

培養した為、スループット性の向上が、今後の検討課題として挙げられる。現在、COCの単培養の導入を検討しており、今後の「候補化学物質」を用いた評価において、スループット性の高度化についても検討予定である。

#### E. 結論

一般毒性解析系の整備に加えて、夜間行動量測定を含めたケージ内行動測定装置による影響評価を取り入れることを試みた。これは、従来手法でカバーしきれなかった、夜間における投与影響を評価できるものと考えられた。また生殖細胞への影響評価系作出を目的とした卵巣中の卵丘細胞-卵母細胞(以降、COC)を用いた体外培養下の生殖細胞影響評価を行った結果、新たな生殖細胞毒性評価系作出が期待できることが明らかとなった。今後、評価指標の追加による、評価系としての頑強性の強化と、スループット性の向上が求められる。

#### F. 参考文献

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hiradate Y, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. C-type natriuretic peptide inhibits porcine oocyte meiotic resumption. *Zygote*. 2013 Jan 18:1-6.

2. Ohashi Y, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. Distribution of protein disulfide isomerase during maturation of pig oocytes. *Anim Sci J*. 2013 Jan;84(1):15-22.

3. Macchiarelli G, Palmerini MG, Nottola SA, Cecconi S, Tanemura K, Sato E. Restoration of corpus luteum angiogenesis in immature hypothyroid rdw rats after thyroxine treatment: morphologic and molecular evidence. *Theriogenology*. 2013 Jan 1;79(1):116-126.

4. Sakurai M, Sato Y, Mukai K, Suematsu M, Fukui E, Yoshizawa M, Tanemura K, Hoshino Y, Matsumoto H, Sato E. Distribution of tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 and structural matrix proteins in mouse embryos during preimplantation development in vivo and in vitro. *Zygote*. 2012 Oct 1:1-7.

5. Igarashi K, Kitajima S, Aisaki K, Tanemura K, Taquahashi Y, Moriyama N, Ikeno E, Matsuda N, Saga Y, Blumberg B, Kanno J. Development of humanized steroid and xenobiotic receptor mouse by homologous knock-in of the human steroid and xenobiotic receptor ligand binding domain sequence. *J Toxicol Sci*. 2012;37(2):373-380.

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）  
分担研究報告書

2. 学会発表

種村 健太郎、古川 佑介、大塚 まき、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋 聡、佐藤 英明、菅野 純

発生-発達期の神経シグナルかく乱による遅発中枢影響解析-幼若期マウスへのイボテン酸投与による成熟期の脳高次機能障害について- [第39回日本毒性学会学術年会シンポジウム]2012年7月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

## PET 分子イメージングによる薬効評価・薬物動態研究

研究報告者 渡辺 恭良

理化学研究所 分子イメージング科学研究センター センター長

共同研究者

Hume William Ewan、金山洋介、八塩桂司 (理化学研究所 分子イメージング科学研究センター 分子プローブ動態応用研究チーム)

崔 翼龍 (同 細胞機能イメージング研究チーム)

### 【研究要旨】

本事業において見出された B 型肝炎治療薬候補物質について、小動物・大型動物における PET 分子イメージング技術を用いた薬物動態解析により有効性と安全性を評価し、研究全体へフィードバックすることで、薬候補化合物の最適化と絞り込みに寄与することが全研究期間を通じた我々の研究目標である。しかしながら薬候補物質が選出される以前の初期段階においては、薬候補物質が選出された際に円滑に PET 解析を行い得る体制と、薬候補物質の治療効果を *in vivo* で検討するための非侵襲的な評価系の構築が重要と考える。そこで本年度は B 型肝炎ウイルス感染モデル動物を安全に PET 撮像可能にするためのアイソレーションボックスの作成を行うと同時に、非侵襲的に肝組織内に残留する B 型肝炎ウイルス量の診断が可能な分子イメージング法の開発に着手した。

#### A. 研究目的

我々はこれまでに小分子化合物はもとよりペプチド、抗体、核酸などの生体高分子を含め様々な分子の PET プローブ化技術を開発し、分子イメージング研究を推進してきた。薬物動態研究においては、肝細胞への取り込みトランスポーターの機能的定量的解析、薬物相互作用解析、薬理量非線型性メカニズム解析を、様々な動物種とヒトで行ってきた大いなる経験を有する。肝炎治療に用いるインターフェロン等のサイトカイン類を標識した受容体解析、核酸プローブの肝細胞への DDS 開発研究など肝臓を標的とした分子イメージング研究も行ってきた。我々の目的はこれらの技術を基に、本事業において開発する B 型肝炎

治療用薬候補化合物の分子イメージング法を開発し、B 型肝炎ウイルス感染モデルマウス、サル等霊長類などにおける薬物動態解析により有効性・安全性を評価することで、最終的な薬候補化合物の最適化・絞り込みに寄与することである。実際に薬候補化合物が選出された際に円滑に分子イメージング法の開発を行うために、本年度は B 型肝炎ウイルス感染モデルマウスを安全に取扱うための PET 撮像用アイソレーションボックス作成を行った。

また一方で、薬候補化合物の治療効果を検討する上では、実際に肝臓内に残存する B 型肝炎ウイルス量を評価することが重要である。実際に患者に投与することを考慮すれば、非侵襲的に残存ウイルス量を

把握可能な分子イメージング法確立が必要である。そこで、B型肝炎ウイルスに特有の逆転写酵素特異的・高親和性阻害剤である核酸アナログ製剤エンテカビル（ETC）のPETプローブ化についても検討に着手した。

## B. 研究方法

今回アイソレーションボックスを作成するに当たり、理化学研究所分子イメージング科学研究センターの所有する動物用PET装置（microPET focus220、SIEMENS社製）のガントリサイズ、撮像用ベッドに適合したサイズ・形状でかつ、内部からウイルスを漏出させずに撮像を可能にする様留意し、透明なアクリル製のケースとULPA（Ultra Low Penetration Air）フィルタを採用した。ULPAフィルタは直径 $0.15\mu\text{m}$ の粒子を99.9995%以上の捕集効率で除去する性能を有し、粒子サイズがこれ以上でも以下でも捕集効率は向上することから、ウイルス粒子またはウイルス含有飛沫等の漏出防止に十分な性能を有すると判断した。

さらに、モデルマウスを飼育室にてボックス内に保定し、隔離後に撮像室へ運搬、PET撮像を行う一連の間にマウスの体温と麻酔状態を維持するため麻酔ガスラインと体温調節用ホットパッド、検温プローブの接続を可能にする機構を考案した。

（倫理面への配慮）

神戸理研動物実験委員会に申請中。

## C. 研究結果

作成したPET撮像用アイソレーションボックスの写真を図1に示した。ボックスの前後にULPAフィルタを装備し、片方のフィルタよりドラフト装置へダクトを接続して吸引することで、内部空気の置換を行う仕様である。さらに麻酔ガスラインは迅速接続継手を介して外部と接続するため、ガス流入を行わない時に内部空気が漏れることを防ぐ。また、ホットパッドの電線も図1Bに見られる様に一度端子で接続しているためボックスの隔離状態を維持可能である。検温プローブと注射ルート導入用の穴に関しては径を

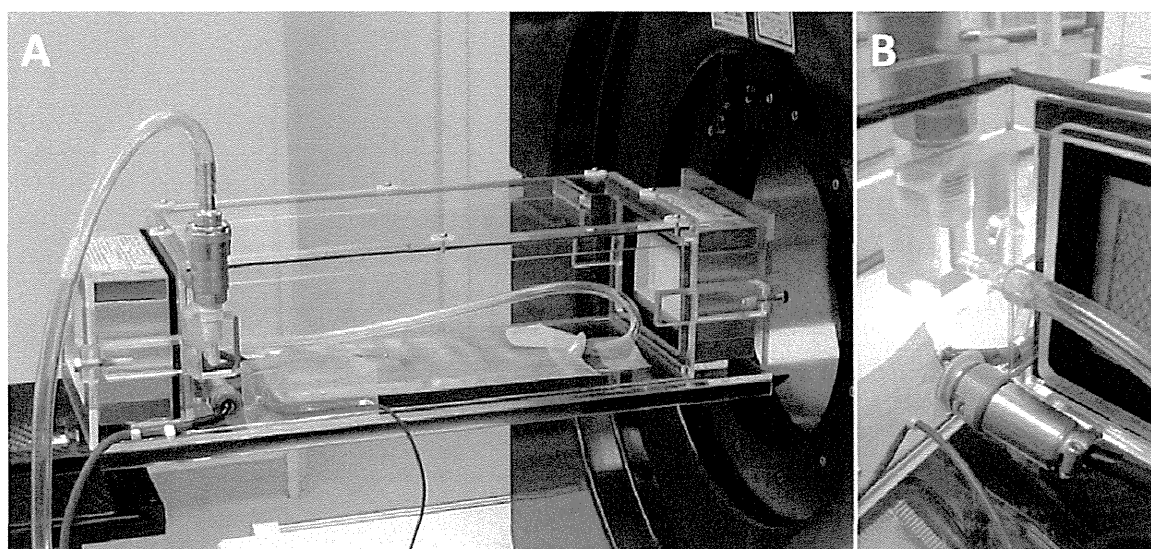


図1. PET撮像用アイソレーションボックス

A: 撮像ベッド上に設置したアイソレーションボックスの写真。ULPAフィルタ（両サイド）、麻酔ガスライン、ホットパッド、検温プローブを接続。B: 接続部詳細。

ごく小さくしており、写真の様にシールで覆うことで気体の流通を防ぐ。基本的に ULPA フィルタを介して一方向に空気が流れるため、これら微小孔からの内部気体の流出はないと思われる。

#### D. 考察

今回のアイソレーションボックスを作成したことで、イソフルランガスなどを用いて安定した麻酔の維持と体温調節が可能な状態でウイルスの漏出を防ぎ安全に PET 撮像を行うことが可能となった。B型肝炎ウイルスに限らず、バイオセーフティレベル 2 までの感染性モデル動物を用いた実験に有効な撮像システムを構築できたと言える。

#### E. 結論

現在、エンテカビル F-18 標識 PET プローブ化について検討を行っており、高い標的親和性を持つ F-18 標識化合物が作成でき次第、ヒト型肝臓キメラマウスに B型肝炎ウイルスを感染させたモデルマウスを用いた PET 撮像試験が可能である。動物モデルにおいて肝組織中の残存ウイルスの検出イメージングに成功すれば、ヒトでのイメージングのためのマイクロドーズ臨床試験を進める。

#### F. 参考文献

D.R. Langley et al. *J. Virol.* 81(8)  
pp:3992-4001, 2007

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし。

##### 2. 学会発表

該当なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

##### 1. 特許取得

該当なし。

##### 2. 実用新案登録

該当なし。

##### 3. その他

該当なし。

# 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌	巻号	ページ	出版年	当研究班に 対する 謝辞記載の 有無
山本由佳、原詳子、 <u>小嶋聡</u> へ	肝線維化研究Update—基礎から臨床へ	医学のあゆみ	244	533-537	2012	無
Laurent T, Murase D, Tsukioka S, <u>Matsuura T</u>	A novel human hepatoma cell line, FLC-4, exhibits highly enhanced liver differentiation functions through the 3-dimensional cell shape	J Cell Physiol	227	2898-2906	2012	無
Schroder K, Irvine KM, Taylor MS, Bokil NJ, Le Cao KA, Masterman KA, Labzin LI, Semple CA, Kapetanovic R, Fairbairn L, Akalin A, Faulkner GJ, Baillie JK, Gongora M, Daub CO, Kawaji H, McLachlan GJ, Goldman N, Grimmond SM, Carninci P, Suzuki H, Hayashizaki Y, Lenhard B, Hume DA, Sweet MJ.	Conservation and divergence in Toll-like receptor 4-regulated gene expression in primary human versus mouse macrophages.	Proc Natl Acad Sci U S A.	109	E944-53	2012	無
Suzuki T, Nakano-Ikegaya M, Yabukami-Okuda H, de Hoon M, Severin J, Saga-Hatano S, Shin J, Kubosaki A, Simon C, Hasegawa Y, Hayashizaki Y, <u>Suzuki H.</u>	Reconstruction of Monocyte Transcriptional Regulatory Network Accompanies Monocytic Functions in Human Fibroblasts.	PLoS One.	7	e33474	2012	無
Shin JW, Suzuki T, Ninomiya N, Kishima M, Hasegawa Y, Kubosaki A, Yabukami H, Hayashizaki Y, <u>Suzuki H.</u>	Establishment of single-cell screening system for the rapid identification of transcriptional modulators involved in direct cell reprogramming.	Nucleic Acids Res.	40	e165	2012	無
Tanaka H, Takafuji K, Taguchi A, Wiryasermkul P, Ohgaki R, Nagamori S, Suh PG, <u>Kanai Y.</u>	Linkage of N-cadherin to multiple cytoskeletal elements revealed by a proteomic approach in hippocampal neurons.	Neurochem Int.	61	240-250	2012	無
<u>Kanai Y.</u> , Clemenccon B, Simonin A, Leuenberger M, Lochner M, Weisstanner M, Hediger MA.	The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family.	Mol Aspects Med			in press	無
Unoki M, Masuda A, <u>Dohmae N.</u> , Arita K, Yoshimatsu M, Iwai Y, Fukui Y, Ueda K, Hamamoto R, Shirakawa M, Sasaki H, Nakamura Y.	Lysyl 5-Hydroxylation, a Novel Histone Modification, by Jumonji Domain Containing 6 (JMJD6).	The Journal of Biological Chemistry	288	6053-6062	2013	無
Liu HM, <u>Aizaki H.</u> Machida K, Ou JH, Lai MM.	Hepatitis C virus translation preferentially depends on active RNA replication.	PLoS One	7	e43600	2012	無
Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, <u>Aizaki H.</u> Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, Wakita T, Suzuki T.	Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection.	Virology	10	29-38	2012	無
Murayama A, Sugiyama N, Watashi K, Masaki T, Suzuki R, <u>Aizaki H.</u> Mizuochi T, Wakita T, Kato T.	Japanese reference panel of blood specimens for evaluation of hepatitis C virus RNA and core antigen quantitative assays.	J Clin Microbiol	50	1943-1949	2012	無
Ando T, Imamura H, Suzuki R, <u>Aizaki H.</u> Watanabe T, Wakita T, Suzuki T.	Visualization and Measurement of ATP Levels in Living Cells Replicating Hepatitis C Virus Genome RNA.	PLOS Pathogen	8	e1002561	2012	無

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌	巻号	ページ	出版年	当研究班に対する謝辞記載の有無
田中純子、小山富子、相崎英樹	C型肝炎ウイルス(HCV)による感染	臨床とウイルス	40	28-35	2012	無
相崎英樹	C型肝炎ウイルスの生活環	ニューサイエンス社	44(9)	199-202	2012	無
酒井健一、西山広徳、小椋孝介、黒木悠平、遠藤健司、土屋好司、酒井秀樹、阿部正彦	モノメリック型およびジェミニ型カチオン界面活性剤の相挙動に及ぼす重合性基の影響	Journal of the Japan Society of Colour Material	85	317-320	2012	無
酒井秀樹、鈴木菜津美、遠藤健司、酒井健一、土屋好司、阿部正彦	微小気泡を鋳型としたシリカ中空粒子の調製	Material Technology	30	147-153	2012	無
Igarashi K, Kitajima S, Aisaki K, Tanemura K, Taquahashi Y, Moriyama N, Ikeno E, Matsuda N, Saga Y, Blumberg B, Kanno J.	Development of humanized steroid and xenobiotic receptor mouse by homologous knock-in of the human steroid and xenobiotic receptor ligand binding domain sequence.	J Toxicol Sci.	37(2)	p373-380	2012	無
Takashima, T., Wu, C., Takashima-Hirano, M., Katayama, Y., Wada, Y., Suzuki, M., Kusuvara, H., Sugiyama, Y., and Watanabe, Y.	Evaluation of breast cancer resistance protein function in hepatobiliary and renal excretion using PET with [11C]SC-62807.	J. Nucl. Med.	54(2)	183-186	2013年	無
Yamamoto, S., Ouchi, Y., Nakatsuka, D., Tahara, T., Mizuno, K., Tajima, S., Onoe, H., Yoshikawa, E., Tsukada, H., Iwase, M., Yamaguti, K., Kuratsune, H., and Watanabe, Y.	Reduction of 11C-(+)-3-MPB binding in brain of chronic fatigue syndrome with serum autoantibody against muscarinic cholinergic receptor.	PLoS One	7(12)	e51515	2012年	無
Watanabe, Y.	Molecular imaging-based early-phase and exploratory clinical research.	Yakugaku zasshi	133(2)	187-195	2013年	無
Långström, B., Karimi, F., and Watanabe, Y.	Endogenous compounds labeled with radionuclides of short half-life—some perspectives.	J. Labelled Compd. Rad.	in press		2013年	無

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
相崎英樹	HCV粒子形成に関する脂肪滴周辺蛋白の同定と機能解析	株式会社メディカルトリビューン	Liver Forum in Kyoto第14回学術集会記録	株式会社メディカルトリビューン	東京	2012	30-33



## 研究成果の刊行物・別刷

TGF- $\beta$  活性化反応と治療・診断への応用TGF- $\beta$  activation reaction and application to treatment and diagnosis

山本由佳(写真) 原 詳子 小嶋聡一

Yuka YAMAMOTO<sup>1,2</sup>, Mitsuko HARA<sup>2</sup> and Soichi KOJIMA<sup>1,2</sup>東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科医歯理工学専攻理研生体分子制御学分野<sup>1</sup>, 理化学研究所基幹研究所ケミカルバイオロジー領域ケミカルゲノミクス研究グループ分子リガンド生物研究チーム<sup>2</sup>

◎ TGF- $\beta$  は組織線維化を強力に誘導する主要因子である。その産生は正常な組織修復過程では一過性でほどなく停止するが、障害刺激が繰り返されると TGF- $\beta$  が持続的に産生されるようになり、組織線維症が引き起こされる。TGF- $\beta$  は潜在型複合体として産生された後に標的細胞周囲で活性化反応を経て活性型 TGF- $\beta$  となるが、その作用機序は臓器や病期により異なる。ここでは肝線維化初期段階でみられるセリンプロテアーゼの血漿カリクレイン (PLK) 依存 TGF- $\beta$  活性化反応を標的とした肝線維化の治療・予防法、TGF- $\beta$  のプロペプチドである latency associated protein (LAP) の分解産物 (LAP 断片) を指標とした診断法開発の試みについて紹介する。

Key word : TGF- $\beta$  活性化反応, LAP, 血漿カリクレイン, fibrogenesis線維症における TGF- $\beta$  の働き

慢性肝炎、慢性膵炎、腎炎、肺線維症、増殖性網膜症、心筋梗塞、嚢胞性線維症、強皮症などに伴う各種組織の線維症、硬化性疾患はコラーゲンを主とする ECM (「サイドメモ 1」参照) の組織への過剰な蓄積によって起こる。肝線維症は B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染、C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染、アルコールの過剰摂取、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、原発性胆汁性肝硬変 (PBC)、自己免疫性肝炎などを原因として引き起こされ、肝硬変や肝癌へ進展しうる病態である。これら線維化の反応は Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  によって強力に誘導される<sup>1)</sup>。

TGF- $\beta$  は、細胞の生存、アポトーシス、分化、遊走、接着や、血管新生、上皮-間葉転換 (EMT) など、数多くの生理的・病理的現象に深くかかわる多機能性サイトカインである。正常な組織修復過程では TGF- $\beta$  の産生は一過性でほどなく停止するが、障害刺激が繰り返されると TGF- $\beta$  は持

続的に産生されるようになり、組織線維症を引き起こす<sup>1)</sup>。

TGF- $\beta$  は高分子潜在型複合体として産生され

サイド  
メモ  
1

## ECM (extracellular matrix)

細胞外基質 (extracellular matrix : ECM) は線維状や網目状の構造をもち、細胞を物質的に支持する。ECM には、線維成分のコラーゲンやエラスチンなど、非線維成分のプロテオグリカン・グルコサミノグリカンなど、さらにこれらと細胞との接着を調節するフィブロネクチン・ラミニン・ヒアルロン酸・オステオポンチンなどの接着物質が知られている。ECM の恒常性維持には ECM の合成系と分解系のバランスが大事であり、肝線維化の病態形成過程においては活性化された肝星細胞からコラーゲンやフィブロネクチン、エラスチン、ラミニン、ヒアルロン酸、プロテオグリカンなどの産生が異常増加する。

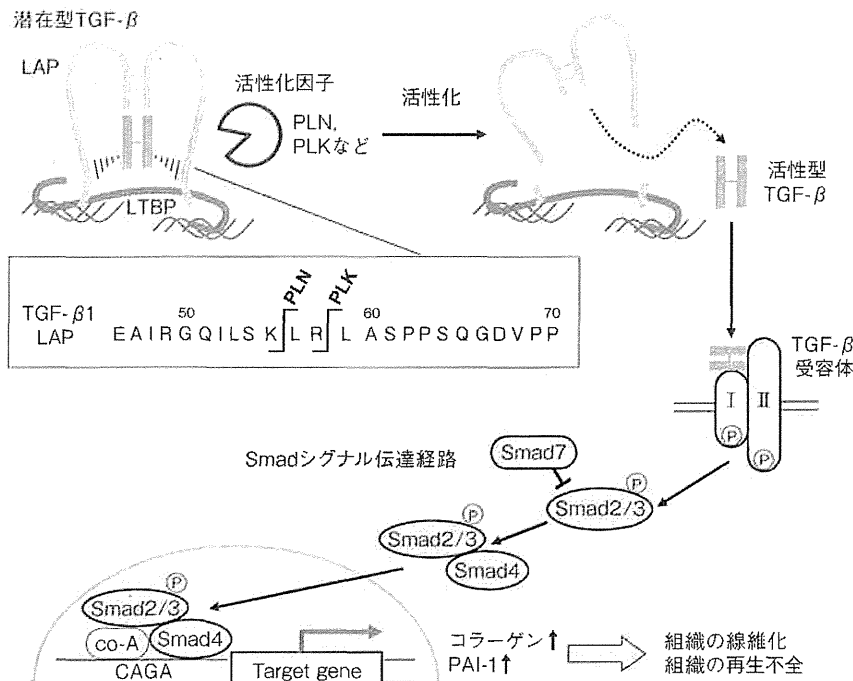


図1 TGF-β活性化反応とシグナル伝達

TGF-βは活性化因子によって潜在型複合体から遊離し、活性型 TGF-β となる。これが細胞表面の TGF-β II 型受容体に結合し、I 型受容体と会合した後、I 型受容体がリン酸化される。リン酸化 I 型受容体によって Smad3 がリン酸化されると、Smad2, Smad4 とともに三量体を形成した後、核内へ移行する。これによってコラーゲン、PAI-1 などの転写が活性化され、組織線維症が進行する。

た後に標的細胞周囲で活性化反応を経て活性型 TGF-β となる。TGF-β1 の場合、390 アミノ酸からなる前駆体ポリペプチドの R<sup>278</sup>-A<sup>279</sup>間が furin 様プロテアーゼにより切断されると、112 アミノ酸からなる C 末端ポリペプチドが 2カ所の S-S 結合により二量体を形成し、活性型 TGF-β1 と

なる<sup>2)</sup>。一方、Latency associated protein (LAP) と呼ばれる N 末端プロペプチドも S-S 結合により二量体となり、R<sup>278</sup>-A<sup>279</sup>間切断後に疎水結合により TGF-β 1 分子と会合し、受容体に結合できない潜在型複合体を形成する。トロンボスポンジンやインテグリン、セリンプロテアーゼ、MMP (「サイドメモ 2」参照) などによって、LAP と活性型 TGF-β の会合が損なわれることにより、潜在型複合体から活性型 TGF-β が遊離する(これを TGF-β の活性化という)。

活性型 TGF-β が細胞表面の TGF-β II 型受容体に結合すると、I 型受容体と会合して、TGF-β 二量体 1 分子に対し I 型受容体/II 型受容体 2 分子ずつからなるヘテロ四量体を形成し、I 型受容体がリン酸化される<sup>3)</sup>。リン酸化された I 型受容体は細胞内蛋白質である Smad3 の C 末端をリン酸化する。Smad3 は、Smad2, Smad4 とともに三量体を形成した後、核内へ移行し、コラーゲン

**サイドメモ 2**

**MMP (matrix metalloproteinase)**

MMP(matrix metalloproteinase)は活性中心に亜鉛分子を有する ECM 分解酵素であり、癌細胞の浸潤・転移、血管新生、炎症性疾患、自己免疫疾患など、多くの疾病に関与する。哺乳動物では現在までに 20 種以上の MMP が同定されており、MMP-2、-9 は、TGF-β 潜在型複合体中の LAP を切断し TGF-β を活性化することや、肝線維症では MMP-2、腎線維症では MMP-9 の発現上昇が報告されている。

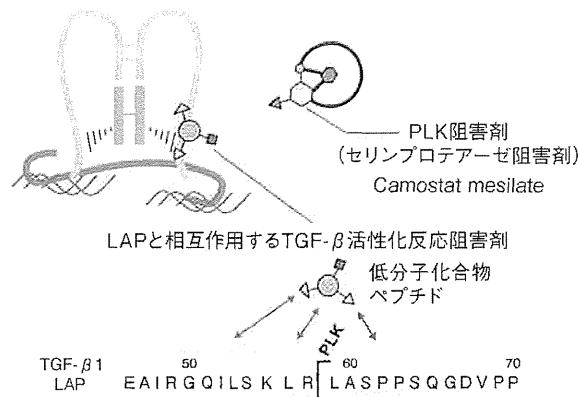


図 2 PLK依存TGF-β 活性化反応を標的とした初期線維化治療薬の開発

セリンプロテアーゼ阻害剤である camostat mesilate が線維化抑制に有効であることを報告したが<sup>3</sup>, セリンプロテアーゼ阻害剤も TGF-β シグナル伝達阻害剤の場合と同様, PLK による病的な反応だけでなく PLK の生理的機能をも阻害してしまう。著者らは現在, LAP の PLK 切断配列およびその周辺に相互作用することによって TGF-β 活性化反応を抑制する, 肝線維症治療薬の探索を行っている。

をはじめとする ECM, ならびに線溶系プロテアーゼのキーファクターであるプラスミノゲン活性化因子の抑制因子(plasminogen activator inhibitor-1: PAI-1)などの転写を活性化することにより組織線維症を進行させる(図 1)。哺乳類で発現が認められる TGF-β1-3 の 3 つのアイソフォームは遺伝子プロモーター構造の違いから異なる転写調節を受けるために, 臓器や刺激の種類によりその発現パターンは異なるが, いずれも前述した共通のシグナル受容体に結合し働くことで線維症に関与する。肝線維化では線維化の過程で肝星細胞中で生成するレチノイン酸が肝星細胞自身に働き TGF-β の発現, 活性化, Smad シグナルカスケードを高めることが知られている<sup>4</sup>。活性化型 TGF-β は肝星細胞を筋線維芽細胞様に形質転換(肝星細胞の活性化)させる働きをもっている。連続的な TGF-β 刺激により肝星細胞の ECM の産生および MMP の阻害因子である tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMPs)-1, -2 の分泌が促進されるのに加え, MMP の分泌が抑制されることにより線維症が進行する<sup>5</sup>。さらに, 活性化された肝星細胞ではオートクラインにより, より多くの TGF-β の産生や分泌が引き起こされる<sup>1</sup>。

### TGF-β 活性化反応

TGF-β 活性化反応には, トロンボスポンジンやインテグリンなどの細胞接着分子が, それぞれ LAP の<sup>54</sup>LSKL<sup>57</sup> や<sup>244</sup>RGD<sup>246</sup>に結合し立体構造が変化することにより引き起こされる接着型活性化反応<sup>6,7</sup>と, セリンプロテアーゼ, MMP などのプロテアーゼによる LAP 切断を介する活性化反応がある。著者らは肝線維化動物モデルにセリンプロテアーゼ阻害剤(camostat mesilate)を投与すると線維症が抑制されることから, プラスミン(PLN)や血漿カリクレイン(PLK)による切断活性化が肝線維症に関与することを見出した<sup>8</sup>。さらに, PLN は TGF-β1 LAP の 56 番目のリシンと 57 番目のロイシンの間(K<sup>56</sup>-L<sup>57</sup>)を, PLK は 58 番目のアルギニンと 59 番目のロイシンの間(R<sup>58</sup>-L<sup>59</sup>)を切断することを明らかにした<sup>9</sup>。

2011 年, 潜在型 TGF-β1 分子の結晶構造が解かれ, LAP の<sup>46</sup>IEAIRGQILSKL<sup>57</sup>の αヘリックス構造と 59 番目のロイシンが疎水結合による TGF-β1 との会合に重要であることが報告された<sup>10</sup>。PLN や PLK による K<sup>56</sup>-L<sup>57</sup>や R<sup>58</sup>-L<sup>59</sup>の切断により αヘリックスの立体構造が変化し, 疎水結合が失われ潜在型複合体から活性化型 TGF-β1

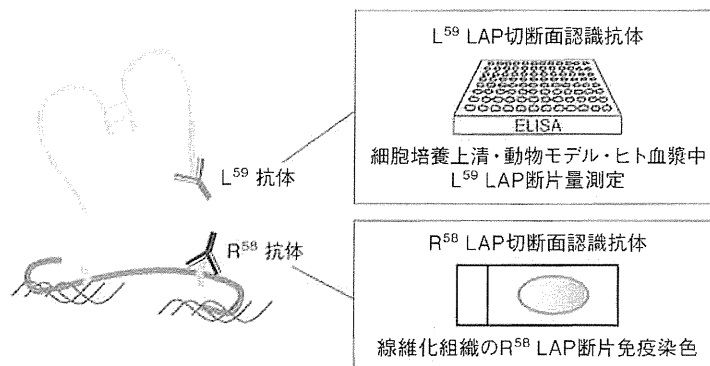


図 3 PLK依存TGF-β 活性化反応を標的としたfibrogenesis診断法の開発

肝線維症ではPLKによりTGF-β1 LAPのR<sup>58</sup>-L<sup>59</sup>が切断されTGF-βが活性化されることに着目し、①L<sup>59</sup>LAP断片を認識する抗体を用いた血液検査用ELISAキット、②R<sup>58</sup>LAP断片を認識する抗体を用いた組織免疫染色法、を開発した。

表 1 TGF-β 活性化反応を標的とした肝線維化の治療・診断法

TGF-β 活性化因子	制御・治療		組織検出	血液診断
	活性化因子を標的とする阻害剤	LAPを標的とする阻害剤		
トロンボスポンジン	報告なし	テトラアミノ酸(LSKLなど)	mRNA, 染色	不可能
インテグリン(αvβ6)	EMD527040, STX-100	報告なし	mRNA, 染色	不可能
セリンプロテアーゼ(PLN, PLK)	プロテアーゼ阻害剤(camostat mesilateなど)	低分子阻害剤, 抗体	染色	可能
MMP	プロテアーゼ阻害剤(GM6001など)	報告なし	染色	報告なし

が遊離するものと予想される。

### 治療・診断への応用

TGF-βを制御する方法として、①TGF-βの産生抑制、②TGF-β活性化反応の抑制、③受容体への結合ならびにシグナル伝達の抑制、の3つがあげられる。

これまでに③を標的とした薬剤が開発されてきたが、いずれもTGF-βによる病的な反応だけでなく、TGF-βの生理的機能をも阻害してしまうため、重篤な副作用が問題となってきた。これに対して、TGF-β活性化を標的とした治療法では、TGF-β1-3 LAPの配列が違うことやTGF-β活性化反応が刺激の種類や臓器によって異なるため、臓器特異的な治療・診断が可能であると考えられる。

TGF-β活性化反応を抑制する化合物にかんす

る研究では、Schuppanらが胆汁性肝線維症モデルを用いて線維化のステージ進行に伴う胆管上皮でのαvβ6インテグリン発現増加とαvβ6インテグリン拮抗阻害剤EMD527040による活性型TGF-β減少を伴う線維症改善を報告している<sup>11)</sup>。さらに、特発性肺線維症に対するヒト化抗αvβ6抗体であるSTX-100を用いた臨床試験が進行中である<sup>12,13)</sup>。一方、著者らはセリンプロテアーゼ阻害剤のcamostat mesilateなどが線維化抑制に有効であることを報告した<sup>14)</sup>。さらに、PLK依存TGF-β活性化反応においてTGF-β1 LAPのR<sup>58</sup>-L<sup>59</sup>間が切断されることに着目し、LAPのPLK切断配列およびその周辺に相互作用することによってTGF-β活性化反応を抑制する、肝線維症治療薬の探索を行っている(図2)。

また、著者らはTGF-β1 LAPのR<sup>58</sup>-L<sup>59</sup>切断により生じるR<sup>58</sup>をC末端にもつN末端側LAP断

片(R<sup>58</sup>LAP断片)と、L<sup>59</sup>をN末端にもつC末端側LAP断片(L<sup>59</sup>LAP断片)を認識する2種の特異抗体(R<sup>58</sup>, L<sup>59</sup>抗体)を作製し、これらの抗体を用いた肝線維症診断法を開発した。LAPがPLKにより切断を受けると、R<sup>58</sup>LAP断片はlatent TGF-β binding protein(LTBP)に結合したまま組織、細胞表面に残存すると考え、R<sup>58</sup>LAP断片認識抗体を用いた組織染色法を開発した。一方、L<sup>59</sup>LAP断片は血中に流出すると考え、L<sup>59</sup>LAP断片認識抗体を用いて血中L<sup>59</sup>LAP断片量測定用のELISAを開発した(図3)。健常人血漿25サンプルのLAP断片濃度は114±60pMであり、+2 SDまでの基準範囲を234pMと定めた。951検体の肝障害患者血漿では10%が基準範囲以上の高値を示し、そのうち慢性B型肝炎例では17%、慢性C型肝炎例では16%、それ以外では7%の検体でL<sup>59</sup>LAP断片濃度が基準範囲を超える高値を示した。肝障害患者の血漿中L<sup>59</sup>LAP断片濃度は、現在診断法として用いられている肝障害マーカーのALT活性、すでに蓄積してしまったIV型コラーゲン量、ヒアルロン酸とは相関は認めず、肝生検した症例のなかで、慢性B型肝炎、慢性C型肝炎症例計47例の新犬山分類に基づく組織の線維化と炎症の活動性および生検同時期の採血血漿のL<sup>59</sup>LAP断片濃度の関係を検討したところ、F1-2の線維化初期でL<sup>59</sup>LAP断片濃度はもっとも高い値を示した。このことから、血漿L<sup>59</sup>LAP断片が線維化初期の線維化活動度、すなわちfibrogenesisの血中バイオマーカーとして有用であることが示唆された。さらに、慢性C型肝炎症例のなかで、ペグインターフェロン/リバビリン併用療法の開始後6カ月では血漿LAP断片濃度は治療後低下傾向を示すことから、治療効果の判定にも有用であると考

えられる。

## おわりに

TGF-βはプロテアーゼのほかにも異なるメカニズムによって病的な活性化反応を示すことが知られている。表1にTGF-β活性化反応を標的とした肝線維化の治療・予防法、診断法開発の試みについて現在の知見をまとめた。これらの活性化反応についてさらなる研究が進み、臓器や疾患特異的な治療・診断法が開発されることを願っている。

謝辞：本研究は東京慈恵会医科大学の松浦先生、相澤先生、浦島先生、高木先生、永妻先生および東京大学の池田先生をはじめ諸先生方との共同研究によるものです。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

## 文献

- 1) Border, W. A. and Noble, N. A.: *N. Engl. J. Med.*, **331** : 1286-1292, 1994.
- 2) Walton, K. L. et al.: *J. Biol. Chem.*, **285** : 17029-17037, 2010.
- 3) Groppe, J. et al.: *Mol. Cell*, **29** : 157-168, 2008.
- 4) 秋田國治・他：最新医学, **55** : 1765-1770, 2000.
- 5) Hayashi, H. and Sakai, T.: *Front. Physiol.*, **3** : 12, 2012.
- 6) Ribeiro, S. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **274** : 13586-13593, 1999.
- 7) Yang, Z. et al.: *J. Cell Biol.*, **176** : 787-793, 2007.
- 8) Akita, K. et al.: *Gastroenterology*, **123** : 352-364, 2002.
- 9) 桐田暁子・他：肝・胆・膵, **65** : 211-218, 2012.
- 10) Shi, M. et al.: *Nature*, **474** : 343-351, 2011.
- 11) Patsenker, E. et al.: *Gastroenterology*, **135** : 660-670, 2008.
- 12) Hayden, T.: *Nat. Med.*, **17** : 18-20, 2011.
- 13) Crunkhorn, S.: *Nat. Rev. Drug Discov.*, **11** : 260, 2012.
- 14) Okuno, M. et al.: *Gastroenterology*, **120** : 1784-1800, 2001.

\* \* \*

# A Novel Human Hepatoma Cell Line, FLC-4, Exhibits Highly Enhanced Liver Differentiation Functions Through the Three-Dimensional Cell Shape

THOMAS LAURENT,<sup>1</sup> DAIKI MURASE,<sup>1</sup> SAYAKA TSUKIOKA,<sup>1</sup> TOMOKAZU MATSUURA,<sup>2</sup> SEISHI NAGAMORI,<sup>3</sup> AND HIROAKI ODA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Nutritional Biochemistry, Department of Applied Molecular Biosciences, Nagoya University, Nagoya, Japan

<sup>2</sup>The Jikei University of School of Medicine, Tokyo, Japan

<sup>3</sup>National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

We characterized three-dimensional human hepatoma cell lines, functional liver cell (FLC) cell lines, to establish a highly differentiated hepatoma cell line. We investigated the effect of extracellular matrix and cell morphology on liver-specific gene expression in FLC cells. The hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  (HNF-4 $\alpha$ ) and other liver-specific gene expressions were enhanced in spherical FLC-4 cells on EHS-gel, but other human hepatoma cells such as HepG2 did not show the enhancement. Importantly, the liver-specific gene expression levels in spherical FLC-4 cells cultured on EHS-gel were comparable to those of human liver and were much higher than those of other human hepatoma cell lines. The major matrix components and growth factors in EHS-gel did not affect cell shape and liver functions. To exclude any effect of the extracellular matrix, we made spherical FLC-4 cells by actin filament disruption. The actin-disrupted spherical cells also showed an enhanced liver-specific gene expression. We concluded that three-dimensional cell shape per se is one of the most important determinants of liver differentiation functions in FLC-4 cells. Cell morphology-dependent induction of liver-specific gene expression was mediated through microtubule organization. In conclusion, differentiation of FLC-4 human hepatoma cell line can be enhanced to a human liver-like level through the three-dimensional cell shape in a microtubule-dependent manner.

J. Cell. Physiol. 227: 2898–2906, 2012. © 2011 Wiley Periodicals, Inc.

Under usual culture conditions, human primary hepatocytes are not able to sustain stable hepatic functionality in a stable fashion because these cells undergo rapid dedifferentiation after isolation and cell proliferation arrests after few cell divisions (Marek et al., 2003; Chamuleau et al., 2005). Functional liver cell (FLC) cell lines (human hepatoma-derived cell lines from Japanese patients) were established several decades ago. FLC cell lines were chosen according to their ability to secrete liver-specific proteins, including alpha-fetoprotein (AFP) and  $\alpha$ 1-anti-trypsin (Hasumura et al., 1988; Homma et al., 1990). In addition, either in a monolayer or radial flow bioreactor (RFB), FLC cell lines seem to secrete these proteins at high levels. Hascilowicz et al. reported that FLC-4, FLC-5, and FLC-7 secrete apolipoprotein (apo) A-I, a crucial apolipoprotein for lipid transport, in a physiological manner only in an RFB culture system (Hascilowicz et al., 2005). FLC-5 has been demonstrated to strongly express cytochrome P-450 3A4 (CYP3A4), a drug-metabolizing enzyme, in three-dimensional culture systems. Further, CYP3A4 gene expression and activity were shown to be induced by rifampicin, and drug-induced CYP3A4 expression has been reported to be a sensitive marker of adult hepatocyte differentiation (Iwahori et al., 2003; Zamule et al., 2008).

A three-dimensional culture system can be a useful tool for enhancing the differentiation status of primary culture hepatocytes (Hamilton et al., 2001; Sidhu et al., 2004; Oda et al., 2008). Engelbreth-Holm-Swan (EHS)-gel derived from mouse EHS sarcoma induces noticeably increased expression of hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  (HNF-4 $\alpha$ ), albumin, and apo A-I in rat primary culture hepatocytes (Oda et al., 1995). An EHS-gel culture system improves functions and life span of rat primary hepatocytes; CYP expression, which contributes particularly to drug metabolism, bile acid synthesis, biosynthesis

of steroids, and lipid metabolism, was especially enhanced in hepatocytes on EHS-gel (Hamilton et al., 2001; Sidhu et al., 2004). In addition, EHS-gel enhanced sensitivity of CYP2B1/B2 to phenobarbital relative to type I collagen (TIC) coating in rat primary hepatocytes (Rodriguez-Antona et al., 2003; Oda et al., 2008).

HNF-4 $\alpha$  is an orphan nuclear receptor with a structure consisting of zinc finger motifs and is known to be a liver-enriched transcription factor. HNF-4 $\alpha$ , which binds to direct repeat-1 (DR-1) motif as a homodimer, remains an extremely conserved gene, suggesting that its integrity is necessary to maintain liver functions. Indeed, mutation of HNF-4 $\alpha$  triggers maturity-onset diabetes of the young (Stoffel and Duncan, 1997). This transcription factor has been reported to regulate

**Abbreviations:** FLC, functional liver cell; AFP, alpha-fetoprotein; RFB, radial flow bioreactor; apo, apolipoprotein; EHS, Engelbreth-Holm-Swan; HNF, hepatocyte nuclear factor; CYP, cytochrome P-450; TIC, type I collagen; DR, direct repeat; GFR, growth factor reduced; TIVC, type IV collagen; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; ECM, extracellular matrix; IDPN, 3-3'-iminodipropionitrile; FGF, fibroblast growth factor

\*Correspondence to: Hiroaki Oda, Laboratory of Nutritional Biochemistry, Department of Applied Molecular Biosciences, Nagoya University, Nagoya 464-8601, Japan.  
E-mail: hirooda@agr.nagoya-u.ac.jp

Received 2 February 2011; Accepted 13 September 2011

Published online in Wiley Online Library  
(wileyonlinelibrary.com), 29 September 2011.  
DOI: 10.1002/jcp.23033

many genes involved in drug metabolism, fatty acid transport, bile acid synthesis, bile acid secretion, and gluconeogenesis (Fraser et al., 1997; Trauner and Boyer, 2003; Watt et al., 2003; Bhalla et al., 2004). HNF-4 $\alpha$  is expressed during liver differentiation, suggesting that this factor is closely involved in the maintenance of adult liver-specific function (Watt et al., 2003).

As described above, FLC cell lines express several liver-specific functions at a high level. Therefore, we focused our study on characterizing liver functions in FLC cell lines with different cell architectures. We demonstrated that the differentiation status of FLC-4 cells as measured by HNF-4 $\alpha$  expression is influenced by their three-dimensional structures, and revealed that the maintenance of HNF-4 $\alpha$  expression and liver phenotype in these cells depends on the integrity of the cell morphology. Microtubule organization may be involved in the upregulation of HNF-4 $\alpha$  in spherical FLC-4 cells. Our findings suggest that FLC-4 cells are highly differentiated under three-dimensional culture conditions.

## Materials and Methods

### Cell culture

The development of FLC-4, FLC-5, and FLC-7 cell lines from hepatocellular carcinomas of Japanese patients has previously been reported (Hasumura et al., 1988; Homma et al., 1990). The cells were maintained in ASF104 serum-free medium (Ajinomoto Co. Ltd., Tokyo, Japan). Cells were seeded into 100-mm culture dishes (Corning Inc., Corning, NY) at 40% confluency (number of cells:  $2.7 \times 10^3 \text{ cm}^{-2}$ ) and cultured with medium changes every 3 days. HepG2 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Nissui Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan) supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), and 10% fetal bovine serum (FBS). H4IIE cells were grown in DMEM supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 5% FBS, and 5% newborn calf serum. Hep3B cells were cultured in DME/F12 medium supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), and 10% FBS. HuH-6 and HuH-7 cells were cultured in RPMI 1640 medium (Sigma, St. Louis, MO) supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), and 10% FBS. All cell cultures were cultured in 100-mm dishes at a constant temperature of 37°C under highly humidified 95% air and 5% CO<sub>2</sub>.

### Preparation of culture dishes

TIC-coated dishes were prepared by adding 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  TIC (Nitta Gelation, Osaka, Japan) to plastic dishes (Cat. No. 1029; Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ). EHS-gel-coated dishes were prepared as previously described (Oda et al., 2008). Growth factor-reduced Matrigel<sup>®</sup> (growth factor reduced (GFR)-EHS-gel)-coated dishes were prepared by plating 500  $\mu\text{l}$  (5 mg of protein/ml) of gel in a 100-mm dish (Cat. No. 1029; Falcon, Becton Dickinson). Substrata were then incubated at 37°C for 1 h before use. Mannuzza (1994) have reported on GFR-EHS-gel compositions. Type IV collagen (TIVC)-coated and laminin-coated dishes were purchased from Collaborative Biomedical Products (Bedford, MA).

### RNA isolation and RNA analysis

Total RNA was extracted according to the method of Chomczynski and Sacchi (1987) and RNA was subjected to northern blot analysis. Total RNA from human liver was purchased from Stratagene (La Jolla, CA). Complementary DNA (cDNA) clones of rat HNF-4 $\alpha$ , albumin, HNF-3 $\alpha$ , HNF-3 $\beta$ , C/EBP $\alpha$ , apo A-I, apo C-III, mouse apo E, and  $\beta$ -actin were labeled with [<sup>5</sup>- $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP using the Megaprimer DNA Labeling System (Amersham Life Science Inc., Arlington Heights, IL) and used for hybridization. Hybridized bands were visualized by autoradiography. Specific hybridization was quantified with BAS

2000 II (Fuji Film, Tokyo, Japan). Ethidium bromide-stained of 18S and 28S rRNAs were used as a reference.

### Real-time RT-PCR

Complementary DNA was prepared using a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. The forward and reverse primer sequences used in the real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay were as follows: human CYP3A4 forward primer: 5'-CCTTACATATACACACCCTTTGGAAG-3'; human CYP3A4 reverse primer: 5'-GGTTGAAGAAGTCCTCCTAAGCT-3'; human CYP3A7 forward primer: 5'-TGGGAAATGCTTTGTCC-TTC-3'; human CYP3A7 reverse primer: 5'-TGTCGGGATCT-GTGATAGCC-3'; human plasma membrane calcium-ATPase 1 PMCA1 forward primer: 5'-GAGCTGCGGGCTTCATG-3'; human PMCA1 reverse primer: 5'-TGGTGCAAATTCATAGACATCTC-3'. Real-time RT-PCR amplification was performed in ABI StepOne instrument (Applied Biosystems) in a 20- $\mu\text{l}$  containing 8  $\mu\text{l}$  of 80 $\times$  diluted cDNA, 10  $\mu\text{l}$  2 $\times$  Power SYBR Master Mix (Applied Biosystems), and 200 nM of each primer. The amplification program was 95°C for 10 min followed by 40 cycles of melting for 15 sec at 95°C, annealing at 54°C for CYP3A4, 55°C for CYP3A7, or 59°C for PMCA1 for 30 sec, and extension for 30 sec at 72°C. Quantitative RT-PCR melting curve data were collected to check the specificity of each PCR. Expression levels were calculated using the standard curve method. In addition, the expression of each of the chosen genes was normalized to that of PMCA1 as an internal control.

### Nuclear protein extraction

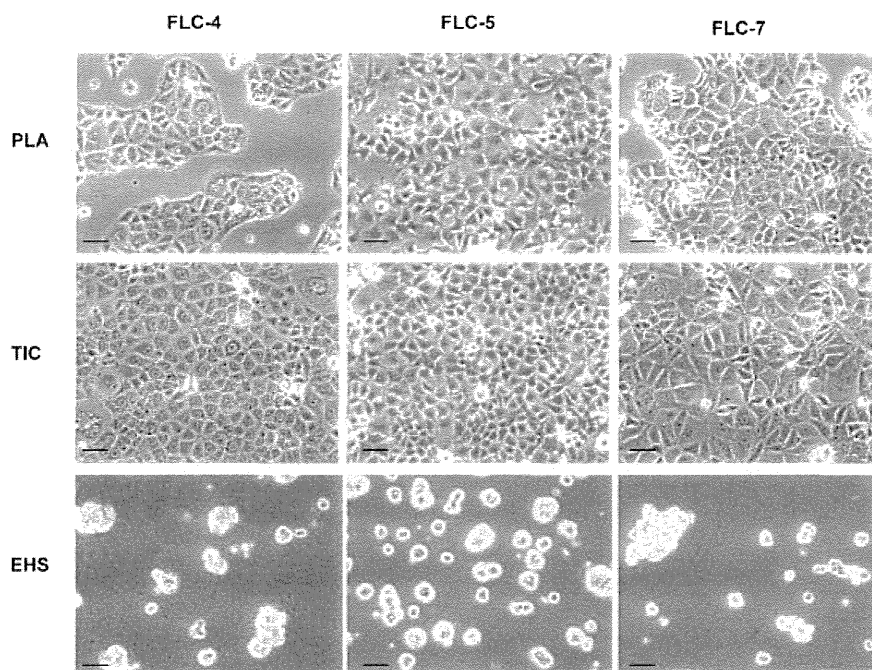
FLC-4 cells were harvested, washed with cold phosphate-buffered saline (PBS), and resuspended in 750  $\mu\text{l}$  of PBS. Samples were centrifuged at 600 rpm for 1 min and 30 sec, and the upper phase was discarded. Cells were resuspended in 150  $\mu\text{l}$  of hypotonic buffer (10 mM HEPES, pH 7.6; 0.25 mM EDTA; 0.1 mM EGTA; 10 mM KCl; 1 mM dithiothreitol; 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride; 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin; 0.3 U/ml aprotinin; 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pepstatin A; 100 mM NaF; 20 mM  $\beta$ -glycerophosphoric acid; 2 mM sodium orthovanadate; 20 mM *p*-nitrophenyl phosphate), and incubated on ice for 15 min. Samples were then mixed with 12  $\mu\text{l}$  each of 10% Nonidet P-40, incubated on ice for 5 min, and centrifuged for 4 min at 2,500 rpm. The nuclear pellet was resuspended in the same volume of ice-cold nuclear extraction buffer (20 mM HEPES, pH 7.6; 0.2 mM EDTA; 1 mM DTT; 2 mM PMSF; 0.1 mM EGTA; 25% glycerol; 250 mM NaCl; 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin; 0.3 U/ml aprotinin; 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pepstatin A; 100 mM NaF; 20 mM  $\beta$ -glycerophosphoric acid; 2 mM sodium orthovanadate, 20 mM pNPP), incubated on ice for 30 min with intermittent mixing, and centrifuged at 15,000 rpm for 10 min at 4°C. The upper phase was recovered, and the amount of protein evaluated by a Bradford method-based (Bradford, 1976) protein assay kit (Cat. No. 500-0006; Bio-Rad, Richmond, CA). The nuclear extract was either used immediately or stored at -80°C for later use.

### Western blot analysis and electrophoretic mobility-shift assay (EMSA)

The nuclear extract was subjected to Western blot analysis. Proteins were transferred to a membrane, that was then treated with goat anti-human HNF-4 $\alpha$  antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, sc-6556) and rabbit anti-goat IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase (EY Laboratories Inc., San Mateo, CA). Immunoreactive proteins were detected using an enhanced chemiluminescence detection system (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

DNA mobility shift assays were performed with the following double-stranded oligonucleotide: DR-1 (5'-agcTCAGGTCA-CAGGTAC-3', 5'-tcgaGTGACCTGTGACCTGA-3'). The





**Fig. 1.** Morphology of functional liver cell (FLC) cell lines cultured on various substrates. FLC-4, FLC-5, and FLC-7 cells were plated at 40% density and cultured for 48 h on uncoated (PLA), type-I collagen (TIC)-coated (TIC), or Engelbreth-Holm-Swan (EHS)-gel-coated (EHS) plastic dishes. Scale bar = 100  $\mu$ m.

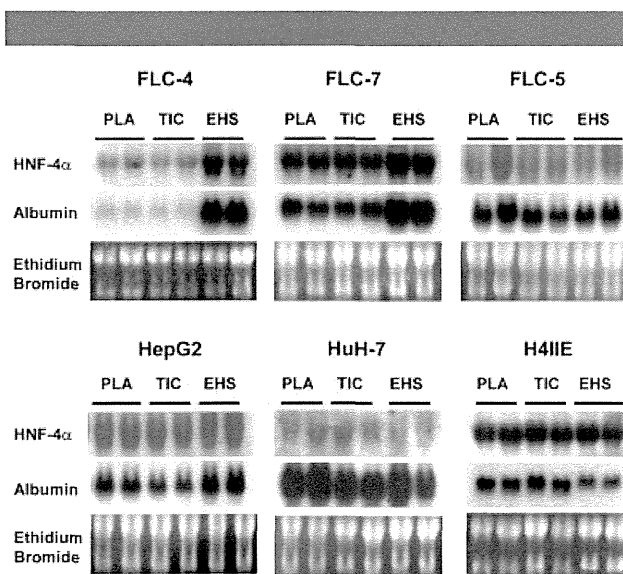
annealed oligonucleotides (2 pmol) were 5'-end-labeled with [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP by 0.4  $\mu$ l Klenow enzyme at 5 U/ $\mu$ l (New England Biolabs, Beverly, MA) and incubation for 15 min at 30°C. Labeled products were purified on a Sephadex G-50 column (Cat. No. 17-0573-02; GE Healthcare). FLC-4 cell nuclear extracts (5.0  $\mu$ g) (obtained as described above) were incubated with 500 ng of the nonspecific competitor poly(dI-dC) for 10 min on ice in 1  $\times$  binding buffer (20 mM HEPES-KCl, pH 7.6; 50 mM KCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10% glycerol). Then, an amount of  $^{32}$ P-labeled probe corresponding to 50,000 cpm was added and incubation was prolonged for 30 min on ice (in a final volume of 20  $\mu$ l). Where indicated, specific HNF-4 $\alpha$  goat polyclonal IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc.; sc-6556) was added to the reaction mixture, and incubated on ice for additional 30 min. The samples were then loaded onto a 5% polyacrylamide gel and subjected to electrophoresis in 0.5  $\times$  TBE (45 mM Tris base; 45 mM boric acid; 1 mM EDTA, pH 8.0). The gel was dried and bands were visualized by autoradiography.

## Results

### FLC-4 and FLC-7 cells cultured on EHS-gel showed enhanced expression of HNF-4 $\alpha$ and other liver phenotypic gene expression

After 48 h in culture, FLC-4, FLC-5, and FLC-7 cells showed a spread-out monolayer morphology when cultured on plastic and TIC. On the other hand, when cells were cultured on EHS-gel, cell shape became cuboidal and the cell density decreased relative to that on plastic and TIC (Fig. 1). HepG2, Hep3B, HuH-7, HuH-6, and H4IIE cells grown on EHS-gel also showed cuboidal morphologies and low densities (data not shown). HNF-4 is one of the most important liver-enriched transcription factors for liver differentiation in cultured hepatocytes (Oda et al., 1995; Nagaki and Moriwaki, 2008). We first compared HNF-4 $\alpha$  mRNA among different human

hepatoma cell lines, such as FLC-4, FLC-5, FLC-7, HepG2, and HuH-7 cells cultured on plastic. There was no significant difference in the HNF-4 $\alpha$  mRNA levels among these monolayer human hepatoma cell lines (data not shown).



**Fig. 2.** Upregulation of HNF-4 $\alpha$  and albumin mRNA levels by growth on EHS-gel was observed only in FLC-4 and FLC-7 cells. FLC-4, FLC-5, FLC-7, HepG2, HuH-7, and H4IIE cells were plated at 40% density on uncoated (PLA), TIC-coated (TIC), or EHS-gel-coated (EHS) plastic dishes. Total RNA was extracted, and mRNA levels were evaluated by northern blotting. Ethidium bromide-stained rRNA was used as a standard.

Cell shape-dependent induction of HNF-4 $\alpha$  gene expression and liver-phenotypic expression such as CYP2B1/2B2 has been observed in rat primary hepatocytes (Oda et al., 1995, 2008). Cell morphology and extracellular matrix (ECM) have not been reported to induce liver phenotypic expression in human hepatoma cell lines. We next examined the responsiveness of these hepatoma cell lines to ECM. Culture on EHS-gel, strongly and significantly induced expression of HNF-4 $\alpha$  and albumin in FLC-4 and FLC-7 cells only; no significant change was seen in any other hepatoma cell line, including FLC-5, HepG2, Hep3B, HuH-7, HuH-6, and H4IIE cells (Fig. 2 and data not shown). These results indicate that both FLC-4 and FLC-7 cells maintain the matrix- and cell shape-dependent induction of HNF-4 $\alpha$  gene expression characteristic of primary hepatocytes.

The mRNA levels of HNF-3 $\alpha$ , C/EBP $\alpha$ , AFP, apo A-I, and apo E were higher in FLC-4 cells grown on EHS-gel than in those grown on plastic and TIC (Fig. 3A). Similar results were obtained for FLC-7 cells (Fig. 3C). Moreover, CYP3A7 gene expression in FLC-4 cells was significantly elevated by growth on EHS-gel rather than plastic. EHS-gel showed a tendency to increase CYP3A4 mRNA levels in FLC-4 cells, although the difference was not significant (Fig. 3B). Our results have first demonstrated that FLC-4 and FLC-7 cells retain the capacity to enhance the differentiation phenotype through responsiveness to ECM or cell shape as primary hepatocytes have. HNF-4 $\alpha$  would be expected to play a central role in the induction of enhanced differentiation functions in FLC-4 and FLC-7 cells.

To characterize the induction of liver-specific gene expression in spherical FLC-4 cells on EHS-gel, time-course analysis was performed. HNF-4 $\alpha$  expression increased rapidly and reached a maximal level within 24 h in culture on EHS-gel. In contrast, albumin, AFP, and apo A-I mRNA levels increased more gradually but with a similar trend (Fig. 4A,B).

#### Spherical FLC-4 cells cultured on EHS-gel expressed markers of hepatocyte differentiation at a comparable level to human liver

Many researchers in the field of hepatology are aware that the available human hepatoma cell lines have many fewer phenotypic functions than human liver. Having largely succeeded in inducing a hepatic phenotype in FLC-4 cells by three-dimensional culture, we next compared the function of FLC-4 cells with that of human liver tissue. The HNF-4 $\alpha$  mRNA level in FLC-4 cells cultured on EHS-gel for 48 or 96 h reached the same level as in human liver (Fig. 4C), although FLC-4 cultured in monolayer showed a lower level of HNF-4 $\alpha$  mRNA than did human liver. HNF-3 $\alpha$  mRNA also reached a level similar to that in human liver in FLC-4 cells grown on EHS-gel. Albumin and apo A-I gene expression in FLC-4 cells cultured on EHS-gel was increased to levels comparable to, although still lower than those in human liver.  $\beta$ -actin gene expression was slightly stronger in FLC-4 cultured on plastic than FLC-4 cultured on EHS and human liver (Fig. 4C). Importantly, when all

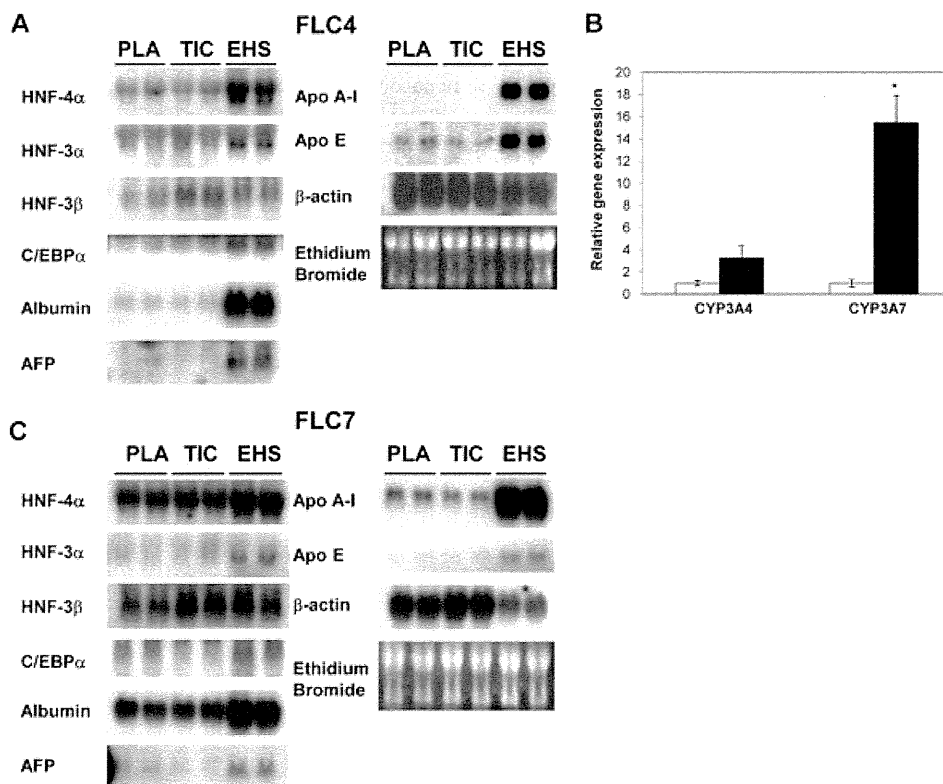
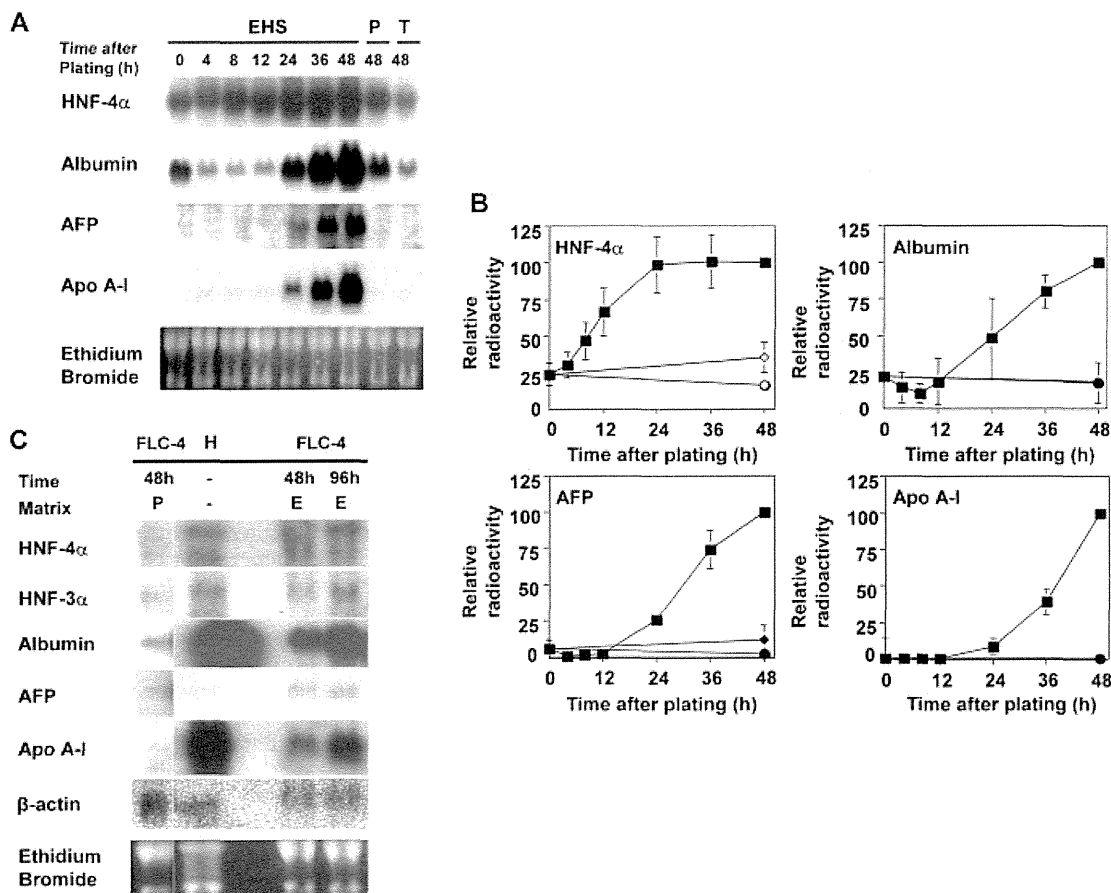


Fig. 3. FLC-4 and FLC-7 cells cultured on EHS-gel displayed enhanced liver-specific gene expression. FLC-4 cells or FLC-7 cells were plated at 40% density on uncoated (PLA), TIC-coated (TIC), or EHS-gel-coated (EHS) plastic dishes. Forty-eight hours after plating, total RNA was extracted, and mRNA levels of several liver-specific genes were investigated by northern blotting of FLC-4 (A) or FLC-7 (C) cells. Ethidium bromide-stained rRNA was used as a standard. The expression of human CYP3A4 and CYP3A7 was assessed by real-time RT-PCR in FLC4 cells cultured for 48 h on EHS-gel or plastic-coated dishes. The results are expressed as the mean (SEM) of three independent experiments. Expression levels were normalized to PMCA1 gene expression. Differences were analyzed by Student's *t* test; \**P* < 0.05 compared with control. The open bars and filled bars show the relative gene expression levels on uncoated plastic and EHS-gel, respectively (B).



**Fig. 4.** Liver-specific gene expression in spherical FLC-4 cells cultured on EHS-gel increased in a time-dependent manner and reached levels comparable to those in human liver. FLC-4 cells were plated at 40% density and cultured for 4–48 h on EHS-gel-coated dishes (EHS), or for 48 h on uncoated (P), or TIC-coated (T) plastic dishes. The expression of HNF-4 $\alpha$ , albumin, AFP, and apo A-I was assessed by northern blotting (A). Band intensities were quantified relative to the mRNA level at 48 h. Curves depict gene expression in FLC-4 cells cultured on uncoated (diamond), TIC-coated (circle), and EHS-gel-coated (square) plastic dishes. Bars indicate standard errors (B). Cells were plated at 40% density and the expression levels of various liver-specific genes compared by northern blotting, between FLC-4 cells cultured on an EHS-gel-coated dish (E) for 48 or 96 h and human liver tissue (H) (C). In northern blot experiments, ethidium bromide-stained rRNA was used as a standard.

genes examined here were compared, the expression of liver-specific genes in spherical FLC-4 cells were comparable and very similar to those in human liver.

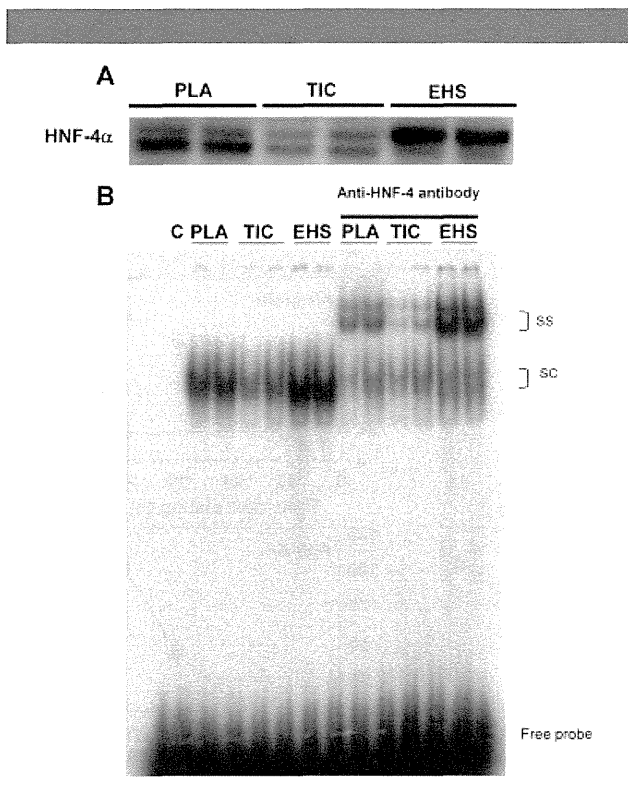
**Upregulation of DNA-binding activity of HNF-4 $\alpha$  in spherical FLC-4 cells on EHS-gel**

To confirm the protein level and DNA binding activity of HNF-4 $\alpha$  in FLC-4 cells on EHS-gel, Western blot analysis and EMSA were performed. The nuclear HNF-4 $\alpha$  protein level was increased in FLC-4 cells grown on EHS-gel (Fig. 5A). To investigate the HNF-4 $\alpha$  activity, we performed EMSA and a supershift assay with anti-HNF-4 antibody. A DR-1 double-stranded oligonucleotide was used as a probe in order to obtain sufficient binding, although other nuclear receptors can bind to this sequence. A strong band shift was observed in FLC-4 cells grown on EHS-gel, and the supershift assay with anti-HNF-4 antibody confirmed that HNF-4 $\alpha$  binding activity was strongest in spherical FLC-4 cells grown on EHS-gel (Fig. 5B). These results demonstrated that HNF-4 $\alpha$  mRNA, HNF-4 $\alpha$  protein, and HNF-4 $\alpha$  DNA binding activity were all increased in spherical FLC-4 cells cultured on EHS-gel.

**Single matrix components or growth factors in EHS-gel were not involved in the induction of HNF-4 $\alpha$  gene expression in FLC-4 cells cultured on EHS-gel**

EHS-gel is well known to contain different ECM components including laminin, TIVC, entactin, and heparan sulfate proteoglycans. To determine whether any single matrix component is responsible for the cell shape determining and its differentiation functions, FLC-4 cells were cultured on the major ECM components of EHS-gel, laminin, and TIVC. FLC-4 cells grown on plastic, TIC, TIVC, and laminin displayed a flat, spread-out morphology, while cells cultured on EHS-gel exhibited a rounded morphology (Fig. 6A). FLC-4 cells cultured on TIC, TIVC, and laminin showed lower expression levels of the hepatic function-related genes investigated above than those cultured on EHS-gel. These results clearly demonstrate that the major ECM components of EHS-gel are not individually responsible for the enhanced differentiation function, and that spherical morphology itself correlates with the phenotypic expression of FLC-4 cells.

EHS-gel contains not only several kinds of ECM but also several growth factors (Mannuzza, 1994). To elucidate whether



**Fig. 5. Upregulation of HNF-4 $\alpha$  protein level and DNA binding activity in FLC-4 cells grown on EHS-gel.** FLC-4 cells were plated at 40% density and cultured for 48 h on TIC-coated (TIC), uncoated (PLA), or EHS-gel-coated (EHS) plastic dishes. Nuclear proteins were extracted, and HNF-4 $\alpha$  protein level was evaluated by Western blotting (A). Electrophoretic mobility-shift assay (EMSA) was performed using a radiolabeled DR-1 double-stranded oligonucleotide, and a supershift assay using anti-HNF-4 antibody was performed. "SS" and "SC" indicate supershifted HNF-4 complex and shifted complex, respectively. "C" indicates a sample without any nuclear extract (B).

these growth factors could mediate the induction of the hepatic phenotype by EHS-gel, we compared the effect of EHS-gel with that of GFR-EHS-gel, which has fewer growth factors. FLC-4 cells grown on GFR-EHS-gel showed the same spherical morphology as those grown on EHS-gel (Fig. 6C). As shown in Figures 2–4, FLC-4 cells grown on EHS-gel expressed higher levels of HNF-4 $\alpha$ , HNF-3 $\alpha$ , albumin, AFP, and apo A-I mRNA than did spread-out monolayer cells grown on uncoated plastic. There were no noticeable differences between cells cultured on EHS-gel and GFR-EHS-gel in the expression of these genes (Fig. 6D). This result indicated that the growth factors reduced in GFR-EHS-gel were not responsible for the spherical cell morphology and differentiation functions. As GFR-EHS-gel still contains some growth factors, we were not able to exclude the possibility that the remaining growth factors in GFR-EHS-gel were responsible for the hepatocyte phenotype of the EHS-gel-cultured cells.

In conclusion, our data suggested that spherical cell morphology and/or EHS-gel constituents other than the major ECM components or growth factors are primarily responsible for liver-specific gene expression.

#### Signals of cell shape were transmitted to HNF-4 $\alpha$ via microtubule organization

To obtain insight into the intracellular signaling pathways that sense and transmit information on cell morphology, we

investigated the impact of cytoskeletal organization on expression of liver-specific genes. We treated spherical FLC-4 cells cultured on EHS-gel with three different cytoskeleton-disrupting reagents: colchicine, which disrupts microtubules, cytochalasin B, which disrupts actin filaments, and 3-3'-iminodipropionitrile (IDPN), which disrupts intermediate filaments. Treatment with colchicine completely suppressed cell shape-dependent induction of HNF-4 $\alpha$  mRNA, HNF-4 $\alpha$  protein, and DNA-binding activity of HNF-4 $\alpha$  (Fig. 7A–C), while treatment with cytochalasin B or IDPN did not substantially affect any step of HNF-4 $\alpha$  regulation. As previously observed,  $\beta$ -actin was higher in cells grown on TIC and plastic, while its mRNA level was enhanced after treatment with colchicine (Fig. 7A). These data clearly demonstrate that the spherical cell shape-dependent induction of HNF-4 $\alpha$  expression was transmitted through the microtubule organization.

Finally, to make sure that cell morphology itself controls HNF-4 $\alpha$  gene expression in the absence of EHS-gel, we treated spread-out monolayer FLC-4 cells cultured on plastic with cytochalasin B, which makes monolayer cells spherical by disrupting the tension of actin filaments. The treated cells were converted to a spherical morphology, similar to that of cells grown on EHS-gel (Fig. 7D). HNF-4 $\alpha$  gene expression and HNF-4 $\alpha$  activity were boosted by cytochalasin B so that they reached the same expression level as observed in cells cultured on EHS-gel (Fig. 7E,F). In contrast,  $\beta$ -actin gene expression was slightly downregulated in cells grown on EHS-gel and was not affected by cytochalasin B treatment (Fig. 7E). Even when not cultured on EHS-gel, spherical FLC-4 cells produced by disrupting actin filaments showed enhanced HNF-4 $\alpha$  gene expression and activity. These results confirm that the spherical cell shape per se regulates HNF-4 $\alpha$  activity and phenotypic expression of FLC-4 cells.

#### Discussion

Human hepatocyte cell lines exhibiting sufficiently hepatic functions are required to establish a practical systems for artificial liver support system and drug discovery (Nagamori et al., 2000). Many hepatoma cell lines have been established, but their phenotypic functions have generally been very low compared with that of human liver. Moreover, for application in humans, bovine fetal serum must be eliminated from the culture medium. We have established FLC hepatoma cell lines from Japanese patients that can be cultured in a serum-free medium (Hasumura et al., 1988). These FLC cells show highly differentiated phenotypes (Homma et al., 1990; Iwahori et al., 2003). As we recently found that the phenotypic expression of FLC hepatomas can be enhanced by three-dimensional culture, we characterized the properties of FLC-4 cells grown in a three-dimensional culture system.

We used EHS-gel, a reconstituted basement membrane gel, to culture the hepatoma cell lines examined herein in a three-dimensional configuration (Fig. 1). However, only FLC-4 and FLC-7 cells responded to three-dimensional culture by upregulating liver-specific gene expression (Fig. 3). Both FLC cell lines showed enhanced expression of the HNF-4 gene (Figs. 2 and 3). In rat primary hepatocytes, three-dimensional spherical cell shape is important in liver-specific gene expression (Oda et al., 1995, 2008). Our results indicated that, among the human hepatoma cell lines examined, only FLC-4 and FLC-7 cells retained their spherical cell shape-dependent induction of hepatocyte functions. These two cell lines may be more similar than the other established human hepatoma cell lines to normal hepatocytes. Because FLC cells have a well-differentiated basal phenotype (Hasumura et al., 1988; Homma et al., 1990), the phenotypic function of these cells would be able to reach the human liver levels.