

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

目 次

KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法 (DLI) の実用化	藤原成悦	589
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字	636
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子	656
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄	680
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行	691
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治	707
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹	720
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治	728
KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広	740
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人	761
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子	772
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和	783
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂	795
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔	826
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二	836
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江	839
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫	919
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明	939
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究	乾 賢一	951
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘	966

KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 979
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間 正充 …… 1000
KH71069	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	永森 静志 …… 1021
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾 和人 …… 1042
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野 泰雄 …… 1054
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田 康文 …… 1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 …… 1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾 恵治 …… 1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈 邦夫 …… 1090
KHC1204	チオレドキシニンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 …… 1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 …… 1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 …… 1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤 雄一 …… 1115

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 総合診療科学
研究者 永森静志

研究要旨 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。また新規バイオセンサーで肝産生蛋白・薬物代謝能、抗HCV薬の薬効評価に適したRFB/HCV実験、ヒト肝細胞特異的遺伝子発現及び発現量の確認。

分担研究者

- (1) 杏林大学医学部 金井好克
- (2) 国立医薬品食品衛生研究所 本間正充
- (3) 筑波大学 長崎幸夫
- (4) 千葉大学大学院 千葉寛
- (5) 岡山大学大学院 宮崎正博
- (6) 国立感染症研究所 鈴木哲朗 相崎英樹
- (7) 名古屋大学大学院 小田裕昭
- (8) 秋田大学医学部 杉山俊博
- (9) 中外製薬株式会社 木下春喜、西宮一尋
- (10) 京都大学医学部 下遠野邦忠
- (11) 順天堂大学医学部 市田隆文
- (12) 岩手医科大学 鈴木一幸
- (13) 千葉科学大学 細川正清

A. 研究目的

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。また新規バイオセンサーで肝産生蛋白・薬物代謝能、抗HCV薬の薬効評価に適したRFB/HCV実験、ヒト肝細胞特異的遺伝子発現及び発現量の確認。

1. 千葉寛研究班：薬物によるCYPの誘導や阻害は薬物血中濃度の低下や上昇を引き起こし、治療効果の変動や有害作用の発現といった薬物相互作用を生じる原因となる。薬物によるCYPの誘導に関する*in vitro*での予測には主にヒト初代培養肝細胞が使用される。

本年は、Dex投与ラット肝ミクロソームにおけるMPHSの加水分解に寄与するCESアイソザイムの同定、基質特異性の検討およびヒトCESとの比較、およびヒト肝癌由来細胞を用いたDexによる誘導機構の解明を目的に検討をおこなった。

3. 国立感染症研：より操作が簡便で汎用性が高く抗ウイルス薬のスクリーニングなど多検体の薬剤評価に適した実験系を構築するために、完全な化学合成高分子からなる温度感応性高分子Thermo-reversible Gelation Polymer (TGP)を用いてヒト肝細胞癌株の三次元培養系を開発した。TGP培養したヒト肝細胞株の形態学的解析及びチトクロームP450 CYP3A4の機能発現解析を行った。

れている。ヒト初代培養肝細胞は長期培養により肝機能が低下する、コストが高い、個体差が大きい、取り扱いが難しいという問題点がある。

永森らの研究グループによって樹立されたヒト肝がん由来細胞株であるFLC4、5、7細胞は三次元培養することで薬物代謝能、薬物による誘導能を含む肝機能を回復することが報告されている。三次元培養法の一つであるスミロニセルタイトスフェロイドを用いてFLC4-BIOS-1細胞のスフェロイド培養をおこない薬物動態関連遺伝子の発現が増加するか検討した。さらに臨床で最も重要なCYP分子種であるCYP3A4をはじめとする各CYP分子種の誘導能を回復する培養条件を明らかにしヒト初代培養肝細胞の代替となるCYP分子種の誘導評価系を構築することを目的とした。

細川研究班：カルボキシルエステラーゼ CES はエステル、アミドおよびチオエステル結合を含む化合物を効率よく加水分解する酵素であり、その幅広い基質特異性から多くの医薬品、農薬、環境化学物質などの生体外異物の代謝に関与することが報告されている。吸収性の改善や副作用の軽減などを目的に、エステルやアミド型プロドラッグが数多く開発されておりプロドラッグの代謝活性化にCESが大きな役割を果たしている。CESは薬物のfirst-pass metabolismにおいて重要な役割を担っている肝および小腸において高い活性が認められることから、CESの基質特異性や酵素活性の差異は、エステルやアミド型プロドラッグの体内動態に大きな影響を与えるものと考

4. 京都大学班：HCV感染増殖細胞を用いて、細胞内のウイルス蛋白質の局在とウイルス粒子産生についての解析を行った。また、HCV複製を制御する細胞側因子を明らかにして、因子肝細胞における意義も明らかにし、肝細胞がHCV複製にどのような基盤を与えているかを明らかにする。

5. 秋田大学班：メタゾラミドは緑内障における経口眼圧降下薬の第一選択薬のアセトラミドと同様に使われる炭酸脱水酵素阻害剤である。アセトラミドとは異なりStevens-Johnson症候群やLyell症候群など重度の薬疹を日本人や韓国人におこりやすいとされている。メタゾラミドについては1984年非酵素的にグルタチオン抱合されることが報告された。今

回、ヒト由来株化肝細胞 (FLC4細胞) が、経口眼圧降下薬メタゾラミドの代謝の研究でヒトへの外挿実験に用いることができるかを調べることを目的とした。

6. 名古屋大学班研究：細胞の増殖と分化は相反する関係にあるが、肝臓は例外的に増殖時も機能を維持しているといわれている。肝臓の機能のうち増殖肝細胞で不足している肝機能は十分にわかっていない。増殖時に低下する転写因子の一つに肝臓の糖代謝に重要な肝臓特異的転写因子であるC/EBP α が知られている。遺伝子操作により不足する肝機能を増強するのに適した遺伝子であると考えられる。C/EBP α は増殖を抑制する機能があり、遺伝子導入した細胞を得ることができないという問題が生じる。本研究ではTet-offシステムを用いて人為的に遺伝子発現を制御できる遺伝子導入を行った。

7. 岩手大学班目的：人工肝補助装置による血液浄化療法の進歩にも関わらず、劇症肝炎の内科的救命率は40%前後で肝移植の80%に遠く及ばないのが現状である。原因は、広範肝細胞死と肝細胞再生不全にあり、その克服には肝組織の微少環境を抗アポトーシスおよび肝細胞再生促進の条件に補正することが重要と考えられている。しかし、現在の血液浄化療法には限界があり、十分な効果が得られていない。高度の肝細胞機能を保持した肝細胞株を用いた人工肝臓装置により、劇症肝炎患者血漿を浄化するための基礎的検討。

8. 国立衛生研目的：ヒト肝臓由来培養細胞を用いて、ハイスループットによるスクリーニングを念頭においた、細胞毒性試験法、遺伝毒性試験法を確立することを目的とする。永森らによって樹立されたヒト肝がん由来細胞であるFLC4、FLC5、FLC7細胞は不死化された培養細胞でありながら薬物代謝酵素であるCYP450を高発現する極めて特異的な細胞である。これら細胞は、ヒトでの薬物代謝機能の研究に有用であるばかりでなく、医薬品のヒトへの薬効の判定、副作用の予想等に応用でき、創薬に大きく貢献できる可能性がある。ヒト肝由来細胞を基とした*in vitro*試験法(細胞毒性試験、遺伝毒性試験)の開発はこれまでも試みられてきたが、その多くは他の培養細胞での結果と大きな違いが見られず、肝細胞の特徴が十分に生かされたものではなかった。この原因として、通常の培養方法では本来の肝細胞の薬物代謝活性が十分に保持できないことが挙げられる。本研究では、ヒト由来の肝培養細胞を用いて、薬物代謝活性を保持しうる培養条件を設定し、その条件下での*in vitro*毒性試験法を確立することである。さらに、この方法をスケールダウンし、細胞チップ上での試験法を考案し、ハイスループットによる毒性スクリーニング法の確立を実現することである。利用可能なヒト培養肝細胞の性質の比較と、培養条件の検討を行い、FLC4、HepG2細胞が、染色体異常試験、小核試験には不向きであるが、DNA損傷試験であるコメット試験には適応可能であることが示し、これら細胞の薬物代謝活性が、3次元培養により

増加することを見いだした。このことは肝細胞の本来の性質を利用した試験法を確立する上で重要な知見である。本年度は、より薬物代謝活性を増加させる、3次元培養法の確立と、その評価について研究を行った。

9. 岡山大学班目的：不死化肝細胞株(OUMS-29)(OUMS-29/H-11)(rBM25/S3)も細胞株における薬物代謝酵素CYPの発現を調べるとともに、骨髄間葉系幹細胞クローンの分離を再度試みた。

10. 筑波大学班目的：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。内皮細胞をフィーダ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。このような目標を達成するため、パタン構築法の確立、様々な細胞パタンの構築さらにはパタン化培養細胞活性に関して検討した。

10. 杏林大学班金井研目的：アミノ酸輸送機構は、その基質であるアミノ酸分子の多様性を反映し、極めて多様なトランスポーターから成り立っている。そのなかでも輸送系Lは、分枝アミノ酸や芳香族アミノ酸を含む多くの中性アミノ酸の輸送を担当し、細胞への栄養供給に携わる主要なトランスポーターの一つである。加えて、輸送系Lは、その基質選択性の広さから、アミノ酸と類似の構造をもつ薬物も透過するため、薬物トランスポーターとしても知られている。先に輸送系LトランスポーターLAT1、LAT2を同定し、輸送系Lの分子実体を明らかにした。分担研究者らは、FLC4細胞のアミノ酸輸送活性の測定を行い、FLC4細胞のアミノ酸輸送系は他の多くの培養細胞株とは、大きく異なることを明らかにした。この発見に基づき、機能発現クローニングを施行し、FLC4細胞のアミノ酸輸送機構の分子実体である新規アミノ酸トランスポーターLAT3を同定した。肝細胞は、単離し培養系で維持すると急速に(24時間程度で)輸送系Lの特性が変化することが知られている。単離前及び単離直後は、低親和性で比較的基質選択性の狭い輸送系L2と呼ばれる輸送系Lの亜系が支配的であるが、24時間後には高親和性で基質選択の広い輸送系L1に入れ替わる。金井らが見い出したLAT1及びLAT2は輸送系L1に相当し、輸送系L2に相当するトランスポーターはその後しばらく不明のままであったが、FLC4細胞から同定したLAT3が輸送系L2の最初の分子実体であることが輸送特性の検討により明らかとなった。LAT3は分化型の肝細胞に発現する輸送系Lアミノ酸トランスポーターであり、トランスポーターの観点からも、FLC4細胞が正常肝細胞の特質を保持していることが支持されたことになる。

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。この検討のもとに、FLCの薬物代謝系としての総合的な評価が可能となる。本分担研究では、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、加えてバイオリアクター上の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する。

中外研：創薬において肝細胞を用いて化合物の肝毒性を評価することは、ヒトでの肝毒性を予測する上で重要である。本研究では、日本人男性から樹立された細胞株FLCを使用し、医薬品開発におけるヒト肝毒性評価系の構築を目的とした。In vitroでの肝毒性の評価にはEndpointとして一般にALT、AST、Glutathione 濃度等々が用いられているが、新たな肝毒性のendpoint や堅牢性の高い評価方法が必要とされている。そこで今回、近年、注目されている新規技術であるメタボミクス的手法により、肝毒性を評価できるバイオマーカーの検索をFLC細胞の利用で検討。

11. 永森研目的：ヒト肝由来細胞とラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)を用いて高密度3次元培養、ヒト肝に近似した機能発現能解析を行った。1) 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。2) 肝細胞特異的遺伝子の発現及び発現量の確認のため、各地の研究施設に細胞株配布しリストを作成。

B. 研究方法

1. 千葉班方法：1 平面培養。 2 細胞アレイを用いた培養。3 ヒト初代肝細胞培養。

4 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によるアルブミンの定量。5. Real-time PCR。

2. 中外班方法：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を用いたメタボミクスにより検索した。FLC-4,5,7およびJHH-7を6cmシャーレで培養した(各 n=3)。それぞれの細胞に1) 1mM NH₄NH₄ (肝毒性群1)、2)1mM CCl₄ (肝毒性群2)を添加して48時間暴露した。CCl₄の溶媒であるDMSOを添加し48時間暴露した群(溶媒添加コントロール群および何も加えず48時間放置した群(溶媒非添加コントロール群)をコントロール群とした。各群の培養上清1mLを採取し、上清液中のAlbumin,LDH,AST,ALT値の測定およびNMR測定を実施した。NMR用の試料は培養液上清150 microLに0.9% NaCl含有D₂O溶液350 microLを加え攪拌したものを測定試料とした。NMR測定はPre saturation 1D-NOESY測定を行った。得られたNMRスペクトルはパケット積分を実施後、Soft Independent Modeling of Class Analogy(SIMCA)にて解析を行った。

3. 国立感染研班方法：ヒト肝癌細胞由来細胞Huh7およびHepG2を氷冷下でTGPと懸濁した後、37°CのCO₂インキュベーターへ移し培養を行った。細胞の形態は、固定後、透過型および走査型電子顕微鏡にて観察した。TGP培養または単層培養したHuh7細胞からtotal RNAを抽出し、CYP3A4、PXR、RXR α 遺伝子の各発現をreal time RT-PCR 法によって定量し

た。CYP3A4活性はP450-GloCYP3A4 assay kit (Promega)を用いて測定した。

5. 秋田大学班方法：(1-1) グルクロン酸、硫酸抱合物の生成・排泄系の検討。FLC4細胞が1-ナフトールをグルクロン酸化あるいは硫酸化するかどうかを調べた。(1-2)メルカプツール酸の生成・排泄系の検討。S-benzylcysteine (SBC)の代謝を見ることにした。(2)FLC4細胞によるメタゾラミドの代謝。

6. 名古屋大学班方法：FLC-4細胞を用いた。培地として無血清培養が可能なASF104培地(味の素)を用いた。細胞外マトリクスを変えることにより小規模3次元培養を行い、細胞形態を変える実験を行った。再構成基底膜ゲル(EHS-gel)を用いて3次元培養を行った。対照として組織培養用のプラスディッシュとI型コラーゲンディッシュを用いて単層培養を行った。MTTアッセイを用いて薬物による細胞毒性を検討した。遺伝子導入には、チューブリンとEYFPとの融合遺伝子とHNF-4とEGFPの融合遺伝子、EGFPの遺伝子をCMVプロモーターによって発現させるプラスミドを用いた。誘導的発現を可能にするため、Tet-offシステムを採用し、Tetリプレッサータンパク質を発現する遺伝子を導入した。エレクトロポレーション法によりプラスミドを導入し、ジェネチンで選択し、遺伝子導入クローン株を作出した。Tetリプレッサー導入株における誘導能を調べるために、ルシフェラーゼとEGFPの両方を持つプラスミドを導入した。

7. 岩手大学班：劇症肝炎患者の血漿交換時の廃棄血漿(ヘパリン500単位/血漿100ml)を用いて20%血漿含有DMEM培養液を作成し、ヒト肝癌細胞株HepG2細胞を96時間培養し、各時点でBrdU取り込み能および生細胞数を計測した。

8. 国立衛生研方法：前年に同じ。

9. 岡山大学班方法：1. 骨髄細胞培養。 2. 免疫細胞化学染色。 3. RT-PCR

10. 筑波大学班方法：前年に同じ。

11. 杏林大学班金井研と永森研方法：前年に同じ。(倫理面への配慮)

プロジェクト全般にわたり杏林大学医学部倫理委員会をはじめ各施設での審議を受ける。本プロジェクトで使用するヒト組織は既に樹立した細胞株であり、また使用方法も直接ヒトに作用させるものでないので、組織の入手や研究の目的での倫理面での問題性は低い。

C. 研究結果

1. 千葉班千葉寛研結果：1. FLC4-BIOS-1細胞の平面培養およびスフェロイド培養。FLC4-BIOS-1細胞を通常のcell culture dishを用いた平面培養したところ、cell culture dishにFLC4-BIOS-1細胞が接着している様子が観察された。培養開始3~4日後にコンフルエントとなり、その後の培養を中止した。一方、

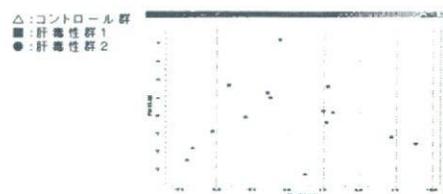
スミロンセルタイトスフェロイドを用いたスフェロイド培養では、FLC4-BIOS-1細胞がスミロンセルタイトスフェロイドに播種した翌日にウェルの中央に集まり、徐々にスフェロイドを形成した。2. FLC4-BIOS-1細胞のアルブミン産生量。Fig. 1に示したように、FLC4-BIOS-1細胞のアルブミン産生量は、平面培養下よりもスフェロイド培養下において多く、スフェロイド培養下における細胞は培養19日目までアルブミン産生能を維持していた。3. 薬物動態関連遺伝子のmRNA発現量。Real-time PCRの結果、スフェロイド培養を開始して7日目に回収したFLC4-BIOS-1細胞におけるCYP分子種のmRNA量は、平面培養3日目の細胞に対して、CYP2B6は13700倍高いmRNA発現量を示し、CYP2C19のmRNAはスフェロイド培養下における細胞でのみ発現が見られた (Fig. 2)。また、RT-PCRの結果、スフェロイド培養7日目のFLC4-BIOS-1細胞におけるCYP3A4のmRNAは平面培養3日目における細胞と比較して高い発現量を示した (Fig. 3)。転写因子については、real-time PCRの結果、スフェロイド培養の7日目におけるFLC4-BIOS-1細胞では平面培養3日目の細胞に対して、HNF4 α は38倍、C/EBP α は147倍高いmRNA発現量を示し、C/EBP β は同程度のmRNA発現量を示した (Fig. 4)。核内レセプターについては、real-time PCRの結果、スフェロイド培養の7日目におけるFLC4-BIOS-1細胞では平面培養3日目の細胞に対して、PXRは31倍高いmRNA発現量を示し、CARのmRNAはスフェロイド培養下における細胞でのみ発現が見られた (Fig. 5)。薬物トランスポーターについては、real-time PCRの結果、スフェロイド培養の7日目におけるFLC4-BIOS-1細胞では平面培養3日目の細胞に対して、OATP1B1が235倍高いmRNA発現量を示した (Fig. 5)。

4. CYP3A4のmRNA発現量に対するrifampicinの影響。RT-PCRの結果、スフェロイド培養7日目におけるFLC4-BIOS-1細胞にrifampicinを曝露したときのCYP3A4 mRNAはDMSOを曝露したときよりも高い発現量を示した。一方、平面培養における細胞ではrifampicin曝露とDMSO曝露との間でCYP3A4 mRNAの発現に差は見られなかった (Fig. 6)。また、real-time PCRの結果では、スフェロイド培養7日目におけるFLC4-BIOS-1細胞にrifampicinを曝露したときのCYP3A4 mRNAの発現量はDMSOを曝露したときよりも11500倍高かった (Fig. 7)。

細川研結果：1. Dexによって誘導されるMPHS水解活性を有するラット肝CESアイソザイムの同定。MPHSを基質として、Control (Cont) Ms、Dex Msにおける水解活性を測定したところ、Fig. 1に示したようにCont Msと比べDex Msにおいて24.5倍 ($P < 0.005$)の加水分解活性の上昇が認められた。一方、PNPAを基質として同様にCont MsおよびDex Msにおける水解活性を測定したところ、Fig. 1に示したようにCont Msと比べDex Msにおいて加水分解活性の低下が認められた ($P < 0.005$)。また、Dexによって誘導されるラット肝ミクロソームCESのアミノ酸配列の解析結果より、ラット肝においてAB010635のmRNA

の発現量がDex投与により増加している可能性が示唆されたため、Cont MsおよびDex MsについてそれぞれAB010635のmRNA発現量をreal time PCR法により定量した。その結果、Fig. 2に示したようにDex MsにおけるAB010635のmRNA発現量は、Cont Msに比べて208~532倍高いことが明らかとなった。2. CES RL4の基質特異性の検討およびヒトCESとの比較。1.の結果より、Dex投与によって誘導されるラット肝CESはCES RL4であることが示唆されたため、次にこのCESアイソザイムの基質特異性について検討をおこなった。Temocaprilを基質とした場合、CES2ファミリーに属するRL4およびヒトCES HU3は水解活性を示さなかったのに対して、CES1ファミリーに属するラットCES RH1およびヒトCES HU1では高い水解活性が認められた。3. DexによるCES RL4の誘導機構の解明。CES RL4の5'上流領域約3kbpを組み込んだpGL3-Basic Vector (CES RL4-2957bp/ pGL3-Basic Vector) を、rPXRおよびrGRとともにFLC7細胞あるいはHepG2細胞に共発現させ、転写活性に対するDexの影響をレポータージーンアッセイによって調べた。その結果、FLC7細胞においてはrGR共発現下でのDex曝露により転写活性は11.6倍上昇した。一方、HepG2細胞においてはrGR共発現下でのDex曝露による転写活性の上昇は認められなかった。また、いずれの細胞においてもrPXR共発現下でのDex曝露による転写活性への影響は認められなかった。CES RL4-2957bp/pGL3-Basic VectorをrGRとともにFLC7細胞あるいはHepG2細胞に共発現させ、転写活性に対するDex濃度の影響を10 nMから10 mMの範囲でレポータージーンアッセイにより検討した。その結果、Fig 3に示したようにFLC7細胞においてはDex 1 mMから転写活性の上昇が認められ (4.29倍)、10 mMにおいて転写活性の上昇が最大となることが明らかとなった (10.6倍)。一方、HepG2細胞においては今回検討した範囲の濃度ではDexによる転写活性化は認められなかった。

2. 中外班結果：Albumin, LDH, AST,ALTの平均値はコントロール群でそれぞれ0.210 g/L,61.8 IU/L, 14.2 IU/Lおよび3.00 IU/L、肝毒性群1ではそれぞれ0.210 g/L,95.6 IU/L, 14.2 IU/Lおよび16.8 IU/Lであった。これに対して肝毒性群2ではそれぞれ0.210 g/L, 140 IU/L, 27.0 IU/Lおよび13.8 IU/Lであった。コントロール群と比較して肝毒性群ではLDH,ASTおよびALT値の上昇がみられた。各群のNMRスペクトルのPCA解析では、主成分1(77.0%)、主成分2(12.2%)を用いることでコントロール群と肝毒性群を判別できる可能性が示唆された。



3. 国立感染研結果：(1) TGPを用いて三次元培

養したヒト肝癌細胞の形態学的解析。 Huh7細胞、HepG2細胞をTGP中で培養すると7日目に直径約50 μm のスフェロイド構造が形成された。これらの細胞の微細構造を調べるため、透過型および走査型電子顕微鏡による観察を行った。細胞表面では単層培養に比べ、微絨毛の発達が見られた。また、細胞間でも微絨毛の発達が見られ、さらにデスモゾーム様またタイトジャンクション様の構造及び微小胆管様構造の形成も観察された。これらの結果からヒト肝癌細胞を三次元培養化することにより生体肝組織に近い特徴を示すことが示された。(2)TGP三次元培養におけるP450の発現と機能解析。TGP三次元培養肝細胞を用いてP450 CYP3A4の機能発現を解析した。Huh7細胞をTGP培養した場合、単層培養と比較してCYP3A4の薬物代謝活性は顕著に増加した。この時、CYP3A4の遺伝子発現が亢進し、またCYP3A4発現調節に関わる転写因子PXR、RXR α の顕著な(10倍以上)発現亢進も認められた。肝由来細胞株では形態変化に伴って、種々の転写因子の発現が変動し肝臓分化機能の発現誘導に繋がる可能性が示唆された。

(3) TGP三次元培養細胞を用いたチトクロームP450活性測定系の薬剤評価への応用。 通常の単層培養細胞系では、デキサメサゾン等で誘導する場合を除き内在性のチトクロームP450 CYP3A4の活性は極めて低レベルであり測定が難しい。TGP培養の場合、誘導剤未処理の状態でもCYP3A4活性の検出が可能である。そこでHuh7細胞のTGP培養系が、薬剤のCYP3A4活性へ及ぼす影響の評価法として有用であるかを明らかにするため、エリスロマイシンをモデルとしてCYP3A4活性への影響を検討した。その結果、エリスロマイシンは濃度依存的にCYP3A4活性を阻害し、そのIC₅₀は約0.1 mMであった。高いCYP3A4活性を有する本培養系は薬剤の副作用評価系として有用であることが示された。

4. 京都大学班: RT-PCRで検出できる程度のウイルスゲノム複製が観察された。現在、この細胞のHCV感染および複製効率を高くする工夫をしている。特に、TLR3を介したHCVゲノム複製制御についての知見を得ることを目的とした。Huh7はTLR3の活性が抑制されている。この細胞に外来的にTLR3遺伝子を導入すると、TLR3シグナルが活性化されその結果ウイルスゲノムの複製が強く抑制された。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。

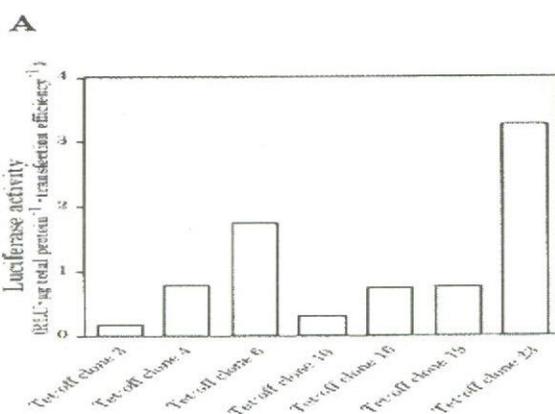
5. 秋田大学: (1-1) ナフトールは細胞内に取り込まれ、グルクロン酸抱合物と硫酸抱合物として細胞外に排除されることが確認できた。硫酸抱合物が排泄される量はグルクロン酸抱合物より、少ないと

考えることができる。(1-2) 経日的に培養液(細胞外液)中のABCの濃度は増加した。よって、FLC4細胞はSBCを取り込むことができ、Nアセチル化して細胞外に排泄することがわかった。なお、予試験で、培養液に標準培養液(DMEM/F12、50:50)を用いた場合はABCを検出することができなかつたので、有機アニオン輸送系(OAT1)はSBCを基質とすることができないと考えられる。液体クロマトグラフ質量分析(LC/MS)でこのピークの質量スペクトルをとった。分子イオンm/z 277 (M+H⁺)、フラグメントイオンとしてm/z 190 (M+2)、m/z 148 (M+3)が認められた。これらのイオンは有機合成したメタゾラミドシステイン抱合物のFABスペクトルで見られたものと一致した。よってメタゾラミドのシステイン抱合物であると断定した。

6. 名古屋大学班結果: Tetリプレッサーを持つFLC-4細胞を7クローン選択した(クローン番号、3, 4, 6, 10, 16, 19, 23)。まず、これらのクローンの3次元培養に应答する能力を検討するために、EHS-gel上で培養した細胞のHNF-4 mRNA量をノーザン法で検討した。いずれの細胞株もEHS-gel上で培養した細胞で高いHNF-4 mRNA量を示した。このことは、クローン化されたいずれの細胞も親株であるFLC-4細胞の3次元培養に应答する能力を保持していることを示している。

Tetリプレッサーを持つFLC-4細胞クローンのドキシサイクリン除去による標的遺伝子の誘導能を検討した。Tetリプレッサーのターゲット配列を持ち2つの遺伝子発現を制御することができるベクターを用いて、ルシフェラーゼとEGFPの誘導を試みた。クローン6, 23は、ドキシサイクリン除去により高いルシフェラーゼ活性を示した(図1A)。ドキシサイクリン除去により誘導されるルシフェラーゼ活性の誘導倍率を検討したところ、クローン4, 6は200倍弱の誘導倍率を示し、クローン23では400倍以上の誘導を示した(図1B)。

C/EBP α 遺伝子をTetリプレッサー依存的に転写誘導できるベクターの構築を試みこれに成功した。



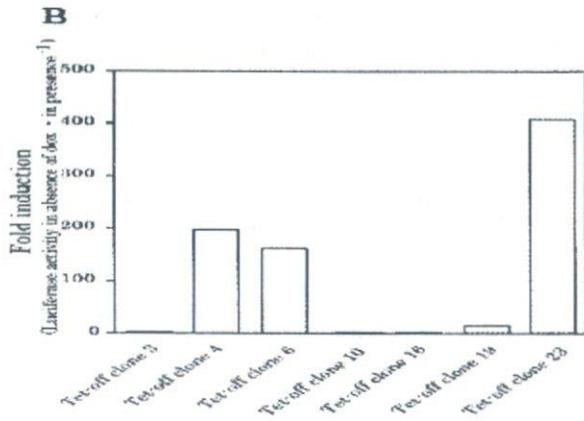
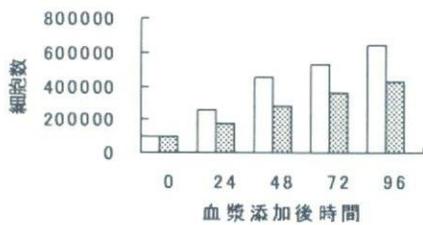
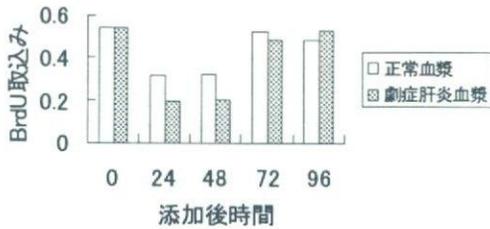


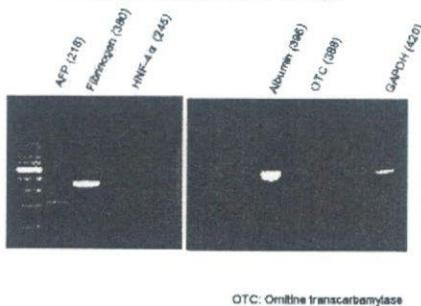
図1 Tet-offシステムを導入したクローン化 FLC-4細胞株におけるルシフェラーゼ活性 (A) と誘導倍率 (B)

7. 岩手大学班：劇症肝炎患者血漿は、健常人血漿に比し添加後24-48時間のBrdU取込みを有意に抑制し (図1)、その後96時間にわたって生細胞数の増加を遅延させた (図2). 1. 細胞形態：培養細胞は強固な細胞間接着をもって密に配列し、一部は微絨毛の形成を認めたが、毛細胆管形成は明らかではなかった。

図1 図2



RFB培養における肝特異的遺伝子の発現



OTC: Ornithine transcarbamylase

8. 国立衛生研結果：1. 細胞のスフェロイド形成。HepG2、FLC4を、住友ベークライト社の「スミロン

セルタイトスフェロイド」で培養し、3次元スフェロイド状の細胞凝塊を形成させた。細胞播種後、約72時間でスフェロイドの形成が観察された。

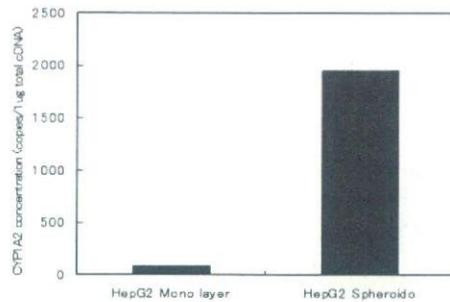


平面培養

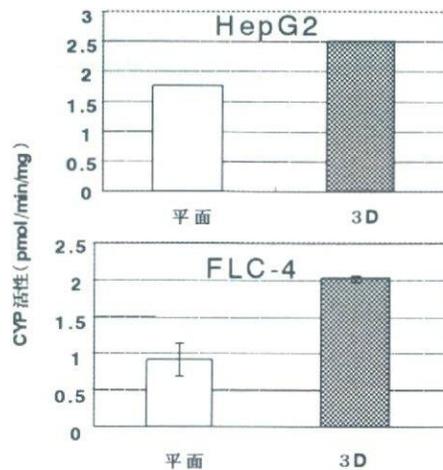


3次元培養

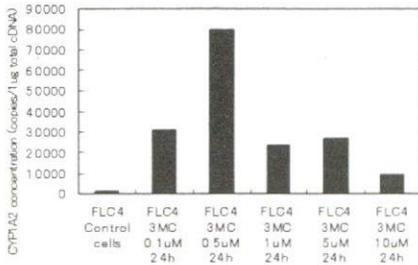
2. スフェロイド細胞のCYP2A1/2の発現、および薬物代謝活性。HepG2細胞の平面培養、3次元培養下でのCYP1A2遺伝子の発現量を比較したところ、3次元培養下でのスフェロイド細胞は、平面培養時に比べて、25倍程度の発現の亢進が認められた。



一方、酵素活性に関しては、HepG2で約1.5倍、FLC-4で2倍のCYP2A1/2の酵素活性の増加が観察された。



3. 3 MC誘導によるCYP1A2遺伝子の発現誘導。FLC4細胞のスフェロイド形成後、3 MCを処理し、24時間後におけるCYP1A2の遺伝子発現を測定した。全ての濃度 (0.1~10uM) において、発現の誘導が観察された。もっとも誘導が高かったのは、0.5uM処理時であった。



9. 岡山大学班結果：7日間分化誘導培養した細胞あるいは増殖維持条件で培養したコントロール細胞からRNAを抽出してRT-PCRを行った。その結果、分化誘導した細胞からアルブミンmRNAが検出された（レーン3, 5, 7）。この他にも、G6Pase, TO, TATのような肝特異酵素の遺伝子発現が認められた（レーン3, 5, 7）。さらに、分化誘導したrBM25/S3およびrBM48/F8-1細胞からCYP1A1およびCYP1A2のmRNAが検出された（レーン3, 7）。一方、増殖維持培養したコントロール細胞からはこれらのmRNAは全く検出されなかった（レーン2, 4, 6）。

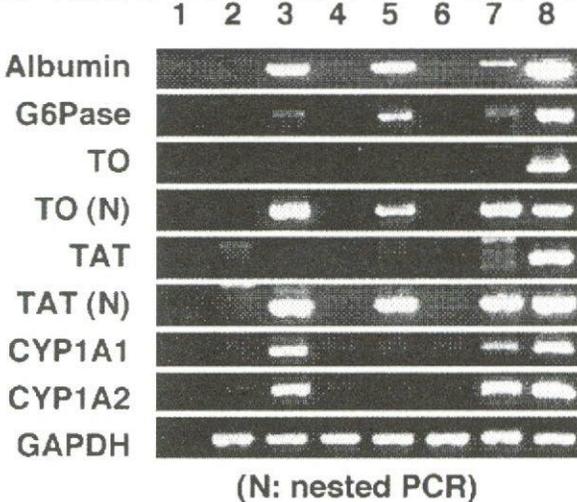


図7 RT-PCRによる分化誘導したrBM25/S6あるいはrBM48/F8-1細胞における肝特異遺伝子の発現
1: 水（ネガティブコントロール）
2, 4, 6: 各々rBM25/S34, rBM25/S6あるいはrBM48/F8-1細胞 [EGF, PDGF添加フィブロネクチン上培養（増殖維持条件）] 3, 5, 7; 各々rBM25/S34, rBM25/S6あるいはrBM48/F8-1細胞 [HGF, FGF-4添加マトリゲル上培養（分化誘導条件）] 8:成熟ラット肝臓

10. 筑波大学班結果：①内皮細胞バタンとFLC-4バタンの形状維持を比較：チップに内皮細胞。内皮細胞は単層のバタンが1週間後も維持されているものの、LC-4細胞播種後1週間ではFLC-4細胞の増殖によって一面に細胞が広がっていることがわかる。

11. 杏林大学班金井研結果：1. FLC4の輸送系Lの発現：FLC4細胞におけるLAT3の発現を、ノーザンブロット及びLAT3特異抗体を用いたウェスタンブロットにより検討した。ノーザンブロットにおいては、ヒト肝臓及びFLC4細胞に、同サイズのLAT3のバンドが検出された。ウェスタンブロットでは、

抗LAT3抗体によりFLC4細胞に37KDaのバンドが検出されたが、このバンドはLAT3抗原ペプチドの存在下で完全に消失し、本抗体の特異性が確認された。これにより、LAT3のFLC4細胞での発現が確認された。

LAT1及び4F2hcの発現を、ノーザンブロット及び抗LAT1抗体を用いたウェスタンブロットにより、FLC4細胞とヒト膀胱癌由来T24細胞で比較した。ノーザンブロットにおいては、LAT1はT24細胞とともにFLC4細胞に強い発現が見られたが、4F2hcの発現はFLC4細胞では極めて弱かった。そこでウェスタンブロットを行ったところ、非還元条件下では抗LAT1抗体によりT24細胞に125KDaのバンドが検出された。これは還元条件下で38KDaへシフトした。

この125KDaのバンドは、LAT1と4F2hcのヘテロ二量体に相当し、38KDaのバンドは、LAT1の単体に相当するものである。FLC4細胞においては、38KDaのバンドのみが検出され、125KDaのバンドは非還元条件下においても検出されなかった。従って、FLC4細胞には、ヘテロ二量体型の機能性のLAT1は存在しないことが示された。

2. FLC4細胞の薬物トランスポーターABCC2の発現：ラジアルフローバイオリアクターによる三次元培養法においてFLC4を20日間培養し、平面培養でマトリゲルコートディッシュにおいて培養したFLC4と遺伝子発現を比較した。今回は、薬物代謝酵素CYP2B6と薬物の胆汁排泄を担うABCトランスポーターABCC2 (MRP2)のフェノバルビタールによる遺伝子発現誘導を逆転写PCRにより検討した。ラジアルフローバイオリアクター三次元培養 (30mLラジアルフロー型バイオリアクター) においては、担体としてシランビーズ (平均粒径 1~2 mm)を用い、DMEM/F12 + 10% FBSを培地として用いた。平面培養においては、薄層マトリゲルにてコンフルエントに達するまで培養を行った。フェノバルビタール 2 mM、48時間暴露によるCYP2B6とABCC2の遺伝子発現の変化をRT-PCR法により定量的に観察した。

その結果、ラジアルフローバイオリアクター培養、マトリゲルコートディッシュ培養ともに、CYP2B6及びABCC2の両者の遺伝子に関して、フェノバルビタールによる大きな誘導が観察された。本結果は、FLC4細胞が正常肝細胞の特質を保持していることをさらに支持するものである。

12. 杏林永森班結果：肝細胞株の保有する遺伝子研究のため、現在下記の研究施設に配布された。下記のヒト肝胆由来の腫瘍細胞株は2003年3月から2006年12月までの永森らが樹立し、2006年までに、ヒューマンサイエンス研究資源バンク (HSRRB) に保存を依頼し、研究、試験、教育等に利用を希望する施設または研究者への細胞分譲状況を示した表である。

JHH：ヒト肝細胞癌由来細胞株、NOZ：ヒト胆のう癌由来細胞株、OZ：ヒト胆管癌由来細胞株

細胞分譲依頼リスト				
申込日		細胞株名	株数	研究目的
2003年	4/25	Human gallbladder carcinoma cell line	1	代謝実験
	5/25	JHH-4	1	
	7/1	Noz	1	胆のう癌における研究
	7/2		1	ヒト肝細胞癌発生の基礎研究
		JHH-6	1	
		JHH-5	1	
	7/18	JHH-2	1	肝細胞癌株における細胞周期とfunctional P53の発現との関係を明らかにすること
		JHH-7	1	
	8/5	Noz	1	胆のう癌celllineにhomeodomain protein cdx2の発現を研究する
	8/8	Noz	1	癌に対する免疫細胞療法の研究
	8/10	JHH-5	1	肝癌に対する各種薬剤の制癌効果に関する研究
		JHH-4	1	
	8/22	JHH-7	1	B型肝炎ウイルスの発癌メカニズムの解明
	9/18		1	新しい糖尿病新薬DHEAがどのような影響を及ぼすかウエスタンブロットを用いて検討
		JHH-5	1	
	10/3	Noz	1	癌遺伝子の検索、遺伝子治療研究のため
	10/11	.	1	Development of gene therapy for gall bladder cancer
	9/24	oz	1	cholangio carcinoma adenoviral gene therapy
2004年	2/13	oz	1	胆管癌に対する自殺遺伝子療法
	3/2	oz	1	細胞運動と核の研究
	3/10		1	薬剤の胆嚢毒性の解析
		Noz	1	
	4/13		1	遺伝子導入実験
		Noz	1	
	4/14	JHH-7	1	化合物評価（培養系における増殖抑制）、ヌードマウス移植後の抗腫瘍活性評価
		JHH-2	1	
	4/8		1	同型接合体の遺伝子研究
		JHH-2	1	
		JHH-5	1	
		JHH-6	1	
		JHH-4	1	
	5/10	oz	1	胆管上皮発生・文化について
	6/18	JHH-4	1	肝癌におけるチロシンキナーゼの発現とチロシンキナーゼ阻害薬の効果と検討
	7/5	Noz	1	消化器癌の生物学的解析
		oz	1	
	7/20	JHH-1	1	JHH-1の分泌するコラーゲン分析
	10/12	JHH-1	1	各種薬剤暴露時の薬剤反応性関連遺伝子の発現変化の解析
		JHH-2	1	
		JHH-4	1	
		JHH-5	1	

		JHH-6	1	
		JHH-7	1	
	10/30	oz	1	胆管系癌に対する抗癌剤感受性試験
		Noz	1	
	12/16	Noz	1	胆嚢癌細胞株に対する分子標的薬の効果
2005年	1/5	JHH-1	1	癌遺伝子の解析
		JHH-2	1	
		JHH-4	1	
		huH-1	1	
	1/17	HuH-7	1	肝細胞癌の発育・進展過程におけるFGFの役割についての検討
		JHH-1	1	
		JHH-2	1	
		JHH-5	1	
		JHH-6	1	
	1/31	JHH-1	1	JHH-1の分泌するコラーゲン分析
	2/16	JHH-1	1	癌ゲノム異常解析
		JHH-2	1	
		JHH-4	1	
		JHH-5	1	
		JHH-6	1	
		JHH-7	1	
	3/4	JHH-6	1	薬剤感受性試験
	3/7	JHH-2	1	ヒト肝癌・膵癌における <i>in vivo</i> 抗癌剤感受性探索
	3/29		1	胆嚢癌における血管新生分子の網羅的解析
		Noz	1	
	4/12		1	消化器癌の生物学的解析
		JHH-1	1	
		JHH-4	1	
		JHH-7	1	
	5/11		1	肝内胆管癌細胞株の特定遺伝子の発現を調べる
		oz	1	
	5/12		1	膵癌・胆嚢癌の抗癌剤感受性現言因子の探索
		oz	1	
		Noz	1	
	5/30	Noz	1	胆嚢癌・癌遺伝子スクリーニング
	6/2	huH-1	1	肝炎ウイルス感染の解析
		JHH-1	1	
		JHH-4	1	
	10/3	JCRB9004	1	K-ras mutation check (PCR-RFLP法) に対する positive/negative controlに使用
		JCRB0225	1	
		JCRB1033	1	
		JCRB0070	1	
	10/7	oz	1	Investigation of prognostic factor of gallbladder carcinoma.
		Noz	1	
	10/11	JHH-7	1	マウスへの移植実験
	11/8	oz	1	Basic Research
	11/22		1	細胞周期にかかわる糖鎖転移酵素の解析
		oz	1	

	11/22		1	Testing cytotoxic activity of now chonical entities on bile duct carcinoma.
		oz	1	
	12/5	JHH-2	1	肝癌幹細胞の同定
		JHH-6	1	
		JHH-7	1	
	12/15	JHH-1	1	肝細胞ガンの機序解明
2006年	1/31	JHH-1	1	肝細胞癌の進展に関する分子の機能の検討
		JHH-2	1	
		JHH-5	1	
		JHH-6	1	
		JHH-7	1	
	2/23	JHH-2	1	抗癌剤感受性試験の研究
		JHH-4	1	
	3/3		1	signal transduction in cancer cell lines.
		J=111	1	
		JHH-1	1	
		JHH-2	1	
		JHH-4	1	
		JHH-6	1	
		JHH-7	1	
	4/3		1	胆管ガンにおけるゲノム解析
		oz	1	
	4/20	JHH-4	1	肝がん細胞の種々のコネキシンの発現と増殖文化を調べることにより薬剤の効果判定を行う
		JHH-5	1	
	4/20	Noz	1	細胞毒性試験
	4/20	JHH-7	1	殺細胞効果の検討
	7/5	JHH-7	1	抗癌剤の研究
	7/14	JHH-4	1	anti tumor drug screening
		JHH-7	1	
	7/14		1	HBV integrationのある細胞よりのcloning
		JHH-7	1	
	7/26		1	癌肝細胞の解析・性格同定
		JHH-7	1	
	7/27		1	アスコルビン酸合成に関する研究
		JHH-4	1	

D. 考察

1. 千葉寛研考察：三次元培養法の一つであるスミロンセルタイトスフェロイドを用いてFLC4-BIOS-1細胞のスフェロイド培養をおこない、平面培養と比較して薬物動態関連遺伝子の発現が増加するか検討。さらに各CYP分子種の誘導能を回復する培養条件を明らかにしヒト初代培養肝細胞の代替となるCYP分子種の誘導評価系を構築することを目的として検討をおこなった。成熟肝細胞は、多種の血漿タンパク質を合成分泌している。アルブミン合成能は、肝実質細胞の示す重要な肝特異機能の一つである。FLC4-BIOS-1細胞のアルブミン産生量を測定したところ、平面培養下の細胞においてはアルブミン産生量は微量であったのに対し、スフェロイド培養下の細胞は、培養19日目までアルブミン産生能を維持していた (Fig. 1)。この結果よりスミロンセルタイトスフェロイドを用いてスフェロイド培養することにより、FLC4-BIOS-1細胞が肝機能を回復する可能性が考えられた。

一方、薬物動態関連遺伝子であるCYP2B6、CYP2C19、CYP3A4、HNF4 α 、C/EBP α 、PXR、CARおよびOATP1B1のmRNAの発現量については、スフェロイド培養したFLC4-BIOS-1細胞では平面培養された細胞に比較して高い値を示すことが明らかとなった (Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5)。今回の検討では、スミロンセルタイトスフェロイド1枚で培養したため細胞数が少なく、ミクロソーム抽出や核抽出はおこなうことができなかつた。したがって、これら薬物動態関連遺伝子のタンパク質発現量や代謝活性を検討するためには、今後、スミロンセルタイトスフェロイドの枚数を増やして培養する必要性が考えられた。

多数のCYP分子種のうち、CYP3A4は臨床で用いられている医薬品の約50%の代謝に関与する重要な薬物代謝酵素である。CYP3A4はrifampicinによりPXRを介して誘導される。スフェロイド培養7日目におけるFLC4-BIOS-1細胞では平面培養3日目における細胞と比較してPXRの発現量が増加したことから、スフェロイド培養7日目における細胞ではrifampicinによるCYP3A4の誘導能を回復したと考えられた (Fig. 6, Fig. 7)。一方、phenobarbitalによるCYP2B6の誘導にはCARが関与している。FLC4-BIOS-1細胞はスフェロイド培養下でのみCARの発現が認められたため、スフェロイド培養下における細胞ではCYP2B6の誘導能も回復している可能性が考えられた。さらに、PXRおよびCARは、CYP3A4およびCYP2B6以外のCYP分子種の誘導にも関与していることから、複数のCYP分子種について誘導能を回復している可能性も考えられた。

以上より、スミロンセルタイトスフェロイドを用いてスフェロイド培養することによりアルブミン産生量および複数の薬物動態関連遺伝子の発現量を増加させることができることが明らかとなった。また、スミロンセルタイトスフェロイドを用いて7日間スフェロイド培養したFLC4-BIOS-1細胞は少なくともCYP3A4の誘導をmRNAレベルで評価できる可能性が示された。

細川研考察：誘導型の薬物代謝酵素は、医薬品のバイオアベイラビリティに大きな影響を及ぼす可能性

があるため、その特性を詳細に検討する必要がある。Dexによって誘導され、MPHS水解活性を有するCESアイソザイムはCES RL4である可能性が強く示唆されたため、次にアミノ酸配列の解析をおこなった。その結果、Dexによって誘導されるラット肝ミクロソームCESとCES RL4は同一であり、その本体はAB010635でコードされるタンパクであることが明らかとなった。Dex投与によって血漿中でのCES RL4の存在量が増加している可能性が示唆された。さらにアミノ酸配列を解析した結果、Dex plasmaにおいて増加するCESはCES RL4であることが明らかとなった。Dex投与によって観察されたMPHSは全身性エリテマトーデスの治療や腎移植およびショック時などに幅広く用いられるエステル型プロドラッグのステロイドであり、体内で加水分解されMPに変換されることによって薬効を発揮する。HepG2細胞はFLC7細胞と同様、ヒト肝がん由来細胞株である。そのため、両細胞間において転写活性化に差異が認められたことは、DexによるCES RL4の誘導メカニズムにGR以外の二次的因子、例えばC/EBP、AP-1などが関与している可能性が示唆された。

3. 国立感染研班考察：1. TGPを利用したヒト肝癌細胞株の三次元培養系は肝臓分化機能を保持した形で肝組織を再構築する。2. TGP培養肝癌細胞系は、薬剤等のチトクロームP450阻害作用の評価系として有用である。

4. 京都大学班考察：Huh7はもともとTLR3シグナルが抑制されておりそのことがHCVゲノム複製効率を上げていると考えられた。Huh7細胞におけるTLR3シグナル機構の解明はHCVゲノム複製の自然免疫による制御の解明の一助になると期待される。

5. 秋田大学班考察：FLC4細胞を用いることによって自然界に存在する新規有用物質の探索や、薬理効果の評価に有効であるが明らかになった。

6. 名古屋大学班考察：3次元培養したFLC-4細胞では薬物代謝能が高いことが示されているが、ヒト肝臓と比べた定量的な研究がないため、現時点では薬物代謝能が低いために毒性を検出することができなかったのかを判断することはできない。実験条件の最適化以外に、他の肝毒性物質も検討するなどして原因を調べる必要がある。微量検出系を開発する目的で外来遺伝子を導入したFLC-4細胞株の作出を行った。EGFPを導入した細胞株では、細胞毒性のスクリーニング系で、EGFPの細胞外への溶出をリアルタイムで観察することのできる細胞株として有用であり、今後マイクロスクリーニング系で肝毒性物質、肝保護物質の探索に使用できるか検討していく予定である。HNF-4は肝臓特異的転写因子の中で肝機能にとって最も重要な転写因子である。薬物のスクリーニングにHNF-4の動態をマーカーとして用いることでこれまでとは別の視点で検討することが可能になると考えられる。一方微小管について、多くの細胞内情報伝達機構が微小管をレールとして利用し、リン酸化やタンパク質の運動の方向性が決められている。微小管のネットワークの維持は、正常な肝機

能にとって重要である。微小管のネットワークを指標として、肝毒性の場合にはチューブリンタンパク質の漏出を指標として薬物のスクリーニングが可能になるのではないかと現在これらの細胞株を使用して、薬物性肝毒性の試験を開始している。

7. 岩手大学班考案：劇症肝炎患者血漿添加直後から48時間までのBrdU取り込みの低下が見られたがその後回復したことより、この時間内での増殖抑制がその後の生細胞数の差となったものと推定される。BrdU取り込みの回復はHepG2細胞自身の浄化能による可能性も考えられ、今後の生物学的人工肝臓による浄化の意義が期待される。

8. 国立衛生研考案：肝細胞を3次元培養することにより、薬物代謝活性が上昇し、2次元培養に比べ、本来の肝臓の機能に近い状態を反映できることが報告されている。これら肝細胞の3次元培養は、ラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) を必要とする。RFBは人工肝臓を想定した大型の機器であり、毒性試験等のスクリーニングを目的とした試験には不向きかもしれない。ハイスループットを念頭に置いた、簡便な肝細胞の3次元培養法と、それをういた *in vitro* 試験法の構築が求められている。これまで、コラーゲンゲルでのHepG2細胞の3次元培養に成功し、一旦、3次元スフェロイドを形成させれば、その後は通常の培養で、スフェロイドを増殖、維持できることがわかったが、薬物代謝活性を始め、種々の肝機能マーカーに大きな変化が見られなかった。このことから、3次元スフェロイドが肝機能を持つには、その大きさや、形態が重要であることがわかった。これまで、コーニング社の超低接着プレート (item#3261) 法で培養を行い、スフェロイド形成に成功したが、十分な薬物代謝を持つことは確認できなかった。これは、酵素活性の測定に十分なスフェロイドの回収ができなかったためである。今回用いた住友ベークライト社の「スミロンセルタイトスフェロイド」は96穴プレートに細胞を播種し、3日後には全ての穴でスフェロイドの形成が確認された。このスフェロイドは、遺伝子発現解、タンパク質解析、また各種試験を行うためには十分量を調整できることが特徴である。FLC4, HepG2両細胞で問題なくスフェロイドの形成が確認されたことから、多くの肝細胞への応用が期待できる。スフェロイドのCYP1A2に遺伝子の発現は20倍以上も増加し、高い酵素活性が期待されたが、酵素活性の増加は数倍程度に留まった。このことは、薬物代謝酵素の発現は、転写レベルだけでなく、翻訳レベルでも制御されていることを示すものである。今後、酵素活性をより高く獲得させるための他の条件の検討が必要である。その一つとして、3MCなどによる誘導が利用できる。FLC4細胞では3MCの処理により発現量がさらに数十倍程度増加した。今回の培養条件下での実際の酵素活性はまだ未測定であるが、昨年、別の培養条件下で酵素活性の誘導が観察されている。従って、3次元培養によるスフェロイド形成と、薬物による酵素誘導の組み合わせにより、高い薬物代謝能を持つ細胞試験系の確

立が可能になるものと期待できる。

9. 岡山大学班：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るだけでなく、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であろう。

10. 杏林大学班：肝臓は薬物代謝の中心的臓器であり、薬物は肝細胞内に取り込まれ代謝される。第一相反応により薬物は酸化、還元、あるいは加水分解等を受け、第二相反応で抱合反応によりグルクロン酸、グルタチオン、硫酸等との抱合体となる。これにより疎水性薬物に極性が賦与され、細胞外へ排出される。この代謝・排泄の過程において、細胞膜のトランスポーターは薬物の肝細胞内への取り込みと代謝産物の細胞外への排出に重要な役割を担っている。肝臓における薬物トランスポーターにはABCトランスポーター、SLC21有機イオントランスポーター、SLC22有機アニオントランスポーターが存在する。さらに今回検討した輸送系Lアミノ酸トランスポーターもこれに含まれる。ラジアルフローバイオリアクターによる3次元肝細胞培養における薬物代謝酵素の研究はすでに行なわれているが、細胞膜上のトランスポーターの発現解析は行なわれていない。そのため3次元肝細胞培養におけるトランスポーター遺伝子およびタンパク質発現のプロファイリング研究は肝培養細胞株を用いた薬物有効性、安全性評価法の確立のため必須となる。本研究は、「高機能保持ヒト由来肝培養細胞株を用いた薬物有効性、安全性評価法の確立とその応用」を最終ゴールとして、高機能保持ヒト由来肝細胞FLC4における薬物トランスポーターの遺伝子およびタンパク質発現プロファイリングを目的として行われている。

FLC4は、肝細胞の分化機能を高度に保持した細胞であり、分担研究者らは本細胞を材料としてすでに肝細胞型新規アミノ酸トランスポーターLAT3の分子クローニングに成功している。LAT3は、分化型の肝細胞に発現する輸送系Lアミノ酸トランスポーターであり、FLC4細胞がこれを発現していることからトランスポーターの観点からも、FLC4細胞が正常肝細胞の特質を高く保持していることが支持されたことになる。本年度の研究において、FLC4細胞が他の一般の培養細胞株と異なり、輸送系Lアミノ酸トランスポーターとしてLAT1ではなく、肝細胞型のLAT3の輸送特性を示す理由を検討した。その結果、FLC4細胞は、未分化肝細胞に存在するLAT1を発現するが、LAT1の機能発現に必須の補助因子4F2hcを欠いており、その結果、LAT1が機能できず、肝細胞型LAT3の活性が支配的となっていることが明らかになった。また、本研究において、FLC4細胞のラジアルフローバイオリアクター培養及びマトリゲルコートディッシュ培養において、薬物代謝酵素CYP2B6と薬物の胆汁排泄を担うABCトランスポーターABCC2(MRP2)のフェノバルビタールによる遺

伝子発現誘導を逆転写PCRにより比較した。その結果、ラジアルフローバイオリクター培養、マトリゲルコートディッシュ培養ともに、CYP2B6及びABCC2の両者の遺伝子に関して、フェノバルビタールによる大きな誘導が観察された。本結果は、FLC4細胞が正常肝細胞の特質を保持していることを確認するものである。しかし今回は、ラジアルフローバイオリクター培養はマトリゲル培養を凌駕する効果を示さなかった。今後培地や担体等の培養条件を比較し、さらに検討を加える計画である。今回は核内受容体CARを介する遺伝子発現が確認されている2遺伝子を標的としたが、他の薬物トランスポーターの検討を続行する予定である。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。この検討のもとに、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が、本分担研究の目的であり、本年度の検討に引き続き、培養条件のさらなる検討による最適化を行い、ラジアルフローバイオリクター上の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り、本項目においても本研究との関連において継続して推進していく計画である。

12. 杏林永森：肝細胞特異的遺伝子の発現及び発現量の確認。細胞が上皮様細胞の極性を獲得するときはMesenchymal-epithelial transition間葉系細胞-上皮細胞転換が起こる。この現象のキー分子としてEカドヘリンが重要である。カドヘリンの発現、血液凝固因子mRNA発現が認められ、さらにラジアルフロー型バイオリクター(RFB)では発現量が高まるものもあることが立証できた。しかしさらに良いRFBにおける培養方法の条件検討されなければならない。またヒト肝細胞株機能の検討は広く国内外の研究者に株細胞配布したことにより、研究者たちの多角的な分析結果はFLC-4をはじめとする細胞の安定した利用の道と発展が期待される。

E. 結論

中外結論：ヒドラジンをラジアルフロー培養したFLC細胞に添加し、経時的に増加するピークを検出した結果、肝毒性群とコントロール群がNMRスペクトルにより分離できる可能性が示唆された。

京都大学結論：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。

名古屋大学結論：3次元培養のスケールダウンを試み、96穴丸底マイクロプレートでの培養系に成功してきたが、FLC-4細胞を用いた肝毒性試験の適正化が必要であることがわかった。マイクロスクリーニング系に必須なナノセンサーを開発するにあたって、対象となるバイオマーカーを遺伝子導入することにより効率的な検出系を開発しようと試みた。EGFP、チューブリン、HFN-4の導入FLC-4クローンを作成した。これらの細胞の薬物スクリーニングへの最適化を図っていく必要がある。

国立衛生研結論：ヒト肝由来細胞株であるFLC4、HepG2を低接着性プレートで培養し、スフェロイド状細胞塊を形成させることに成功した。このスフェロイド細胞は、平面培養細胞に比べて転写レベルでは約25倍の薬物代謝酵素の発現が認められ、また酵素活性も数倍程度増加していた。さらに、3メチルコランズレン(3MC)の誘導により発現はさらに増加した。この性質を利用し、ヒト肝細胞を三次元チップ化すれば、ヒト型試験系として医薬品の毒性スクリーニングに利用できることが期待できる。

筑波大学結論：FLC-4をパタン基板上でスフェロイド培養した場合、増殖した細胞はパタン内で上方や外側へと増殖を続け、本研究結果から、肝細胞由来細胞のスフェロイドアレイ構築の技術により、細胞の活性を向上させることが示され、抗癌剤の薬効検査などに利用可能なセンサチップとしての応用が期待される。

杏林大学金井研結論：FLC4細胞は、分化型の肝細胞に発現する輸送系Lアミノ酸トランスポーターのLAT3を発現し、未分化肝細胞型LAT1の機能発現が抑えられている。このようにトランスポーターの観点からも、FLC4細胞が正常肝細胞の特質を保持していることが支持された。また、FLC4細胞の薬物代謝酵素CYP2B6と薬物の胆汁排泄を担うABCトランスポーターABCC2(MRP2)のフェノバルビタールによる遺伝子発現誘導の検討の結果、FLC4細胞が正常肝細胞の特質を高度に保持した細胞株であることがさらに確認された。

杏林永森研結論：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。

F. 研究結果

1. 論文発表

Kawashima S, Kobayashi K, Takama K, Higuchi T, Furihata T, Hosokawa M, Chiba K. (2006) "Involvement of hepatocyte nuclear factor 4{alpha} in the different expression level between CYP2C9 and CYP2C19 in the human liver." *Drug Metab. Dispos.* 34: 1012-8.

Shimizu T, Akimoto K, Yoshimura T, Niwa T, Kobayashi K, Tsunoo M, Chiba K. (2006) "Autoinduction of MKC-963 metabolism in healthy volunteers and its

retrospective evaluation using primary human hepatocytes and cDNA-expressed enzymes." *Drug Metab. Dispos.* 34: 950-4.

Miyazaki M, Yamashita T, Hosokawa M, Taira H and Suzuki A Species-, sex-, and age-dependent urinary excretion of cauxin, a mammalian carboxylesterase. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 145, 270-277, 2006

Kawashima S, Kobayashi K, Takama K, Higuchi T, Furihata T, Hosokawa M and Chiba K Involvement of hepatocyte nuclear factor 4alpha in the different expression level between CYP2C9 and CYP2C19 in the human liver. *Drug Metab Dispos* 34:1012-1018, 2006

永森 静志、秋山一郎、細川正清 別冊医学のあゆみ 消化器疾患ver.3 II.肝・胆・膵 効率のよい人工肝装置の条件—特にバイオ人工肝の重要性 133-137, 2006

Oka, H., Ikeda, K., Yoshimura, H., Ohuchida, A., Honma, M. Relationship between p53 status and 5-fluorouracil sensitivity in 3 cell lines. *Mutat. Res.*, 606, 52-60 (2006)

Umabayashi, Y. Honma, M., Abe, T., Ryuto, H. Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M., Yatagai, F. Mutation induction after low-dose carbon-ion beam irradiation of frozen human cultured cells. *Biological Sci. in Space*, 19, 237-241 (2006)

Hamazaki H, Ujino S, Miyano-Kurosaki N, Shimotohno K, Takaku H. Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by short hairpin RNA synthesized by T7 RNA polymerase in hepatitis C virus subgenomic replicons. *Biochem Biophys Res Commun.* 343 : 988-994, 2006.

Ishii N, Watashi K, Hishiki T, Goto K, Inoue D, Hijikata M, Wakita T, Kato N, Shimotohno K. Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication. *J Virol.* 80 : 4510-4520, 2006.

Naka K, Abe K, Takemoto K, Dansako H, Ikeda M, Shimotohno K, Kato N. Epigenetic silencing of interferon-inducible genes is implicated in interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells. *J Hepatol.* 44 :869-878, 2006

Shimakami T, Honda M, Kusakawa T, Murata T, Shimotohno K, Kaneko S, Murakami S. Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *J Virol.* 80 :3332-3340, 2006

Hamazaki H, Ujino S, Miyano-Kurosaki N, Shimotohno K, Takaku H. Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by short hairpin RNA synthesized by T7 RNA polymerase in hepatitis C virus subgenomic replicons.

Biochem

Hamazaki H, Takahashi H, Shimotohno K, Miyano-Kurosaki N, Takaku H. Inhibition of hcv replication in HCV replicon by shRNAs. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 25(7):801-805, 2006.

Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Kaneko H, Takada Y, Egawa H, Uemoto S, Shimotohno K. Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J Hepatol.* 46(1):26-36, 2007.

Medina RJ, Kataoka K, Takaishi M, Miyazaki M, Huh NH. Isolation of epithelial stem cells from dermis by a three-dimensional culture system. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98 (1), 174-184, 2006.

Medina RJ, Kataoka K, Miyazaki M, Huh NH. Efficient differentiation into skin cells of bone marrow cells recovered in a pellet after density gradient fractionation. *International Journal of Molecular Medicine*, 17(5), 721-727, 2006.

Takikawa Y, Endo R, Suzuki K, et al. Prediction of hepatic encephalopathy development in patients with severe acute hepatitis. *Dig Dis Sci* 2006;51:359-364.

Lin SD, Kawakami T, Ushio A, Sato A, Sato S, Iwai M, Endo R, Takikawa Y, Suzuki K. Ratio of circulating follistatin and activin A reflects the severity of acute liver injury and prognosis in patients with acute liver failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:374-380.

G. 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

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル (小伝馬町駅前) 4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社