

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小澤 正吾

平成19(2007)年 3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 ..... 14

石田誠一

2. 遺伝子発現調節機構の解析 ..... 29

宮島敦子

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業（トキシコゲノミクス研究））  
総括研究報告書

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・薬理部室長

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研究に着手した。今年度までにヒト肝癌由来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薬物代謝型P450であるCYP3A4の酵素誘導につき解析し、ほぼ増殖期細胞のみで、誘導がかかることを見出した。増殖期の細胞では発癌関連遺伝子の発現が亢進していたと共に、細胞周期の進行に必要な遺伝子の発現上昇が認められ、増殖期細胞は、平面培養の細胞に比較して細胞増殖が亢進している事を示唆した。また、細胞骨格や細胞間コミュニケーションに関連する遺伝子発現の亢進が新たに見出された。HepG2細胞を用い、ヒストンアセチル化やDNAのメチル化がCYP1AやCYP3A4の構成的発現に重要であることを示唆する結果を得た。

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。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。本研究チームの上記目標は、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こととも関係している。本研究において、近年入手可能になったヒト肝組織を用いて、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した。薬物代

謝において主要な役割を果たす CYP3A4 を始めとして、薬物代謝酵素の発現レベルには大きな個体差が存在することが知られている。CYP3A4 等の遺伝子発現調節機構の解析を目指し、ヒト肝における、CYP3A4 遺伝子の発現量 (mRNA レベル) 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解析を進める。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、ならびにヒト肝組織を用いた薬物代謝酵素遺伝子の発現調節機構の研究に、ncRNA レベルの解析による新たな検討を加えたい。各種 CYP 遺伝子の発現レベルの個体差には関連核内受容体や転写因子の発現が関与していると思われる。近來の分子生物学の進歩により、遺伝子発現調節機構として、ncRNA 以外には、ヒストンアセチル化や DNA メチル化といったクロマチン構造の変化につながる事象が関連していると考えられている。

これらの遺伝子発現調節に関する解析結果を総合し、最終的には、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していく。今年度までに、CYP3A4 遺伝子の誘導がかかる三次元細胞培養系を HepG2 細胞について確立した。最終年度は、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

HepG2 細胞は ATCC より購入し、通常は DMEM (Sigma) + 10 % FBS (Invitrogen) 培地または 4,500 mg/l の glucose を含む William's E + 10 % FBS 培地で平面培養した。JHH-1 ならびに JHH-4 は医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクより購入し、通常は 4,500 mg/l の glucose を含む William's E + 10 % FBS 培地で平面培養した。また、HepG2 細胞を、ヒストン脱アセチル化阻害剤、DNA メチル化阻害剤の影響を調べる実験に用いた。

### 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 CO<sub>2</sub> インキュベータ内で静置培養した。培地は一定量 (100  $\mu$ l) 毎日交換した。

### 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。細胞の支持担体はハイドロキシアパタイト (Pentax Corporation)、及び、ポリビニル酢酸樹脂 (以下 PVA、Muromachi Kagaku) を用いた。シャーレ上で培養している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  $5 \sim 6 \times 10^6$  cells/ml になるように播種した。培地は 10 % FBS 含有 high glucose DMEM (Invitrogen) (HepG2) または 4,500 mg/l の glucose を含む

10 % FBS 含有 William's E 培地 (JHH-1 および JHH-4) を用い、播種後細胞が細胞支持担体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。細胞の増殖は 1 日あたりの培地中のグルコース消費量を測定し (グルコース CII-テストワコー)、あらかじめ平面培養より得た 1 細胞あたりのグルコースの 1 日あたりの消費量をもとに換算し推定した。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。

### RNA 調製

細胞を回収し、PBS で二回洗浄後、RNeasy Mini Total RNA preparation kit (Qiagen) にて RNA を調製した。

### TaqMan real-time PCR

調製した total RNA を TaqMan Reverse Transcription Reagent (Applied Biosystems Inc.) により、試薬に添付された方法に従って逆転写を行い cDNA を調製した。*CYP3A4* 特異的 TaqMan プライマー (Applied Biosystems Inc.) と TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc.) を用い、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

ラジアルフローバイオリアクターに HepG2 細胞を播種後 7 日目に、HepG2 細胞を培養装置下部三箇所より total RNA を回収した。平行して、細胞培養用シャーレ (Corning) で平面培養した sub-confluent の HepG2 から total RNA を回収した。両 total RNA を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。得られた平面培養と三次元培養の遺伝子発現量を *t*-検定により比較し、有意差のあった遺伝子のうち、三次元培養での発現量が平面培養での発現量の2倍以上または2分の1以下であった遺伝子を“三次元培養で発現が変化した遺伝子”とした。該当する遺伝子は94であった。三次元培養で発現が変化した遺伝子のリストを National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH の運営するバイオインフォマティクスツール DAVID Bioinformatics Resources 2007 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)にてクラス分けした。同時に同サイトより遺伝子のアノテーション情報を得た。

#### マクロアレイ解析

細胞培養用シャーレ(Corning)上、4,500 mg/l の glucose を含む William's E +10% FBS 培地中で平面培養した sub-confluent の HepG2、JHH-1、JHH-4 から total RNA を回収し、RT<sup>2</sup> PCR Array First Strand Synthesis kit(SuperArray)により、試薬に添付され、解説された方法に従い逆転写反応を行い、cDNA を得た。得られた cDNA を RT<sup>2</sup> Real-Time PCR SYBR Green/ROX (SuperArray)と混合後、RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array ver 2.0 Drug Metabolism (SuperArray)に添加し Prism 7900 real time PCR system (Applied Biosystems Inc.)によりリアルタイムを実行し増幅データを得た。得られた Ct 値を用い、 $\Delta\Delta Ct$  法により発現量の変化を解析した。

#### ヒト肝組織からの RNA 画分の調製および mRNA 発現量の測定

ヒト肝臓組織は、獨協医科大学および HS 研究資源バンクより供給された転移性肝癌患者における肝臓非腫瘍部位30例を測定検体として使用した。検体は、男性19検体、女性11検体、平均年齢61.2歳 (Mean age  $\pm$  SD: 61.2  $\pm$  11.4)で

あった。Total RNA 画分の抽出は、RNAqueous Small Scale Phenol-Free Total RNA Isolation Kit (Ambion Inc., USA)により行った。Total RNA サンプルを oligo d(T)<sub>16</sub> もしくは random primer により RT 反応を行い、cDNA を調製した。内在性コントロールとして BACT ( $\beta$ -actin), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用い、TaqMan probe を用いた real-time PCR 反応により mRNA 発現量を定量した。対象遺伝子として、薬物代謝酵素は、*CYP1A1*, *1A2*, *2B6*, *2C8*, *2C9*, *2C18*, *2C19*, *3A4*, *3A5*, *GSTA2*, *UGT1A1* を、核内受容体は *AHR*, *PXR*, *CAR*, *GR* および核内受容体と複合体を形成する *ARNT*, *RXR $\alpha$* 、転写因子は、*HNF1A*, *HNF4A* について測定した。内部標準物質として市販のヒト poly (A)<sup>+</sup> RNA (Becton Dickinson, USA) サンプルを使用した。調製した RNA 画分の quality は、Agilent Bioanalyzer により rRNA の 18S, 28S のピークにより確認した。

#### ヒストン脱アセチル化阻害剤、および DNA メチル化阻害剤の HepG2 細胞における薬物代謝酵素遺伝子発現レベルへの影響

HepG2 細胞を、5%炭酸ガス下 10 % FBS, penicillin-streptomycin 添加 DMEM で培養した。ヒストン脱アセチル化阻害剤、トリコスタチン A (TSA) および DNA メチル化阻害剤アザ C (5-aza-2'-deoxycytidine, AzaC)による HepG2 細胞内薬物代謝酵素関連遺伝子の発現レベルに対する影響を調べるため、上記阻害剤で、細胞を種々の濃度、時間処理した。あらかじめ、TSA、AzaC の HepG2 細胞に対する毒性を、細胞増殖阻害を指標として調べ、細胞増殖阻害が現れない薬剤濃度を調べた。薬剤処理後、総 RNA をキアゲン社の RNeasy Mini Kit で回収し、cDNA を Multiscribe Reverse Transcriptase (Applied

Biosystems)で調製した。測定対象遺伝子は、チトクロム P450 (CYP)では、*CYP1A1*, *1A2*, *1B1*, *2A6*, *2B6*, *2C8*, *2C9*, *2C18*, *2C19*, *2D6*, *2E1*, *3A4*, *3A5*、核内受容体では、*PXR*, *CAR*, *AhR*, *RXR $\alpha$* , *GR*, *Arnt*、転写因子では、*HNF1A*, *HNF4A*とした。

上記の種々の遺伝子特異的 TaqMan プライマー (Applied Biosystems Inc.) と TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc.)を用い、ABI Prism 7700 real time PCR system (Applied Biosystems Inc.)により各種遺伝子発現量を測定した。各種 CYP をコードする mRNA レベルを規格化するため、 *$\beta$ -Actin*, *GAPDH*の発現量を測定した。

#### (倫理面への配慮)

今年度、樹立培養癌細胞 HepG2 細胞を用いて行った研究の内容には、遺伝子配列解析実験も含まれておらず、倫理面で配慮すべき該当事項はなしと考える。本研究におけるヒト組織使用は国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会の承認を受けて行った。また、研究に使用したヒト肝組織は、獨協医科大学およびヒューマンサイエンス財団研究資源バンクにおいて、書面にてドナーより同意を得て取得した試料である。いずれの試料も、連結不可能匿名化され、個人を特定することはできず、提供者の人権を損害する危惧はない。提供された試料は本研究にのみ使用し、使用後は定められた基準に従い廃棄した。

### C. 研究結果

#### スフェロイド形成

予備検討として、まず各種細胞播種濃度によるスフェロイドの形成の差異と回収されてくる total RNA 量を検討した。細胞培養用シャーレ

上で培養した 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 CO<sub>2</sub> インキュベータ内で静置培養した。培地交換は毎日行った。6 日間のスフェロイド形成では 1 well あたり 3 X 10<sup>4</sup> cell を播種し、16 well の細胞から total RNA を調製すると十分量の total RNA が回収できた。この時スフェロイドは目視できるほどの大きさになり、スフェロイドとしての形状は維持していた。

次に、予備検討で得られた条件でスフェロイドの形成を行い、6 日間の培養期間の後半の 2 日間 20  $\mu$ M rifampicin に暴露した。コントロールは vehicle として用いた 0.1 % DMSO のみに同じ期間暴露した。両サンプルから回収された total RNA を用い、*CYP3A4*の発現を TaqMan real-time PCR により比較し、同遺伝子の発現誘導を観察した。平行して、同数の細胞を細胞培養用 96 well plate (Falcon) に播き、平面培養での *CYP3A4*の発現誘導を同様に観察した。スフェロイド培養では、予備検討と同様目視できる程度の大きさの細胞塊が形成されたが、細胞塊は 1 well につき 1 個で、細胞塊を形成しない細胞はほとんど観察されなかった。また、形成された細胞塊は複数の well 間でほぼ同様の形状を示していた。この培養を行った際の平面培養およびスフェロイド培養での rifampicin 処理による *CYP3A4* の誘導を行った結果、20  $\mu$ M rifampicin 2 日間の処理により平面培養では約 2 倍の誘導が認められたが、スフェロイド培養では発現誘導は認められなかった。他の暴露条件やスフェロイド形成条件でも同様に *CYP3A4* の誘導は認められなかった。

#### 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。

RFB 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。今回は、粒状のハイドロキシアパタイトと孔径 130  $\mu\text{m}$  の PVA スポンジを細胞支持担体として用いた。粒状のハイドロキシアパタイトはカラムに充填した後培養を行い、培養終了後はスパーテル等でかき出し細胞を回収する。そのため、回収時にサンプルの培養器内の位置情報が失われてしまう。一方、PVA は回収後も培養時の形状を維持しているため、培地の流れと細胞の機能を解析することが可能と考えられ、担体内で生育している細胞の生理的状态を培養液の流れる方向等との関連で考察することができる。

#### 三次元培養による遺伝子発現の変化

HepG2 細胞を三次元的に培養した際に発現の変化する遺伝子を、三次元培養装置でハイドロキシアパタイトを細胞支持担体とし、6 日間培養した細胞から調製した total RNA と平面培養で sub-confluent にある細胞から調製した total RNA における遺伝子発現を Affymetrix 社 HG U133A GeneChip で網羅的に解析することで比較検討した。三次元培養装置で 6 日間培養した細胞は増殖曲線上では増殖期にある。

三次元培養での発現量と平面培養での発現量を  $t$ -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、三次元培養での発現が平面培養に比べて 2 倍以上または 2 分の 1 以下であった遺伝子は 94 遺伝子であった。この 94 遺伝子を gene ontology による機能分類をもとに、クラス分けした。クラス分けは、National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH の運営するバイオインフォマティクスツール DAVID Bioinformatics Resources 2007

(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)によった。その結果、19 のクラスターが得られた。その中でもクラスター内に含まれる遺伝子の gene ontology に基づく機能の統一性が高かった 4 つのクラスターを得ることができた。

主に細胞周期の進行に関係する遺伝子を含むクラスターが得られ、それらは Cluster 2 と cluster 7 に分類された。このクラスターに含まれる遺伝子のほとんどは細胞周期の進行に必要な遺伝子であり、その多くで三次元培養での発現上昇が認められたことは、三次元培養装置内で増殖期にある細胞は、平面培養の細胞に比較して細胞増殖が亢進している事を示唆している。遺伝子発現が抑制されている *checkpoint suppressor 1* は細胞周期の進行に負に働く遺伝子であり、上の結果と矛盾しない。

細胞骨格や細胞間コミュニケーションに関連する遺伝子群として Cluster 12 と cluster 15 が得られた。三次元培養において、これらの遺伝子の多くの発現が上昇していることは、細胞が三次元的な培養条件に置かれることによって、細胞群の形態的变化、および細胞間連絡を含めた機能変化をしていることを示唆している。

#### HepG2 以外の肝癌由来培養細胞の三次元培養への適用

東京慈恵会医科大学永森らにより日本人肝癌患者より樹立された培養細胞株 JHH-1、JHH-4 を医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクより購入し、三次元培養に適用可能かを調べた。

あらかじめ 4,500 mg/l の glucose を含み、10% FBS 含有 William's E 培地中で増やしておいた JHH-1 細胞  $2.5 \times 10^7$  cell を三次元培養装置に播種した。細胞支持担体としては、ハイドロキシアパタイトと PVA を並行して検討した。播種時よりバイオリクターカラムの溶存酸素、pH をモニターすることで培養条件が一定になるよ

う調整し、培養開始 3 日目からは新鮮な培地の供給も開始した。細胞の増殖状態は、1 日当りバイオリアクター内で消費されるグルコースの量を計算し、あらかじめ平面培養で求めておいた細胞 1 個あたりの 1 日のグルコース消費量から細胞数を推定することで観察した。

10 日目から 13 日までの細胞数の変化の様子を観察すると、播種細胞数より増加が認められたが、ハイドロキシアパタイトと PVA の比較では PVA の方が最終到達細胞数が高かった。しかしながら、播種細胞数から計算すると約 2 週間培養後 PVA で約 6 倍、ハイドロキシアパタイトで約 4 倍の細胞増殖しか認められなかった。

引き続き、同様の培養条件で JHH-4 細胞を三次元培養装置に播種した。播種細胞数は  $3 \times 10^7$  cell であった。細胞支持担体として、今回もハイドロキシアパタイトと PVA を用いたが、いずれの場合も良好な細胞の増殖は認められなかった。播種後 7 日目までグルコース消費量を測定し細胞数を推定したが、播種細胞数より増えることはなかった。その為、JHH-4、はいずれの単体を用いた場合でも三次元培養に耐えられないと判断し培養を中止した。

#### HepG2、JHH-1、JHH-4 の細胞特性の比較

現在まで三次元培養に適用してきた肝癌由来の培養細胞株 3 種、HepG2、JHH-1、JHH-4 について、平面培養における薬物動態関連遺伝子 84 種類の発現に関して比較解析を行った。

解析には RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array ver 2.0 Drug Metabolism (SuperArray)を用いた。これは、96 well plate に 84 種類の薬物動態関連遺伝子と 5 種類のハウスキーピング遺伝子を検出する特異的プライマーが載っているマイクロアレイで、SYBR Green 検出法によりリアルタイム PCR にて発現量を  $\Delta\Delta Ct$  法により解析するものである。リアルタイム PCR による測定のため高

感度でダイナミックレンジの広い解析が一度に行える利点を有している。本マイクロアレイを用いることにより、84 種類の遺伝子の解析が可能であった。

HepG2 と JHH-1、JHH-4 における 84 遺伝子の発現量を *GAPDH* と *beta-2-microglobulin* を内在性のコントロールとして、 $\Delta\Delta Ct$  法により求めた結果をまとめた。具体的には各遺伝子の Ct 値とコントロールとした 2 遺伝子の Ct 値の平均値の差  $\Delta Ct$  より  $2^{-\Delta Ct}$  を求め、各遺伝子のおおのこの細胞における相対的発現量とした。RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array ver 2.0 には 5 種のハウスキーピング遺伝子が載っているが、そのうち *GAPDH* と *beta-2-microglobulin* は、三種の細胞間で発現の変動が最も少ないため内在性コントロールとした。

HepG2、JHH-1、JHH-4 細胞における 84 遺伝子の相対的発現量の相関を調べた。HepG2 と JHH-1 の遺伝子発現を比較するとどちらか一方の細胞で発現が上昇している遺伝子の数は 14 個と 23 個と大きな差がなかった。一方、JHH-4 の遺伝子発現を HepG2 または JHH-1 と比較すると、いずれの場合でも JHH-4 に比べ発現が上昇している遺伝子が 34 (HepG2)、37 (JHH-1) と測定した遺伝子の 40 %以上を占めていた。

このことは、各遺伝子の相対的発現量を heat map で示すことにより、鮮明に示された。heat map とは各遺伝子の三種類の細胞における相対的発現量を、三種類の細胞の相対的発現量の median で割ることで規格化し、変化を赤(> X 8 fold)から緑(< 1/8 fold)の色調で示すものである。HepG2 と JHH-1 では赤で示される遺伝子と緑で示される遺伝子が交じり合っているが、JHH-4 では多くの遺伝子の発現量が緑色で示されており、HepG2、JHH-1 と比較して JHH-4 で多くの遺伝子の発現が低かった。平面培養に

においてではあるが、JHH-4 は他の二種の細胞と比較して薬物動態関連遺伝子の発現が低い細胞であることが示唆された。

heat map により HepG2 と JHH-1 の各遺伝子の発現パターンを比較してみると、*CYP1A1*、*CYP2C19*、*CYP2C8*、*CYP2C9*、*CYP2E1* の発現が相対的に高い。このことは、RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array ver 2.0 Drug Metabolism を用いることで、細胞や培養条件の違いによる薬物動態関連遺伝子の発現を比較し、細胞や培養条件の評価が可能であることを示唆しており、同法による評価が有用であることが示された。

#### ヒト肝における種々の薬物動態関連遺伝子の発現

日本人 30 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、*CYP1A2*、*2B6*、*2C8*、*2C9*、*2C18*、*2C19*、*3A4*、*3A5* 遺伝子の mRNA 量の個体差は 15-120 倍、関連核内受容体 *PXR*、*CAR*、*AHR*、*GR* では 11-67 倍、転写因子 *HNF1A*、*4A* では 22、28 倍で、昨年度の 24 検体で解析した時と同様、*CYP1A*、*2B*、*3A* 遺伝子の発現量の個体差変動の幅が大きかった。各遺伝子の発現量の相関について検討した結果、*CYP1A2*、*2B6*、*2C8*、*2C9* および *3A4* 遺伝子の mRNA 発現量はお互いに相関が観察され、これらの遺伝子はそれぞれ関連核内受容体 *PXR*、*CAR*、*AHR* 遺伝子の発現量と相関していた。(p<0.01 または p<0.05) 転写因子 *HNF4A* mRNA の発現量は、*CYP2C8*、*2C9*、*3A4*、*PXR*、*CAR* mRNA の発現量と相関が認められた。*HNF1A* mRNA の発現量は、*CAR* mRNA の発現量と相関が観察された。さらに、各 *CYP* 遺伝子の発現量と関連受容体遺伝子 (*AhR*、*PXR*、*CAR*) の発現量について多変量解析を行った結果、*CYP2B6*、*2C8*、*2C18* および *3A4* 遺伝子の発現量は、2 つ以上の核内受容体

遺伝子の発現が多因子として関与していることが示唆された。

#### ヒストン脱アセチル化阻害剤、および DNA メチル化阻害剤の HepG2 細胞に対する細胞毒性

ヒストン脱アセチル化阻害剤 TSA、ならびに DNA メチル化阻害剤 AzaC により、クロマチンの修飾状態を変化させた際、薬物代謝関連遺伝子の発現がどのように変化するかを調べる実験を企画した。それに先立ち、TSA や AzaC が HepG2 に対して細胞毒性を現さない濃度を決めておく必要がある。TSA および AzaC は種々の濃度で 24 - 144 時間細胞に暴露した。細胞をクリスタルバイオレット染色して細胞増殖阻害率を算出した結果、TSA による 50%細胞増殖阻害濃度は 160 ng/ml (48 時間暴露)、AzaC は 2 mM まで (96 時間暴露) 細胞増殖阻害作用は認められなかった。

#### ヒストン脱アセチル化阻害剤、および DNA メチル化阻害剤の HepG2 細胞におけるハウスキーピング遺伝子レベルへの影響

ある解析対象遺伝子の発現に対する薬物の影響を調べる場合、解析対象遺伝子の mRNA レベルを、薬物の影響を受けにくいと考えられる GAPDH や  $\beta$ -Actin など、いわゆるハウスキーピング遺伝子の mRNA レベルで規格化し、相対値として表わす。TSA や AzaC はクロマチン構造を変化させると考えられるので、ハウスキーピング遺伝子の発現レベルにも影響を与える可能性があることを考慮し、TSA、AzaC 処理後の GAPDH や  $\beta$ -Actin の mRNA レベルを測定した。その結果、TSA や AzaC のこれらハウスキーピング遺伝子発現に対する影響は、AzaC でより顕著であり、AzaC は GAPDH mRNA レベルを最大で対照の 20%程度にまで低下させることが明らかとなった。このことより、以後の実験では、 $\beta$ -Actin による規格化を行った。

### ヒストン脱アセチル化阻害剤、および DNA メチル化阻害剤の HepG2 細胞における薬物代謝酵素関連遺伝子発現レベルへの影響

HepG2 細胞を TSA で 37°C、48 時間、AzaC で 37°C、96 時間処理し、解析対象の薬物代謝関連遺伝子の発現レベルを測定し、阻害剤処理あり、なしの間で比較した。その結果、TSA により、*CYP1A1*, *1A2*, *2E1*, *3A4*, *3A5* で、AzaC により、*CYP1A2*, *1B1*, *2D6*, *2E1*, *3A4*, *3A5* について 3 倍以上の発現レベルの上昇がみられた。核内受容体では、*CAR* が TSA, AzaC 処理共に mRNA レベルが 7 倍以上に上昇した。

### ヒストン脱アセチル化阻害剤、および DNA メチル化阻害剤存在下の HepG2 細胞における薬物代謝酵素誘導剤の影響

HepG2 細胞を前項のように、TSA、ならびに AzaC で処理した。阻害剤処理時間の最後の 24 時間は、CYP1A の誘導剤であるオメプラゾール (OME)、CYP3A 等の誘導剤であるリファンピシン (RIF) を共存させた。その結果、OME により、*CYP1A1*, *1A2* は、TSA 非存在下でそれぞれ 17, 4 倍、TSA 存在下で 50, 22 倍程度発現が誘導され、AzaC 非存在下でそれぞれ 7, 4 倍、TSA 存在下で 18, 34 倍程度発現が誘導された。それに対し、これら阻害剤存在下で、*CYP3A4* の mRNA レベルは TSA, AzaC 通じて、11~16 倍程度上昇した。阻害剤共存下では RIF による誘導は、あまり顕著ではなく、クロマチン構造が *CYP3A4* の発現にかなり及ぼす影響はかなり大きいことが明らかとなった。転写因子 *HNF4A* については TSA 処理の場合に 2 倍弱の mRNA レベルの上昇が見られたのみであった。*HNF1A*, *HNF4A* とともに RIF による誘導は認められなかった。

#### D. 考察

### スフェロイド形成

初年度の検討で効果的なスフェロイド形成が可能であったセルタイトスフェロイド (Sumilon) を培養器として、HepG2 細胞のスフェロイド形成と形成されたスフェロイドにおける *CYP3A4* の rifampicin による発現誘導を検討した。その結果、スフェロイドにおいては *CYP3A4* の発現誘導は認められなかった。理由としては、スフェロイドが目視できるほどの大きさのものをういたため、細胞塊の内部まで培地中の薬剤や溶存酸素・増殖因子等が到達できなかった可能性がある。この点はより小さいスフェロイドを形成させることで解決できる可能性もあるが、セルタイトスフェロイドでは 1 well あたり 1 個のスフェロイドしか形成できず、total RNA の回収量を考えると実際上簡便な培養方法とは言いがたい。これらのことより、培養細胞のスフェロイド培養による薬物動態関連遺伝子の機能変化を検討することは断念した。

### 三次元培養による遺伝子発現の変化

Affymetrix 社 HG U133A GeneChip を使い、三次元培養 6 日目で増殖期にある HepG2 細胞における遺伝子発現を、平面培養における遺伝子発現と網羅的に比較検討した。統計的に有意差をもって 2 倍以上または 1/2 以下に発現が変化した遺伝子は 94 遺伝子あった。この 94 遺伝子を gene ontology による機能分類をもとにクラス分けした結果、細胞増殖に関連する遺伝子と細胞骨格や細胞間コミュニケーションに関連する遺伝子の発現の上昇が認められた。

三次元培養装置では培養状態を常時モニターし、新鮮な培地を一定量供給しつつ、溶存酸素、pH 等が調整された培養液をバイオリアクター内に循環させるため、細胞がより増殖し易い状況にあると考えられる。その為、前者の遺伝子が平面培養より上昇していると推測される。初

年度の検討で、HepG2 の三次元培養では培養 6 日目前後で細胞が増殖期にある状態において、*CYP3A4* の効率的な誘導が認められることがわかった。この時期の細胞の増殖性が平面培養より亢進していることは、三次元培養の培養条件の改良を考える上で興味深い知見である。

その一方で、同時期において細胞骨格や細胞間コミュニケーションに関連する遺伝子の発現も亢進しており、細胞が平面培養と異なる細胞環境を形成していることも示唆された。既に、細胞の外部から加わる力学的 tension が幹細胞の分化を調節することが報告されている (McBeath R *et al.* Dev. Cell. 2004, 6, 483-495)。ラジアルフロー型バイオリアクターによる三次元培養においても細胞骨格や細胞間コミュニケーションに関連する遺伝子の発現が変化していたことは、この培養法により平面培養では得られない空間的・力学的な効果があることを示唆しており、幹細胞や肝細胞前駆細胞の分化培養系への応用が期待される。

#### HepG2 以外の肝癌由来培養細胞の三次元培養への適用

初年度までの検討では、HepG2 細胞を主に三次元培養の検討を行ってきたが、本年度はそれに加えて東京慈恵会医科大学永森らにより日本人肝癌患者より樹立された培養細胞株 JHH-1、JHH-4 について、三次元培養への適用が可能であるかの検討をした。

両細胞について、ハイドロキシアパタイトと PVA を細胞支持担体として三次元培養に供した。JHH-1 細胞は、2 週間の培養で増殖が認められたものの、播種細胞数に比べ 4~6 倍程度の増加しか示さなかった。HepG2 の場合、30 倍程度の増殖が認められていたので、JHH-1 の三次元培養への適用は HepG2 より難しいと判断している。ただし、*CYP2C19* などの遺伝子発現が認め

られることを考えるとまだ若干の検討の余地は残っている。それに対し、JHH-4 はいずれの細胞支持単体を用いた場合でも増殖を示さなかった。また、HepG2、JHH-1 に比べ薬物動態関連遺伝子の発現も低かったことから、JHH-4 の三次元培養への適用は断念した。

#### 三次元培養に用いる細胞支持担体

HepG2 においては細胞支持担体としてハイドロキシアパタイトと PVA において薬剤による *CYP3A4* の誘導性に明瞭な差異が認められた。rifampicin、dexamethasone いずれを誘導剤とした場合でもハイドロキシアパタイトを用いた場合より高倍率の誘導がみられた。JHH-1 の三次元培養における *CYP3A4* の誘導実験は未実施であるが、細胞の増殖性に明らかな違いがあり、三次元培養において細胞支持担体の果たす役割が小さくないことを示す事例が増えてきている。一方、ハイドロキシアパタイトは粒状であり、ラジアルフロー型バイオリアクターより細胞を回収した際に培養器内での細胞の方向性の情報が失われてしまう。培養器内では培地の流れに方向性があり、細胞が三次元的に増殖していく際に方向性を持っている可能性があるが、粒状のハイドロキシアパタイトでの検証は困難である。それに対し、PVA では担体ごと培養器から取り出すことが可能であり、細胞増殖や機能変化の方向性の検討が可能である。今までの検討ではハイドロキシアパタイトより間隙の小さい PVA を用いてきた。しかし現在はハイドロキシアパタイトとほぼ同等の間隙を持つ PVA の利用も可能になった。間隙の小さい PVA では HepG2 においては *CYP3A4* の誘導が認められなかったが、ハイドロキシアパタイトと同等の間隙をもつ PVA では誘導が認められることも考えられる。三次元培養と平面培養の比較で、三次元的培養による細胞の機能変化が生じていることを示唆

する結果を得ているので、今後新たな支持担体の検討も必要と考えられる。

#### HepG2、JHH-1、JHH-4 の細胞特性の比較

平面培養した HepG2、JHH-1、JHH-4 各細胞の特性を、薬物動態関連遺伝子に特化したマクロアレイを用いて評価した。解析に用いた RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array ver 2.0 Drug Metabolism (SuperArray) は 84 種類の遺伝子が載っているものである。三者の細胞の発現を相互に比較した結果、JHH-4 においてマクロアレイに載っている遺伝子の 40 % を超える遺伝子で発現が相対的に低い結果となった。また、HepG2 と JHH-1 の比較においても *CYP1A1*、*CYP2C19*、*CYP2C8*、*CYP2C9*、*CYP2E1* の発現が JHH-1 において相対的に高い結果が得られた。今後、市販されている移植不適合肝臓より調製され肝実質細胞や、ヒト肝臓由来の mRNA における遺伝子発現を検討する必要があるが、現在までに検討してきた細胞においても薬物動態関連遺伝子の発現に大きな差があることが確認された。また、この結果は、同マクロアレイが異なる細胞や種々の培養条件における薬物動態関連遺伝子の機能評価の first screening として有用である事を示していると考えられる。

#### ヒト肝における種々の薬物動態関連遺伝子の発現

日本人 30 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、24 検体の解析であった昨年度と同様、*CYP1A*、*2B*、*3A* 遺伝子の発現量の個体差変動の幅が大きかった。*CYP1A2*、*2B6*、*2C8*、*2C9* および *3A4* 遺伝子の mRNA 発現量は相互に相関していると共に、これらの遺伝子はそれぞれ関連核内受容体 *PXR*、*CAR*、*AHR* 遺伝子の発現量と相関していた。(p<0.01 または p<0.05) 転写因子 *HNF4A* mRNA の発現量は、*CYP2C8*、

*2C9*、*3A4*、*PXR*、*CAR* mRNA の発現量と相関が認められた。*HNF1A* mRNA の発現量は、*CAR* mRNA の発現量と相関が観察された。*CYP* 遺伝子の発現量と関連受容体遺伝子の発現量について多変量解析を行った結果、*CYP2B6*、*2C8*、*2C18* および *3A4* 遺伝子の発現量は、2 つ以上の核内受容体/転写因子の遺伝子の発現が多因子として関与していることが示唆された。今回の解析対象遺伝子の発現レベルの個体差を遺伝子多型のみで説明することは困難と考えられている。今回の結果を併せて考えると、薬物代謝関連遺伝子の発現調節に重要な役割を果たしている核内受容体や転写因子の発現を含め、次項以下に述べる後世的クロマチン修飾（エピジェノミクス）の解析が重要であると考えられた。

#### ヒストン脱アセチル化阻害剤、および DNA メチル化阻害剤の HepG2 細胞における薬物代謝酵素関連遺伝子発現レベルへの影響

HepG2 細胞を TSA、ならびに AzaC で処理し、解析対象の薬物代謝関連遺伝子の発現レベルを測定し、阻害剤処理あり、なしの間で比較した。測定対象遺伝子は、チトクロム P450 (CYP) では、*CYP1A1*、*1A2*、*1B1*、*2A6*、*2B6*、*2C8*、*2C9*、*2C18*、*2C19*、*2D6*、*2E1*、*3A4*、*3A5*、核内受容体では、*PXR*、*CAR*、*AhR*、*RXRα*、*GR*、*Arnt*、転写因子では、*HNF1A*、*HNF4A* とした。その結果、TSA により、*CYP1A1*、*1A2*、*2E1*、*3A4*、*3A5* で、AzaC により、*CYP1A2*、*1B1*、*2D6*、*2E1*、*3A4*、*3A5* について 3 倍以上の発現レベルの上昇がみられた。核内受容体では、*CAR* が TSA、AzaC 処理共に mRNA レベルが 7 倍以上に上昇した。解析対象遺伝子により、ヒストン脱アセチル化、DNA メチル化阻害剤の影響の受け方が異なっていたことは興味深い。ここで認められた現象が HepG2 細胞に限るのか否か、など検討が必要であるとされる。

## ヒストン脱アセチル化阻害剤、および DNA メチル化阻害剤存在下の HepG2 細胞における薬物代謝酵素誘導剤の影響

HepG2 細胞を TSA、ならびに AzaC で処理する際、TSA、AzaC 処理時間の最後の 24 時間に、CYP1A の誘導剤であるオメプラゾール (OME)、CYP3A 等の誘導剤であるリファンピシン (RIF) を共存させる実験を行った。その結果、OME により、*CYP1A1*, *1A2* は、TSA 非存在下でそれぞれ 17, 4 倍、TSA 存在下で 50, 22 倍程度発現が誘導され、AzaC 非存在下でそれぞれ 7, 4 倍、TSA 存在下で 18, 34 倍程度発現が誘導された。それに対し、これら阻害剤存在下で、*CYP3A4* の mRNA レベルは TSA, AzaC 通じて、11~16 倍程度上昇した。阻害剤共存下では RIF による誘導は、あまり顕著ではなく、クロマチン修飾が *CYP3A4* の発現に及ぼす影響の方が大きいことが示唆された。本現象についても、HepG2 細胞以外の細胞でも認められ、普遍性があることであるのか否か、検討が必要と考えられる。転写因子 *HNF4A* については TSA 処理の場合に 2 倍弱の mRNA レベルの上昇が見られたのみであった。*HNF1A*, *HNF4A* ともに RIF による誘導は認められなかった。

## E. 結論

本年度の研究により以下のことが明らかとなった。

- ① セルタイトスフェロイド (Sumilon) により形成されたスフェロイドにおける *CYP3A4* の誘導性を検討した結果、同法による遺伝子発現レベルでの細胞機能変化の検討は実用上無理があると判断した。
- ② 平面培養と比較して、三次元培養では細胞周期を進行させる遺伝子と細胞骨格や細胞間コミュニケーションに関連する遺伝子の発現の上昇

が認められた。

③ HepG2 以外のヒト肝が由来培養細胞株として日本人肝癌患者より樹立された JHH-1 および JHH-4 を三次元培養に適用した。その結果、HepG2 の増殖性よりはるかに劣るが JHH-1 において細胞の増殖が認められた。JHH-1 細胞の増殖性はハイドロキシアパタイトと PVA を細胞支持担体として用いた場合で異なっていた。JHH-4 に関しては三次元培養装置での増殖は認められなかった。

④ HepG2、JHH-1、JHH-4 の平面培養での 84 種の薬物動態関連遺伝子の発現を比較検討した結果、JHH-4 において 40% を超える遺伝子の発現が他の 2 種の細胞に比較して低かった。また、HepG2 と JHH-1 の比較でも *CYP1A1*、*CYP2C19*、*CYP2C8*、*CYP2C9*、*CYP2E1* のように JHH-1 で発現が高い遺伝子が存在した。以上の結果をふまえて、最終年度の検討課題としては以下のことが挙げられる。

ア) スフェロイドによる細胞機能の改善は困難であったので、三次元培養に中心をすえて検討を進める。

イ) 平面培養との比較の結果、細胞の増殖が良い状態において *CYP3A4* の効率的誘導が認められるとの結果をふまえ、三次元培養の改良を行う。

ウ) 三次元培養では細胞骨格や細胞間コミュニケーションの変化が示唆されている。ラジアルフロー型バイオリクター内の培地の流路を考えると、培養器内の方向性と機能発現の関係の解析は興味深い点である。新たに入手可能になった口径の異なる PVA 担体でハイドロキシアパタイトの *CYP3A4* 誘導性が再現できるかを確認し、再現可能であれば、培養後の PVA 担体から切片を作成し、種々の肝細胞マーカーなどで免疫染色を行い、培養器の方向性と機能発現の解析を行う。本解析により幹細胞や肝前駆細胞の

三次元条件における分化という新たな研究の方向性を示せる可能性がある。

エ) 平面培養した三種の細胞の薬物動態関連遺伝子のマクロアレイによる解析を行った結果、細胞間の特異性が明らかとなった。市販されている移植不適合肝臓より調製され肝実質細胞や、ヒト肝臓由来の mRNA における遺伝子発現を同方法により解析し基礎データを蓄積する。この基礎データを活用することで、三次元培養による細胞機能の変化を遺伝子レベルで検討することが可能になると考えられる。

オ) 二年度目までは、誘導剤として rifampicin のみを用いてきたが、最終年度は上記の検討で確立した条件においてその他の代表的誘導剤に三次元培養した細胞を暴露することで、どのような細胞機能の変化が起きるかを遺伝子レベル、タンパクレベルで検討する。代表的誘導剤に対する細胞応答を精査することで、構築した三次元培養システムによる種々の化合物の毒性評価の系を確立できるかを検討する。

⑤ *CYP2B6*, *2C8*, *2C18* および *3A4* 遺伝子の発現レベルの個体差には、関連核内受容体 *PXR*, *CAR*, *AHR* 遺伝子 mRNA の発現が多因子的に関与することが示唆された。

⑥ ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞において、TSA および AzaC 処理により *CYP1A*, *CYP2E1*, *CYP3A4* および *3A5* 遺伝子の mRNA 発現が上昇した。

⑦ *CYP3A* 誘導剤 RIF を共存させると、さらに誘導が観察された。これに対して、*PXR* の発現はほとんど影響を受けなかった。

⑧ HepG2 細胞株においては、*CYP3A4* は非誘導時の発現、ヒストン修飾および DNA のメチル化が大きく関与していることが示唆された。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

該当なし

### 2. 学会発表

2-1. The 1<sup>st</sup> Asia Psific ISSX Meeting, May 25 ~ 27, 2006, Korea

2-2. A Miyajima-Tabata, S Ozawa, S Ishida, and K Nakazawa. 46<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of Toxicology (Charlotte, USA), March. 29,2007

2-3. 日本生物工学会、9月11日～13日、大阪

### H. 知的財産権の出願・登録状況

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

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 を三次元培養条件下に置くことで、細胞周期を進行させる遺伝子群と細胞骨格・細胞間コミュニケーションに関連する遺伝子群の発現が上昇していることが明らかとなった。HepG2 以外の培養細胞 JHH-1、JHH-4 の三次元培養への適用を検討し、JHH-1 で増殖が認められた。細胞支持担体による細胞の増殖性や、薬剤への応答性の違いに関する知見が集積しつつある。HepG-2、JHH-1、JHH-4 の平面培養での薬物動態関連遺伝子の発現を比較検討し、差異を明らかにした。本年度は、三次元培養の改良や培養特性の詳細な検討、および、各種薬剤の薬物動態関連遺伝子への影響の評価のために、重要な知見が得られた。

#### 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

HepG2 細胞は ATCC より購入し、通常は DMEM (Sigma) + 10 % FBS (Invitrogen) 培地または 4,500 mg/l の glucose を含む William's E +10% FBS 培地で平面培養した。JHH-1 ならびに JHH-4 は医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクより購入し、通常は 4,500 mg/l の glucose

を含む William's E +10% FBS 培地で平面培養した。

#### 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 CO<sub>2</sub> インキュベータ内で静置培養した。培地は一定量 (100  $\mu$ l) 毎日交換した。

#### 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。細胞の支持担体はハイドロキシアパタイト (Pentax Corporation)、及び、ポリビニル酢酸樹脂 (以下 PVA、Muromachi Kagaku) を用いた。シャーレ上で培養している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  $5 \sim 6 \times 10^6$  cells/ml になるように播種した。培地は high glucose DMEM (Invitrogen) + 10% FBS (HepG2) または 4,500 mg/l の glucose を含む William's E +10% FBS 培地 (JHH-1 および JHH-4) を用い、播種後細胞が細胞支持担体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。細胞の増殖は 1 日あたりの培地中のグルコース消費量を測定し (グルコース CII-テストワコー)、あらかじめ平面培養より得た 1 細胞あたりのグルコースの 1 日あたりの消費量をもとに換算し推定した。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。

#### RNA 調製

細胞を回収し、PBS で二回洗浄後、

RNeasy Mini Total RNA preparation kit (Qiagen) にて RNA を調製した。

#### TaqMan real-time PCR

調製した total 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 TaqMan プライマー (Applied Biosystems Inc.) と TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc.) を用い、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

ラジアルフローバイオリアクターに HepG2 細胞を播種後 7 日目に、HepG2 細胞を培養装置下部三箇所より total RNA を回収した。平行して、細胞培養用シャーレ (Corning) で平面培養した sub-confluent の HepG2 から total RNA を回収した。両 total RNA を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。得られた平面培養と三次元培養の遺伝子発現量を *t* 検定により比較し、有意差のあった遺伝子のうち、三次元培養での発現量が平面培養での発現量の 2 倍以上または 2 分の 1 以下であった遺伝子を“三次元培養で発現が変化した遺伝子”とした。該当する遺伝子は 94 であった。三次元培養で発現が変化した遺伝子のリストを National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH の運営するバイオインフォマティクスツール DAVID

Bioinformatics Resources 2007  
(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)にてクラス分けした。同時に同サイトより遺伝子のアノテーション情報を得た。

#### マクロアレイ解析

細胞培養用シャーレ(Corning)上、4,500 mg/l の glucose を含む William's E + 10 % FBS 培地中で平面培養した sub-confluent の HepG2、JHH-1、JHH-4 から total RNA を回収し、RT<sup>2</sup> PCR Array First Strand Synthesis kit (SuperArray) により、添付の方法に従い逆転写し cDNA を得た。得られた cDNA を RT<sup>2</sup> Real-Time PCR SYBR Green/ROX (SuperArray) と混合後、RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array ver 2.0 Drug Metabolism (SuperArray) に添加し Prism 7900 real time PCR system (Applied Biosystems Inc.) によりリアルタイムを実行し増幅データを得た。得られた Ct 値を用い、 $\Delta\Delta Ct$  法により発現量の変化を解析した。

(倫理面への配慮)

本年度は該当事項なし

### C. 研究結果

#### スフェロイド形成

予備検討として、まず各種細胞播種濃度によるスフェロイドの形成の差異と回収されてくる total RNA 量を検討した。細胞培養用シャーレ上で培養した 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 CO<sub>2</sub> インキュベータ内で静置培養した。培地は一定量 (100  $\mu$ l) 毎日交換した。その結果、スフェロイド形成

を 6 日間行う場合は 1 well あたり  $3 \times 10^4$  cell を播き、16 well の細胞から total RNA を調製すると十分量の total RNA が回収できることがわかった。この際形成されるスフェロイドは目視できるほどの大きさになるが、スフェロイドとしての形状は維持していた。

次に、予備検討で得られた条件でスフェロイドの形成を行い、6 日間の培養期間の後半の 2 日間 20  $\mu$ M rifampicin に暴露した。コントロールは vehicle として用いた 0.1 % DMSO のみに同じ期間暴露した。両サンプルから回収された total RNA を用い、*CYP3A4* の発現を TaqMan real-time PCR により比較し、同遺伝子の発現誘導を観察した。平行して、同数の細胞を細胞培養用 96 well plate (Falcon) に播き、平面培養での *CYP3A4* の発現誘導を同様に観察した。平面培養とスフェロイド培養における細胞の様子の一例を Fig. 1 に示す。スフェロイド培養では、予備検討と同様目視できる程度の大きさの細胞塊が形成されたが、細胞塊は 1 well につき 1 個で、細胞塊を形成しない細胞はほとんど観察されなかった。また、形成された細胞塊は複数の well 間ではほぼ同様の形状を示していた。この培養を行った際の平面培養およびスフェロイド培養での rifampicin 処理による *CYP3A4* の誘導の結果を Fig. 1 中に示す。20  $\mu$ M rifampicin 2 日間の処理により平面培養では約 2 倍の誘導が認められたが、スフェロイド培養では発現誘導は認められなかった。他の暴露条件やスフェロイド形成条件でも同様に *CYP3A4* の誘導は認められなかった (data not shown)。

#### 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。RFB 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(細胞培養器のカラムの概観: Fig. 2A、RFB 内の培地の流れ: Fig. 2B)。今回用いた細胞支持担体である粒状のハイドロキシアパタイトと孔径 130  $\mu\text{m}$  の PVA スポンジの形状を Fig. 2C に示す。粒状のハイドロキシアパタイトはカラムに充填した後培養を行い、培養終了後はスパーテル等をかき出し細胞を回収する。そのため、回収時にサンプルの培養器内の位置情報が失われてしまう。一方、PVA は回収後も培養時の形状を維持しているため、Fig. 2B に見られる培地の流れと細胞の機能を解析することが可能である。

#### 三次元培養による遺伝子発現の変化

HepG2 細胞を三次元的に培養した際に発現の変化する遺伝子を、三次元培養装置でハイドロキシアパタイトを細胞支持担体とし、6 日間培養した細胞から調製した total RNA と平面培養で sub-confluent にある細胞から調製した total RNA における遺伝子発現を Affymetrix 社 HG U133A GeneChip で網羅的に解析することで比較検討した。三次元培養装置で 6 日間培養した細胞は増殖曲線上では増殖期にある。

三次元培養での発現量と平面培養での発現量を  $t$  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、三次元培養での発現が平面培養に比べて 2 倍以上または 2 分の 1 以下であった遺伝子は 94 遺伝子で

あった。この 94 遺伝子を gene ontology による機能分類をもとに、クラス分けした。クラス分けは、National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH の運営するバイオインフォマティクスツール DAVID Bioinformatics Resources 2007 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) によった。その結果、19 のクラスターが得られた。その中でもクラスター内に含まれる遺伝子の gene ontology に基づく機能の統一性が高かった 4 つのクラスターを Fig. 3 に示す。

Cluster 2 と cluster 7 は主に細胞周期の進行に関係する遺伝子を含むクラスターである。このクラスターに含まれる遺伝子のほとんどは細胞周期の進行に必要な遺伝子であり、その多くで三次元培養での発現上昇が認められたことは、三次元培養装置内で増殖期にある細胞は、平面培養の細胞と比較して細胞増殖が亢進している事を示唆している。遺伝子発現が抑制されている *checkpoint suppressor 1* は細胞周期の進行に負に働く遺伝子であり、上の結果と矛盾しない。

Cluster 12 と cluster 15 は細胞骨格や細胞間コミュニケーションに関連する遺伝子群である。三次元培養において、これらの遺伝子の多くの発現が上昇していることは、細胞が三次元的な培養条件に置かれることによって機能変化をしていることを示唆している。

#### HepG2 以外の肝癌由来培養細胞の三次元培養への適用

東京慈恵会医科大学永森らにより日本人肝癌患者より樹立された培養細胞株 JHH-1、JHH-4 を医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクより購入し、三次元培養に適用可

能かを調べた。

あらかじめ 4,500 mg/l の glucose を含む William's E +10% FBS 培地中で増やしておいた JHH-1 細胞  $2.5 \times 10^7$  cell を三次元培養装置に播種した。細胞支持担体としては、ハイドロキシアパタイトと PVA を並行して検討した。播種時よりバイオリアクターカラムの溶存酸素、pH をモニターすることで培養条件が一定になるよう調整し、培養開始 3 日目からは新鮮な培地の供給も開始した。細胞の増殖状態は、1 日当りバイオリアクター内で消費されるグルコースの量を計算し、あらかじめ平面培養で求めておいた細胞 1 個あたりの 1 日のグルコース消費量から細胞数を推定することで観察した。

10 日目から 13 日までの細胞数の変化の様子を Fig. 4 に示す。ともに播種細胞数より増加が認められたが、ハイドロキシアパタイトと PVA の比較では PVA の方が最終到達細胞数が高かった。しかしながら、播種細胞数から計算すると約 2 週間の培養で PVA で約 6 倍、ハイドロキシアパタイトで約 4 倍の細胞増殖しか認められなかった。

引き続き、同様の培養条件で JHH-4 細胞を三次元培養装置に播種した。播種細胞数は  $3 \times 10^7$  cell であった。細胞支持担体として、今回もハイドロキシアパタイトと PVA を用いたが、いずれの場合も良好な細胞の増殖は認められなかった。播種後 7 日目までグルコース消費量を測定し細胞数を推定したが、播種細胞数より増えることはなかった。その為、JHH-4、はいずれの単体を用いた場合でも三次元培養に耐えられないと判断し培養を中止した。

#### HepG2、JHH-1、JHH-4 の細胞特性の比較

現在まで三次元培養に適用してきた肝癌由来の培養細胞株 3 種、HepG2、JHH-1、JHH-4 について、平面培養における薬物動態関連遺伝子 84 種類の発現に関して比較解析を行った。

解析には RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array ver 2.0 Drug Metabolism (SuperArray)を用いた。これは、96 well plate に 84 種類の薬物動態関連遺伝子と 5 種類のハウスキーピング遺伝子を検出する特異的プライマーが載っているマクロアレイで、SYBR Green 検出法によりリアルタイム PCR にて発現量を  $\Delta\Delta Ct$  法により解析するものである。リアルタイム PCR による測定のため高感度でダイナミックレンジの広い解析が一度に行える利点を有している。84 種類の遺伝子の一覧を Fig. 5 に示す。

Fig. 6 は HepG2 と JHH-1、JHH-4 における 84 遺伝子の発現量を *GAPDH* と *beta-2-microglobulin* を内在性のコントロールとして、 $\Delta\Delta Ct$  法により求めた結果をグラフ化したものである。具体的には各遺伝子の Ct 値とコントロールとした 2 遺伝子の Ct 値の平均値の差  $\Delta Ct$  より  $2^{-\Delta Ct}$  を求め、各遺伝子のおおの細胞における相対的発現量とした。RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array ver 2.0 には 5 種のハウスキーピング遺伝子が載っているが、そのうち *GAPDH* と *beta-2-microglobulin* は、三種の細胞間で発現の変動が最も少ないため内在性コントロールとした。

Fig. 6 A, B, C は横軸と縦軸に示す細胞における 84 遺伝子の相対的発現量を scattered plot にしたものである。図中の赤線は各細胞間で三倍差があることを示す。また、横軸の細胞で発現が上昇している遺