver support. *Cell Transplantation* 15(10); 945-952, 2006

2. 学会発表

1) 絵野沢 伸. 生体微細環境の再構成による選択的能動輸送血液浄化デバイス開発の試み. オ

ーガナイズドセッション8. ナノテクと医療の融合による機器開発. 第45回日本生体医工学学会大会(旧日本エム・イー学会). 平成18年5月15日-17日、福岡

2) Saitou R, Enosawa S. An attempt of constructing biologically active membrane using recombinant transporter molecules. NANOBIO-TOKYO2006 Dec 4-7, 2006, Tokyo, Japan

3) 絵野沢 伸. からだの輸送を使った血液浄化. ナノメディスン公開講座—ナノテクが治す病気の治療— 東京コンファレンスセンター品川 2007年2月22日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ナノテクノロジーによる機能的・構造的生体代替デバイスの開発
Ⅲ ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究
機能性プロテオリポソームの開発

分担研究者 久保井 亮一（大阪大学大学院基礎工学研究科 教授）
島内 寿徳（大阪大学大学院基礎工学研究科 助手）

研究要旨：

多剤耐性タンパク質 MDR1 の機能は細胞内からの毒性物質の汲み出しであり、人工臓器のナノバイオデバイスの候補として注目されている。モデル生体膜(リポソーム)に組み込んだ MDR1 は血液中の薬物をリポソーム内水相に除去が可能であり、除去効率が脂質組成(ドメイン形成性)に依存することが示された。したがって、適切な脂質組成の選択が重要である。最もドメイン形成性が高く、MDR1 の境界脂質でもある DOPE を含んだ DOPC/DOPE 系を用いてプロテオリポソームを調製した。プロテオリポソームの凝集抑制と連続除去操作を目的として、ゲル担体への固定化条件を検討した。ゲルの選定やカラム長などを最適化した結果、Sephadex 1000 が適する担体であると判断した。さらに、ローダミンをモデル薬物として、模擬血流からの連続的透析除去操作試験から、直接血流をカラムに導入するよりも透析カラムと複合化することで除去効率を維持できることが分かった。これより、プロテオリポソーム固定化カラムが人工臓器のデバイスとして利用可能であることが示された。

A.研究目的

A-1.背景

肝・腎不全や敗血症、薬物中毒症の治療において透析・濾過と輸液・血漿輸血を組み合わせた血液浄化治療が死亡率低下に効果を発揮している。しかし、長期透析治療による弊害も指摘されており、新鮮血漿の大量消費や血漿性ウイルス感染、ならびに透析アミロイドーシスは克服すべき課題として残っている。一つの模索として、細胞を利用したバイオ人工肝の開発が行なわれているが、装置の煩雑さ、細胞性感染に関する潜在的危険性は否定できない。そこで、細胞の機能から必要なものだけを抽出、再構築した人工細胞膜を構築することにより、現在の血液浄化法の有する限界・問題点を克服できることが期待される。

その一つとして膜タンパク質の利用が挙げられる。ヒトの細胞には様々な膜タンパク質があり、多くは ATP の加水分解によって得られるエネルギーを利用して、細胞内外の物質やイオンの輸送を行っている。その中でも ABC(ATP 結合カセット)タンパク質は薬物排出能を有しており、生体防御に深く関与しているため、人工肝/腎臓への応用が期待されている。

膜タンパク質の再構築の場として、モデル生体膜であるリン脂質二重層からなる閉鎖系小胞(リポソーム)を選んだ。必須機能を担う膜タンパク質を組み込んだリポソーム(プロテオリポソーム)の調製や応用方法についての研究は未だ十分なものとは言い難いのが現状である。したがって、プロテオリポソームは、バイオ人工肝が有する潜在的・技術的問題点

を克服するための新しい切り口として期待される。

A-2. これまでの研究成果

前年度までにおいて、我々は、プロテオリポソーム調製の基礎的検討として、天然高分子(タンパク質)や合成高分子(スマートポリマー)を用いたモデル細胞膜(リポソーム)との相互作用の解析に取り組んだ。ストレス条件下においてタンパク質やスマートポリマーは構造変化し、疎水核を形成してからリポソーム膜と相互作用することが示唆された(平成 14 年度)。この機構に基づき、機能性リガンドや膜タンパク質を適切なストレス条件下において外部から導入し、リポソームの機能化を評価することが可能になる。誘電分散解析法を用いて、膜タンパク質—界面活性剤混合系に対する活性相関を検討し、適切な界面活性剤の選択の必要性と脂質膜に導入する過程のモニタリングが可能であることを示した(平成 15 年度)。次に、ABC タンパク質である MDR-1(Multidrug Resistance-1)を脂質膜中に再構築したプロテオリポソームの基礎的機能評価を行い、薬物除去機能が脂質組成に依存する点や調製後の自然劣化による機能低下が MDR1 自身の強い疎水性による事を示した(平成 16 年度)。MDR1 の薬物排出特性を一次速度論的に解析し、膜特性により排出挙動を制御する可能性を示した。また、プロテオリポソームをゲル担体に固定化し、排出プロセスの連続化の可能性を示した(平成 17 年度)。

A-3. 研究目的

本研究では MDR-1 を配向させたリポソームの薬物排出能の詳細な評価と共に、プロテオリポソームのゲル担体への固定化の最適化を行った。次に、人工透析装置への応用を指向し、種々の操作法(短絡、並列化など)を行い、モデル薬物の除去特性を検討した。

B. 研究方法

B-1. 試薬

中性リン脂質として、1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl ethanolamine (DOPE), を用いた。また、Egg phosphatidylcholine(EPC)は Avanti Polar Lipids 製を用いた。その他の特級試薬は和光純薬 (Osaka, Japan)から購入した。また、膜タンパク質 MDR1 は植田ら(京大)、および絵野沢ら(国立成育医療センター)より提供して頂いた。

B-2. リポソームの調製

B-2-1. 一般的なリポソームの調製

リポソームは下記のプロトコールで調製した。リン脂質をクロロホルムで溶解させた溶液をナス型フラスコに入れ、エバポレータにより溶媒を留去すると脂質薄膜が得られる。これを一昼夜、デシケータにて溶媒を蒸発させる。これを適当な水溶液で水和し、一時間振とうさせると多重層リポソーム (MLVs) が生成する。脂質の相転移温度以下の温度 (ここでは -80°C , 15 分)で急速に冷却すると MLVs 溶液はゲル状態で凍結される。その後、相転移温度以上 (37°C , 15 分)で解凍すると、冷却により崩壊した脂質膜どうしが融合してより大きな MLVs を得ることが出来る。この操作を凍結融解法と呼び、今回は 5 サイクル行なった。この後、50-200nm の細孔径を有するポリカーボネートフィルターで MLVs 溶液を押し出すとフィルターの細孔径に一致する均一な粒径分布を持ったリポソーム溶液を得る事ができる。この手法 (extrusion 法)により、今回は粒径 100nm のリポソームを調製した。詳細は、既報 (Yoshimoto *et al.*, 1998) を参照されたい。

B-2-2. プロテオリポソームの調製

調製法の詳細は既報記載の通りである(Sharom et al., 1998). DOPC/DOPE の混合脂質薄膜を水和し, 凍結融解法, および超音波照射法によってリポソーム(粒径 30nm)を調製した. それを界面活性剤 CHAPS と混合した. 次に, MDR1 を β -dodecyl-D-maltoside に可溶化した後, 脂質膜と混合し, 透析を行なった.

B-2-3. 膜タンパク質配向リポソームの薬物排出機能評価

上述の MDR-1 配向リポソームによる薬物排出能(Q_{\max})を測定した. これまでの検討より配向性は図 B-1 のように, ATP 結合部位が外水相に向いていると考えられる. そこで, ATP を外水相に添加することで, MDR-1 の ATP の加水分解量を測定した. ATP 加水分解量は, 遊離するリン酸由来のモリブデン錯塩形成量から評価した(Chifflet et al., 1988). MDR-1 の ATP 加水分解活性(ATPase 活性)は, ATP 加水分解量の経時変化から得られる初期勾配を MDR-1 の質量で除した値で定義した.

B-3. 固定化リポソームクロマトグラフィー

MDR1 組み込んだ DOPC/DOPE リポソームを前報(Yoshimoto et al., 1998)と同様の方法を用いてゲル担体に固定化した. 活性化したゲル担体(Sephacryl S-1000 ゲル)にリポソームを添加し, 1 昼夜静かに攪拌することで固定化した. 脂質量とタンパク質量の定量により(プ

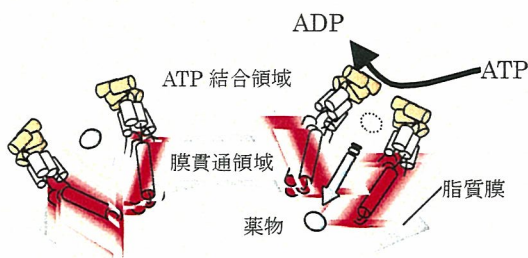


図 B-1 リポソームに組み込まれた MDR-1 の立体構造

ロテオリポソームの固定化を確認した. 得られたリポソーム固定化ゲルを 5.5cm×0.5cm ガラスカラム(HR5/5, Amersham, Pharmacia Biotech 製)に充填した. 実験によってはカラム充填高さを適宜変えた. これをポンプ, ならびに透析ユニットに接続し, 所定の条件(37°C, pH7.5)において透析操作を行なった.

B-4. 薬物排出の動力的評価

MDR1 と各種薬物分子との結合特性については, ローダミン B などのモデル薬物を MDR-1 配向リポソームに添加し, 外水相におけるローダミン濃度の経時変化を測定した. 対照系(MDR-1 を配向していないリポソーム)とプロテオリポソームとの差分を MDR1 による薬物排出量(Q)と定義した. 前年度の検討から, Q の経時変化は次式により議論できることが示されている.

$$Q = Q_{\max} (1 - e^{-k_{app}t}) \dots \dots (1)$$

そこで, 各種モデル薬物に関してみかけの排出速度係数 k_{app} と最大排出量(Q_{\max})を求めた.

C. 研究結果

プロテオリポソーム調製において問題になるのは, 組み込んだ膜タンパク質の機能発現である. そこで, 最初に MDR 1 の配向性を検討した.

一般に, リポソームに配向させた膜タンパク質の ATP 結合部位の向きにより薬物の輸送方向が変化する. これまでの検討の結果, MDR-1 の配向性は粒径依存的であり, 粒径が小さいほど ATP 結合部位が外向きに配向する(図 B-1). また, 脂質組成の影響は小さいことがわかっている. これは, 結合部位と排出部位が嵩高いため, 限られ容積しかない内水相に配向するのはエントロピー的に不利であることを示唆している. この結果と MDR-1 の

ATP 結合部位と輸送機構との関係を考慮すると、図 B-1 に示すように、薬物がリポソーム外水相から内水相に輸送されることが期待され、MDR-1 配向リポソームを薬物除去に利用できる可能性が示唆された。

C-1. MDR1 の薬物排出機能の評価

MDR1 の薬物排出の動力学は、式(1)より得られる速度論的パラメータ k_{app} により評価できる。 k_{app} 値は MDR1 への薬物の結合速度定数の意味を持つ。前年度の検討により、 k_{app} は、脂質膜上のクラスター形成挙動の指標である E/M 比(ピレンのエキシマー/モノマー蛍光強度比)とに対応していることが分かっている。この点からも、高い E/M 比を示す DOPC/DOPE リポソーム系が本実験目的に合致する系であることが分かる(PE が相分離性であり、MDR1 の高活性発現のための境界脂質として必須)。生体膜上では、膜タンパク質はラフトあるいはカベオラと呼ばれるマイクロドメインに存在していることを踏まえると、 k_{app} は、脂質膜の構造を考慮した膜タンパク質の速度論的指標として扱うことができる。

そこで、 k_{app} 値を薬物濃度に対してプロットした結果、図 C-1 のようにシグモイダル曲線を得た。したがって、 k_{app} 値の最大値の 1/2 に対応する濃度を EC_{50} と定義すると、薬物結合特性に関する量的指標を得ることができる。 EC_{50} 値が小さいほど、MDR1 による除去効率が低いことを示しているため、 EC_{50} 値の逆数を MD(多剤耐性)と定義し、DOPC/DOPE と EPC 系について複数の薬物の MD プロファイルを示した(図 C-2)。全体的に DOPC/DOPE 系が優れた多剤耐性を示している。配向性が脂質組成によらないことを考慮すると、この結果は、DOPC/DOPE 系に存在するドメインが MDR1 の構造を安定化させたためであると考えられる。

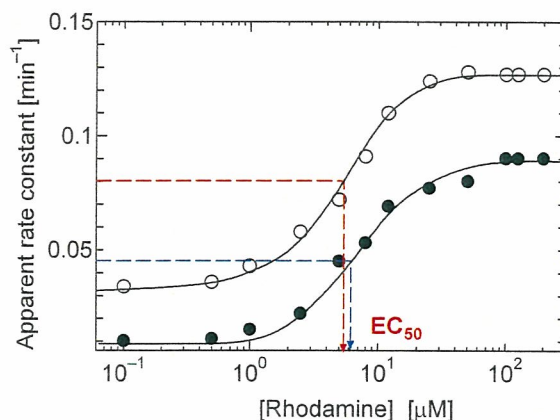


図 C-1 ローダミン B の薬物結合特性。(○)DOPC/DOPE, (●)EPC. 縦軸は式(1)により得られる k_{app} 値である。

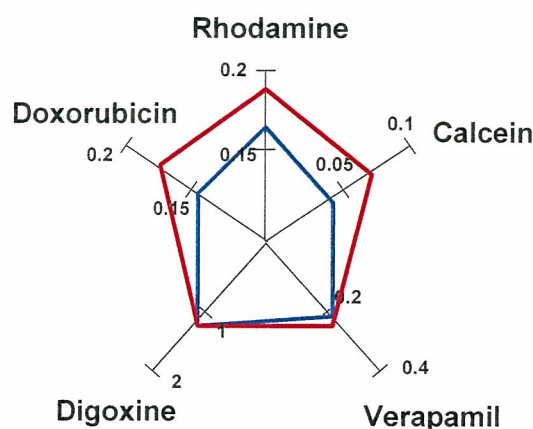


図 C-2 DOPC/DOPE と EPC における薬物除去能の MD プロファイル。MD(=1/ EC_{50}): 多剤耐性。 EC_{50} 値は図 C-1 より得た。赤: DOPC/DOPE, 青: EPC。

C-2. プロテオリポソームの固定化

従来のバイオ人工肝などの透析システムでは、肝臓由来細胞をシートに固定化する手法が技術開発の鍵になっている。前年度までの検討より、ゲル担体へのプロテオリポソームの固定化により透析システムへの応用が可能であることが示された。しかし、固定化法には、共有結合法、Avidin-Biotin 法、疎水結合法、立体的封じ込め法などがあり、それぞれ一長一短がある。本研究では、境界脂質として DOPE を用いているので、DOPE の頭部のエタノールアミン基を介した共有結合法を用

いる。以降において、プロテオリオソームをゲル担体に共有結合により固定化するための最適条件を探索した。

C-2-1. 固定化に及ぼすゲル担体の影響

固定化に及ぼすゲル担体の影響を検討した。プロテオリポソームの脂質組成は先述の DOPC/DOPE を用いた。図 C-3 に各種ゲル担体におけるローダミン B 除去量を示した。最も高い除去効率を与えるのは Sephacryl S-1000 であった。次いで Sephadex や TSK 6000PW の固定化量が高かった。これらは疎水性が高く、ゲル担体としても固めであるが、Sephacryl S-1000 のように柔らかいゲル担体への固定化は非常に効率が低かった。カラムへの充填などの実用面を考えると、Sephadex S-1000 のような硬いゲル担体を用いるのが有効であることが示唆された。

C-2-2. カラム長さの影響

固定化プロテオリポソームカラムによる薬物や老廃物の除去プロセスの効率は、カラム長さ(充填高さ)に直接影響を受ける。そこで、カラム長さの効果を検討した。図 C-4 は、プロテオリポソームの固定化量で基準化したローダミン除去量をカラム長さに対してプロットした図である。ゲルの種類によらず両者は良好な相関性を示しており、期待通り、薬物除去能が、カラム長さに比例する固定化量に依存することが示された。

C-3. プロテオリポソーム固定化カラムによる透析操作

プロテオリポソーム固定化カラムによる透析操作を行うため、図 C-5 のような操作系を構築した。模擬血流としてローダミン B と各種共存物質を混合した溶液を用いた。ここで、プロテオリポソーム固定化カラムに直接模擬

血流を流通させる方式を Single-flow 方式と呼び、透析カラムにプロテオリポソームをつなぐ方式を Double-flow 方式と呼ぶ。

Single-flow 方式の場合、各種タンパク質を共存するとローダミン B の除去率が低下する。MDR1 を組み込んだリポソームの疎水性は大きいので、疎水性相互作用によりウシ血清タンパク質や β_2 -ミクログロブリンが結合し、輸送活性を低下させたと考えられる。一方、 $A\beta(1-40)$ はMDR1の輸送基質になることが知られており(Lam et al., 2001)、競合阻害剤として作用した可能性が高い。

Double-flow 方式の場合、模擬血流と除去系が直接接触していないので、第3成分が存在している場合でも除去効率の低下は

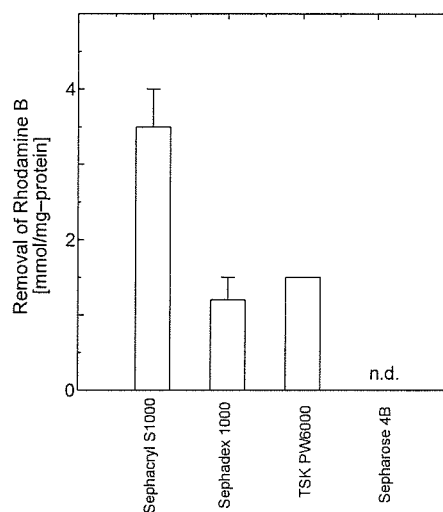


図 C-3 固定化に及ぼすゲル担体の影響

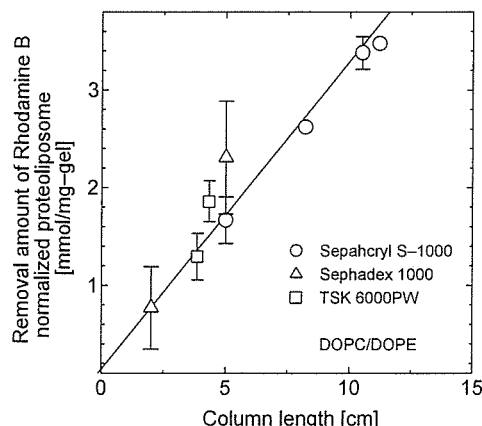


図 C-4 カラム長さと除去能の関係。カラム径は 0.5cm, 流速: 0.25ml/min, 脂質系: DOPC/DOPE

Single-flow ほど顕著ではなかった。この結果はプロテオリポソーム固定化カラムが Double-flow 方式において効果的に機能を発現することを示している。

D. 考察

本研究においてリポソーム固定化手法として共有結合法を選択した理由は、用いた脂質組成(DOPC/DOPE)が共有結合に必須なエタノールアミン基を有するからである。しかし、どのゲル担体に対してもプロテオリポソームの固定化量は高々2 $\mu\text{mol}/\text{mg-gel}$ であり、全体的に対照系としての(MDR1 を含まない)リポ

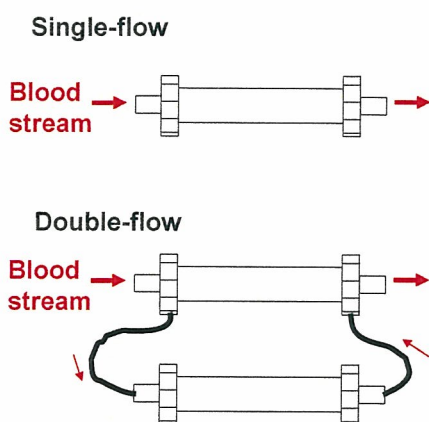


図 C-5 透析操作の概要

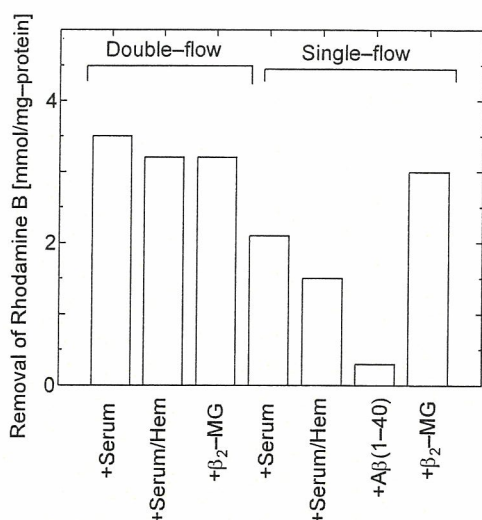


図 C-6 Single-flow および Double-flow における模擬血流からのローダミン B 除去効率。模擬血流には各種タンパク質(10 μM)を共存させた。

ソームよりも固定化量が少なかった。MDR1 が嵩高い部位(ATP 結合部位や輸送部位)が外水相に向き、固定化部位となる DOPE が MDR1 の周囲に存在するため、DOPE が有効にゲル担体と共有結合しにくい。Avidin-biotin 法の場合、biotin のスペーサー長さを分子設計することで上記の問題点が克服できると考えられる。

β_2 -ミクログロブリンや A β はアミロイド性タンパク質として知られている。特に、透析分野においては、 β_2 -ミクログロブリンは透析アミロイドーシスの原因タンパク質として、分離対象として種々の分離カラムが開発されている。本研究においては、 β_2 -ミクログロブリンが共存する場合、Single-flow と Double-flow のいずれの場合も目的物質の除去効率に影響を与えなかった(図 C-6)。 β_2 -ミクログロブリンは分子内水素結合が不安定であり、脂質膜への吸着が強いことが分かっている(Fernandez et al., 2003)。したがって、図 C-6 の結果は、MDR1 と β_2 -ミクログロブリンの相互作用が MDR1 の輸送活性を妨げない様式に依ることが推定される。

MDR1 に関する従来の輸送機構(vacuum cleaner 仮説)を図 B-1 に示す。前年度に検討した通り、MDR1 を含むプロテオリポソームは 24 時間で凝集・沈殿、もしくは膜融合に至る。詳細な検討が必要であるが、 β_2 -ミクログロブリンは輸送部位周辺の嵩高いドメインに結合し、結果として MDR1 の輸送活性を妨げない形になっていると推測される。もしくは、MDR1 の輸送活性が膜流動性には相関しない点を踏まえると、脂質膜に結合している可能性がある。

他方、A β は薬物除去効率の低減効果を示している。輸送機構は vacuum cleaner 機構だけではなく、MDR1 が ATP を分解するときを生じるコンフォメーションの変化と周辺脂質の秩序の変化が密接に関連しているとする仮説(flippase 仮説)もある(Lam et al. 2001)。A β

とローダミン B はいずれも MDR1 の基質になり、それぞれの解離定数は $K_d = 12.5 \mu\text{M}$ (Lam et al., 2001), $3.2 \mu\text{M}$ (Sharom et al., 1996) である。MDR1 に対する $A\beta$ の結合部位は明確にされていないが、競争阻害効果の観点からは、 $A\beta$ が呈する除去効率の顕著な低下は説明できない。Lam ら(2001)によれば、 $A\beta$ の輸送機構は vacuum cleaner 機構よりもむしろ flippase 仮説に基づいて説明されるべきであるとしている。つまり、 $A\beta$ が示す薬物除去効率の低減効果は競争阻害によるものではなく、境界脂質である DOPE が形成しているドメインに $A\beta$ が結合することで、輸送活性発現過程における MDR1 のコンフォメーション変化に必要な周辺脂質の秩序構造の変化を妨げることに依ると考えられる。

E. 結論

MDR1 をモデル細胞膜(プロテオリポソーム)の多剤耐性について検討した結果、脂質に依存することが分かった。共有結合法によるプロテオリポソームのゲル担体(Sephadex S-1000 など)への固定化は効率が低いが、長時間安定であった。また、薬物除去効率は、ゲルの種類や充填量に依存する。

プロテオリポソーム固定化カラムを透析カラムに接続する(Double-flow にする)ことで、模擬血流環境においても薬物除去効率が維持されることが見出された。

【参考文献】

- Chifflet, S. et al., *Anal. Biochem.*, **168**, 1-4(1988)
Yoshimoto, M., R. Kuboi, Q. Yang and J. Miyake, *J.Chromatogr. B*, **712**, 59-71(1998)
Sharom, F.J., et al., *J. Biol. Chem.*, **270**, 10334-10341 (1995)
Liu and Sharom, F.J., *Biochemistry*, **35**, 11865-11873 (1996)
Fernandez, A. and Berry, R.S., *Proc. Natl. Acad. Soc. USA*, **100**, 2391-2396 (2003)
Lam F.C. et al., *J. Neurochem.*, **76**, 1121-1128 (2001)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 論文

1. Proteoliposome as a functional material for the artificial organs, T. Shimanouchi, R. Kuboi et al., *Artificial organs*, to be submitted

G-2. 学会発表

1. 分離機能を有するリポソームの調製と膜分離システムへの応用, (阪大院・基礎工) 島内 寿徳, 馬越 大, 久保井亮一, 分離技術会年会, 早稲田大学, 2006年6月
2. Stress-Mediated Preparation of Liposome Incorporating Membrane Protein, T.Shimanouchi, H. Umakoshi, R.Kuboi, 6th ESBES, Salzburg (2006.8.28)

G-3. 新聞報道

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

III. ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究
薬物代謝機能発現環境の最適化

分担研究者 大政健史 大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻 助教授

研究要旨：本研究では、ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究を目指し、薬物代謝の機能発現にかかる環境について簡便に検討できる系として、昨年引き続き、生体血管内反応系を模倣することの可能なマイクロリアクタによる評価系について検討した。容量 100 μ L のマイクロリアクタ内に肝臓由来の薬物代謝強化細胞や初代肝細胞を播種し、生体外にて生体内反応を模倣した形での薬物代謝評価系を構築し、薬物代謝機能発現環境検証系を構築した。

A. 研究目的

薬物代謝とは、生体内において行われる酵素反応による化合物(蛋白質も含む)の化学構造の変化である。すなわち、ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスを開発するにあたり、「生体内反応」そのものを担っている薬物代謝機能発現環境を整備することは非常に重要なポイントである。

生体内にてこれら薬物代謝反応を担っているのは細胞内に存在する酵素であるが、酵素反応の反応場としては、マイクロレベルでの構造体：細胞、組織等が用いられている。すなわち、生体内では生きたマイクロバイオリアクターが生体反応を担っていると言っても過言では無い。

生体内における薬物代謝反応場として、最もよく知られているのが、肝臓である。肝臓は人体の化学工場と呼ばれる様に、数百以上の非常に多数の化学反応に関わっている臓器である。

肝臓は、生体内最大の臓器（成人で約 1.5kg）であり、約 50 万の肝小葉と呼ばれる構造体からなっている。一つの肝小葉には 50 万個の肝細胞があり、これらの細胞が放射状に配置され、効率よく血液と接することにより、その機能を発揮できる様になっている。

生体内に吸収された薬物は、肝動脈を通過して毛細血管を通じて肝実質細胞に供給され、「連続的に」代謝される。内径 10 μ m 程度の毛細血管の場合、血流量は 10^{-7} ml/min 程度となり、まさにマイクロチャンネルと同レベルの層流条件下での反応が実現されている。

ヒト生体内薬物代謝の機能発現にかかる環境を解明する事柄は、医薬品の開発においては、避けては通れない必須の検討項目であり、化合物自身の構造に基づく予測、解析、酵素、肝ミクロソーム、細胞株、初代細胞から動物実験までありとあらゆる手段によって *in vitro* の実験からヒトにおける *in vivo* での代謝を予測する手法が開発されている。これらのアプローチは、構成要素を要素分解して、マイクロレベルでの反応から予測する手法と、ミニスケールでの動物で得られたデータをヒトに外挿して推定する手法がある。

マクロからのアプローチ：動物実験系、バイオ人工臓器

薬物のヒト体内における薬物代謝環境を予測するためには、アロメトリーと呼ばれる個体の大きさ（体重や表面積など）と臓器の構造及び機能との相関性を用いた経験則を利用

して、予測をする手法が主として用いられている。本手法は実際の医薬品開発の現場においては常套手段として利用され、近年では、ヒト初代肝臓細胞を移植可能なマウスを構築し、これを用いて薬物代謝を予測しようとする試みがある。一方、動物実験自体について、できるだけ回避しようとする方向性もあり、近未来的には、細胞を用いて再構築したバイオ人工肝やバイオ人工腎によって薬物代謝を予測する手段についても検討されている。

バイオ人工臓器は従来の機械的装置のみからなる人工臓器ではなくて、より実際の生体に近い生体由来の材料（細胞、酵素等）を用いて、これと人工物を組み合わせることにより構築した臓器である。人工肝臓の場合は、生体由来の初代肝実質細胞や、細胞株を用いて、これを高密度可能なリアクターと組み合わせる事により、薬物やアンモニアの代謝を行わせる事が可能となる。一方、バイオ人工腎臓は、従来の濾過機能のみをシミュレートしている血液透析とはことなり、腎由来細胞と透析装置を組み合わせることにより、腎機能を再現しようとする試みである。さらには、肝臓と腎臓の細胞を組み合わせることにより、これらの臓器による薬物代謝を再現する試みもある。

ミクロからのアプローチ：肝ミクロソーム、初代肝細胞、肝由来細胞株の利用

一方、これに対してヒトでの代謝予測を、薬物代謝を担っている酵素、細胞に要素分解することにより行う手法も様々に用いられている。具体的にはP450を多量に含むヒト肝ミクロソーム画分やヒト初代肝細胞、肝由来細胞株を用いることにより、生成される代謝物

の構造決定、代謝経路の解明、さらには代謝経路に関与する酵素系の解明、細胞における酵素誘導、薬物相互作用、基質阻害活性、等の検討である。現在、これらの評価系を用いた新薬候補化合物の絞り込みのためのハイスループットアッセイ系は、できるだけ多数のサンプルの評価を同時にこなすために、回分反応を用いて行われている。ところが、しばしば、これらの評価を行う際には、回分反応であるがゆえに、代謝反応の直線性が保たれていない範囲での測定や、広い基質濃度範囲での代謝活性検証が行われていない場合がある。また、反応に伴って基質濃度が減少し、反応速度も低下する。

そこで、基質濃度を一定に保て、かつそのレベルを自由自在に制御可能で、かつ、ステップ応答的に基質を切り替えられるため、多種の薬物に対する切り替え応答についても評価可能なシステムとしてマイクロチャネルを用いたマイクロリアクターが注目されている。

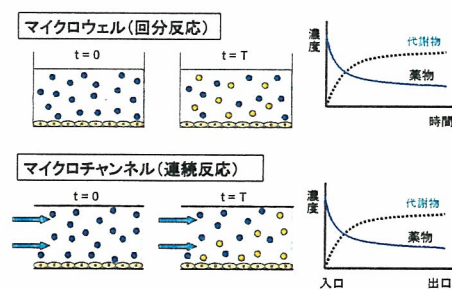


図 マイクロウェルとマイクロチャネルの比較

本年度は、昨年度に引き続き、薬物代謝評価細胞を用いて下記のような Cell-based screening system の開発を行い、これを用いた薬物代謝環境整備を行うことを目標とし、マ

マイクロリアクターを用いて血管での流れを模倣した評価システムを構築した。

B.研究方法

実験材料としてグルタミン合成酵素遺伝子と薬物代謝酵素遺伝子ヒト CYP3A4 遺伝子を含むベクターを構築し、これを用いて、肝由来の HepG2 細胞株を形質転換して構築した GS-3A4-HepG2 細胞を用いた。本細胞株は、ヒト初代肝細胞と比較して遜色ない P450 3A4 活性を持つ。また、さらにヒト初代肝細胞を用いて、実際の肝細胞における代謝についても検討した。

センサとしての細胞をもちいて測定系を構築するためには、細胞の測定環境の整備が欠かせない。そこで、マイクロリアクターとして、昨年度と同様に、下記の図に示す深さ 400 μm 、幅 4000 μm 、流路長 50mm のマイクロチャンネル型リアクター(容積 100 μL , $\mu\text{-SlideI}$)を用いて薬物代謝実験を行った。

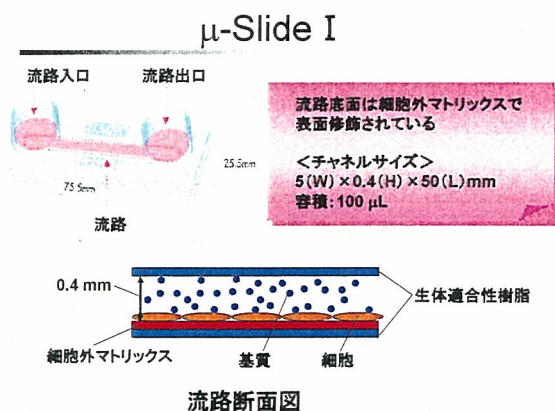


図 マイクロリアクター($\mu\text{-SlideI}$)の構造

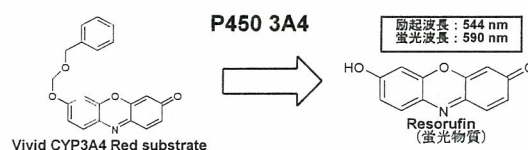
(倫理面への配慮)

ここで用いた研究手法は、すでに既知(公表済)の細胞株および遺伝子を用いており、また、ヒト初代肝細胞は、HAB 研究機構を通じて所定の倫理審査の元に入手したものである。

C.研究結果

マイクロリアクターの操作因子として、もっとも重要なパラメータにリアクタへの薬物を導入する流速がある。生体内の血管においては、血管のサイズによって流速が変化する。昨年度に引き続き、肝小葉における流速として、毛細血管における血流値を用い、これに近い流速値として、0.04cm/sec を目安として、流速の設定を行った。この流速で溶液を流すと、層流が実現可能である。

連続反応系での測定を行うため、細胞培養容器として $\mu\text{-Slide I}$ (ibidi) を使用した。流路底面は細胞外マトリックスによって表面修飾が成されており、ここに細胞を播種して接着させ、代謝反応の場とする。基質は P450 3A4 によって特異的に代謝されて蛍光物質 resorufin となる Vivid CYP3A4 Red Substrate を 1 μM 、5 μM 、25 μM で用いた。本基質は励起波長 544nm、蛍光波長 590nm にて CYP3A4 特異的の反応を検出可能である(下図)。



上記のマイクロリアクターおよび細胞を用いて、基質濃度 1 μM 、流入速度 3mL/h にて連続培養を行い、同じ基質濃度の回分反応と比較して、細胞あたりの代謝活性の経時変化を求めた。

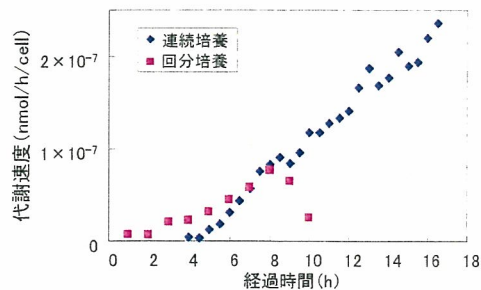


図 細胞あたりの代謝速度の経時変化

連続反応系においては、代謝活性が時間と共に上昇していくが、回分培養では8時間まで経過した後に活性が低下し、連続反応系での活性上昇がみられた。

同様の実験を初代肝細胞を用いた系においても行った。実験条件として基質濃度 25 mM, 300 mL/h の流速にて反応を行い、その代謝速度の経時変化を測定した。またその結果を回分培養と比較した。さらに、反応前後で細胞の接着を観察・比較した。その結果、肝細胞株とは異なり、ヒト初代肝細胞は、連続・回分どちらの反応系においても活性を維持していた。また、反応前後において、細胞の剥離などの接着面からの解離は見あたらず、安定に接着・反応を行うことが可能であった。

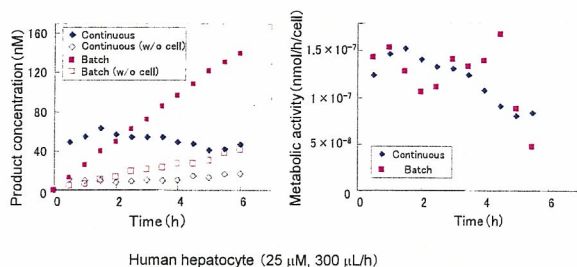


図 初代肝細胞による回分・連続反応

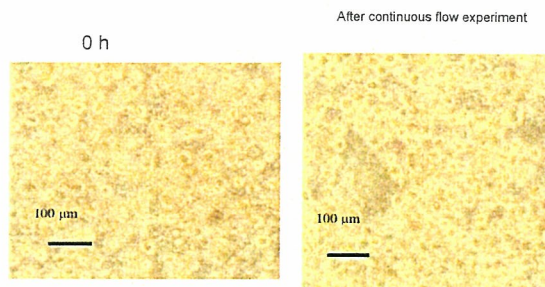


図 反応前後における細胞の形態変化

E. 結論

以上をまとめると、薬物代謝の機能発現にかかる環境について、生体内薬物代謝環境を忠実に再現する手段の候補の一つとして、薬物代謝細胞をもちいたマイクロリアクタによる代謝活性測定システムを構築した。マイクロリアクタを用いた連続反応系と通常のディッシュを用いた回分反応系を比較したところ、連続反応系においては代謝活性が持続的に維持され、上昇することが示された。さらに、ヒト初代肝細胞を用いた系においてもマイクロリアクタを用いた反応系を構築できた。実際の非細胞性代謝機能代替デバイスにおいては、連続反応系を用いることになり、本研究で得られたシステムが薬物代謝環境整備に十分なる貢献が期待できる。

F. 健康危険情報

該当する情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shin Enosawa, Tomoyuki Miyashita, Tomohiro Saito, **Takeshi Omasa**, and Toshiharu Matsumura

"The significant improvement of survival times and pathological parameters by bioartificial liver with recombinant HepG2 in porcine liver failure model." Cell Transplantation. vol.15, No.10, pp.873-880 (2006).

2) Masahiro Takahashi, Masayuki Sakurai, Shin Enosawa, Takeshi Omasa, Shuichi Tsuruoka, Toshiharu Matsumura "Double-compartment cell culture apparatus: construction and biochemical evaluation for bioartificial liver support." Cell Transplantation vol.15, No.10, pp.945-952 (2006).

3) 大政健史 "「工業動物細胞」のゲノム解析 10g/l へ向けたチャレンジ" 化学と生物 vol.45, No.1, pp.9-11 (2007)

2.著書

1)大政健史 「5.1 生体触媒反応の速度論のおさらい」(分担執筆) 化学工学会バイオ部会編「バイオプロダクションーものつくりのためのバイオテクノロジー」 コロナ社、東京 78-82 頁 (2006)

2)高木睦、大政健史 「動物細胞の形質転換と培養」(分担執筆) 今中忠行編 「第5版 実験化学講座 29 巻 バイオテクノロジーの基本技術」丸善、東京 (2006)

3.学会発表

(国際学会)

1) Yumi Narita, Kozue Kaito, Satoshi Terada, and Takeshi Omasa "Generation of functional hepatic

cells for bio-artificial liver and immediate expansion of the cells" In; Engineering Conference International: Cell Culture Engineering X, P-145, p.237, April 23-28, 2006, Whistler, BC, Canada

2)Takeshi Omasa, Hidenori Yano, Yihua Cao, Mihoko Kajita, Yuki Ogura, Tomohiro Yoshikawa, and Hisao Ohtake "Suitable chromosomal location for dihydroforate reductase gene amplification in Chinese hamster ovary cell" In; Engineering Conference International: Cell Culture Engineering X, P-38, p.130, April 23-28, 2006, Whistler, BC, Canada (2006)

4.その他

新聞記事:日経産業新聞 平成 18 年 11 月 16 日 薬品代謝生体に近く アテクトと阪大 評価装置開発へ

H.知的財産権の出願・登録状況

特になし

ナノテクノロジーによる機能的・構造的生体代替デバイスの開発

Ⅲ ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究

薬剤輸送トランスポーターのメカニズム解析とバイオ人工肝開発に向けた研究

分担研究者 植田 和光（京都大学大学院農学研究科 教授）

研究要旨：

薬剤輸送トランスポーターMDR1 を精製し、それらを人工リン脂質膜に埋め込んだプロテオリポソームを用いてバイオ人工肝を開発するためには、それら薬剤輸送トランスポーターをどのようにして活性を保ったまま精製し、効率よくリポソームに再構成し、安定性を保つかが重要な課題である。本年度の研究によって、20%程度コレステロールを含むリポソームに再構成することによって MDR1 が高い活性を示すことが明らかになった。MDR1 と高い相同性をもつ MDR2 は細胞膜中の PC を特異的に細胞外へ排出すること、PC 輸送には胆汁酸が必要であることが明らかになった。さらに精製 ABCA1 を用いた研究から ABCA1 は PC を輸送基質として最も好むこと、コレステロールも基質として ABCA1 によって直接認識されていることが示唆された。

A. 研究目的

A-1. 背景

MDR1 は、12 の膜貫通セグメントによって膜に埋め込まれ、分子内に存在する 2 つの ATP 結合領域が交互に ATP 加水分解を繰り返すことによって構造変化を繰り返し、薬剤を輸送している。ATP 加水分解によって生じる MDR1 のダイナミックな構造変化が物質の輸送と共役していると考えられる。それゆえ、これらトランスポーターを精製し、それらを人工リン脂質膜に埋め込んだプロテオリポソームを用いてバイオ人工肝を開発するためには、薬剤輸送トランスポーターをどのようにして活性を保ったまま精製し、効率よくリポソームに再構成し、安定性を保つかが重要な課題である。そのためには、薬剤輸送トランスポーターの作用メカニズムを理解するとともに、膜からの可溶化条件、精製条件、再構成条件などの最適化が必要である。

本年度は、人工リポソーム中のコレステロールと精製 MDR1 の相互作用を検討し、再構成条件の最適化を行なった。また、MDR1 と高い相同性をもつ MDR2 との機能の比較を行なった。さらに、HDL 形成に重要な役割を果たす ABCA1 についても、MDR1 と同様に精製して機能解析した。

B. 研究方法

B-1. 精製 MDR1 再構成系の最適化

ヒト MDR1 を昆虫細胞 Sf9 細胞を用いて大量発現し精製した。精製 MDR1 をコレステロール (0 ~ 40%) を含む人工リポソーム(PC : PE : PS = 4 : 4 : 2)に精製 MDR1 を再構成し、さまざまな輸送基質によって誘導される ATP 加水分解を測定することによって、精製 MDR1 再構成系の最適化条件を検討した。

B-2. MDR1 と MDR2 の機能の比較

ヒト MDR2 は、肝細胞の毛細胆管膜に発現し

ており、MDR2 の変異により肝内胆汁うっ滞や胆石症が生じ、深刻な肝疾患となる。また、MDR2 は MDR1 と 78% のアミノ酸配列で同一であるが、MDR1 とは異なり、MDR2 の発現では多剤耐性は生じず、MDR1 も MDR2 の機能を代替できない。MDR2 やマウス Mdr2 は、ホスファチジルコリン(PC)の胆汁中への排出に関わっていると考えられている。しかし、MDR2 による PC 排出の関係について、細胞レベルでの研究は行われておらず、その機能に関しては不明な点が多く残されている。そこで、MDR2 を安定発現する HEK293(HEK/MDR2)細胞を用い、胆汁酸存在下でのリン脂質排出について調べた。また、Mdr2 ノックアウトマウスの胆汁中にはわずかなコレステロールしか含まれていないことが報告されていることから、HEK/MDR2 細胞によるコレステロール排出についても検討を行った。

B-3. ヒト ABCA1 の精製

HDL 形成に重要な役割を果たすヒト ABCA1 の C 末端にヒスチジンタグを融合した蛋白質を昆虫細胞で大量発現し、精製した。精製 ABCA1 をさまざまな脂質で形成させた人工リポソームに再構成し、ATP 加水分解を測定することによって ABCA1 の輸送脂質を明らかにすることを試みた。

C. 研究結果と考察

C-1. 精製 MDR1 再構成系の最適化の検討

さまざまな濃度のコレステロールを含有する人工リポソーム(PC : PE : PS = 4 : 4 : 2)を調製し、そこに精製 MDR1 を再構成した。そして、コレステロール濃度が MDR1 の ATP 加水分解活性に影響するかどうか検討した結果、コレステロール濃度が 30% まで濃度に依存して ATP 加水分解活性を増大させることが明らかになった。

コレステロールは分子量が 500 以下の薬剤に対する親和性を一律に向上させた。一方コレステロールは分子量が 800 から 900 の薬剤に対す

る親和性には影響せず、分子量が 1000 を超える大きな輸送基質に対する親和性を減少させた。

これらの結果から、MDR1 は分子量 800 から 900 の化合物を最も効率よく認識する基質結合部位を持つことが示唆された。コレステロールは MDR1 が小さな化合物を認識する場合、輸送基質と同時に基質結合部位に結合し、余剰の空間を充填することでより効率よく基質の認識を可能にすることが示唆された(図1)。

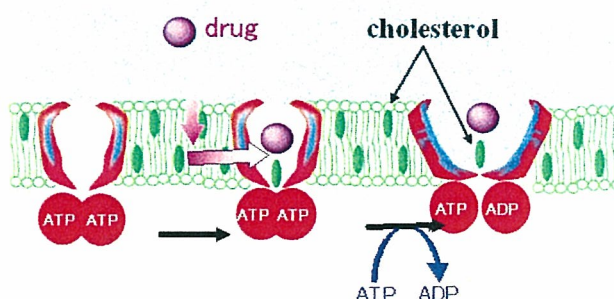
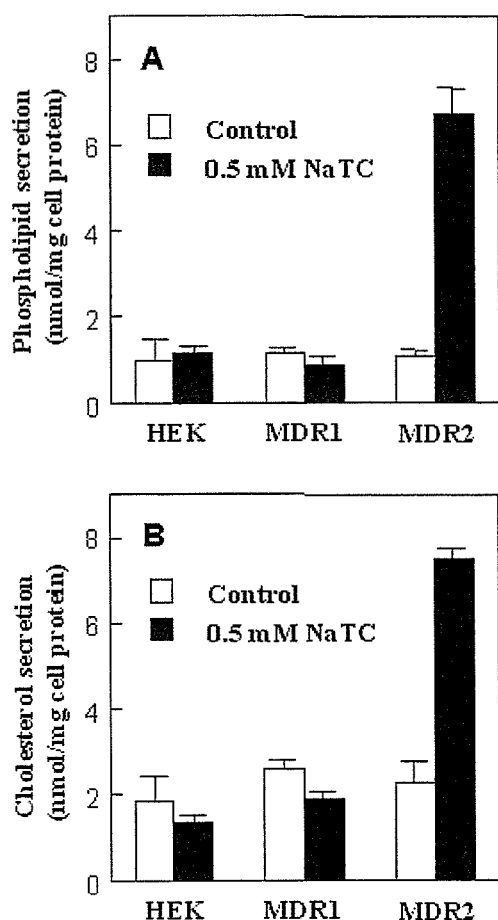


図1. MDR1 による輸送のコレステロールによる調節

C-2. MDR1 と MDR2 の機能の比較

リン脂質やコレステロールは、胆汁中で胆汁酸と混合ミセルを形成している。そこで、胆汁酸による HEK/MDR2 細胞からのリン脂質とコレステロールの排出に対する影響について調べた。培地中に 0.02% BSA のみを含む条件では、HEK と HEK/MDR1、HEK/MDR2 細胞でリン脂質とコレステロール排出に差は見られなかった。しかし、0.5mM タウロコール酸存在下では、HEK/MDR2 細胞でリン脂質とコレステロール排出が大きく増加したのに対し、HEK と HEK/MDR1 細胞では変化が見られなかった(図2)。このとき、タウロコール酸存在下で MDR2 依存的に排出されたコレステロール/リン脂質のモル比は 1.1 であった。また、HEK/MDR2 細胞のリン脂質とコレステロールの排出に対する促進作用は、タウロコール酸 > グリココール酸 > コール酸の順となった。質量分析の結果、0.5mM タウロコール酸存在下で HEK/MDR2 細胞から排出されたリン脂質は、主に 16:0-18:1 PC であることが示された。これらの



ことから、胆汁酸、特にタウロコール酸は、MDR2 による細胞からの PC 排出のアクセプターとして働くことが明らかとなった。

図 2. MDR2 による胆汁酸に依存した PC・コレステロール排出

タウロコール酸により促進される HEK/MDR2 細胞からのコレステロール排出は、MDR2 による能動的なものか、MDR2 により排出されたリン脂質とタウロコール酸との集合体への拡散によるものかを確認するために、PC リポソームを用いた実験を行った。その結果、HEK 細胞からのコレステロール排出は、PC リポソーム濃度依存的 (50–200 μ M) に増加した。しかし、HEK/MDR2 細胞が排出する PC とほぼ同量の低濃度 (2.5 μ M) PC と 0.5mM タウロコール酸の存在下では、HEK 細胞からのコレステロール排出量の増加は見られなかった。このことから、タウロコール酸存

在下で、MDR2 は能動的にコレステロールの排出を行っていることが示唆される。

以上のことから、肝臓において MDR2 は胆管中へ PC とコレステロールを排出することで、胆汁形成における重要な役割を果たし、胆汁酸の毒性による肝障害を防いでいると考えられる。

C-3. 精製 ABCA1 を用いた輸送基質の検索

精製 ABCA1 は、界面活性剤による可溶化状態でも ATP 加水分解活性を示し、さらに大豆脂質の添加によって約 2 倍に増加した。脂質排出活性が損なわれる ATP 結合ドメイン変異体 (K939M) では ATP 加水分解活性を示さず、また脂質による誘導も見られなかった。

次に、精製 ABCA1 を合成脂質だけで構築したリポソームに再構成した。その結果、ABCA1 はホスファチジルコリンを多く含んだリポソームに再構成すると最も強く ATP 加水分解活性が誘導されることが明らかになった。ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロールを含むリポソームで再構成すると、それらの含量が増えるにしたがって活性が減少した。また、脂肪酸鎖ではオレイン酸とパルミチン酸をもつホスファチジルコリンを含むリポソームに再構成したときに最も高い活性を示した。これは、ABCA1 によって細胞外へ排出される脂質を質量分析によって分析した時に、一番高濃度に検出される脂質であった。以上の結果は、ABCA1 がオレイン酸とパルミチン酸をもつホスファチジルコリンを最適な基質として認識し輸送していることを示唆している。さらに、HDL 形成を阻害することが知られているグリベンクラミドによって ABCA1 の ATP 加水分解活性が一部阻害を受けることが明らかになった。しかし、コレステロールを含むリポソームに再構成すると ABCA1 の ATP 活性は抑制された。

D. 結論

人工リポソームに含まれるコレステロールによってMDR1のATP加水分解活性が影響を受けること、20%程度コレステロールを含むリポソームを用いることによってMDR1が高い活性を示すことが明らかになった。MDR2は薬剤は輸送しないが細胞膜中のPCを特異的に細胞外へ排出すること、そしてPC輸送には胆汁酸が必要であることが明らかになった。さらに精製ABCA1を用いた研究からABCA1はPCを輸送基質として最も好むこと、ABCA1はコレステロールも基質として直接認識していることが示唆された。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

G-1.論文

Takahashi, K., Kimura, Y., Kioka, N., Matsuo, M. and Ueda, K. Purification and ATPase Activity of Human ABCA1. **J Biol Chem**, 281, 10760-10768 (2006)

Matsumura Y, Ban N, Ueda K, Inagaki N. Characterization and classification of ATP-binding cassette transporter ABCA3 mutants in fatal surfactant deficiency. **J Biol Chem**. 281, 34503-34514 (2006)

Kobayashi, A., Takanezawa, Y., Hirata, T., Shimizu, Y., Misasa, K., Kioka, N., Arai, H., Ueda, K., and Matsuo, M. Efflux of sphingomyelin, cholesterol and phosphatidylcholine by ABCG1. **J Lipid Res**. 47, 1791-1802 (2006)

Abe-Dohmae, S., Ueda, K. and Yokoyama, S. ABCA7, a molecule with unknown function, **FEBS Lett**, 580, 1178-1182 (2006)

Abe-Dohmae, S., Kato, K.H., Kumon, Y., Hu, W., Ishigami, H., Iwamoto, N., Okazaki, M., Wu, C.A., Tsujita, M., Ueda, K. and Yokoyama, S. Serum amyloid A generates high density lipoprotein with cellular lipid in an ABCA1- or ABCA7-dependent manner. **J Lipid Res**. 47, 1542-1550 (2006)

Nagao, S., Murao, K., Imachi, H., Cao, W. M., Yu, X., Li, J., Matsumoto, K., Nishiuchi, T., Ahmed, R. A., Wong, N. C., Ueda, K., Ishida, T. Platelet derived growth factor regulates ABCA1 expression in vascular smooth muscle cells. **FEBS Lett**, 580, 4371-4376 (2006)

Mutoh K, Mitsuhashi J, Kimura Y, Tsukahara S, Ishikawa E, Sai K, Ozawa S, Sawada J, Ueda K, Katayama K, Sugimoto Y. A T3587G germ-line mutation of the MDR1 gene encodes a nonfunctional P-glycoprotein. **Mol Cancer Ther**. 5, 877-84 (2006)

Yazaki, K, Yamanaka, N., Masuno, T., Konagai, S., Shitan, N., Kaneko, S., Ueda K. and Sato, F. Heterologous Expression of a Mammalian ABC Transporter in Plant and its Application to Phytoremediation. **Plant Molecular Biology**, 61, 491-503 (2006)

Kimura, Y., Kioka, N., Kato, H., Matsuo, M., Ueda, K. Modulation of drug-stimulated ATPase activity of human MDR1/P-glycoprotein by cholesterol. **Biochem J**. 401, 597-605 (2007)

Morita, S.-y. Kobayashi, A., Takanezawa, Y., Kioka, N., Handa, T., Arai, H., Matsuo, M., Ueda, K. Bile Salt-Dependent Efflux of Cellular Phospholipids Mediated by ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). **Hepatology**, in press (2007)

小段篤史、木村泰久、加藤博章、植田和光 ABC
蛋白質の構造解析が拓く未来 未来材料 10,
30-36 (2006)

ABC 蛋白質による薬剤輸送と脂質恒常性
バイオ・マイクロシステム研究会
(2006. 10. 31)

植田和光、高橋 圭、小林 綾、松尾道憲 脂
質を動かすABC蛋白質 蛋白質核酸酵素 51,
342-349, 2006

G-3.新聞報道
なし

植田和光、稲留弘乃、梅田真郷 膜脂質2重層を
横切るフリップ・フロップ脂質輸送 実験医学
24, 905-911, 2006

H.知的所有権の取得状況
なし

植田和光、吾妻佑哉、高橋 圭、松尾道憲 ABC
タンパク質の輸送体および受容体としての生理
的重要性 実験医学 24, 608-615, 2006

G-2.学会発表

ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From
Multidrug Resistance to Genetic Disease
1st FEBS Special Meeting on ABC Proteins
Plenary Talk (2006.3.7)

ABC proteins in lipid homeostasis
Gordon Research Conference, Membrane Transport
Protein (2006.08.15)

Function and mechanism of ABC proteins involved
in lipid homeostasis
FEBS Special Meeting European Lipidomics
Initiative (2006.10.23)

ABC 蛋白質による薬剤輸送と脂質輸送
日本生体医工学会 (2006.5.16)

MDR2 発現細胞によるリン脂質とコレステロー
ルの排出
脂質生化学会 (2006. 6. 8)

トランスポーター研究に基づく医薬品開発
東京肝臓シンポジウム (2006. 6. 10)

III. ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究

薬物トランスポーター機能発現環境の最適化

分担研究者 藤村昭夫 自治医科大学臨床薬理学教室 教授

研究要旨：ナノテクノロジーを応用した非細胞性代謝機能代替デバイスとしての新しいタイプの人工肝臓作成に向けて、抱合型ビリルビンを効率よく輸送する新規膜蛋白 ABCA8 を肝臓において高発現させる条件について、マウスを用いて検討した。慢性腎不全モデルに対して急性胆管欠紮を行い、抱合型ビリルビンを負荷すると、無処置の約 20 倍までマウス肝臓における同遺伝子および蛋白発現が増加した。また、バキュロウィルスを用いることで、蛋白の大量生成が可能となった。これらの知見により、非細胞性代謝機能代替デバイスへの蛋白導入が可能となったと考えられる。

A. 研究目的

肝不全患者の治療には肝移植が行われるが、移植可能な肝臓が必ずしも常にあるわけではなく、現時点での問題となっている。培養肝細胞を用いた人工肝臓は移植までの bridging に使用され、少なくとも外国においては一定の成果を挙げている。しかし、これらの人工臓器には抱合型ビリルビンの除去が困難であるという共通した欠点があり、このため人工肝臓を長期間使用することができなかった。一方近年の分子生物学の進歩により、ビリルビンを含めた、様々な薬物の体内からの排泄機序が明らかとなりつつある。

昨年までに研究者らは本研究においてナノテクノロジーを応用した非細胞性代謝機能代替デバイスとしての新しいタイプの人工肝臓作成に向けて、抱合型ビリルビンを効率よく輸送する新規膜蛋白 ABCA8 をクローニン

グし、その機能解析を詳細に明らかにするとともに、動物肝臓においてこの蛋白・遺伝子発現量を増加させる手段を検討した。これにより正常肝臓よりも 2-3 倍量の蛋白を得るための条件を明らかにするなど、一定の成果を挙げてきた。しかしナノテクノロジーを応用した非細胞性代謝機能代替デバイスにこの蛋白を付与するためにはより多くの蛋白を得ることが必須であり、そのためには本遺伝子を安定発現させた培養細胞系を確立することが急務であった。

そこで本年度は、第 1 に昨年度までの研究を継続し発展させ、マウス肝臓において、更に新規膜蛋白 ABCA8 蛋白発現量を上昇させることができる条件を探索した。具体的には腎機能障害時には肝臓での CYP3A4 など薬物代謝機能・さらには OATP など薬物排泄機構が代償的に変化するということが最近報告さ

れており、この影響を明らかにした。またこれと平行して、バキュロウイルスを用いた蛋白発現系の確立を目的として研究を行った。

B.研究方法

C57BL/6 マウスを用いて片側腎動脈分枝を欠紮し、1 週後に反対側腎臓を摘出することにより 5/6 腎臓摘出慢性腎不全モデルを作成した。手術終了後経時的に採血採尿を行い、クレアチニンクリアランスにより腎機能を評価した。腎不全となったことを確認したあと、さらに胆管欠紮を行い、組織を取り出して解析に供した。

ABCA8 mRNA 発現については、昨年度までの研究で得られたマウス ABCA 8 遺伝子配列をもとに作成されたプローブを利用し Real time PCR(Taqman)法により検討した。蛋白発現についても、昨年度までの研究でマウス ABCA 8 蛋白に対するポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロットを行った。これらを用いて、正常および各種モデルマウスにおいて、遺伝子・蛋白発現の変化を検討した。臓器としては、肝・腎などのようにビリルビン・外因性薬物の排泄に関わる臓器だけではなく、脂溶性ステロイドホルモンの体内動態に関わるいくつかの内臓臓器をも検討した。

また、ヒト ABCA8 を組み入れたバキュロウイルストランスファーベクター (Sapphire™ Baculovirus など) を作成し、昆虫培養細 sf9 に感染させることで蛋白を発現させた。バキュロウイルストランスファーベクターは、発現効率の低いものが多かったために、いくつかの市販ベクターを試みた。

C.研究結果

1. 慢性腎不全および腎不全+急性胆管欠紮モデ

ルの作成

腎不全モデルは手術終了後経時的に採血採尿を行ったが、クレアチニンクリアランスから評価した腎機能は徐々に悪化し、約 3 ヶ月で腎不全レベルに達した (図 1)。

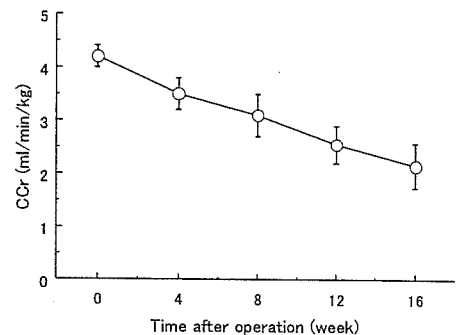


図 1 5/6 腎臓摘除モデルにおけるクレアチニンクリアランスの推移

さらに急性の胆管欠紮処置を行い、肝における遺伝子発現を検討した。欠紮後 12-24 時間をピークに ABCA 遺伝子発現は有意に増加した。これは正常ラットを用いて胆管欠紮を行った場合と比較して、更に大きなものであった (図 2,3)。

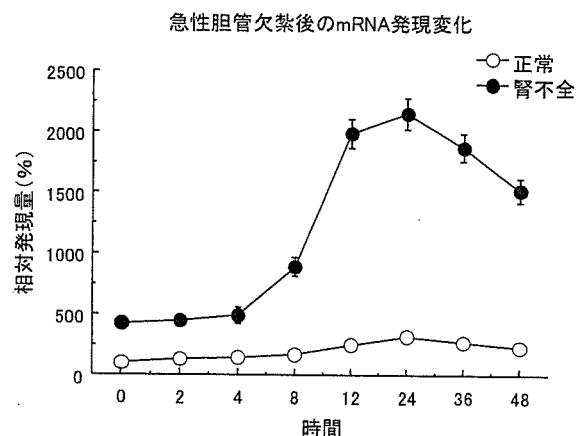


図 2 腎不全モデルにおける急性胆管欠紮時肝における ABCA8mRNA の発現の変化