

Figure 5. Merged mass spectral data. (a) The mass spectra of tryptamine analyzed on ESI-QqQ-MS² by different collision energies (CE), 10–50 V. (b) The five ESI-QqQ-MS² data of tryptamine were overlaid and merged into one 'merged mass spectrum'.

as the mislabeling of a test tube are caught by comparing the observed mass of the molecular ions with the calculated mass from the molfiles. For higher resolution MSⁿ data of known chemical compounds, chemical formulae may be uniquely assignable to most of the product ions in a higher *m/z* range within an error range of 50 ppm. Contributors are advised to add the chemical annotation of as many product ions as possible in an optional data field, PK\$ANNOTATION, of the MassBank record format. Such chemical annotations are useful for the removal of mass spectral data that contain ions from contaminants. Annotations are also helpful to MassBank contributors who evaluate the mass accuracy of the data.

At present, MassBank data are the mass spectra of specific chemical compounds commercially available as purified reagents of metabolites. In the near future, we will accept the mass spectral data of metabolites detected and identified by LC-MSⁿ analysis of biological cell and tissue samples. In such cases, contributors must provide satisfactory experimental evidence for the identification of the chemical compounds in the chemical section.^[11] We will also accept LC-, GC- and CE-coupled or direct MSⁿ data analysis of tissue pieces or single cells. Such data will include the mass spectra of identified and unidentified chemical compounds. Identified chemical compounds are indicated by their chemical names or structures and unidentified or unknown chemical compounds by their MSⁿ data. MSⁿ data are used as the tag of unidentified chemical compounds. By comparing the MSⁿ data analyzed on different biological samples, the intersample similarity or difference of the chemical compounds can be determined.

Sharing mass spectral data among research communities

Beginning in June 2008, the Mass Spectrometry Society of Japan supported MassBank as the official database of the society. In the near future, the society's journal will recommend the authors to register their mass spectral data in MassBank at the time they submit their manuscripts. MassBank will provide the authors with accession numbers for citation of the data in the manuscript. This will make it possible for readers to lookup data details on MassBank and to search for related articles with Spectral Search and other search tools available on MassBank. We plan to advocate the registration of mass spectral data in MassBank among contributors to other academic journals. In 2009 we started collaboration with LipidBank, the official database of the JCBL and organized joint special lectures on MassBank and LipidBank at annual meetings. The society and the conference will work jointly to seek continuous academic funding to support both MassBank and LipidBank.

MassBank provides a record field for copyright, the default holders of which are contributors, but none for data distribution. Because the distribution of mass spectral data is another method of data sharing, users and contributors propose to prepare a record field for data distribution in which contributors express under the terms of the Creative Commons Attribution Licenses.^[34] We will prepare the record field and an FTP site for the download of data. Additionally, we consider augmenting the record documentation of MassBank by conforming to the guidelines for the controlled vocabularies from Proteomics Standards Initiative (PSI).^[35]

Conclusions

MassBank is based on the three concepts. First, it is a public database of mass spectral data analyzed under nonstandardized experimental conditions. Second, it is a distributed database in which contributors prepare and provide their data from their own data servers on the Internet. Third, it develops and provides free tools for contributors to prepare and manage data on their sites. To improve the metabolite identification from mass spectra, we merged ESI-MS² data of identical chemical compounds analyzed under different experimental conditions. Merged data as a TS of spectral search were significantly improved precision without decreasing recall of the spectral search when compared with the unmerged original data set. This showed that merging spectral data is useful for generating reference data for metabolite identification.

Acknowledgements

We thank Ms Rie Matsuzawa and Ms Michi Kittaka for their input of data, Dr Toshiaki Katayama for his advice on the development of Web API on MassBank, Dr Zenzaburo Tozuka and Dr Yoshinao Wada for their support on introducing MassBank as the official database of the Mass Spectrometry Society of Japan and Dr Masaru Tomita for his financial support. This work was supported by a grant for the advancement and standardization of biological databases (2006-2010) from the Institute for Bioinformatics Research and Development of the Japan Science and Technology Agency (to T. N., M. A. and S. K.), a grant-in-aid for Scientific Research on the Priority Area from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (grant number 18016028 to T. N., M. A. and S. K.), research grants from Yamagata Prefecture and Tsuruoka City (to T. N. and M. A.) and a grant from the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO) of Japan as part of the 'Development of Fundamental Technologies for Controlling the Material Production Process of Plants' (to T. A., N. S., H. S. and D. S.).

References

- P. N. Schofield, T. Bubela, T. Weaver, L. Portilla, S. D. Brown, J. M. Hancock, D. Einhorn, G. Tocchini-Valentini, M. Hrabe de Angelis, N. Rosenthal. Post-publication sharing of data and tools. *Nature* **2009**, *461*, 171.
- J. Kopka, N. Schauer, S. Krueger, C. Birkemeyer, B. Usadel, E. Bergmuller, P. Dormann, W. Weckwerth, Y. Gibon, M. Stitt, L. Willmitzer, A. R. Fernie, D. Steinhauser. GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome database. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 1635.
- C. A. Smith, G. O'Maille, E. J. Want, C. Qin, S. A. Trauger, T. R. Brandon, D. E. Custodio, R. Abagyan, G. Siuzdak. METLIN: a metabolite mass spectral database. *Ther. Drug Monit.* **2005**, *27*, 747.
- A. Kameyama, N. Kikuchi, S. Nakaya, H. Ito, T. Sato, T. Shikanai, Y. Takahashi, K. Takahashi, H. Narimatsu. A strategy for identification of oligosaccharide structures using observational multistage mass spectral library. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4719.
- D. S. Wishart, C. Knox, A. C. Guo, R. Eisner, N. Young, B. Gautam, D. D. Hau, N. Psychogios, E. Dong, S. Bouatra, R. Mandal, I. Sinelnikov, J. Xia, L. Jia, J. A. Cruz, E. Lim, C. A. Sobsey, S. Shrivastava, P. Huang, P. Liu, L. Fang, J. Peng, R. Fradette, D. Cheng, D. Tzur, M. Clements, A. Lewis, A. De Souza, A. Zuniga, M. Dawe, Y. Xiong, D. Clive, R. Greiner, A. Nazyrova, R. Shaykhtudinov, L. Li, H. J. Vogel, I. Forsythe. HMDB: a knowledge base for the human metabolome. *Nucleic Acids Res* **2009**, *37*, D603.
- National Institute of Standards and Technology, NIST Standard Reference Database 1A, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program: (Data Version: NIST 08, Software Version 2.0f). <http://www.nist.gov/srd/nist1a.htm>. [Last accessed: March 2010].
- National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japan. Spectral Database for Organic Compounds, SDBS. http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct.frame_top.cgi. [Last accessed: March 2010].
- C. M. Dobson. Chemical space and biology. *Nature* **2004**, *432*, 824.
- J. Clardy, C. Walsh. Lessons from natural molecules. *Nature* **2004**, *432*, 829.
- S. A. Sansone, T. Fan, R. Goodacre, J. L. Griffin, N. W. Hardy, R. Kaddurah-Daouk, B. S. Kristal, J. Lindon, P. Mendes, N. Morrison, B. Nikolau, D. Robertson, L. W. Sumner, C. Taylor, M. van der Werf, B. van Ommen, O. Fiehn. The metabolomics standards initiative. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 846.
- L. Sumner, A. Amberg, D. Barrett, M. Beale, R. Beger, C. Daykin, T. Fan, O. Fiehn, R. Goodacre, J. Griffin, T. Hankemeier, N. Hardy, J. Harnly, R. Higashi, J. Kopka, A. Lane, J. Lindon, P. Marriott, A. Nicholls, M. Reily, J. Thaden, M. Viant. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics* **2007**, *3*, 211.
- F. Matsuda, K. Yonekura-Sakakibara, R. Niida, T. Kuromori, K. Shinozaki, K. Saito. MS/MS spectral tag-based annotation of non-targeted profile of plant secondary metabolites. *Plant J.* **2009**, *57*, 555.
- A. Sreekumar, M. Poisson, T. M. Rajendiran, A. P. Khan, Q. Cao, J. Yu, B. Laxman, R. Mehra, R. J. Lonigro, Y. Li, M. K. Nyati, A. Ahsan, S. Kalyana-Sundaram, B. Han, X. Cao, J. Byun, G. S. Omenn, D. Ghosh, S. Pennathur, D. C. Alexander, A. Berger, J. R. Shuster, J. T. Wei, S. Varambally, C. Beecher, A. M. Chinnaiyan. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* **2009**, *457*, 910.
- L. A. McDonnell, R. M. A. Heeren. Imaging mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26*, 606.
- T. Masujima. Live single-cell mass spectrometry. *Anal. Sci.* **2009**, *25*, 953.
- M. Kanehisa, S. Goto, M. Furumichi, M. Tanabe, M. Hirakawa. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Res* **2010**, *38*, D355.
- United States National Library of Medicine, National Institutes of Health, National Center for Biotechnology Information. PubChem Compounds Database. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. [Last accessed: March 2010].
- Y. Shinbo, Y. Nakamura, M. Altaf-Ul-Amin, H. Asahi, K. Kurokawa, M. Arita, K. Saito, D. Ohta, D. Shibata, S. Kanaya. KNApSACK: A comprehensive species-metabolite relationship database. In *Plant Metabolomics*, K. Saito, R. A. Dixon, L. Willmitzer (Eds). Springer-Verlag Berlin: NY, **2006**, 165.
- Japanese Conference on the Biochemistry of Lipids. Database of natural lipids. <http://www.lipidbank.jp/>. [Last accessed: March 2010].
- E. Fahy, S. Subramaniam, H. A. Brown, C. K. Glass, A. H. Merrill, R. C. Murphy, C. R. H. Raetz, D. W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M. S. VanNieuwenhize, S. H. White, J. L. Witztum, E. A. Dennis. A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 839.
- D. J. Weininger. SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1988**, *28*, 31.
- International Union of Pure and Applied Chemistry. The IUPAC International Chemical Identifier. <http://www.iupac.org/inchi/>. [Last accessed: March 2010].
- S. Tanaka, K. Aoshima, Y. Miura, Y. Oda. 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (American Society for Mass Spectrometry), Philadelphia, PA, 31 May to 04 June, **2009**.
- Biomarkers and Personalized Medicine Core Function Unit, Eisai Product Creation Systems, Eisai Co. Ltd. Mass++. <http://groups.google.com/group/massplusplus>. [Last accessed: March 2010].
- Institute for Advanced Biosciences, Keio University. MassBank. <http://www.massbank.jp>. [Last accessed: March 2010].
- Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Stress and Developmental Biology. MassBank. <http://msbi.ipb-halle.de/MassBank/>. [Last accessed: March 2010].
- S. E. Stein, D. R. Scott. Optimization and testing of mass spectral library search algorithms for compound identification. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, *5*, 859.
- H. Horai, M. Arita, T. Nishioka. Comparison of ESI-MS in MassBank Database. 1st International Conference on BioMedical Engineering and Informatics, Sanya, Hainan, China, 28–30

- May, 2008. (The abstract is downloadable from the site <http://www.massbank.jp/en/document.html>).
- [29] C. Hopley, T. Bristow, A. Lubben, A. Simpson, E. Bull, K. Klagkou, J. Herniman, J. Langley. Towards a universal product ion mass spectral library – reproducibility of product ion spectra across eleven different mass spectrometers. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 1779.
- [30] K. Volná, M. Holcapek, L. Kolářová, K. Lemr, J. Čáslavský, P. Kacer, J. Poustka, M. Hubálek. Comparison of negative ion electrospray mass spectra measured by seven tandem mass analyzers towards library formation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 101.
- [31] Geeknet, Inc. SourceForge.net. <http://sourceforge.net/projects/massbank/>. [Last accessed: March 2010].
- [32] Institute for Advanced Biosciences, Keio University. Mass++ Manual. <http://www.massbank.jp/en/manual.html>. [Last accessed: March 2010].
- [33] RIKEN, Plant Science Center. Platform for RIKEN Metabolomics MS/MS spectral tag (MS2T) viewer. <http://prime.psc.riken.jp/lcms/ms2tview/ms2tview.html>. [Last accessed: March 2010].
- [34] Creative Commons. Creative Commons Attribution Licenses. <http://creativecommons.org/>. [Last accessed March 2010].
- [35] R. G. Cote, P. Jones, L. Martens, R. Apweiler, H. Hermjakob. The ontology lookup service: more data and better tools for controlled vocabulary queries. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, W372.

1. CE-MS 法によるメタボローム解析と医薬への応用

曾我 朋義

キャピラリー電気泳動-質量分析装置 (CE-MS) を用いたメタボローム測定法は、細胞や組織中に含まれる数百種類以上のイオン性代謝物の一斉分析を可能にする。本法は、新規代謝経路の探索、代謝調節機構の解明などの代謝の理解、遺伝子やタンパク質の機能解明といった基礎研究のみならず、医薬分野においても癌や疾患の機序解明、創薬標的探索、薬物代謝解析、各種バイオマーカーの探索などに威力を発揮する。近年メタボロミクスがトランスポーターの機能解明に有用であることも示された。本稿では、CE-MSによるメタボローム測定法と医薬分野の応用例を紹介したい。

はじめに

生物が共通にもっている中心代謝経路に存在する代謝中間体のほとんどがイオン性である。筆者らは世界に先駆けて、キャピラリー電気泳動-質量分析装置 (capillary electrophoresis-mass spectrometry: CE-MS) を用いたメタボローム測定法を開発し、千種類以上のイオン性代謝物の一斉分析を可能にした。これまでに本法を微生物¹⁾²⁾、植物³⁾、動物⁴⁾⁷⁾ の様々な試料に応用し、興味深い成果を得てきた。本稿では、CE-MSによるメタボローム測定法とその周辺技術の概要を述べた後、本法を用いて癌組織のメタボローム解析を行った結果⁸⁾ とトランスポーター機能解明に成功した例⁹⁾ を紹介する。

1. CE-MS測定の実験的アプローチ

1.1 CE-MS

CE-MS法は、細胞や組織からの代謝抽出物を、細長い中空のキャピラリー (内径 50 μm , 長さ 100

cm) に導入後、数万ボルトの電圧を印加する。陽イオン性物質は陰極方向に、一方、陰イオン性物質は陽極方向に電荷と水和イオン半径の比に基づいた速度によってキャピラリー内を電気泳動する。そこで質量分析計をキャピラリーの出口に接続することによって、各代謝物を高感度かつ選択的に検出することができる (図1)。

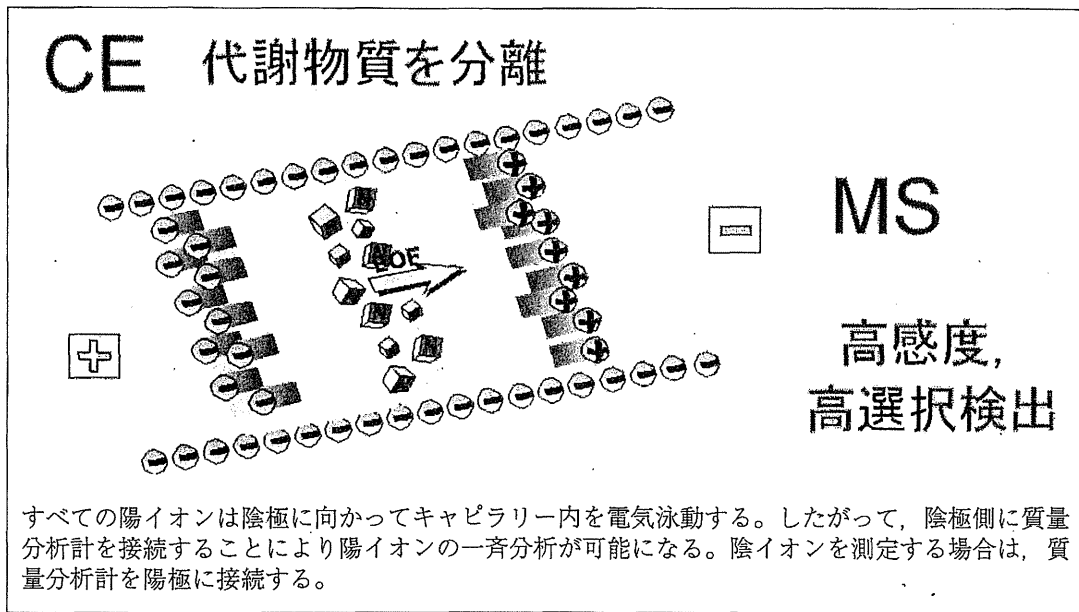
2. 試料の前処理

細胞内の代謝物量を正確に定量するためには代謝を瞬時に止めることが必要である。また CE-MS 測定では、前処理によって分析に悪影響を与えるタンパク質や脂質などの夾雑物を除去することが重要であり、筆者らは生体組織に関しては以下のような前処理法を用いている。採取された組織は瞬時に液体窒素で凍結後、メタノール溶液中に浸漬し、ジルコニアなどの金属ビーズなどを用いて細胞破砕機で処理する。次いで、メタノール、クロロホルム、水の液々分配を行い、水相を分画分子量 5000 の限外濾過フィルターによって除タンパク後、濾液を減圧乾固する。測定前に Milli-Q 水で

key words

CE-MS, ワールブルグ効果, 大腸癌, 解糖系, クエン酸回路, ATP, フマル酸呼吸, トランスポーター, OCTN1, ノックアウトマウス, エルゴチオネイン

図① CE-MS によるメタボローム測定法



再溶解し CE-MS に注入する。

3. データ解析

現在、筆者らのグループでは、精密質量の高分解能をもつ飛行時間型質量分析計 (TOFMS) を CE に組み合わせた Agilent 社の CE-TOFMS が主力装置であるが、CE-MS 法は試料間で各物質の泳動時間がずれることがある。筆者らはこの問題を解決するため、CE-TOFMS 解析に特化したソフトウェア (KEIO MasterHANDS) を開発し⁹⁾⁻¹⁰⁾、試料間の泳動時間の自動補正を可能にした。このソフトは慶應メタボロームコンソーシアム (<http://www.iab.keio.ac.jp/metabolome-consortium/>) に参加すればライセンスが可能である。

II. 癌のエネルギー代謝研究

癌細胞が、酸素濃度が十分な条件でも主に解糖系によってエネルギー産生を行う現象はワールブルグ効果¹¹⁾と呼ばれ、この現象は様々な癌種で確認されている。癌が増殖するにはエネルギー (ATP) が不可欠であり、ATP は主に解糖系か酸化的リン酸化反応 (クエン酸回路で生産された NADH を用いて電子伝達系で ATP を生成する反応) によって産生される。しかしながら、血流が少ないところで増殖する大腸や膵臓の癌細胞は、解糖系に必要なグルコース量も酸化的リン酸化反

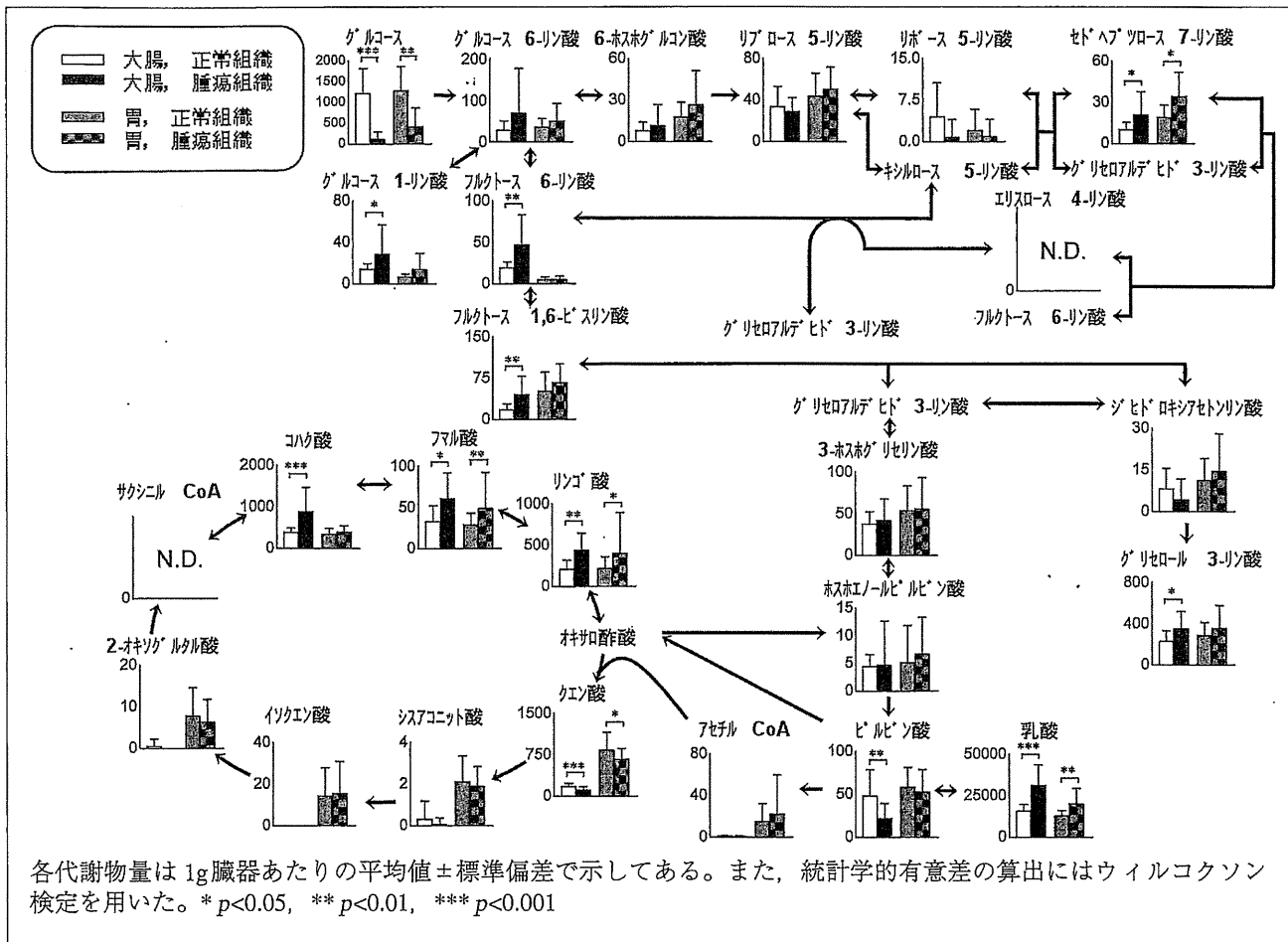
応で必要とされる酸素も不足しており、どのようにして ATP を生産しているか謎である。筆者らは国立がんセンター東病院の江角浩安院長らと共同で、大腸癌および胃癌患者から採取した癌組織および正常組織のメタボローム解析を行い、癌組織のエネルギー産生の機序に迫った。

1. 解糖系, ペントースリン酸回路およびクエン酸回路

CE-TOFMS を用いたメタボローム測定によって、16 名の大腸癌患者と 12 名の胃癌患者の腫瘍組織中から、それぞれ 877 種類、1142 種類の代謝物質由来のピークを得、解糖系、ペントースリン酸回路、クエン酸回路にある代謝物の測定結果をマッピングした (図②)。腫瘍組織中のグルコース量は、正常組織の量に比べて大腸癌で 1/10、胃癌で 1/3 程度であった。一方で、解糖系の最終産物である乳酸は両腫瘍組織中において有意に高かった。この結果は、Warburg が述べたように、ヒトの癌組織でも解糖系が有意に充進していることを示唆した。

今回のメタボローム測定によって、クエン酸回路の代謝で興味深い知見が得られた。大腸では正常組織、癌組織ともクエン酸回路前半の代謝物 (クエン酸からサクシニル CoA まで) がほとんど検出されておらず、ATP 量も極めて低かった。大腸の

図② 解糖系, ペントースリン酸回路, クエン酸回路に関する代謝物の変動 (文献5より改変)



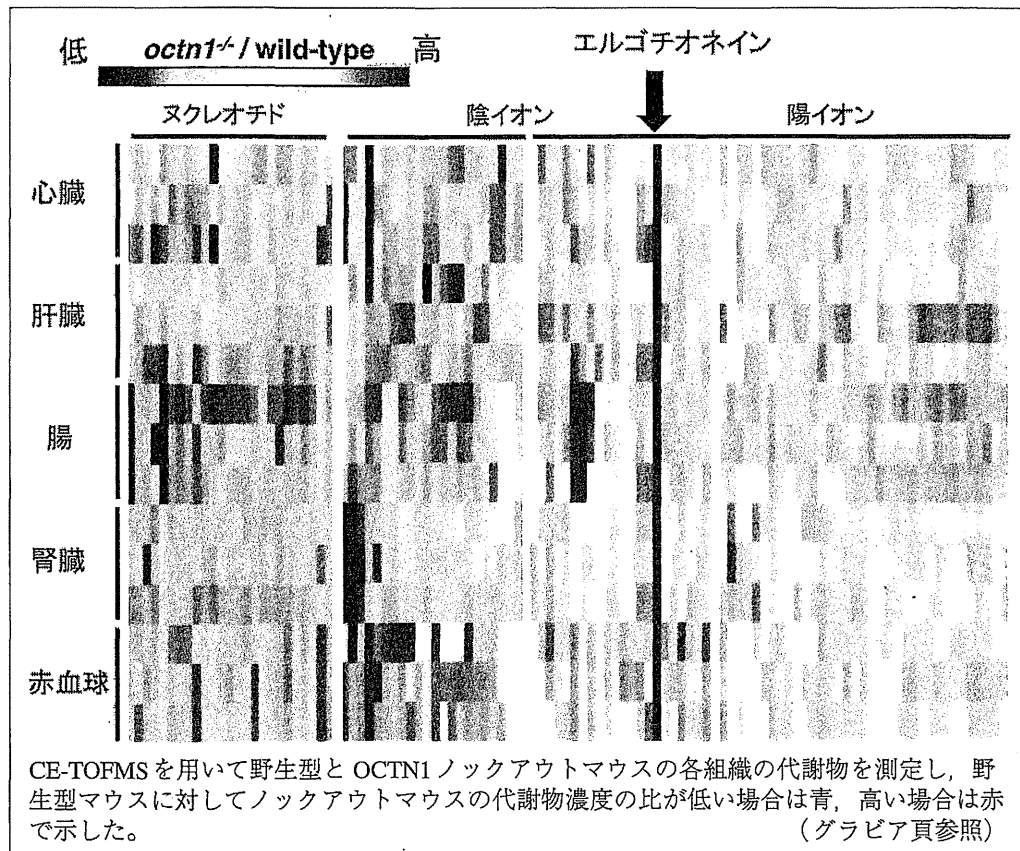
酸素分圧は胃の1/5であることから、大腸では酸化的リン酸化反応は行われていない可能性が高い。一方、特に大腸の癌組織でクエン酸回路の後半部分の代謝物(コハク酸, フマル酸, リンゴ酸)の増加がみられた。微生物, 回虫などの寄生虫は、嫌気的条件下でフマル酸呼吸¹¹⁾によってATPを産生し、コハク酸が蓄積することが知られている¹²⁾¹³⁾。大腸の癌細胞でもコハク酸が有意に蓄積しており、フマル酸呼吸を示唆する結果であった。江角らは、フマル酸呼吸阻害薬が膵臓癌などの嫌気的な条件でも増殖が活発な癌細胞を死滅させることも見出しており¹⁴⁾、筆者らは、大腸癌, 膵臓癌など血流が乏しいところでも活発に増殖する癌細胞は、フマル酸呼吸かそれに近い代謝を用いてATPを生産しているのではないかと考えている。

Ⅲ. トランスポーターの機能解明

分子クローニングによって哺乳類の多くの重要

なトランスポーターの分子実体が明らかにされてきたが、いまだに多くの機能未同定のトランスポーター遺伝子が存在する¹⁵⁾。筆者らは金沢大学大学院自然科学研究科の辻彰教授のグループと共同で、両性イオントランスポーターであるOCTN1¹⁶⁾²⁾の機能解明を行った。野生型マウスの組織には存在するが、OCTN1ノックアウトマウスの組織に存在しない代謝物は、OCTN1の基質である可能性が高い。またノックアウトマウスの組織のみに代謝物が存在しない場合は、その組織にOCTN1が発現しているはずである。そこで野生型マウスとOCTN1ノックアウトマウスの心臓, 肝臓, 腸, 腎臓, 赤血球中の代謝物をCE-TOFMSによって測定したところ、ノックアウトマウスではすべての組織でエルゴチオネインという抗酸化物質が検出されなかった(図③)。一方、野生型マウスではすべての組織からエルゴチオネインが検出された。さらに全部で15の組織・血液について解析したところ、

図3 野生型マウスと OCTN1 ノックアウトマウスの各組織の代謝物濃度の比較 (文献 16 より改変)



OCTN1 ノックアウトマウスでは、これらのすべての組織でエルゴチオネインは検出されなかった。この結果から、OCTN1 は生体のほとんどの組織に発現しており、エルゴチオネインが基質であると推定された¹⁶⁾。

トランスポーターノックアウトマウスとメタボローム解析技術の組み合わせは、オーファントランスポーターの機能を探索する新手法として、今後のトランスポーター研究に大きく貢献するはずである。なお本研究の詳細に関しては、本誌の金沢大学大学院の加藤将夫教授らの稿 (77~82 頁) を参照されたい。

おわりに

本稿では、CE-MS を用いたメタボローム測定法の概要と、本法を癌組織の代謝研究およびトランスポーターの機能解明に応用した例を紹介した。メタボローム解析は生まれたばかりの新しい新手法であるが、各種疾病の機序の解明、早期診断マーカーや副作用マーカーの発見、創薬標的の探索など幅広い医薬分野にすでに大きな波及効果を与えつつある。メタボロミクスがこの分野のさらなる発展に貢献することを期待したい。

用語解説

1. **フマル酸呼吸**：嫌気呼吸の一種。呼吸鎖複合体 II において電子受容体としてフマル酸を用い、共役する呼吸鎖複合体 I のプロトンポンプ機構を駆動して ATP 産生を行う。この時に生成される副産物がコハク酸である。フマル酸呼吸は微生物や回虫などの寄生虫で見つかっている。
2. **OCTN1 (organic cation transporter 1)**：両性イオンを輸送する有機カチオントランスポーターファミリーの 1 つ。クローン病 (口腔から肛門までの全消化管全域に非連続の炎症および潰瘍を起こす非特異性炎症疾患) の発症リスクに OCTN1 の遺伝子多型が関与していることが報告されているが、まだ不明である。

参考文献

- 1) Soga T, Ohashi Y, et al : J Proteome Res 2, 488-494, 2003.
- 2) Ishii N, Nakahigashi K, et al : Science 316, 593-597, 2007.
- 3) Sato S, Soga T, et al : Plant J 40, 151-163, 2004.
- 4) Soga T, Baran R, et al : J Biol Chem 281, 16768-16776, 2006.
- 5) Hirayama A, Kami K, et al : Cancer Res 69, 4918-4925, 2009.
- 6) Minami Y, Kasukawa T, et al : Proc Natl Acad Sci USA 106, 9890-9895, 2009.
- 7) Kato Y, Kubo Y, et al : Pharm Res 58, 62-68, 2010.
- 8) Baran R, Kochi H, et al : BMC Bioinformatics 7, 530, 2006.
- 9) Baran R, Robert M, et al : BMC Bioinformatics 8, 72, 2007.
- 10) Sugimoto M, Hirayama A, et al : Metabolomics 6, 78-95, 2010.
- 11) Warburg O : Science 123, 309-314, 1956.
- 12) Kita K, Hirawake H, et al : Biochim Biophys Acta 1553, 123-139, 2002.
- 13) Ullmann R, Gross R, et al : J Bacteriol 182, 5757-5764, 2000.
- 14) Esumi H, Lu J, et al : Cancer Sci 95, 685-690, 2004.
- 15) 金井好克, 平田 拓 : 実験医学 26, 18-23, 2008.
- 16) Kato Y, Kubo Y, et al : Pharm Res, 27, 832-840, 2010.

参考ホームページ

- ・メタボローム研究グループ
<http://metabolome.iab.keio.ac.jp/>

曾我朋義

- 1984年 慶應義塾大学工学部応用化学科卒業
横河電機株式会社
- 1992年 横河アナリティカルシステムズ株式会社
- 2000年 工学博士 (豊橋技術科学大学)
- 2001年 慶應義塾大学環境情報学部および先端生命科学研究所助教授
- 2003年 ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社取締役
- 2005年 理化学研究所植物科学研究センター客員主管研究員
- 2006年 慶應義塾大学環境情報学部および先端生命科学研究所教授
- 2008年 慶應義塾大学医学部教授 (兼担)

CE-MS メタボロミクスの最新動向

キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) を用いたメタボローム測定法は、細胞や組織中に存在する数千種類のイオン性代謝物の一斉分析を可能にした。本法は、生命科学の基礎研究のみならず、医薬、食糧、環境、エネルギーなど人類が直面している問題に有効な解決策をもたらすのではないかと期待されている。本稿では、最新の CE-MS によるメタボローム測定法とその応用例について概説したい。

曾 我 朋 義

1 はじめに

メタボロミクスは、細胞内の代謝産物を網羅的に探索することにより、細胞の動的な振る舞いを理解しようとする方法論である。メタボロミクスは、新規代謝経路や代謝調節機構の解明に威力を発揮するばかりでなく、これまで未知であった遺伝子やタンパク質の機能解明や生体内の分子間ネットワークの理解にも有用な情報を提供する。さらに近年は、医薬分野における各種のがんや疾病の機序の解明、病態の診断、各種バイオマーカーの探索、高温、乾燥、病害などのストレスに強い農作物の開発、食品中の機能性成分の探索、微生物や植物を利用したバイオ燃料の開発など幅広い産業分野にもメタボローム解析が用いられている。

ほとんどの生物が有する解糖系、クエン酸回路、ペントースリン酸回路に代表されるエネルギー代謝やアミノ酸、核酸生合成経路などの中間代謝物の多くは、リン酸基、カルボキシル基、アミノ基等を持つ分子量 1000 以下のイオン性物質であり、UV 吸収がない、不揮発性などの特徴を有す。さらに、物理的・化学的性質が類似する異性体から、性質が全く異なる化合物が混在する。生体内にはこのような性質の代謝物が数百種類から数万種類存在するため、すべての代謝物を一斉分析することは極めて困難である。

これまでに、GC/MS¹⁾、LC-MS²⁾³⁾、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析 (FT-ICR/MS)⁴⁾、NMR⁵⁾などを用いるメタボローム測定法が開発された。しかし、いまだに決定的なメタボローム測定法は確立されていない。

GC/MS 法は高感度、高分離が可能であるが、細胞内の代謝物の多くがイオン性であり、代謝物を気化するための誘導体化反応が必要である。しかし誘導体化できない代謝物や誘導体化されても GC/MS では測定できな

い代謝物も多い。

LC-MS 法は脂質など疎水性の代謝物の測定に適した方法である。しかし、イオン性代謝物の多くは、LC-MS で一般に用いられる逆相系のカラムでは保持されず、測定することが困難である。最近 HILIC カラムなどの親水性相互作用クロマトグラフィーを用いて、代謝物を測定する方法も開発されているが、LC-MS や FT-ICR/MS は、イオンサプレッションを受けやすいため、定量性の問題を考慮する必要がある。

NMR 法は、簡便な測定法であるが、質量分析計を用いた他の測定法に比べて感度が乏しく、検出される代謝物に限りがある。

筆者らは代謝物のほとんどがイオン性であることに着目し、イオン性物質に対して高分離能を示すキャピラリー電気泳動 (CE) と高い選択性と感度を提供する質量分析装置 (MS) を組み合わせた CE-MS 法を用いたメタボローム測定法を世界に先駆けて開発し、数千種類の代謝物の一斉分析を可能にした⁶⁾。

これまでに本法を、微生物^{6)~8)}、植物⁹⁾、動物^{10)~12)}など細胞、組織のメタボローム測定に応用し、新規知見を報告してきた。

本稿では、キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) 法⁶⁾¹⁰⁾によるメタボローム測定法の特徴と本法の生命科学への応用例を紹介し、最後にメタボロミクスの課題と方向性について展望する。

2 CE-MS によるメタボローム測定法

2.1 CE-MS 法

前述のように中心代謝経路に存在する代謝中間体は、ほとんどがイオン性物質である。CE-MS に注入された試料中の代謝物は、電気泳動によりキャピラリー内で分離後、質量分析計 (MS) で検出される。図 1 に示すようにすべての陽イオン性物質は陰極方向に、また陰イオンは陽極方向に移動する。各物質の移動速度はその物質の (電荷/水和イオン半径) の比に基づくため、この比

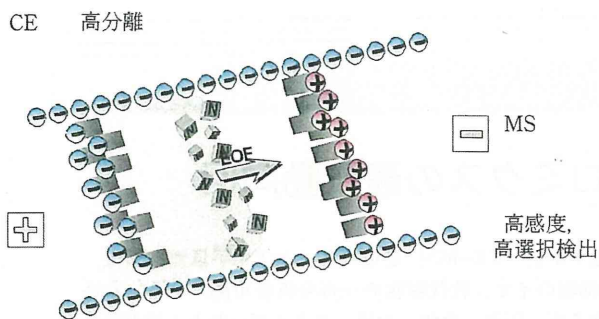


図1 CE-MSによるメタボローム測定法

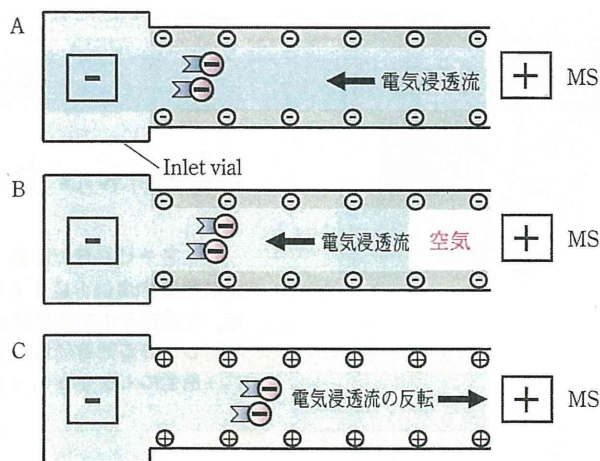
率が異なる物質はキャピラリー内で分離され、キャピラリーの出口に接続した質量分析計で、各成分の固有の質量に基づき選択的に検出される。CE-MS法の利点は、二種類の測定条件で、ほとんどのイオン性物質を直接定量分析できることと¹⁰⁾、イオンサプレッションの影響を受けず定量性が高いことである¹³⁾。

2.2 陽イオン代謝物の測定法

陽イオンは、陰極方向に電気泳動するため、陽イオン性代謝物質を測定する場合は、キャピラリーの出口が陰極となるように電圧を印加する(図1)。泳動緩衝液には、1 Mのギ酸(pH 2以下)を使用した¹⁴⁾。この条件ではpHが低いため、カルボキシル基、リン酸基などの解離は抑制され、一方アミノ基は完全解離する。したがって、アミノ基を持つ多くの代謝物が陽イオンとなり、陰極方向に電気泳動する。陰極に接続した質量分析計での検出は、各化合物の質量数にプロトンが付加したプロトン化分子 $[M+H]^+$ で行った¹⁴⁾。本法を用いることにより、各陽イオンを一斉にかつ選択的に測定することが可能になった⁹⁾。現在までに一つの分析条件で、717種類の陽イオン性代謝標準物質の測定が確認されている。

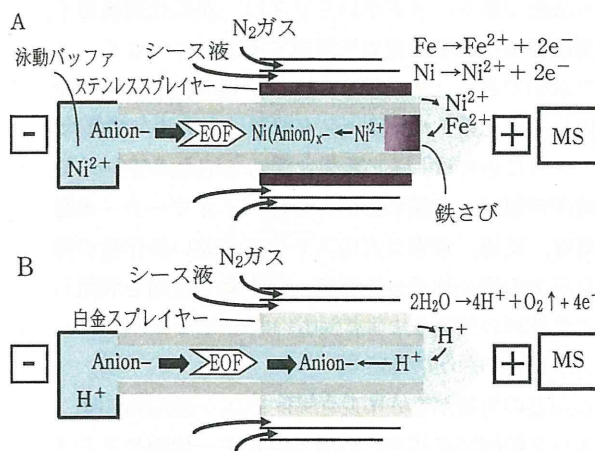
2.3 陰イオン代謝物の測定法

解糖系、TCA回路、ペントースリン酸回路などエネルギー代謝経路に存在する代謝中間体はすべて陰イオン性化合物である。しかし、通常のフューズドシリカキャピラリーを使用したCE-MS陰イオン測定システム(図2A)では、試料を注入後、数分で電流が流れなくなる問題が発生する¹⁵⁾。理由は、このシステムでは電圧を印加した際に、電気浸透流¹⁶⁾と呼ばれる液流が陽極(MS側)から陰極(キャピラリーの入口側)に発生し、この液流によってキャピラリーの出口側に空気が入り、電流が落ちるからである¹⁵⁾(図2B)。この問題を解決するため、塩基性物質をキャピラリー表面にコーティングしたCOSMO¹⁷⁾やSMILE(+)¹⁸⁾などのキャピラリー(いずれもNacalai Tesque)を用いて、電気浸透流を陰極から陽極に反転する方法を考案した¹⁵⁾



A: 内表面が陰イオン性のフューズドシリカキャピラリーでは電気浸透流が陰極(入口)方向に発生。B: キャピラリーの出口に空気が入り、数分で電流が流れなくなる。C: 内表面が陽イオン性ポリマーのキャピラリーを用いることで電気浸透流が反転し、陰イオンが測定可能に。

図2 CE-MSによる陰イオンの測定法



A: ステンレス製スプレーヤーは電気分解によって金属イオンが溶出し、キャピラリー内を陰極方向に電気泳動する。 Fe^{2+} はキャピラリー出口で鉄さびとして析出、 Ni^{2+} は陰イオンと錯体を形成し、陰イオンの感度の低下を招く。B: 白金製スプレーヤーは水が電気分解するため、上記の現象は起きず、高感度で安定した陰イオンの測定が可能になった。

図3 陰イオン測定におけるCE-MS用スプレーヤーの材質の影響

(図2C)。

しかし、この陰イオン測定法では、図3Aに示すように、ステンレス製などの材質のスプレーヤーを陽極に用いると電気分解によってスプレーヤーから金属イオンが溶出し、短時間でスプレーヤーが腐食した。また溶出した鉄やニッケルなどの金属イオンがキャピラリー内を電気泳動によって陰極方向に逆流することも判明した¹⁷⁾。また、鉄イオンはキャピラリーの出口側に鉄さびとなって析出し、数回から十数回の分析でキャピラリーが詰まった。さらに、逆流する鉄やニッケルイオンは、電気泳動中の有機酸やリン酸化合物などと金属錯体

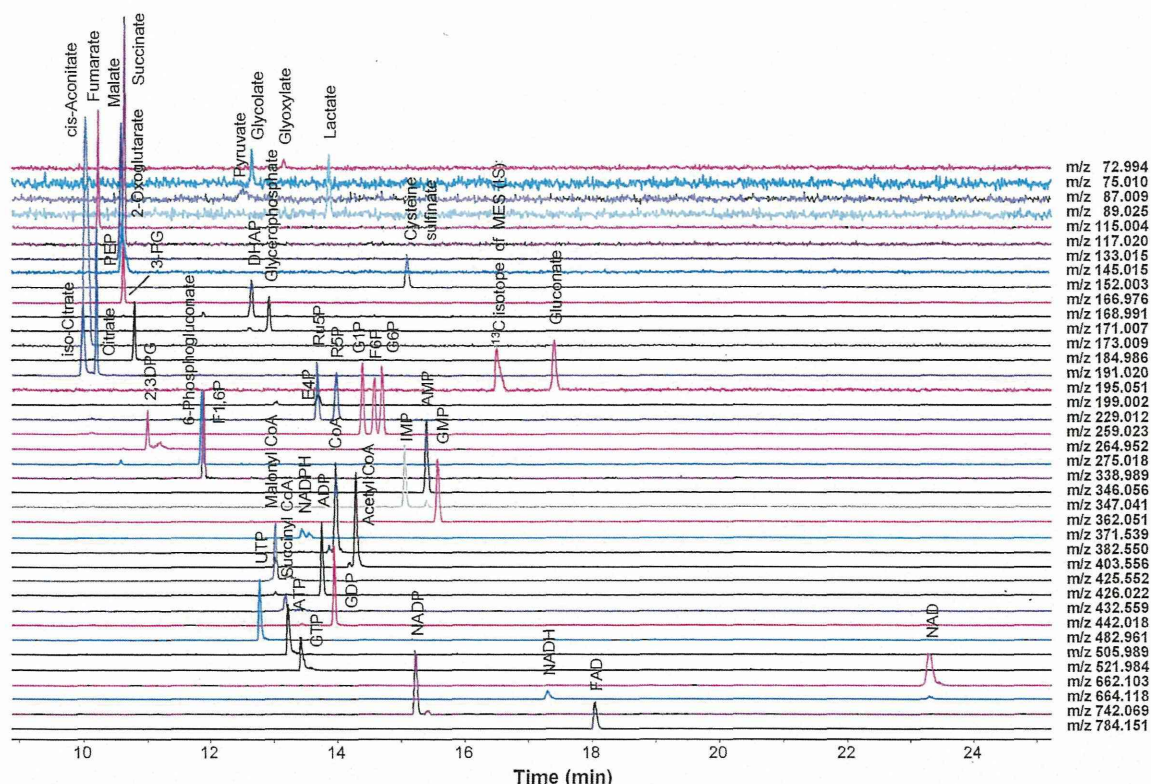


図4 CE-TOFMSによる陰イオン性代謝物の測定例

を形成し、これらの陰イオン性化合物の感度が著しく低下した¹⁷⁾ (図3A)。

電気分解による金属イオンの溶出を抑制するため、筆者らは、水よりイオン化傾向の小さい白金製のスプレイヤーを製造し、使用することによって(この場合は水の電気分解が発生)、この問題を解決し(図3B)、数倍から数十倍の高感度化と安定した陰イオン性化合物の測定を可能にした¹⁷⁾ (図4)。本法では、519種類の陰イオン性代謝標準物質の一斉分析が確認されている。

なお、電気分解で溶出した金属イオンがキャピラリー内を入り口方向に電気泳動する現象に関しては、高周波誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)、金属イオンと陰イオン性代謝物との錯体形成に関しては、CE-TOFMSで確認済である¹⁷⁾。

2.4 試料の前処理

細胞内の代謝物を正確に定量するためには代謝を瞬時に止めることが不可欠である。また前処理によってCE-MS測定に悪影響を与えるタンパク質や脂質などの夾雑物を除去することが重要であり、筆者らは生体組織に関しては、以下のような前処理を行っている。採取された組織は瞬時に液体窒素で凍結後、メタノール溶液中に浸漬し、ジルコニアなどの金属酸化物ビーズを用いた細胞破碎機で処理する。この操作によって酵素は失活し、代謝の亢進が止まる。次いで、メタノール、クロロホルム、水の液々分配を行い、水相を分画分子量5000

の限外濾過フィルターによって除タンパク後、濾液を減圧乾固する。測定前にMilli-Q水で再溶解し、CE-MSに注入する。

2.5 データ解析

筆者らのグループでは、精密質量の高分解能を持つ飛行時間型質量分析計(TOFMS)をCEに組み合わせたCE-TOFMS¹⁰⁾がメタボローム測定の主力装置である。しかしCE-MS法は、試料間で各物質の泳動時間がずれることがある¹⁰⁾。この問題を解決するため、CE-TOFMS解析に特化したソフトウェアKEIO MasterHANDSを独自に開発し^{10)19)~21)}、試料間の泳動時間の自動補正を可能にした。KEIO MasterHANDSは得られたピークを積分後、ピークの同定、定量を自動で行うことも可能であり、メタボロームデータの解析時間を飛躍的に短縮した。このソフトは慶應メタボロームコンソーシアム(<http://www.iab.keio.ac.jp/metabolome-consortium/>)に加入すればライセンスを受けることができる。

3 生命科学への応用

筆者が所属する慶應義塾大学先端生命科学研究所では、医療、環境・エネルギー、食糧問題に最新のメタボローム解析を応用し、これらの問題の解決に取り組んでいる。本稿では、CE-MSメタボロミクスを医薬分野の研究に応用した例について紹介する。

3.1 がんのエネルギー代謝研究

ほとんどの生物の生体内で最も多く生産されている物質は、エネルギー物質（ATP）であり、ヒトの場合は一日のうちに体重相当量のATP（40~60 kg）が生産される。ATPの生産は生物が活動を行うためには必須であり、生物は生活環境に応じたATPの生産戦略を備えている。

がん細胞が、酸素濃度が十分な条件でも、主に解糖系によってエネルギー産生を行う現象はワーバーク効果²²⁾と呼ばれ、この現象は様々ながん種で確認されている。がんが増殖するにはATPが不可欠であり、ATPは主に解糖系が酸化的リン酸化反応（クエン酸回路で生産されたNADHを用いて電子伝達系でATPを生成する反応）によって産生される。しかし、血流が少ないところで増殖する大腸や膵臓がん細胞は、解糖系に必要なグルコースも、酸化的リン酸化反応で必要とされる酸素も不足しており、どのようにしてATPを生産しているか謎である。筆者らは、国立がんセンター東病院の江角浩安院長らと共同で、大腸がんおよび胃がん患者から採取したがん組織および正常組織のメタボローム解析を行い、がん組織のエネルギー産生の機序に迫った。

16名の大腸がん患者と12名の胃がん患者から採取した腫瘍組織と正常組織から代謝物を抽出し、CE-TOFMSを用いてメタボローム測定を行った。大腸組織からは877種類、胃の組織からは1142種類の代謝物質由来のピークを得、解糖系、ペントースリン酸回路、クエン酸回路にある代謝物の測定結果を代謝経路上に示した¹¹⁾（図5）。腫瘍組織中のグルコース量は、正常組

織の量に比べて大腸がんで1/10、胃がんで1/3程度であった。一方で、解糖系の最終産物である乳酸は両腫瘍組織中において有意に高かった。この結果は、ワーバークが述べたように、ヒトの腫瘍組織でも解糖系が有意に亢進していることを示唆した。

またメタボローム解析により、新たにクエン酸回路の代謝で興味深い知見が見いだされた。大腸では正常組織、腫瘍組織ともクエン酸回路前半の代謝物（クエン酸からサクシニル CoA まで）がほとんど検出されておらず、ATP量も極めて低かった¹¹⁾（図5）。大腸の酸素分圧は胃の1/5であることを勘案すると、大腸では酸化的リン酸化反応はあまり行われていない可能性が高い。一方、特に大腸のがん組織で、クエン酸回路の後半部分の代謝物（コハク酸、フマル酸、リンゴ酸）の増加が見られた¹¹⁾。

微生物、回虫などの寄生虫は、嫌気的条件下でフマル酸呼吸によってATPを産生し、その結果としてコハク酸が蓄積することが知られている²³⁾。大腸のがん細胞でもコハク酸が有意に蓄積しており、フマル酸呼吸を示唆する結果であった。江角らは、フマル酸呼吸の阻害薬が膵臓がんなどの嫌気的な条件でも増殖が活発ながん細胞を死滅することも見いだしており²⁴⁾、筆者らは、大腸がん、膵臓がんなど血流が乏しいところでも活発に増殖するがん細胞は、フマル酸呼吸かそれに近い代謝を用いてATPを生産しているのではないかと仮説をたてている。もしこの経路が、大腸がん、膵臓がんの主要なATPの生産経路であれば、この経路は抗がん剤の新規ターゲットになるはずである。

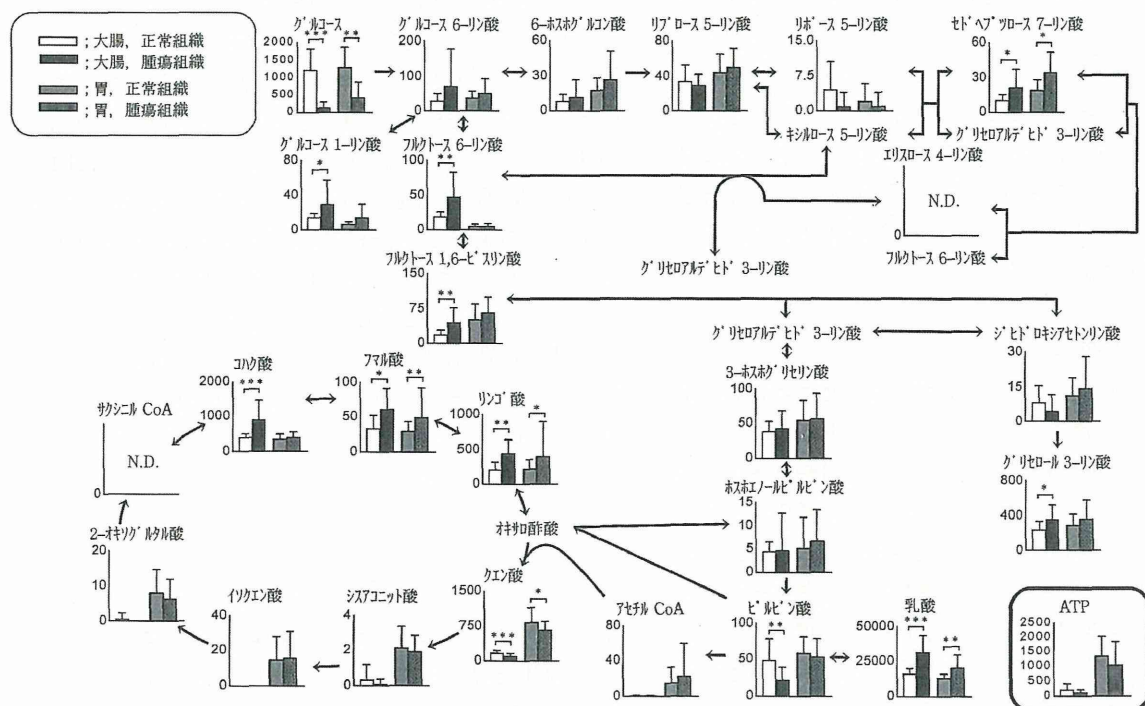


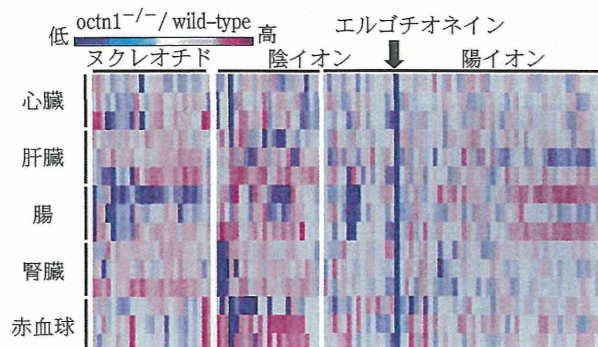
図5 大腸と胃の正常および腫瘍組織のエネルギー代謝経路の代謝物量（単位 nmol/g）

3.2 トランスポーターの機能解明

トランスポーターは、低分子化合物の細胞膜の通過を可能にする膜タンパク質である。創薬研究においては、トランスポーターの輸送メカニズムを制御することにより、薬効部位・副作用発現部位への薬物デリバリーの増大・軽減を可能にして理想的な動態特性をもつ薬の開発が行われている。この研究開発には、細胞内に存在する各種のトランスポーターの機能解析は不可欠である。これまで、分子クローニングによって哺乳類の重要なトランスポーターの分子実体が明らかにされてきたが、いまだに多くの機能未同定のトランスポーター遺伝子が存在する。

最近筆者らは、金沢大学大学院自然科学研究科の辻彰教授のグループと共同で、メタボローム解析を用いて、両性イオントランスポーターである OCTN1 の基質（被輸送物）や発現組織を探索したので紹介したい²⁵⁾。

野生型マウスの組織には存在するが、OCTN1 ノックアウトマウスの組織に存在しない代謝物は、OCTN1 の基質である可能性が高い。またノックアウトマウスの組織のみに代謝物が存在しない場合は、その組織に OCTN1 が発現しているはずである。そこで野生型マウスと OCTN1 ノックアウトマウスの心臓、肝臓、腸、腎臓、赤血球中の代謝物を CE-TOFMS によって網羅的に測定したところ、図 6 に示したように、ノックアウトマウスではすべての組織でエルゴチオネインという抗酸化物質が検出されないことが判明した²⁵⁾。一方、野生型マウスではすべての組織からエルゴチオネインが検出された。さらに全部で 15 の組織、血液についてエルゴチオネイン量を測定したところ、OCTN1 ノックアウトマウスでは、すべての組織でエルゴチオネインは検出されなかった。これらの結果から、OCTN1 は生体のほ



野生型マウスと OCTN1 ノックアウトマウスの各組織 ($n=3$) をメタボローム測定し、野生型に対する OCTN1 ノックアウトマウスの代謝物の濃度比を色で示した。各代謝物は、ヌクレオチド、陰イオン性、陽イオン性の順に左から並べた。OCTN1 ノックアウトマウスの濃度比が高い代謝物は赤、低い代謝物は青で示した。エルゴチオネインは OCTN1 ノックアウトマウスすべての組織で検出されなかった。

図 6 野生型マウスと OCTN1 ノックアウトマウスの各組織中の代謝物質量の比較

とんどの組織に発現しており、エルゴチオネインを基質としていることが判明した²⁵⁾。

トランスポーターノックアウトマウスとメタボローム解析技術の組み合わせは、機能未知トランスポーターの役割を迅速かつ簡便に解明する新手法として、今後のトランスポーター研究の進展に貢献すると思われる。

4 メタボロミクスの課題と展望

前述のようにメタボロミクスは、破壊力のある生命科学の新規手法であるが、いまだに細胞内のすべての代謝物の一斉分析を可能にする方法論は開発されていない。また現在は、 10^5 から 10^6 個の細胞を測定に用いており、1細胞測定には、さらに 10^5 倍以上の高感度化など、メタボローム解析を完全に行うためには、さらなる技術革新が必要不可欠であり、今後の分析化学の進展に期待したい。

また、メタボローム解析では、得られた代謝物のうち同定できる成分が 20~30% 程度しかないことも大きな問題である。代謝物が特定できない大きな理由は、代謝物の標準化合物が大幅に欠如していることである。例えば KEGG の LIGAND データベース²⁶⁾には、1万種類以上の代謝物が登録されているが、標準試薬が入手できる代謝物は、2500 種類弱しかない。したがって、メタボローム解析で極めて有望な化合物（例えば、ある疾患特異的なバイオマーカー候補）を発見しても、同定できないことが頻繁に起こる。逆に標準試薬が揃っていれば、一つの機関で各疾患のバイオマーカーの特許を独占することも可能である。

筆者らのグループは、市販されていない代謝物の標準試薬を地道に化学合成している。しかし、8000 種類以上の化合物を化学合成しなければならず、気の遠くなるような時間と労力が必要である。そこで、国家プロジェクトを立ち上げて標準化合物を早急に整備することを強く求めたい。代謝標準物質が揃えば、研究成果から医薬などの産業が飛躍的に発展するばかりでなく、メタボロミクスで日本が世界を凌駕することが可能である。

一方、ヒトの各組織に存在する代謝物は 3000 種類程度と言われており、他のオミクスと比較して、メタボロミクスは、解析対象となる物質数が圧倒的に少ない。また、多くの生物種について主要な代謝経路はすでに明らかになっており、得られたデータの解釈がしやすいなどメタボロミクスには他のオミクスにない利点がある。

さらに、メタボロームは、ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム情報の最終産物（表現型）であり、ほとんどのオミクスの動的な振る舞いは、関与する代謝経路や代謝物の変動として現れるはずである。したがって、メタボロミクスは、細胞や生体の活動や異常を理解するための重要かつ簡便な方法論として、生命科学の基礎研究のみならず医薬、化学、農学、食

品、環境、エネルギーなど様々な産業分野でも今後ますます広がるであろう。

5 おわりに

CE-MS を用いたメタボローム測定法の概要とその応用例を紹介した。CE-TOFMS 法は細胞内の代謝物に限らず、イオン性物質であれば、二種類の分析条件で数千種類の物質を一度に測定できる分離分析手法である。理論段数は数万段から数十万段であり、極めて高い分離性能を持つ。また CE で対象成分が分離できなくても、質量がミリマス（小数点以下3桁^{けた}の質量）の違いがあれば MS で区別することが可能である。検出下限は、10~100 nM であり、LC-MS で問題となるイオンサプレッションもほとんど起きない極めて汎用的かつ定量的な分析手法である。

筆者らは、この方法論をこれまで様々な生物種の組織、細胞に応用し、興味深い知見を得ることができた。一方、CE-MS では試料間で時間のずれが生じるなどの問題、試料から得られた膨大な数のピークを正確に積分し、定性、定量を行う問題など、オミクスならではの困難に直面した。これらの問題を解決するためには、測定技術の進展や IT 技術の開発が不可欠であった。CE-MS メタボローム解析技術を開発し、それを実試料に応用する上で、科学技術が発展するためには、高い目標設定と直面した問題を乗り越えるための強い意志と絶えまぬ努力が必要なることを改めて感じた次第である。

文 献

- 1) O. Fiehn, J. Kopka, R. N. Trethewey, L. Willmitzer : *Anal. Chem.*, **72**, 3573 (2000).
- 2) R. Plumb, J. Granger, C. Stumpf, I. D. Wilson, J. A. Evans, E. M. Lenz : *Analyst*, **128**, 819 (2003).
- 3) H. Yoshida, T. Mizukoshi, K. Hirayama, H. Miyano : *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 551 (2007).
- 4) A. Aharoni, C. H. Ric de Vos, H. A. Verhoeven, C. A. Maliepaard, G. Kruppa, R. Bino, D. B. Goodenowe : *Omic*, **6**, 217 (2002).
- 5) N. V. Reo : *Drug Chem Toxicol*, **25**, 375 (2002).
- 6) T. Soga, Y. Ohashi, Y. Ueno, H. Naraoka, M. Tomita, T. Nishioka : *J. Proteome Res.*, **2**, 488 (2003).
- 7) N. Ishii, K. Nakahigashi, T. Baba, M. Robert, T. Soga, A. Kanai, T. Hirasawa, M. Naba, K. Hirai, A. Hoque, P. Y. Ho, Y. Kakazu, K. Sugawara, S. Igarashi, S. Harada, T. Masuda, N. Sugiyama, T. Togashi, M. Hasegawa, Y. Takai, K. Yugi, K. Arakawa, N. Iwata, Y. Toya, Y. Nakayama, T. Nishioka, K. Shimizu, H. Mori, M. Tomita : *Science*, **316**, 593 (2007).
- 8) Y. Ohashi, A. Hirayama, T. Ishikawa, S. Nakamura, K. Shimizu, Y. Ueno, M. Tomita, T. Soga : *Mol. Biosyst.*, **4**, 135 (2008).
- 9) S. Sato, T. Soga, T. Nishioka, M. Tomita : *Plant J.*, **40**, 151 (2004).
- 10) T. Soga, R. Baran, M. Suematsu, Y. Ueno, S. Ikeda, T. Sakurakawa, Y. Kakazu, T. Ishikawa, M. Robert, T. Nishioka, M. Tomita : *J. Biol. Chem.*, **281**, 16768 (2006).
- 11) A. Hirayama, K. Kami, M. Sugimoto, M. Sugawara, N. Toki, H. Onozuka, T. Kinoshita, N. Saito, A. Ochiai, M. Tomita, H. Esumi, T. Soga : *Cancer Res.*, **69**, 4918 (2009).
- 12) Y. Minami, T. Kasukawa, Y. Kakazu, M. Iigo, M. Sugimoto, S. Ikeda, A. Yasui, G. T. van der Horst, T. Soga, H. R. Ueda : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 9890 (2009).
- 13) T. Soga, T. Ishikawa, S. Igarashi, K. Sugawara, Y. Kakazu, M. Tomita : *J. Chromatogr. A*, **1159**, 125 (2007).
- 14) T. Soga, D. N. Heiger : *Anal. Chem.*, **72**, 1236 (2000).
- 15) T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, Y. Ohashi, M. Tomita, T. Nishioka : *Anal. Chem.*, **74**, 2233 (2002).
- 16) K. D. Lukacs, J. W. Jorgenson : *J. High Resolt. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **8**, 407 (1985).
- 17) T. Soga, K. Igarashi, C. Ito, K. Mizobuchi, H. P. Zimmermann, M. Tomita : *Anal. Chem.*, (2009).
- 18) H. Katayama, Y. Ishihama, N. Asakawa : *Anal. Chem.*, **70**, 5272 (1998).
- 19) R. Baran, H. Kochi, N. Saito, M. Suematsu, T. Soga, T. Nishioka, M. Robert, M. Tomita : *BMC Bioinformatics*, **7**, 530 (2006).
- 20) R. Baran, M. Robert, M. Suematsu, T. Soga, M. Tomita : *BMC Bioinformatics*, **8**, 72 (2007).
- 21) M. Sugimoto, D. T. Wong, A. Hirayama, T. Soga, M. Tomita : *Metabolomics*, **6**, 78 (2010).
- 22) O. Warburg : *Science*, **123**, 309 (1956).
- 23) K. Kita, H. Hirawake, H. Miyadera, H. Amino, S. Takeo : *Biochim Biophys Acta*, **1553**, 123 (2002).
- 24) H. Esumi, J. Lu, Y. Kurashima, T. Hanaoka : *Cancer Sci.*, **95**, 685 (2004).
- 25) Y. Kato, Y. Kubo, D. Iwata, S. Kato, T. Sudo, T. Sugiura, T. Kagaya, T. Wakayama, A. Hirayama, M. Sugimoto, K. Sugihara, S. Kaneko, T. Soga, M. Asano, M. Tomita, T. Matsui, M. Wada, A. Tsuji : *Pharm. Res.*, **27**, 832 (2010).
- 26) S. Goto, Y. Okuno, M. Hattori, T. Nishioka, M. Kanehisa : *Nucleic Acids Res.*, **30**, 402 (2002).



曾我朋義 (Tomoyoshi SOGA)

慶應義塾大学先端生命科学研究所 (〒997-0052 山形県鶴岡市覚岸寺水上 246-2)。
慶應義塾大学工学部応用化学科卒。工学博士。
《現在の研究テーマ》CE-MS メタボローム測定法の開発と様々な研究への展開。
《趣味》釣り。

Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in a Liver Tissue Model Consisting of Primary Hepatocytes Assembling around an Endothelial Cell Network

Yu Toyoda, Miho Tamai, Kasumi Kashikura, Shunsuke Kobayashi, Yoichi Fujiyama, Tomoyoshi Soga, and Yoh-ichi Tagawa

Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan (Y.To., M.T., S.K., Y.Ta.); Institute for Advanced Biosciences Keio University, Yamagata, Japan (K.K., T.S.); and Optical Components Consumer & Optical Products Department Shimadzu, Corporation, Kyoto, Japan (Y.F.)

Received June 10, 2011; accepted October 18, 2011

ABSTRACT:

Primary hepatocytes have been used in drug development for the evaluation of hepatotoxicity of candidate compounds. However, the rapid depression of their hepatic characters *in vitro* must be improved to predict toxicity with higher accuracy. We have hypothesized that a well organized tissue construct that includes non-parenchymal cells and appropriate scaffold material(s) could overcome this difficulty by remediating the viability and physiological function of primary hepatocytes. In this study, we constructed an *in vitro* liver tissue model, consisting of mouse primary hepatocytes assembling around an endothelial cell network on Engelbreth-Holm-Swarm gel, and examined its response to acetamino-

phen treatment. The increase in lactate dehydrogenase release after the exposure to acetaminophen was induced earlier in the liver tissue model than in monolayer hepatocytes alone, suggesting that the tissue model was more sensitive to an acetaminophen-induced toxicity. On the basis of our results, we conclude that liver tissue models of this kind may enhance the responses of hepatocytes against xenobiotics via the maintenance of hepatic genes and functions such as cytochrome P450s. These findings will contribute to the development of more accurate systems for evaluating hepatotoxicity.

Introduction

Despite the dramatic and evolutionary progress made in life sciences over the last decade, the productivity of pharmaceutical companies in bringing new drugs to the market has not been improved (Kola and Landis, 2004; Paul et al., 2010). Nonetheless, research and development expenditure has been increasing, and the high rate of candidate attrition during development has been a considerable problem. To address these issues, a great deal of effort has been devoted toward reducing the candidate attrition in the late stages of drug development,

This work was supported by the Precursory Research for Embryonic Science and Technology and the Adaptable and Seamless Technology transfer Program through target-driven R&D funding [Grant AS2211513G] from the Japan Science and Technology Agency (JST); a Grant-in-Aid for Scientific Research (B) [Grant 21300178] from the Japanese Society for the Promotion of Science (JSPS); and a Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas [Grant 23119003] from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology. Y.To. and M.T. are JSPS research fellows.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://dmd.aspetjournals.org>.

<http://dx.doi.org/10.1124/dmd.111.041137>.

as well as toward producing new drugs more cost effectively (Gleeson et al., 2011; Kwong et al., 2011). It is important to predict and/or detect the toxicity of the drug candidates as early as possible during the process of drug development.

The liver is a multifunctional organ involved in the metabolism, detoxification, and excretion of substances. Therefore, compound-induced hepatotoxicity is a major issue in drug discovery and development (Jaeschke et al., 2002; Kaplowitz, 2005). Although many *in vitro* trials have used primary cultured hepatocytes prepared from the liver, these cells pose several problems for *in vitro* hepatotoxicity assays. When cultured by themselves, hepatocytes cannot continue to grow or maintain their specific functions *in vitro*. The liver is composed of not only parenchymal hepatocytes but also nonparenchymal cells, such as sinusoidal endothelial cells, Kupffer cells, and others. Hepatocytes can express their specific functions only in the structural environment of hepatic tissue. To make it possible for primary hepatocytes to survive for long periods and maintain their specific functions *in vitro*, it is important to maintain cell-cell interactions, both between hepatocytes and between hepatocytes and nonparenchymal cells (Bhatia et al., 1998, 1999; Strain, 1999; Kidambi et al., 2009), as

ABBREVIATIONS: ECM, extracellular matrix; ES, embryonic stem; IVL^{mES}, mouse ES cell-derived *in vitro* liver tissue model; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; NAPQI, *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine; IVL, *in vitro* liver model; APAP, *N*-(4-hydroxyphenyl)acetamide; EHS, Engelbreth-Holm-Swarm; OHT, hydroxytestosterone; HP, hydroxyprogesterone; EGM-2, endothelial cell growth medium-2; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; HBSS, Hank's balanced salt solution; LDH, lactate dehydrogenase; HPLC, high-performance liquid chromatography; CE-TOFMS, capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry; PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule-1; vWF, Von Willebrand factor; HGF, hepatocyte growth factor; IVL_{EHS}, *in vitro* liver model on EHS gel; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; hprt, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; TAT, tyrosine aminotransferase.

well as proper extracellular matrix (ECM) (Kleinman et al., 2003; Takashi et al., 2007).

In this context, we have focused on the interaction between hepatocytes and endothelial cells. In 2005, we successfully achieved hepatic organogenesis from murine embryonic stem (ES) cells (Ogawa et al., 2005; Tsutui et al., 2006). This mouse ES cell-derived in vitro liver tissue model (IVL^{mES}) included both hepatocyte layers and a sinusoid vascular network; the model was capable of recapitulating most hepatic functions. Due to imperfect control of the hepatic regions in IVL^{mES}, it was difficult to quantitatively evaluate metabolites in this system. However, Nahmias et al. (2006) reported a culture system, "liver-like tissue" that included fewer components. Their system consists of two types of cells, primary hepatocytes and an endothelial cell network that formed vascular structures. As with IVL^{mES}, liver-like tissue exhibited long-term expression of hepatic genes such as albumin. It would be reasonable to expect that an optimized liver-like tissue would be a useful system for evaluating the hepatotoxic potential of candidate drug compounds.

In this study, we used both mouse primary hepatocytes and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), a representative type of endothelial cells, to construct an in vitro liver model (IVL) for use in drug screening. Using these two types of cells allowed us to specifically examine the expression of hepatic genes and resulted in development of a simple, cost-effective system. Next, we investigated the response of IVL to xenobiotic treatment to assess the utility of this system in the evaluation of hepatotoxicity.

Acetaminophen [APAP; *N*-(4-hydroxyphenyl)acetamide; C₈H₉NO₂] is one of the most commonly used drugs for the treatment of pain and fever; its reactive metabolite, *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI), oxidized by cytochrome P450 isozymes such as CYP2E1, causes hepatocyte damage (Hayes and Pickering, 1985; Lee et al., 1996; Jaeschke et al., 2003; James et al., 2003). Compared with an in vivo acute liver injury model, in vitro trials using monolayer-cultured hepatocytes generally requires more time for the definite observation APAP cytotoxicity. We have hypothesized that the gap between in vivo and in vitro hepatic reactions could be filled using a well organized tissue construct that included nonparenchymal cells and appropriate scaffold matrix to improve the viability and physiological function of hepatocytes.

To verify this hypothesis, we have constructed an in vitro liver tissue model and examined its response to APAP treatment. In short-term culture, our liver tissue model was more sensitive to APAP-induced toxicity than were hepatocytes alone. Our results suggest that the presence of endothelial cells enhances the responsiveness of hepatocytes to xenobiotics.

Materials and Methods

Cells and Materials. HUVECs were obtained from Cambrex BioScience Walkersville, Inc. (Walkersville, MD). EBM-2 (endothelial cell basal medium) and EGM-2 Single Quots (supplemental factors) were purchased from Lonza Japan Ltd. (Tokyo, Japan). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin/streptomycin (100×), and trypsin-EDTA were from Invitrogen (Carlsbad, CA). Tissue-culture treated cell culture dishes/plates were acquired from Corning Inc. (Tokyo, Japan). Collagenase, trypsin inhibitor, mannitol, D-camphor-10-sulfonic acid, 1,3,5-benzenetricarboxylic acid (trimesate) and gelatin were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid was obtained from Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan). Laminin, fibronectin, poly-D-lysine, collagen type I, collagen type IV, and growth factor-reduced Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) gel were purchased from BD Biosciences (Bedford, MA), and stored at -30°C until use. Acetaminophen (*p*-acetamidophenol) was purchased from Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan). Testosterone (4-androsten-17β-ol-3-one), 6β-hydroxytestosterone (OHT), 2α-OHT, and 11α-hydroxyprogesterone (HP) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). 16α-OHT, 16β-OHT,

and 7α-OHT were purchased from Daiichi Pure Chemicals Corp. (Tokyo, Japan). 3-(*N*-acetyl-L-cysteine-*S*-yl)acetaminophen (acetaminophen mercapturate) was obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). All reagents used were of analytical grade.

Animals. Male, 6- to 10-week-old BALB/cAJc1 mice were purchased from CLEA Japan Inc. (Tokyo, Japan) and were treated in accordance with local institutional guidelines for the care and use of laboratory animals. DsRed2 transgenic mice carrying the expression vector of DsRed2 fluorescence protein gene, controlled by the CAG promoter, were originally obtained via a DsRed2-expressing ES cell-contributing chimera mouse produced by the aggregation chimera method. The F₁ offspring expressing DsRed2 protein has been backcrossed with BALB/cAJc1 mice finally to 20 generations. DsRed2 BALB/cAJc1 transgenic mice (male, 6-week-old) were used in this study for DsRed2 fluorescent assay. The animal protocol was approved by the Animal Experimentation Committees of Tokyo Institute of Technology.

Preparation of Cell Culture Substrate. Gelatin-coated surfaces were prepared by incubation with heat-sterilized 0.05% gelatin solution for 3 h at 4°C. Thawing EHS gel was poured into ice-cold 6-well plates (500 μl/wells) and incubated for 30 min at 37°C to allow polymerization. Laminin, fibronectin, poly-D-lysine, collagen type I, and collagen type IV (50 μg protein/well) were coated onto surfaces according to the manufacturer's instructions.

Cell Culture. HUVECs were maintained in complete EGM-2 [EBM-2 with instructed supplementations as follows: 2% (v/v) fetal bovine serum, hydrocortisone, human fibroblast growth factor-β, vascular endothelial growth factor, R3-IGF-1, ascorbic acid, human epidermal growth factor, GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin-B), and heparin] at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. The passage of cells was limited to 10 times. Isolated hepatocytes were maintained in DMEM supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

Isolation of Primary Hepatocytes from Mouse Liver. Hepatocytes were prepared from mice anesthetized with pentobarbital by an in situ 2-step collagenase perfusion method (Seglen, 1976), with slight modifications. In brief, after the cannulation of isolated portal vein with a 24-gauge catheter (Terumo, Tokyo, Japan), mouse liver was preperfused in situ with Hank's balanced salt solution (HBSS) containing EGTA (0.19 g/l) and glucose (0.98 g/l) to remove the blood; next, the liver was perfused with 0.015% collagenase in HBSS. After the extraction of the liver, the cells were dispersed in ice-cold HBSS (pH 7.2) by blade mincing. The cells obtained were filtered through a 100-μm pore mesh nylon cell strainer (BD Biosciences) and centrifuged twice for 2 min at 500g to remove nonparenchymal cells. Subsequently, for further purification, the remaining cells were centrifuged for 2 min at 1200g and then subjected to 40% Percoll density gradient centrifugation for 10 min at 1200g. At this stage, cell viability measured by the trypan blue method was >85%. The isolated hepatocytes were plated at a cell density of 1.0 × 10⁶ cells per well in 6-well plates; cells were grown in DMEM containing 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂/95% air. The medium for cell attachment was replaced with fresh medium after the first 4 h of incubation. One day later, the growth medium was exchanged with serum-free medium, and replaced daily thereafter.

Detection of mRNA by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. Total RNA was isolated using the acid guanidinium-phenol-chloroform method according to a standard protocol described elsewhere. The purity and concentrations of isolated RNA were assessed by absorbance determination, and the integrity of the RNA was verified by 0.6% agarose gel electrophoresis in TAE buffer (20 mM Tris acetate, 0.5 mM EDTA, pH 8.0). First-strand cDNA was prepared from the extracted total RNA in a reverse-transcriptase reaction, using the SuperScript II Reverse Transcriptase kit and oligo(dT) primer (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction. The cDNA from mRNA of the genes of interest were amplified by PCR in a GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) with a set of specific primers (Tables 1 and 2). After the PCR, the resulting amplicons were separated by 1.5% (w/v) agarose gel electrophoresis with TBE buffer (44.5 mM Tris, 44.5 mM boric acid, 10 mM EDTA, pH 8.0) and detected with ethidium bromide under UV light.

Urea Assay. Culture medium collected in each measurement period was centrifuged for 5 min at 300g to remove floating cells, and supernatant was

TABLE 1
Primer information for human gene

Gene	GenBank Accession Number	Sequences (5'>3')	Position	Product bp
<i>PECAM1</i>	NM_000442	F: ACGGAATCCTTCTCTACACC R: TGCAGTGCAGATATACGTCC	901–920 1377–1358	477
<i>vWF</i>	NM_000552	F: TGCAACACTTGTGTCTGTGTCG R: TGCAGTGCAGATATACGTCC	2786–2805 3271–3251	486
<i>HGF</i>	NM_000601	F: CCGAACAGGATTCCTTTCACC R: TATTGAAGGGGAACCAGAGG	101–120 472–453	372
<i>GAPDH</i>	NM_002046	F: AGATCATCAGCAATGCCTCC R: TGACAAAGTGGTCGTTGAGG	536–555 1027–1008	492

F, forward; r, reverse; bp, base pairs.

stored at -80°C until determination of urea levels. Urea was detected in culture medium using a QuantiChrom Urea Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA). In brief, 5 μl of the obtained solvent was incubated with a 200- μl reaction mixture for 30 min at room temperature. The urea-dependent chromogenic reaction was read using an iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) at 492 nm. To calculate the urea concentration of each sample, known concentrations of urea were used to generate a standard curve.

WST-1 Assay. The viability of cells was evaluated using a Cell Counting Kit (Dojindo Laboratories). In brief, cells were seeded in 96-well plates (4×10^4 cells/well) and cultured at 37°C for 24 h. Acetaminophen was added to the culture medium at various concentrations, and incubation was continued for an additional 24 h. Subsequently, the culture medium was replaced with 110 μl of fresh medium containing 10% (v/v) of the WST-1 assay reaction mixture. Cells were again incubated for 90 min, and 100 μl of the resulting supernatant was transferred to a 96-well microplate. The reduction of WST-1 was measured photometrically using an iMark Microplate Reader at 450 nm.

Lactate Dehydrogenase Assay. After incubation for the indicated periods, the culture medium was collected and centrifuged for 5 min at 300g, and the supernatant was used for determination of lactate dehydrogenase (LDH) level in the culture medium. To detect the LDH levels in whole-cell lysate, the remaining cells were treated with 10 mM phosphate buffer (pH.7.4) containing 1% (w/v) Triton X-100. The cell suspension sample containing the dissolved scaffold materials was homogenized by passage through a 27-gauge needle and then centrifuged for 10 min at 800g at 4°C . The resulting supernatant fraction (whole-cell lysate) was transferred to a new tube. LDH levels in each fraction (culture medium and whole-cell lysate) were detected using SPOTCHEM EZ SP-4430 and SPOTCHEM II LDH (ARKRAY, Kyoto, Japan). Media-released LDH ratio (percentage) was calculated using the following formula: media-released LDH ratio (%) = $\text{LDH}_{\text{media}} / (\text{LDH}_{\text{media}} + \text{LDH}_{\text{whole-cell lysate}}) \times 100$.

Fluorescence Intensity Assay. To count the amount of living hepatocytes quantitatively, DsRed2 fluorescence intensity was measured 24 h after the seeding of red hepatocytes isolated from the DsRed-transgenic mouse. The DsRed2 fluorescence derived from the living red-fluorescent hepatocytes attaching on the culture surface was measured by using LAS-4000 system (Fujifilm, Tokyo, Japan). Obtained images were analyzed by Multi Gauge program, version 3.1 (Fujifilm).

Testosterone Metabolism Assay. To examine the enzymatic activities of cytochrome P450s, each metabolite of testosterone in the culture medium was quantitatively detected using high-performance liquid chromatography (HPLC) as described previously (Tsutui et al., 2006) with some modification. In brief, testosterone and its metabolites were separated using an HPLC system (LC-10AD VP; Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a reversed-phase C18 column (Cadenza CD-C18, 10 mm \times 250 mm; Tosoh, Tokyo, Japan) maintained at 40°C . Elution solvents were as follows: solvent A (water/methanol/acetonitrile: 39:60:1 v/v) and solvent B (water/methanol/acetonitrile: 80:18:2 v/v). Elution was started with 18% solvent B and 82% solvent A for 10 min, followed by elution with a linear gradient of solvent B (18–80%) for the next 10 min. Afterward, 80% solvent B was maintained for 30 min. The elution flow throughout was kept constant at a rate of 0.5 ml/min, and testosterone metabolites were detected by UV absorbance at 254 nm. The resulting chromatograms were analyzed using the LC Solutions software (Shimadzu). The peak of each metabolite was compared with that of the internal standard to determine its quantity. To obtain the standard chromatogram, 2 α -OHT, 6 β -OHT, 7 α -OHT, 11 α -HP, 16 α -OHT, and 16 β -OHT were subjected to independent analyses.

CE-TOFMS Analysis. 3-(*N*-acetyl-L-cysteine-*S*-yl)acetaminophen, one of the APAP metabolites, was detected using the CE-TOFMS method as described previously (Soga et al., 2006). In brief, after the 5% mannitol treatment, cells on the EHS gel were saturated with 1 ml of MeOH containing 25 μM of each internal standard (methionine sulfate, 2-(*N*-morpholino)ethanesul-

TABLE 2
Primer information for mouse gene

Gene	GenBank Accession Number	Sequences (5'>3')	Position	Product bp
<i>Albumin</i>	NM_009654	F: GCTACGGCACAGTGCTTG R: CAGGATGCAGACAGATAGTC	1224–1241 1489–1469	266
<i>Tat</i>	NM_146214	F: CAATCCTGGACAGAACATCC R: GATCTCATCGGCTAAGATGG	565–584 844–825	280
<i>Cyp1a2</i>	NM_009993	F: GTCACCTCAGGGAATGCAGTGG R: AGGTGTCCCTCGTTGTGCTGTG	744–765 1236–1215	493
<i>Cyp2e1</i>	NM_021282	F: TGTGACTTTGGCCGACCTGTTC R: CAACACACACCGCTTTCTCTGC	889–910 1334–1313	446
<i>Cyp2r1</i>	NM_000442	F: CGGAAGATGCAGTTGTACGTGGC R: TCTGCACAGATGAGGTAGGGCTG	1166–1188 1511–1489	477
<i>Cyp3a</i>	NM_007818	F: AATTCCTGGGCCCAACCTCTGC R: AGGATCCTCTGGGTTGTGAGGG	189–211 684–662	496
<i>Abcb11</i>	NM_021022	F: TGGCCAGATCACCAACGAAGCC R: TGCCAGGATCCACAGATACCG	2935–2956 3447–3426	513
<i>Abcc2</i>	NM_013806	F: TGTGGATAATGAGCGCCGTGG R: TGGAGCAACCAAGTTGCAGGC	3921–3942 4373–4352	452
<i>Hprt</i>	NM_013556	F: GTAATGATCAGTCAACGGGG R: AGCTTTACTAGGCAGATGGC	463–482 903–884	441

F, forward; r, reverse; bp, base pairs.

fonic acid, and D-camphor-10-sulfonic acid) for 10 min to extract the metabolites. The resulting solution was immediately mixed with 400 μ l of CHCl_3 and 200 μ l of water and centrifuged at 10,000g for 3 min at 4°C. Subsequently, the 400- μ l upper aqueous layer was centrifugally filtered through a Millipore 5-kDa cutoff filter (Millipore Corporation, Billerica, MA) to remove proteins. The filtrate was lyophilized and dissolved in 50 μ l of MilliQ water containing reference compounds (3-aminopyrrolidine and trimesate) before CE-TOFMS analysis.

CE-TOFMS analysis was performed using an Agilent CE capillary electrophoresis system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), an Agilent G3250AA LC/MSD TOF system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), an Agilent 1100 series binary HPLC pump, a G1603A Agilent CE-MS adapter, and a G1607A Agilent CE-ESI-MS sprayer kit. For system control and data acquisition, we used the G2201AA Agilent ChemStation software for CE and the Analyst QS software for TOFMS. CE-TOFMS analysis for anionic metabolites was carried out according to a previous report (Soga et al., 2009).

Statistical Tests. Experimental data were expressed as means \pm S.D. and analyzed by determining the statistical significance according to Student's *t* test. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Establishment and Characterization of the In Vitro Liver Tissue Model on EHS Gel. HUVECs, a representative type of endothelial cells, were seeded on several scaffold materials (gelatin, laminin, fibronectin, poly-D-lysine, collagen type I, collagen type IV, or EHS gel), to investigate what kind of scaffold material is useful for inducing the functions of endothelial cell. As shown in Fig. 1A, HUVECs grew with normal spreading and displayed a cobblestone morphology within 24 h when grown on laminin, fibronectin, poly-D-lysine, collagen type I, or collagen type IV, as well as on gelatin-coated or noncoated tissue culture 6-well plates. However, on EHS gel, HUVECs rapidly elongated and generated a network structure (Fig. 1A). After the seeding of HUVECs (3.5×10^5 cell/well in 6-well plates), network morphogenesis on EHS gel was accomplished within a few hours and could be maintained for at least 4 days (Fig. 1B). Subsequently, to compare the maintenance of endothelial cell character of HUVECs on each scaffold material, we measured the expression of endothelial cell-specific marker genes, such as *platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)* and *Von Willebrand*

factor (vWF) (Fig. 1C). In HUVECs cultured on EHS gel, expression of these genes was maintained at a high level compared with cells grown on other scaffold materials. It is noteworthy that hepatocyte growth factor (HGF) was strongly expressed in HUVECs only on EHS gel (Fig. 1C).

On this network structure of HUVECs, freshly isolated mouse primary hepatocytes (1.0×10^6 cell/well in 6-well plates) were seeded and cultured. The primary hepatocytes migrated toward the HUVEC network and piled next to one another within 24 h, forming a structure that resembled hepatic tissue (Fig. 1, D and E). This structure could be maintained for 5 days, at least until the disruption of HUVEC network. In the absence of a HUVEC network, primary hepatocytes seeded on EHS gel almost never aggregated with each other. The presence of HUVEC on gelatin did not affect the cobblestone morphology of hepatocytes (Fig. 1D). According to the scheme described in Fig. 1F, this in vitro liver tissue model on EHS gel, which we term IVL_{EHS} , was used in the following experiments.

To confirm whether there was no difference in the percentage of attachment of hepatocytes between gelatin and EHS gel, we used red-fluorescent hepatocytes from the livers of DsRed2-transgenic mice. Based on the linear relationship between the signal intensity of DsRed2 fluorescence and the total amount of red hepatocytes (Fig. 1G), the number of hepatocytes finally attaching on the surface of each culture conditions was almost the same (Fig. 1H).

The IVL_{EHS} Could Maintain Its Hepatic Function for a Longer Period than Monolayer Culture of Hepatocytes. To compare the effect of the IVL_{EHS} to general primary hepatocyte culture on gelatin, we investigated the level of urea production, a major hepatic function (Fig. 2). After the first 24 h, urea production did not differ between samples, regardless of whether primary hepatocytes were cocultured with HUVECs or whether they were grown on gelatin or EHS gel; however, urea levels in the culture were lower when the cells were grown on EHS gel than on gelatin (Fig. 2A). The urea level in the culture medium of the HUVEC network alone was too low (less than several hundred micrograms per deciliter) to recognize a significant effect (data not shown). To estimate the ratio of decrease in relative urea levels on EHS gel (Fig. 2A), identical volumes (2.0 ml) of urea

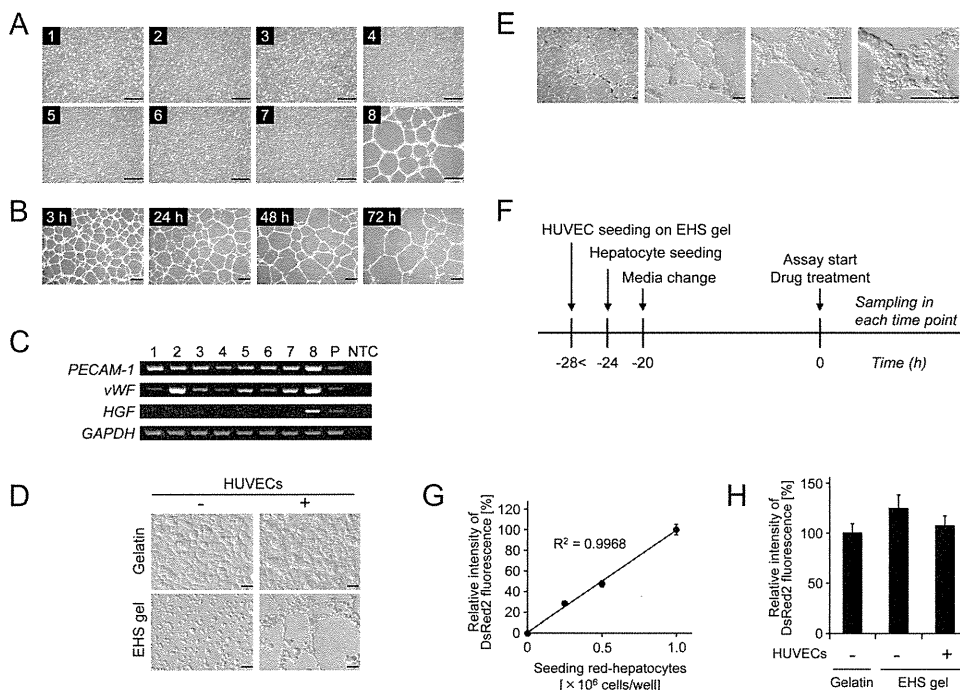


FIG. 1. Characterizations of the IVL_{EHS} . A, microscopic images of HUVECs on each scaffold material after 24 h of culture. 1, tissue-culture treated; 2, gelatin; 3, laminin; 4, fibronectin; 5, poly-D-lysine; 6, collagen type I; 7, collagen type IV; 8, growth factor-reduced EHS gel. B, time-dependent construction of the HUVEC network on EHS gel soon after seeding. C, RT-PCR analysis of HUVECs on each scaffold material: lane 1, tissue-culture treated; 2, gelatin; 3, laminin; 4, fibronectin; 5, poly-D-lysine; 6, collagen type I; 7, collagen type IV; 8, growth factor-reduced EHS gel; P, positive control (cDNA library of human adult liver); NTC, nontemplate control; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), internal loading control. D and E, microscopic images of the in vitro liver tissue model consisting of primary hepatocytes and HUVEC network on EHS gel. All images were obtained 24 h after the seeding of hepatocytes. F, schemes for construction and use of IVL_{EHS} . G, the linear relationship between the signal intensity of DsRed2 fluorescence and the total amount of red hepatocytes on gelatin after 24 h of culture. H, the intensity of DsRed2 fluorescence derived from the red hepatocytes in each culture condition. Fluorescence images were obtained 24 h after the seeding of primary red hepatocytes (1.0×10^6 cells per well in 6-well plates) and then analyzed by Multi Gauge program. Data are expressed as the means \pm S.E.M. Bars, 500 μ m (A and B), 100 μ m (D), and 200 μ m (E).

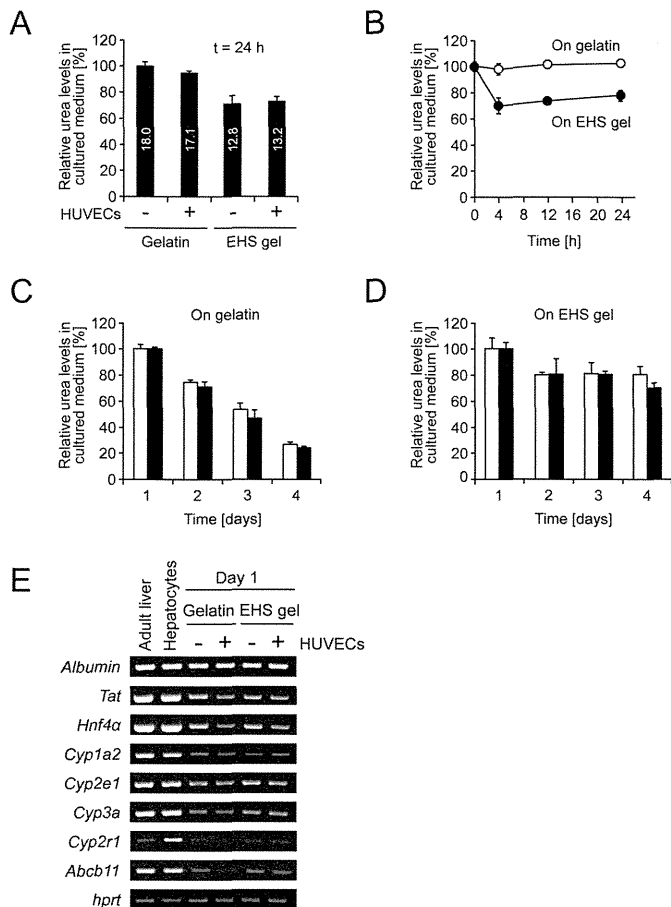


FIG. 2. Validation of hepatic function in IVL_{EHS} . A, urea levels in the culture medium in each culture condition, at 24 h. Data are calculated as ratios by referring to the urea level of hepatocyte monolayers cultured on gelatin. B, apparent decrease in urea level in culture medium incubated on EHS gel. Identical volumes of urea-containing precultured medium were incubated on gelatin or EHS gel. C and D, time-dependent change of urea productivity of hepatocyte with (closed columns) or without (open columns) HUVECs on gelatin (C) or EHS gel (D). Culture medium was changed every day over the course of the measurement period. Data are calculated as ratios by referring to the urea level on day 1 in each culture condition. Data are expressed as the means \pm S.D. of triplicate determinations. E, expression levels of hepatic genes. Adult liver, mouse adult liver at 8 weeks of age; Hepatocytes, hepatocytes immediately after isolation; hprt, internal loading control.

containing precultured medium were incubated on gelatin and EHS gel. As shown in Fig. 2B, a decrease in the urea level was observed on EHS gel in the absence of primary hepatocytes, suggesting that $\sim 30\%$ of the urea was absorbed by the EHS gel. The urea productivity of hepatocytes was not affected by the type of scaffold material or the existence of HUVECs (Fig. 2, A and B).

To investigate whether IVL_{EHS} is superior to other models with regard to the maintenance of liver-specific functions, we examined the time-dependent change of urea productivity during the period when the HUVEC network was adequately maintained. In the case of monolayer culture on gelatin, the urea productivity of hepatocytes rapidly decreased each day (Fig. 2C). In contrast, culture on EHS gel made the cells comparatively resistant to this decrease (Fig. 2D). Although the presence of HUVECs did not enhance the potential urea productivity of hepatocytes, EHS gel was superior to gelatin with respect to the maintenance of hepatic functions.

To investigate any possible change in the hepatic gene expression, hepatocytes were cultured in each condition with or without HUVECs for 24 h and subjected to reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. IVL_{EHS} also retained some cytochrome

P450 expression at least, as well as monolayer cultured hepatocytes (Fig. 2E), suggesting that the hepatic potential of IVL_{EHS} was not lower than that of monolayer cultured hepatocytes.

Measurement of In Vitro Hepatotoxicity Induced by Acetaminophen Treatment. We next examined the hepatotoxicity in the liver tissue model induced by APAP; this treatment was intended to simulate an exogenous stimulus triggered by xenobiotic treatment. At first, to evaluate the effect of APAP on the cytotoxicity of hepatocytes, we incubated hepatocytes on gelatin with APAP at different concentrations for 36 h. Hepatocyte viability was measured by the WST-1 assay. Because 10 mM APAP was sufficient to induce hepatocyte death within 36 h (Fig. 3A), we chose 10 mM APAP as the direct toxicant concentration for the following experiments. The release of LDH into the cultured medium was measured at various time points. Differences between APAP-treated and untreated samples started to be observed 24 h after the addition of APAP (Fig. 3B). After 36-h exposure to APAP, LDH level in the culture medium of treated cells was significantly higher than in the control (Fig. 3B). Microscopic observation indicates that the monolayer-cultured hepatocytes were lethally injured, and that the normal cytoplasmic projections of spreading hepatocytes, present in control culture on gelatin, were disrupted (Fig. 3C). The hepatocytes cultured on EHS gel were also injured. The architecture of the liver tissue model, with hepatocytes massing around the HUVEC network, maintained its appearance (Fig. 3C). It is noteworthy that exposure to APAP for 36 h did not affect the final levels of LDH in any culture condition, but it did affect the time-dependent increase of LDH (Fig. 3D).

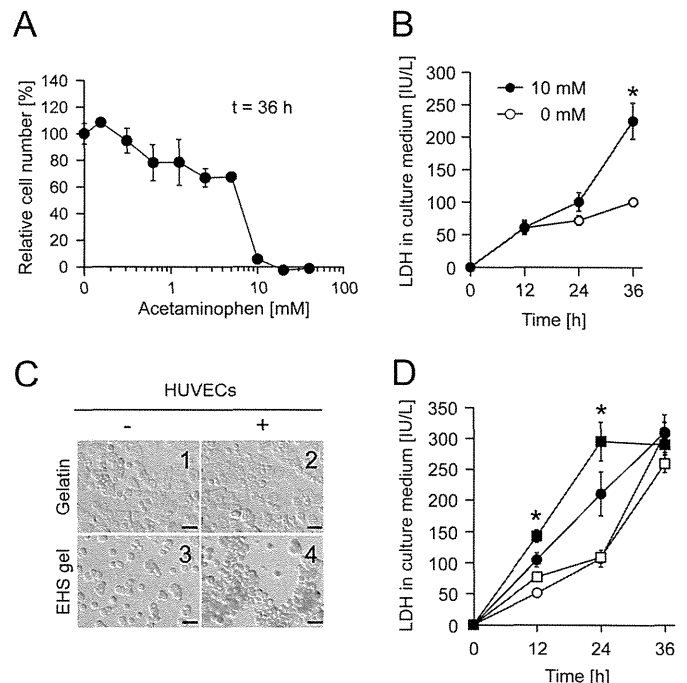


FIG. 3. Measurement of in vitro hepatotoxicity induced by acetaminophen treatment. A, dose-dependent cytotoxicity induced by APAP. Hepatocytes cultured on gelatin were treated with APAP at various concentrations for 36 h. The relative number of hepatocytes was evaluated by WST-1 assay. B, time-dependent change of LDH levels in the culture medium, for hepatocytes on gelatin with (closed circles) or without (open circles) 10 mM APAP. C, microscopic images of hepatocytes in the in vitro liver tissue model (on EHS gel with HUVEC) and other culture conditions (on gelatin with or without HUVEC, and on EHS gel without HUVEC) at 36 h after the APAP treatment. Bars, 50 μ m. D, time-dependent increase of LDH in the culture medium upon 10 mM APAP treatment in each culture condition: with (squares) or without (circles) HUVEC; on gelatin (open symbols) or EHS gel (closed symbols). Data are expressed as the means \pm S.D. of triplicate determinations. *, significantly different from all other groups ($P < 0.05$).

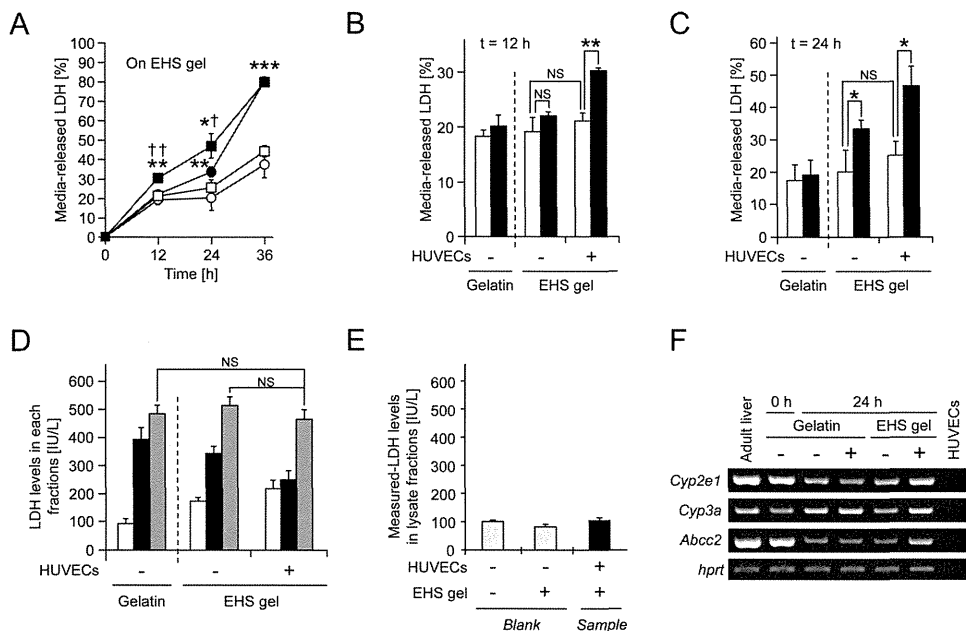


FIG. 4. The effect of construction of the in vitro liver tissue model on APAP-induced hepatotoxicity. A, time-dependent increase of LDH released by hepatocytes on EHS gel in each culture condition, with (squares) or without (circles) HUVEC and with (closed symbols) or without (open symbols) 10 mM APAP. B and C, the ratio of media-released LDH with (closed columns) or without (open columns) 10 mM APAP at 12 (B) and 24 h (C). D, LDH levels in each fraction (cultured medium, open columns; whole-cell lysate, closed columns; total, slashed columns) after 24-h incubation with 10 mM APAP in each culture condition. Data are expressed as the means \pm S.D. $n = 3-9$. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, relative to the APAP-absent control; †, $P < 0.05$; ††, $P < 0.01$ relative to the HUVEC-absent control; NS, not significant. E, measured-LDH levels in HUVECs cultured on EHS gel after 24 h of culture. Blank (dot) means a non-HUVECs control. These raw data are expressed as the means \pm S.D. $n = 3$. F, RT-PCR analysis of hepatocytes cultured with or without HUVECs in each condition. Adult liver, mouse adult liver at 8 weeks of age; hprt, internal loading control.

Enhancement of the Response to Acetaminophen in the IVL_{EHS} . To further investigate whether the construction of the IVL_{EHS} enhances the responsiveness of hepatocytes to APAP, we examined the media-released LDH ratio. As described in Fig. 4A, IVL_{EHS} showed an early response to acetaminophen. Twelve hours after the APAP treatment, the ratio of released LDH in the liver tissue model was already higher than in any controls (Fig. 4B). At this time point, APAP was not directly toxic to HUVECs alone. Hepatocytes alone on EHS gel were also affected by APAP-dependent toxicity after 24 h (Fig. 4C). On the other hand, at those time points, there was no significant difference in the ratio of released LDH caused by APAP treatment in hepatocytes cultured alone on gelatin (Fig. 4, B and C). Furthermore, total LDH levels in hepatocytes incubated with APAP for 24 h were not affected by the type of scaffold material (gelatin or EHS gel) or the presence of HUVECs (Fig. 4D). In this study, the existence of HUVECs had little effect on the LDH level in the culture medium (under the detectable limitation) and whole-cell lysate fraction (Fig. 4E). Under these experimental conditions, HUVECs produced far less LDH than hepatocytes; thus, the increase of LDH release in IVL_{EHS} under the APAP condition appeared to result from the rise of APAP cytotoxicity in hepatocytes. These results suggest that culture on EHS gel could prevent the depression of responsiveness in hepatocytes that is observed in monolayer culture on gelatin; the construction of the IVL_{EHS} would enhance this positive effect further. Finally, to compare the expression level of the *Cyp2e1* gene between IVL_{EHS} and other conditions, RT-PCR analysis was performed 24 h after the seeding of hepatocytes. The expression level of mouse *Cyp2e1* in IVL_{EHS} remained high, compared with other conditions (Fig. 4F). Furthermore, mercapturate, one of the APAP metabolites produced via NAPQI, was quantified by CE-TOFMS in the IVL_{EHS} and primary hepatocyte culture on EHS gel at least 12 h after the APAP treatment. As shown in Table 3, the amount of mercapturate in the IVL_{EHS} was almost the same as that in the primary hepatocyte culture.

Activities of Cytochrome P450 Isozymes in the IVL_{EHS} . The key mechanism underlying APAP hepatotoxicity is cytochrome P450-mediated NAPQI formation (David, 2005). To quantify the P450 activities as major drug-metabolizing enzyme activities in IVL_{EHS} , we quantitatively examined the amount of hydroxylated testosterone in

cultured medium. Each P450 enzyme participates independently in the regioselective hydroxylation of testosterone, enabling us to simultaneously investigate the activities of multiple P450s. Testosterone was added into the IVL_{EHS} system, and its metabolites were analyzed by HPLC in their hydroxylated forms. As described in Fig. 5A, retention times of the analytes were as follows: 6 β -OHT, 16.3 min; 7 α -OHT, 16.9 min; 16 α -OHT, 21.3 min; 16 β -OHT, 23.9 min; and 2 α -OHT, 26.4 min. These products (6 β -OHT, 7 α -OHT, 16 α -OHT, 16 β -OHT, and 2 α -OHT) were differentially converted by specific cytochrome P450s (Cyp3a, Cyp2a4/5 and 2d9, Cyp2d9 and Cyp2b, Cyp2c29 and Cyp2e, and Cyp2d), respectively. The metabolite profile indicates that activities of P450 isozymes in IVL_{EHS} were higher than those under other conditions (Fig. 5B).

Discussion

Positive Effect of the Construction of IVL_{EHS} . In this study, we showed that culture of hepatocytes in a model that resembles the structure of hepatic tissue is superior to monolayer culture of primary hepatocytes, both in regard to the maintenance of some hepatic genes and the response to xenobiotics, at least in the case of APAP. These findings suggest that this system could be applied to the evaluation of compound-associated hepatotoxicity. Because primary hepatocytes have a more complete set of phase I- and II-metabolizing enzymes than immortalized cell lines, they have been used to develop assay systems that are more representative of in vivo hepatocytes (Dambach et al., 2005). A monolayer system consisting of confluent culture of

TABLE 3

Concentration of 3-(N-acetyl-L-cysteine-S-yl)acetaminophen, mercapturate, in each cellular extraction detected by CE-TOFMS analysis

Data are expressed as the means \pm S.D. $n = 3$. There is no significant difference between APAP-treated samples.

HUVEC	APAP Treatment	Mercapturate $\mu\text{M/ml extraction}$
—	—	N.D.
—	+	0.22 \pm 0.0414
+	—	N.D.
+	+	0.19 \pm 0.0052

N.D., not detected.