

図 1. オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖および遊走に対する酢酸鉛の影響
 生後 2 日齢ラット前脳矢状面切片脳室下帯に NIT-eGFP ウィルスを滴下し酢酸鉛 (3, 10 μM) 存在下で 3 日間培養し、eGFP(+) および eGFP(+)O1(+) 細胞数を計測した (A)。酢酸鉛 (3, 10 μM) により eGFP(+) 細胞数は濃度依存的に減少した。また、eGFP(+)O1(+) 細胞数も濃度に依存して減少した。eGFP(+) 細胞における O1(+) 細胞の割合を算出した (B)。eGFP(+) 細胞における O1(+) 細胞の割合は 3, 10 μM とともに同程度減少していた。*:p<0.05, **:p<0.01 vs. control, N=6, Tukey's test following ANOVA

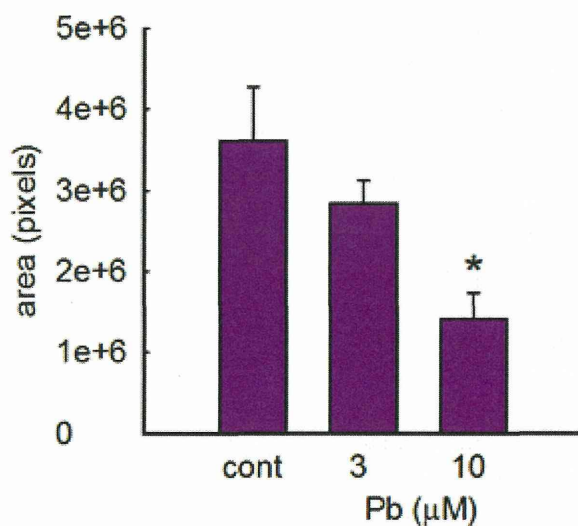


図 2. オリゴデンドロサイト前駆細胞遊走に対する酢酸鉛の影響
 遊走後の eGFP(+)O1(+) 細胞を線で結んだ際の最大面積を遊走のパラメーターとしたところ、濃度依存的に遊走が阻害されていた。*:p<0.05 vs. control, N=6, Tukey's test following ANOVA

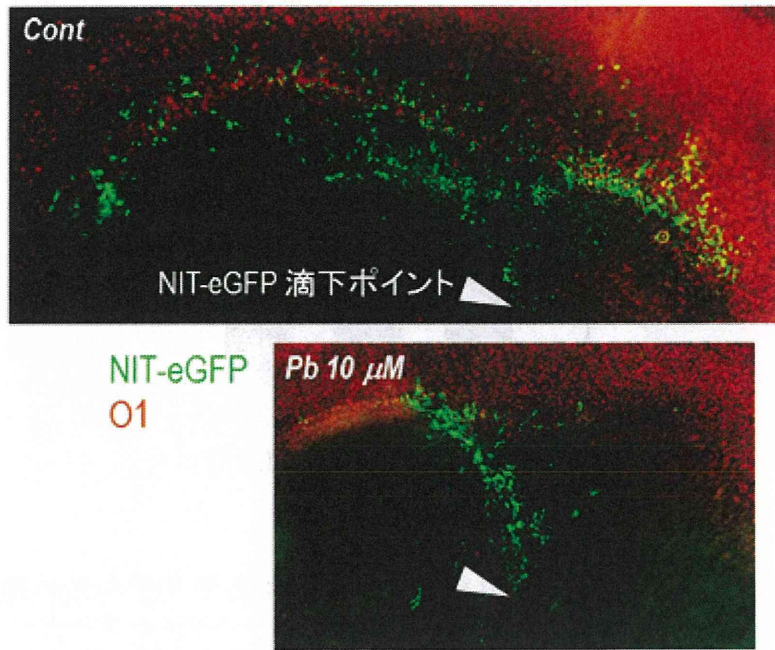


図 3. 酢酸鉛を適用した培養前脳矢状面切片の eGFP および O1 による典型的な蛍光免疫組織化学染色像

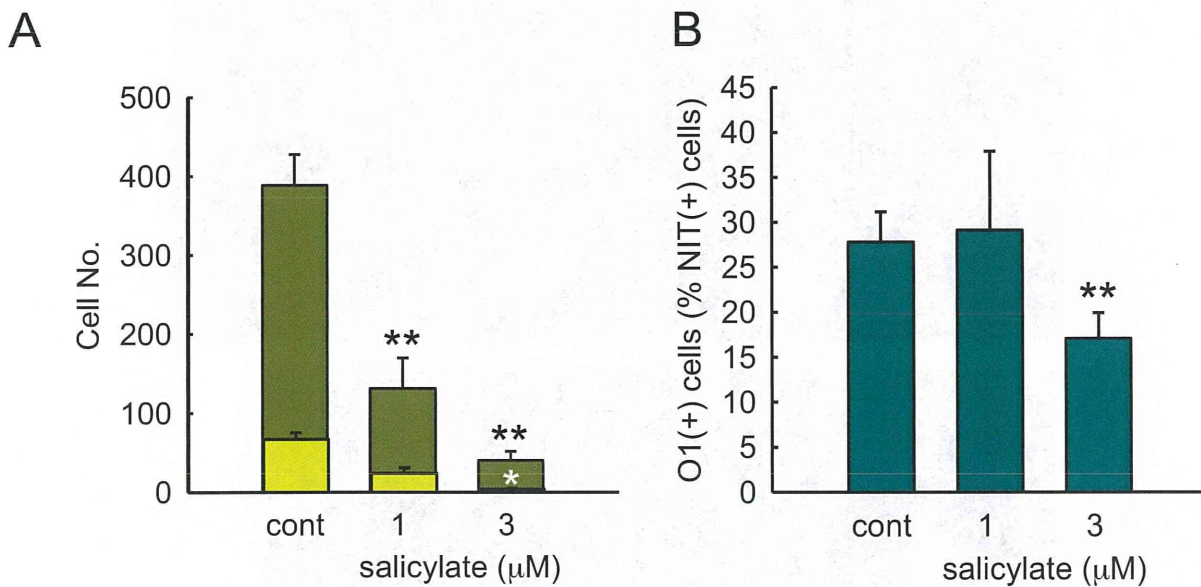


図 4. オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖および遊走に対するサリチル酸の影響
 生後 2 日齢ラット前脳矢状面切片脳室下帯に NIT-eGFP ウィルスを滴下しサリチル酸ナトリウム (1, 3 μM) 存在下で 3 日間培養し、eGFP(+) および eGFP(+)O1(+) 細胞数を計測した (A)。サリチル酸 (1, 3 μM) により eGFP(+) 細胞数は濃度依存的に減少した。また、eGFP(+)O1(+) 細胞数も濃度に依存して減少した。eGFP(+) 細胞における O1(+) 細胞の割合を算出した (B)。eGFP(+) 細胞における O1(+) 細胞の割合は 3 μM で顕著に減少していた。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. control, N=6, Tukey's test following ANOVA

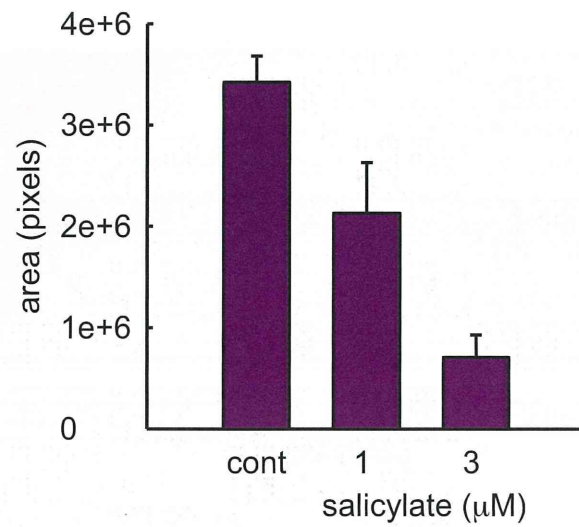


図 5. オリゴデンドロサイト前駆細胞遊走に対するサリチル酸の影響
 遊走後の eGFP(+)O1(+) 細胞を線で結んだ際の最大面積を遊走のパラメーターとしたところ、濃度依存的に遊走が阻害される傾向を示した。*: $p < 0.05$ vs. control, $N=6$, Tukey's test following ANOVA

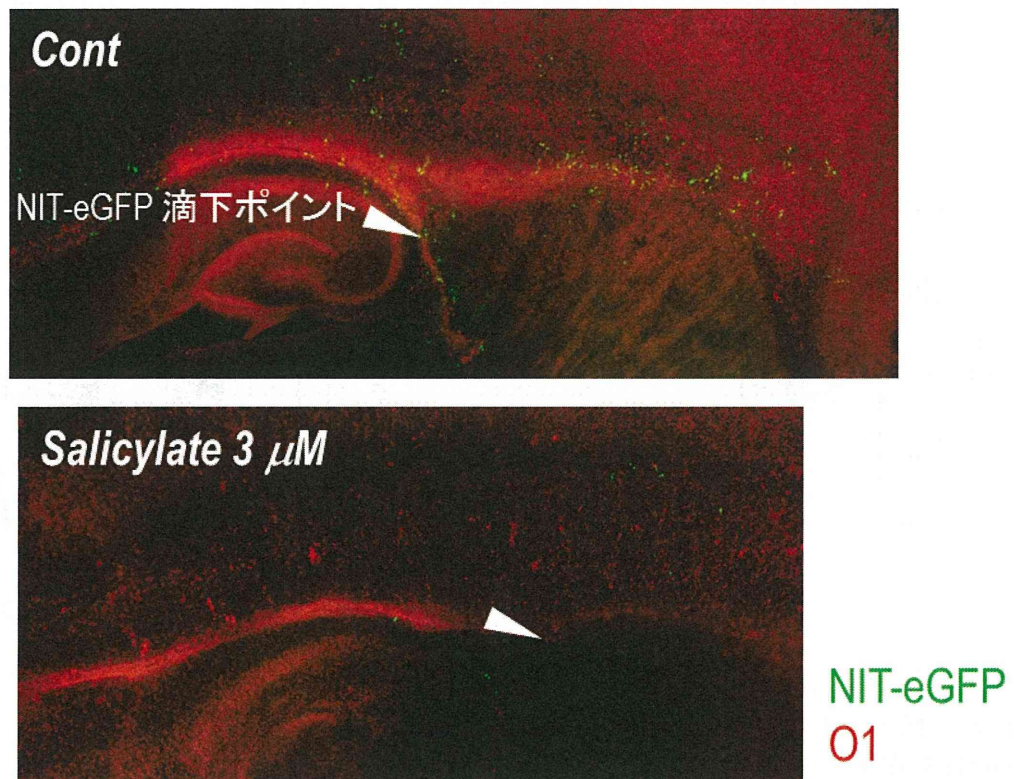


図 6. サリチル酸を適用した培養前脳矢状面切片の eGFP および O1 による典型的な蛍光免疫組織化学染色

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

神経幹／前駆細胞を用いた化学物質評価システムの構築

研究分担者 諫田 泰成 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第二室長

研究要旨

本研究において、発達神経毒性が懸念される化学物質として鉛、銅を用いて、ヒト胎児性癌細胞の生細胞数、糖輸送、酸素消費量の影響を検討した。その結果、酸素消費量の低下が最も高感度のマーカーであったことから、酸素消費量は毒性評価に応用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、子供の学習障害や自閉症などの発達障害が増加しているが、その原因として化学物質の関与が指摘されている(Environ Health Perspect, 2012, 120: a258-60)。脆弱な発達期の胎児、小児期においては中枢神経系が未完成であるため、化学物質により長期あるいは遅発性の影響が懸念される。

現在までの化学物質のリスク評価は主として実験動物の行動実験などの結果に基づいているが、多数の動物とコスト、時間がかかるのが問題である。さらに、評価すべき化学物質は多数あり、簡便、低コスト、スループット性の高い評価手法の開発が必要である。化学物質の毒性発現メカニズムに基づいたアッセイ系を構築すれば、環境中の化学物質がヒト健康に及ぼす影響の予測性の向上が期待される。

神経幹／前駆細胞は、胎児および成体に存在する未分化な細胞で神経細胞などへの分化能を有する。中枢神経系の発達に加えて、学習などの高次機能に寄与することが知られており、発達期に化学物質に暴露されて神経幹／前駆細胞に影響が出る場合は長期にわたり中枢神経毒性が出る可能性が考えられる。従って、ヒト神経幹／前駆細胞はアッセイ系構築に有用なソースと考えられる。

有機スズ化合物は船底などの防汚塗料として使用され、海洋汚染や魚介類への残留が問題となっている。我が国においては、1990年より「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（化審法）の第二種特定化学物質に指定された。有機スズ化合物の1種であるトリブチルスズ(TBT)を投与された妊娠ラットから生まれてきた子供には行動異常が報告されている (Toxicol Lett, 1991, 55,

109-115)。現在、TBTは使用が制限されているが、船舶などに大量に使用されたため環境に大量に残存しており、ヒト血中にも数10nM存在している (Environ Res, 1999, 81, 108-116)。しかしながら、TBTの毒性機構は明らかになっていない。

そこで我々は、神経幹／前駆細胞のマーカーNestinを発現しているヒト未分化細胞を用いて、TBTの曝露による毒性発現メカニズムを検討してきた。昨年度において、TBTの毒性を評価するマーカーとして酸素消費量を明らかにした。本年度は、酸素消費量のメカニズムとして、上流に位置する解糖系に対するTBTの影響を検討した。さらに、他の金属毒性に応用できるのか明らかにするために、化学物質として鉛と銅を追加して、これまでに得られた指標を比較検討した。

B. 研究方法

1. 細胞培養

ヒト胎児性癌細胞 NT2/D1 は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)に 10% fetal bovine serum (FBS, Biological Industries, Ashrat, Israel)、100U/ml penicillin (Gibco BRL, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)、100 µg/ml streptomycin (Gibco BRL) を加えた培地にて培養した。

2. メタボローム解析

解糖系の代謝物質として、グルコース 6リン酸 (G6P)、フルクトース 6リン酸 (F6P) の量は Human Metabolome Technologies 社で開発した CE-MS を用いて定量した。

3. 糖輸送活性

糖輸送活性は、2-デオキシグルコース (2-DG) の蛍光アナログである 2-NBDG の取り込みによって測定した。

4. 酸素消費量

酸素消費量は、細胞外フラックスアナライザー (Seahorse Bioscience 社) を用いて、酸素消費速度 OCR (Oxygen Consumption Rate) により解析した。専用の 96 穴プレートに細胞を播種後、化学物質を添加し、24 時間後に OCR の測定を行った。

C. 研究結果

1. 有機スズ化合物による解糖系の代謝産物の低下

ヒト胎児性癌細胞を用いて有機スズ化合物の曝露により酸素消費量が低下したが、解糖系の低下によるものか明らかにするため、解糖系の代謝産物の量に対するトリブチルスズ (TBT) の影響を検討した。その結果、低濃度 (100nM) の TBT 曝露により G6P、F6P の量が低下した。一方、細胞毒性を示さない酢酸スズ(TA)はほとんど影響を示さなかった(図 1)。

2. TBT 曝露による糖輸送の低下

TBT による G6P 量の低下の可能性として、糖輸送活性の低下及びヘキソキナーゼの活性の低下の可能性が考えられる。そこで、それぞれの活性の測定を行った。その結果、TBT の曝露により有意な糖輸送活性の低下が認められたが、ヘキソキナーゼ活性は特に有意な変化を示さなかった(図 2)。従って、糖取込は TBT の毒性の指標となることが示唆された。

3. TBT 曝露による糖輸送のメカニズム

AMP-activated protein kinase (AMPK) は糖輸送体の細胞膜への局在に関与しているとの報告があることから(Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13, 251-62)、TBT 曝露による糖取込活性低下が AMPK を介しているのか検討した。TBT 曝露によって AMPK 活性が低下すること、AMPK 活性を上昇させる化合物 AICAR によって TBT による糖取込活性低下が回復したことから(図 3)、TBT の作用メカニズムとして AMPK を明らかにした。

4. 毒性評価指標の比較

化学物質として TBT に加えて鉛と銅を用いて、ヒト未分化細胞における生細胞数、糖輸送、酸素消費量に対する影響を検討し、最も感受性の高い指標を検討した。その結果、鉛および銅の曝露 (1 μ M、24 時間) により、酸素消費量の減少が認められた(図 4)。一方、生細胞数は 10 μ M まで濃度あげてもほとんど影響が認められなかった。糖輸送に関しては、Cu (10 μ M、24 時間) により減少したが、Pb はほとんど影響を与えなかった。従って、酸素消費量は、生細胞数、糖輸送よりも高感度な指標となる可能性が示唆された。

D. 考察

本研究において、ヒト未分化細胞を用いて、化学物質の毒性評価の指標の探索を行い、ミトコンドリアにおける酸素消費量を新たに見いだした。この酸素消費量は細胞が死なないうような nM オーダーの TBT による毒性が検出可能であり、非常に高感度であると考えられた。

TBT の作用点として AMPK を明らかにした。そのメカニズムとしては、TBT が直接阻害する可能性が考えられる。一方、AMPK は運動などの代謝亢進によって活性化される酵素であるので、細胞内の代謝低下によって間接的に活性が低下した可能性が考えられ、今後の課題である。

金属属性の指標にはミトコンドリアの活性が有用であり、低コスト、スクリーニング性の高い毒性評価手法となる可能性がある。しかしながら、酸素消費量の解析は現時点においては簡便とは言えず、非常に高額な機器を要する問題があるため、より簡便で高感度な指標の開発が期待される。

将来的には、OECD や EPA の発達神経毒性試験法に代替あるいは補完できるような評価系に発展させることが期待される。

E. 結論

本研究において、ヒト未分化細胞の酸素消費量を指標として、発達神経毒性が懸念される化学物質の毒性を評価できる可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

[1] S. Yamada, Y. Kotake, Y. Sekino, Y.

- Kanda, AMP-activated protein kinase-mediated glucose transport as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma cells. *Metallomics* (in press).
- [2] Y. Kanda. Cardiac differentiation of human iPS cells. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 141 (2013) 32-6.
- [3] Y. Kanda. Cancer Stem Cells - Fact or Fiction? Role of Cancer Stem Cells in Cancer Biology and Therapy. *Science Publishers* (2013) 1-22.
- [4] Y. Ihara, Y. Kanda, M. Seo, Y. Watanabe, T. Akamizu, Y. Tanaka. cAMP blocking but growth stimulating antibody; as another predisposing factor of Graves' disease (GD) -analysis using monoclonal TSH receptor antibodies derived from patients with GD. *Endocrine J*. 59 (2012) 571-7.
- [5] T. Kuroda, S. Yasuda, S. Kusakawa, N. Hirata, Y. Kanda, K. Suzuki, M. Takahashi, S. Nishikawa, S. Kawamata, Y. Sato. Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE* 7 (2012) e37342.
- [6] W. Lin, N. Hirata, Y. Sekino, Y. Kanda. Role of $\alpha 7$ -Nicotinic Acetylcholine Receptor in Normal and Cancer Stem Cells. *Current Drug Targets* 13 (2012) 656-65.
- [7] Y. Kanda. Cigarette smoke and breast cancer stem cells. *Journal of Women's Health Care* 1 (2012) e104.
- [8] Y. Kanda. Isolation and characterization of cancer stem cells using flow cytometry (Chapter6, p107-124). *Clinical Flow Cytometry - Emerging Applications, InTech* (2012).
- [9] 諫田泰成、ヒト幹細胞を用いた医薬品の安全性評価、*ファルマシア*、48 (2012) 862-7.
2. 学会発表
- [1] 諫田泰成, 山田茂, 平田尚也, 関野祐子, Embryonic carcinoma 細胞の増殖に対するトリブチルスズの影響. 第 39 回日本毒性学会学術年会, 仙台, 2012.
- [2] 諫田泰成, 山田茂, 関野祐子, トリブチルスズ毒性に対するメタボローム解析の応用, 第 3 回メタロミクス研究フォーラム, 東京, 2012.
- [3] 山田茂, 関野祐子, 諫田泰成, メタボロームを利用した有機スズ化合物による毒性機構の解析, 第 127 回薬理学会関東部会, 東京, 2012.
- [4] 山田茂, 関野祐子, 諫田泰成, 金属毒性に対するメタボロームの応用, 第 35 回日本分子生物学会, 福岡, 2012.
- [5] 山田茂, 関野祐子, 諫田泰成, ヒト胎児性癌細胞の糖輸送に対する有機スズの影響, 第 86 回日本薬理学会, 福岡, 2013.
- H. 知的財産の出願・登録状況
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし。
 3. その他
メタロミクス研究会若手奨励賞受賞(2012年8月)

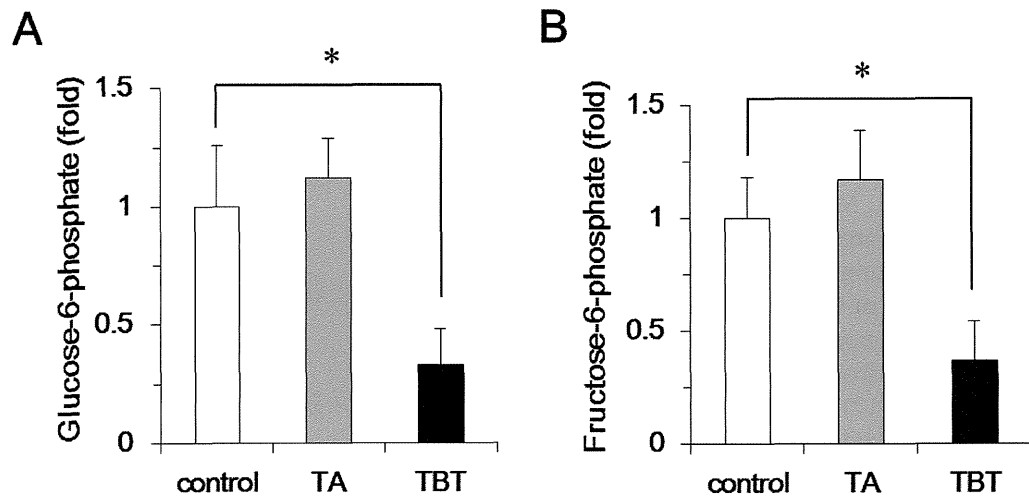


図1 解糖系の代謝産物に対するTBT曝露の影響
 (A) TBT曝露によるグルコース6リン酸量の低下
 (B) TBT曝露によるフルクース6リン酸量の低下

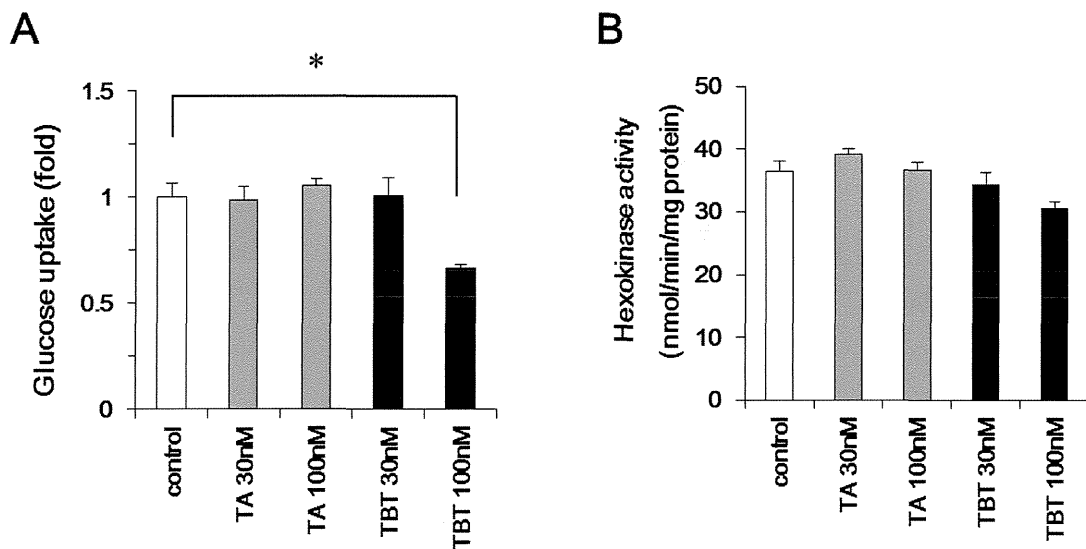


図2 解糖系の代謝産物に対する TBT 曝露の影響
 (A) TBT 曝露による糖輸送活性の低下
 (B) ヘキソキナーゼ活性に対する TBT 曝露の影響

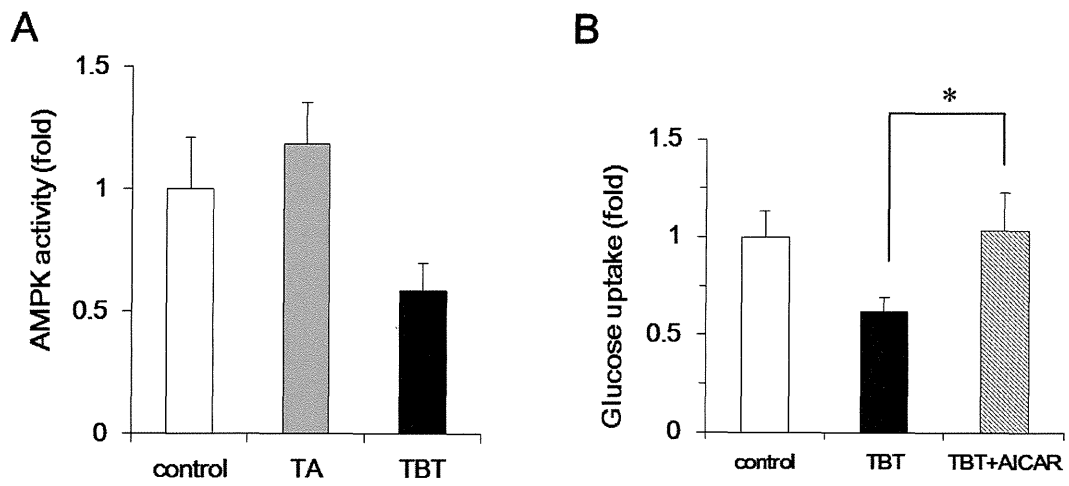
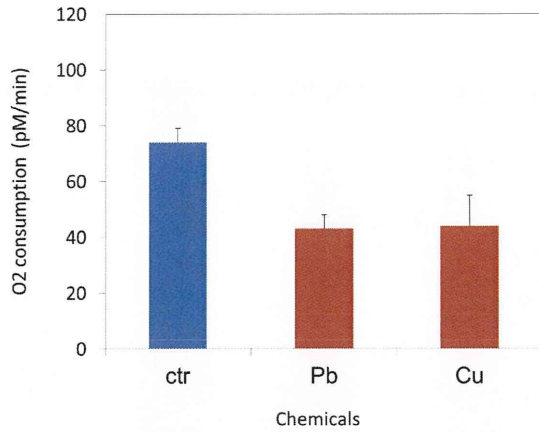


図3 TBTによる糖取込に対するAMPKの関与

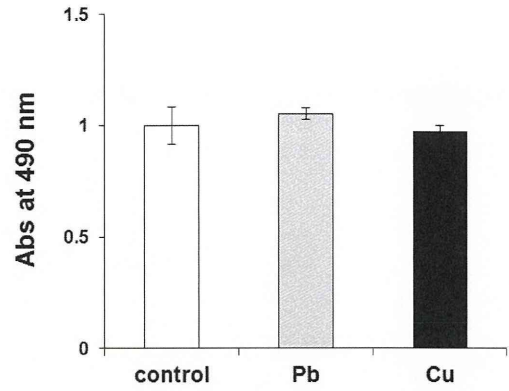
(A) TBT曝露によるAMPK活性の低下

(B) TBT曝露による糖輸送活性の低下に対するAMPK活性化剤AICARの影響

A



B



C

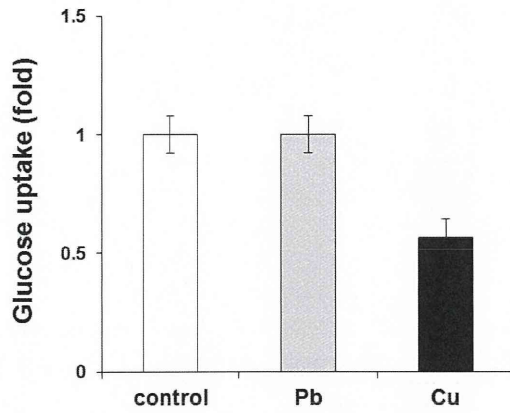


図4 酸素消費量に対する銅と鉛の影響

(A) 酸素消費量に対する鉛および銅曝露 (1 μ M、24 時間) の影響。

(B) 生細胞数に対する鉛および銅曝露 (10 μ M、24 時間) の影響。

(C) 糖取込に対する鉛および銅曝露 (10 μ M、24 時間) の影響。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

胎児肝細胞による化学物質への細胞応答のゲノミクス、メタボロミクス解析

研究分担者 石田 誠一 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第三室長
研究協力者 松下 琢 崇城大学生物生命学部 教授

研究要旨

化学物質の健康影響に対する感受性は、成体に比べて成長期の個体において高いと考えられている。本研究では、胎児・新生児においても重要な薬物代謝器官であるが成体とは機能に差異があることが知られている肝臓について、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法を確立することを目的とする。本年度は、昨年度に進めたメタボローム解析に、更に詳細な解析を加えるとともに、関連する遺伝子の発現解析により、胎児および成人肝細胞間の代謝機能の差異を明らかにした。また、化合物暴露実験を進めることにより、胎児期において特に感受性の高い候補化合物の選定を行った。メタボローム解析では、成人肝細胞がアミノ酸代謝過程で産生するアンモニアを主に尿素回路を通して代謝しているのに対し、胎児肝細胞由来の細胞では尿素回路が機能していないことを明らかにし、同回路を構成する酵素遺伝子の発現解析によっても同様な結論を得た。また、エネルギー代謝や化学物質代謝の第Ⅱ相反応においても、胎児および成人肝細胞間で差異があることを明らかにした。化合物暴露実験では、トリブチルスズ、アセトアミノフェン、バルプロ酸ナトリウムの3種の化合物が成人肝臓に比べ、胎児肝臓に対してより毒性を示しやすいことが示唆された。

A. 研究目的

化学物質の健康影響に対する感受性は、成体に比べて成長期の個体において高いと考えられている。また、成長期における健康被害は長期間にわたる場合や、恒久的な障害が起こる場合があるため、化学物質の適切な健康影響評価は非常に重要である。一方、個体の成長期は動物実験の結果からヒトへの外挿が難しい時期である。そのため、毒性発現メカニズムの解明に基づく評価法が必要であるが、体系的な方法は見あたらない。

本研究では、胎児・新生児においても重要な薬物代謝器官であるが成体とは機能に差異があることが知られている肝臓について、これまでに我々が実施してきた細胞機能の研究の成果を基礎にして、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法を確立することを目的とする。本年度は、昨年度に引き続き、メタボローム解析結果に関して、更に詳細な解析を加えるとともに、関連する遺伝子の発現解析により、胎児および成人肝細胞間の代謝機能の差異を確認した。また、化合物暴露実験を進めることにより、化学物質に対する感受性も胎児と成人肝細胞との間で異なることを明らかにした。

B. 研究方法

1. サンプル調製

（ヒト胎児肝細胞の単層培養）

ヒト胎児肝細胞（CS-ABI-3716）は、DSファーマバイオメディカル（株）より購入した。この細胞は、正常胎児肝臓6ドナー（妊娠週齢平均16週）に由来する。培養には、同社より購入したCSC Complete Medium（10% FBS含有、同一ロット）に、63 mg/L penicillin と 100 mg/L streptomycin を加えたものを用いた。ヒト胎児肝細胞の単層培養には、直径60 mmの培養ディッシュ（FALCON社製、付着細胞用）を用い、5% CO₂を含む気相下37°Cで、6日間培養を行った（Matsushita et al, 2003）。継代数は、6継代の細胞を使用し、播種密度は1 x 10⁵ cells/dish、培地交換は2日毎に行った。6日間培養した細胞を、5% mannitol 溶液で洗浄後、セルスクレーパーにより剥離し、メタボローム解析のサンプルとした。また細胞数は、トリパンブルー染色法で生細胞数を計数した。

（胎児肝細胞から肝芽細胞の誘導と単層培養）

上記と同じ条件でヒト胎児肝細胞の播種

後、培養4時間後に培地交換を行い、1 mM 酪酸ナトリウムを含んだ CSC Complete Medium で8日間培養を行うことで、肝芽細胞の誘導を行った (Kiyota et al, 2007)。その間、培地交換は、5日目までは2日毎に行い、それ以降は毎日行った。アルブミンとサイトケラチン 19 をマーカーとするフローサイトメーターでの解析では、1 mM 酪酸ナトリウムでの肝芽細胞の誘導効率は約30%である。8日間培養した細胞を、5% mannitol 溶液で洗浄後、セルスクレーパーにより剥離し、メタボローム解析のサンプルとした。また細胞数は、トリパンブルー染色法で生細胞数を計数した。

(肝芽細胞の三次元培養(Spheroid 培養))

肝芽細胞の三次元培養には、William's E を基本培地として、Insulin 10 mg/L, EGF 50 µg/L, Linoleic acid 50 µg/L, 63 mg/L penicillin, 100 mg/L streptomycin など含む Hormone Defined Medium (HDM 培地) を用いた (Matsushita et al, 2003, 2006)。ヒト胎児肝細胞を HDM 培地に懸濁し、1 mg/ml Poly-L-Glutamic acid 溶液で被覆した直径 60 mm の培養ディッシュ (IWAKI 社製、浮遊細胞用) に、 8×10^5 cells/dish の密度で播種した。播種後2日目に、1 mM 酪酸ナトリウムを含んだ HDM 培地に交換し、さらに6日間培養を行った。培地交換は2日毎に行った。培養後、5% mannitol 溶液で洗浄後、セルスクレーパーにより剥離し、遠心によって回収した後、メタボローム解析のサンプルとした。また細胞数は、0.1%クリスタルバイオレット溶液を用いて核数計数法によって算出した。

(ヒト成人肝細胞の培養)

メタボローム解析に用いたヒト成人肝細胞は、BIOPREDIC 社より購入したヒト非凍結肝細胞 (12.5 cm² フラスコ接着、製品番号 HEP220-FL12) 3ロットを使用した (ロット番号: HEP220523、HEP220524、HEP220527)。各ロットの基本情報を以下に示す。

HEP220523

Age: 81

Sex: Male

Ethnicity: Unknown

Liver pathology: Hepatocellular carcinoma

HEP220524

Age: 66

Sex: Male

Ethnicity: Unknown

Liver pathology: Hepatic metastases

HEP220527

Age: 62

Sex: Female

Ethnicity: Caucasian

Liver pathology: Hepatocellular carcinoma

細胞を受領後、培地を Incubation Medium (肝細胞培養用培地、製品番号 MIL214-100M) に交換し、3日間培養した。培地は毎日新鮮なものに交換した。培養3日目に細胞から解析用のサンプルを調製した。

化合物暴露実験には、BIOPREDIC 社より購入したヒト凍結肝細胞(HEP187219)を使用した。この細胞は、52歳女性の肝臓正常部位に由来する。細胞を BIOPREDIC 社の Basal hepatic cell medium (MIL600) に Additives for hepatocyte seeding medium (ADD221) を加えたものを用い、 0.5×10^4 cells/mL の密度で播種した。播種24時間後には培地を Basal hepatic cell medium に Additives for hepatocyte culture medium (ADD222) を加えたものに交換し、4日間培養した。

2. メタボローム解析

代謝物質の測定はヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ(HMT)社に委託した(委託試験名: CE-TOFMS による培養細胞のメタボローム解析、報告書番号: NIHSF-HMT-003)。

ヒト胎児および成人肝細胞から回収された代謝物質サンプル (n=3) は、-80°C の条件下で HMT 社に送付された。測定は、各サンプルとも約 2×10^6 個の細胞から回収した代謝物質について、CE-TOFMS (キャピラリー電気泳動—飛行時間型質量分析計) により行った。

測定により検出された 217 の候補化合物 (カチオン 99、アニオン 118) について、その相対的存在量を主成分分析により解析した。胎児肝細胞の単層培養と成人肝細胞間の比較は、t-検定 ($p < 0.05$) により行い、統計学的に有意な変動がみられた 47 化合物について、階層的クラスタリング解析を行った。階層的クラスタリング解析は、距離の定義に Pearson uncentered を用い、群平均距離法 (Average) により行った。

3. 細胞からの RNA の調製および尿素回路を構成する酵素遺伝子の発現解析

(細胞からの RNA の調製)

細胞の全 RNA は、RNeasy mini Kit (Qiagen) により調製し、RNA 量および純度は、Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nyxor Biotech)により測定した。

(リアルタイム PCR による酵素遺伝子の発現解析)

各 RNA サンプルに由来する cDNA は、ランダムプライマー用いた High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems)により合成した。リアルタイム PCR 解析は、ABI7900 Real Time PCR System (Applied Biosystems)により行った。各遺伝子のプライマー/プローブセット (TaqMan Gene Expression Assay) は、それぞれ ASS1 (argininosuccinate synthase 1, Hs01597989_g1)、ASL (argininosuccinate lyase, Hs00902699_m1)、ARG1 (Arginase, Hs00968979_m1)、OTC (Ornithine transcarbamylase, Hs00166892_m1)を使用した。

4. 化合物暴露実験

トリブチルスズ、アセトアミノフェン、バルプロ酸ナトリウム、酢酸鉛(II)三水和物、all-trans-レチノイン酸、パーフルオロオクタンスルホン酸カリウムの6種の化合物(図1、表1)について、胎児および成人肝細胞に対する暴露実験を行い、各化合物のIC₅₀値を算出した。

細胞は、胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より誘導された肝芽細胞の単層培養およびスフェロイド培養、成人肝細胞の単層培養を用いた。各細胞について、培地中に各化合物を様々な濃度で添加し、3日間培養した。その後、セルカウンティングキット-8(同仁化学)を用いて、相対的細胞数を計測した。

(倫理面への配慮)

ヒト胎児肝細胞は、米国ABI社がインフォームドコンセントを得て研究用に取得したものを、DSファーマバイオメディカル社より購入している。

ヒト初代肝細胞は市販されているものであり、ドナー情報は連結不可能匿名化されており倫理的に問題はない。しかし、適宜倫理委員会に申請をし、審査承認を経たのち実施している。

C. 研究結果

1. サンプル調製

ヒト胎児肝細胞(CS-ABI-3716)は、DSファーマバイオメディカル(株)より購入した。播種後6日間培養を行い、各サンプルの調製をした。

同じヒト胎児肝細胞を、1mM酪酸ナトリウムを含んだCSC Complete Mediumで8日間培養を行うことで、肝芽細胞の誘導を行った(Kiyota et al, 2007)。8日間培養した細胞より各サンプルの調製をした。

肝芽細胞の三次元培養では、ヒト胎児肝細胞を1mg/ml Poly-L-Glutamic acid溶液で被覆した直径60mmの培養ディッシュで8日間培養した。培養2日目から培地に1mM酪酸ナトリウムを添加し肝芽細胞へ誘導した。8日間培養した細胞より各サンプルの調製をした。

ヒト成人肝細胞は、当所で受け入れ後、3日間毎日培地を交換しつつ培養した。3日目に、各サンプルの調製をした。

2. メタボローム解析

CE-TOFMSを用いたメタボローム解析により検出されたイオン性の代謝物質は、その精密質量と移動時間をHMT社の有する代謝物質データベースに登録されたおよそ900の化合物と比較することにより候補化合物が同定され、そのピークの大きさから相対的存在量が算出された。検出された217の化合物(カチオン99、アニオン118)について主成分分析により解析したところ、第一主成分により胎児肝細胞と成人肝細胞の二群に分けられた(data not shown)。第一主成分の因子負荷量をもとに検出された代謝産物を序列化したところ、因子負荷量の大きい上位10位までの代謝産物には、Met, Gly, Asnなどのアミノ酸、2-Oxoglutaric acid, Fumaric acid, Malic acid, Succinic acidなどのTCA回路の代謝産物、Glycerophosphocholine, Glucuronic acidなどが含まれていた(data not shown)。

次に、検出された217の化合物について、胎児肝細胞と成人肝細胞間の比較をt検定(p < 0.05)により行うとともに、階層的クラスタリングにより解析した。その結果、47の化合物が有意差ありと判定され、そのうち31化合物が成人肝細胞で増加し、16化合物が減少した(図2、表2)。

変動率の大きかった上位十位までには、

ornithine (46.9-fold, p=0.001), Cys (22.2-fold, p=0.0004), glycerophosphocholine (13.1-fold, p=0.01), glycerol 3-phosphate (13.1-fold, p=0.0004), urea (7.7-fold, p=0.029), guanidoacetic acid (6.4-fold, p=0.0007)などの化合物が含まれていた。

また、下位十位までには、 β -Ala (0.03-fold, p=0.008), O-acetylcarnitine (0.11-fold, p=0.021), carnitine (0.19-fold, p=0.029)などの化合物が含まれていた。

各代謝経路別にみると、まず、尿素回路とその周辺の代謝産物に胎児肝細胞と成人肝細胞間で変化が見られた。成人肝細胞では胎児肝細胞に比べ、ornithine (46.99-fold, p=0.001), urea (7.70-fold, p=0.029), guanidoacetic acid (6.39-fold, p=0.0007), citruline (4.82-fold, p=0.034)などの代謝産物が増加する一方で、クレアチン経路の代謝産物である creatine (0.44-fold, p=0.02), phosphocreatine (0.11-fold, p=0.035)が減少していた(図3)。

エネルギー代謝に関連する代謝物では、解糖系/糖新生の中間代謝物である glucose 6-phosphate (2.48-fold, p=0.042)が、TCA回路の中間代謝物である、fumaric acid (4.03-fold, p=0.014), 2-oxoglutaric acid (3.36-fold, p=0.02), malic acid (2.89-fold, p=0.034), succinic acid (2.56-fold, p=0.034)などが増加していた。

3. 細胞からのRNAの調製および尿素回路を構成する酵素遺伝子の発現解析

メタボローム解析のサンプル調製と同時に細胞から回収したRNAサンプルを用いて、成人肝細胞において代謝物の相対的存在量の増加がみられた尿素回路について、回路を構成する4種の酵素遺伝子の発現量をReal-Time PCRにより測定し、胎児肝細胞と成人肝細胞間で比較した。その結果、argininosuccinate synthase 1 (ASS1, 2.59-fold, p=0.01), argininosuccinate lyase (ASL, 9.89-fold, p=0.026)の2遺伝子で胎児肝細胞に比べ成人肝細胞で発現量が高く、残りの2種の遺伝子 arginase (ARG1), ornithine transcarbamylase (OTC)は、胎児肝細胞ではほとんど発現しておらず、成人肝細胞でのみ発現が確認された(図4)。

4. 化合物暴露実験

上記のメタボローム解析の結果を踏まえ、胎児肝臓に影響を及ぼすことが推察される

化合物による暴露実験を行った。細胞は、胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より誘導された肝芽細胞の単層培養およびスフェロイド培養、成人肝細胞の単層培養の4種を用いた。胎児肝細胞由来の3種の細胞は、胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より誘導された肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養と分化させるにしたがって、成人肝細胞に機能的に近づくことが報告されている

(Kiyota et al, 2007, Matsushita et al, 2003)。そこで、胎児肝臓に影響を及ぼすことが推察されるトリブチルスズ、アセトアミノフェン、バルプロ酸ナトリウム、酢酸鉛(II)三水和物、all-trans-レチノイン酸、パーフルオロオクタンスルホン酸カリウムの6種の化合物(図1、表1)について暴露実験を行い、各化合物のIC₅₀値を算出した(図5)。その結果、トリブチルスズ、アセトアミノフェン、バルプロ酸ナトリウムの3種の化合物は、胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より誘導された肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養、成人肝細胞の単層培養の順に、IC₅₀値が上昇し、成人肝細胞から胎児肝細胞に向けて化合物に対する感受性が高くなることが示された。酢酸鉛(II)三水和物では、胎児肝細胞由来の3細胞間で変化はなく、成人肝細胞に比べ感受性が高くなった。all-trans-レチノイン酸、パーフルオロオクタンスルホン酸カリウムは、他の4種の化合物とは逆に成人肝細胞で最も感受性が高かった。また、胎児肝細胞より誘導された肝芽細胞のスフェロイド培養は、他の胎児肝細胞由来の細胞と異なり成人肝細胞と同程度の感受性を示した。以上の結果から、トリブチルスズ、アセトアミノフェン、バルプロ酸ナトリウムの3種の化合物が胎児肝臓に対してより毒性を示しやすいことが示唆された。

D. 考察

本年度は、昨年度のメタボローム解析結果にさらに詳細な解析を加えるとともに、関連する遺伝子の発現解析により、胎児および成人肝細胞間の代謝機能の差異を明らかにした。また、メタボローム解析結果に基づき、化合物暴露実験を実施することにより、胎児期において特に毒性発現の高い化合物の選定を行った。

メタボローム解析では、検出された217の化合物について、胎児肝細胞と成人肝細胞間

で比較することにより、47 の化合物の変動を確認した。そのうち 31 化合物が成人肝細胞で増加し、16 化合物が減少していた。変動率の大きかった上位十位までには、ornithine (46.9-fold, $p=0.001$), urea (7.7-fold, $p=0.029$), guanidoacetic acid (6.4-fold, $p=0.0007$)の「尿素回路、アミノ酸代謝 (Glu, Gln, His, Pro)」に属する 3 化合物、Cys (22.2-fold, $p=0.0004$), glycerophosphocholine (13.1-fold, $p=0.01$), glycerol 3-phosphate (13.1-fold, $p=0.0004$)の「アミノ酸代謝 (Gly, Ser, Cys)」に属する 3 化合物が、下位十位までには、 β -Ala (0.03-fold, $p=0.008$), O-acetylcarnitine (0.11-fold, $p=0.021$), carnitine (0.19-fold, $p=0.029$)の「アミノ酸代謝 (Asp, Ala, Lys)」に属する 3 化合物が含まれていた (図 2、表 2)。

各代謝経路別にみると、まず、尿素回路とその周辺の代謝産物に胎児肝細胞と成人肝細胞間で変化が見られた。成人肝細胞では胎児肝細胞に比べ、ornithine (46.99-fold, $p=0.001$), urea (7.70-fold, $p=0.029$), guanidoacetic acid (6.39-fold, $p=0.0007$), citrulline (4.82-fold, $p=0.034$)などの代謝産物が増加する一方で、クレアチン経路の代謝産物である creatine (0.44-fold, $p=0.02$), phosphocreatine (0.11-fold, $p=0.035$)が減少していた (図 3)。尿素回路の各酵素遺伝子の発現量を Real-Time PCR により測定し、胎児肝細胞と成人肝細胞間で比較したところ、argininosuccinate synthase 1 (ASS1, 2.59-fold, $p=0.01$), argininosuccinate lyase (ASL, 9.89-fold, $p=0.026$)の 2 遺伝子で胎児肝細胞に比べ成人肝細胞で発現量が高く、残りの 2 種の遺伝子 arginase (ARG1), ornithine transcarbamylase (OTC)は、胎児肝細胞ではほとんど発現しておらず、成人肝細胞でのみ発現が確認された (図 4)。これらの結果は、成人肝細胞がアミノ酸代謝の過程で細胞内に産生するアンモニアを主に尿素回路およびクレアチン経路により代謝する一方で、胎児肝細胞で尿素回路が機能しておらず、細胞内で産生するアンモニアを代謝できないことが示唆される。また、成人肝細胞で胎児肝細胞に比べ、クレアチン経路の下流の代謝産物である creatine, phosphocreatine がともに減少しているのは、成人肝細胞でこれらの代謝産物を排出する能力が高まっているためと考えられるが、詳細は不明である。

エネルギー代謝に関連する代謝物では、TCA 回路の中間代謝物である、fumaric acid (4.03-fold, $p=0.014$), 2-oxoglutaric acid (3.36-fold, $p=0.02$), malic acid (2.89-fold, $p=0.034$), succinic acid (2.56-fold, $p=0.034$)などが、解糖系/糖新生の中間代謝物である glucose 6-phosphate (2.48-fold, $p=0.042$)とともに増加していた。一方、脂肪酸の β -酸化に関与する代謝物のうち、diacylglycerol, triacylglycerol の合成に必要とされる glycerol 3-phosphate (13.12-fold, $p=0.0004$)は成人肝細胞で増加し、脂肪酸の細胞質からミトコンドリアへの運搬に必要とされる carnitine (0.19-fold, $p=0.029$), O-acetylcarnitine (0.11-fold, $p=0.021$)は減少していた。このことは、成人肝細胞では脂肪酸の酸化によりエネルギーを産生するよりも脂肪を蓄える方向に反応が進んでいると考えられる。また、成人肝細胞での解糖系/糖新生から TCA 回路に至る経路の代謝物の増加も糖新生による余剰エネルギーの保存が、グリコーゲン合成という成人肝細胞の特徴を表しているものと思われる。

胎児肝臓では、成人肝臓に比べ化学物質代謝の第 II 相反応のうち、グルクロン酸抱合能が低いことが知られている。今回の測定結果でも、glucuronic acid の相対的存在量が成人肝細胞で高く (1.87-fold, $p=0.041$)、胎児肝細胞においてはグルクロン酸抱合能が低いことが示唆された。この胎児肝細胞における代謝産物のプロフィールは、胎児期の肝機能を反映しているものと思われる。

次に、化学物質代謝の第 II 相反応の一つであるグルタチオンの生合成経路では、Cys の相対的存在量が胎児肝細胞に比べ成人肝細胞で増加していた (22.2-fold, $p=0.0004$)。Cys からは、 γ -glutamylcysteine synthetase と glutathione synthetase により γ -Glu-Cys, glutathione が合成されるが、これらの代謝産物は、成人肝細胞で減少傾向にあった。一方、2-aminobutyrate (2-AB)は、成人肝細胞で増加傾向 (2.2-fold, $p=0.238$)であったが、Cys と同様な代謝を受け 2-AB より生成される γ -Glu-2-AB, ophthalmic acid は、成人肝細胞でのみ検出され、胎児肝細胞では検出されなかった (図 6)。Glutathione の生合成経路では、生成された glutathione が γ -glutamylcysteine synthetase をフィードバック阻害することにより、glutathione の生成量を調節しているこ

とが知られている。成人肝細胞では、生成された glutathione が消費されることにより、 γ -glutamylcysteine synthetase に対するフィードバック阻害が起こらず、2-AB から γ -Glu-2-AB を経て ophthalmic acid が生成される一方、胎児肝細胞では、生成された glutathione により γ -glutamylcysteine synthetase が阻害され、同酵素により生成される、 γ -Glu-2-AB、さらには下流の ophthalmic acid が検出されないことが考えられる (図 6)。これらの結果は、glutathione 抱合により代謝される薬物の胎児肝臓での動態を研究するうえで重要な知見となりうる。

本研究は、個体の成長期における化学物質の健康影響評価法を確立することを目的としており、その端緒として胎児肝細胞と成人肝細胞間の代謝機能の差異をメタボローム解析によって明らかにしてきた。この結果を踏まえ、胎児肝臓に影響を及ぼすことが推察される化合物 (図 1、表 1) による暴露実験を行った (図 5)。今回使用した候補化合物のうち、トリブチルスズ、アセトアミノフェン、バルプロ酸ナトリウムの 3 種の化合物は、胎児肝細胞の単層培養、胎児肝細胞より誘導された肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養、成人肝細胞の単層培養の順に、 IC_{50} 値が上昇し、成人肝細胞から胎児肝細胞に向けて化合物に対する感受性が高くなることが示された。酢酸鉛 (II) 三水合物では、胎児肝細胞由来の 3 細胞間で変化はなく、成人肝細胞に比べ感受性が高くなった。*all-trans*-レチノイン酸、パーフルオロオクタンスルホン酸カリウムは、他の 4 種の化合物とは逆に成人肝細胞で最も感受性が高く、胎児肝細胞より誘導された肝芽細胞のスフェロイド培養も成人肝細胞と同程度の感受性を示した。以上の結果から、トリブチルスズ、アセトアミノフェン、バルプロ酸ナトリウムの 3 種の化合物が胎児肝臓に対してより毒性を示しやすいことが示唆された。

今後、今回得られた知見をもとに胎児肝臓に対して毒性を示しやすい化合物を暴露した細胞のメタボローム解析を進めることが必要と考えられる。また、本研究で得られた結果は、個体の成長期における化合物の毒性発現メカニズムを明らかにするとともに、化学物質の健康影響評価法を確立するうえで重要な知見となることが考えられる。

E. 結論

本年度は、昨年度に進めたメタボローム解析に、更に詳細な解析を加えるとともに、関連する遺伝子の発現解析により、胎児および成人肝細胞間の代謝機能の差異を確認した。また、化合物暴露実験を進めることにより、胎児期において特に感受性の高い候補化合物の選定を行った。

メタボローム解析では、成人肝細胞がアミノ酸代謝過程で産生するアンモニアを主に尿素回路を通して代謝しているのに対し、胎児肝細胞由来の細胞では尿素回路が機能していないことを明らかにし、同回路の遺伝子発現解析によっても同様な結論を得た。また、エネルギー代謝では、成人肝細胞が余剰なエネルギーを細胞内に蓄える一方、胎児肝細胞ではそのような傾向はみられなかった。化学物質代謝の第 II 相反応では、glutathione の合成が胎児肝細胞で抑制されていることが、同経路と同じ酵素を必要とする ophthalmic acid が胎児肝細胞で検出されないことから示唆された。

化合物暴露実験では、トリブチルスズ、アセトアミノフェン、バルプロ酸ナトリウムの 3 種の化合物が成人肝臓に比べ、胎児肝臓に対してより毒性を示しやすいことが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。

2. 学会発表

[1] S. Ishida, S.-R. Kim, T. Kubo, Y. Kuroda, M. Hojyo, A. Miyajima, T. Matsushita, Y. Sekino, The comprehensive analysis of the basal metabolic functions of human fetal and adult hepatocytes. 27th JSSX Annual Meeting in Chiba, 2012.

H. 知的財産の出願・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。

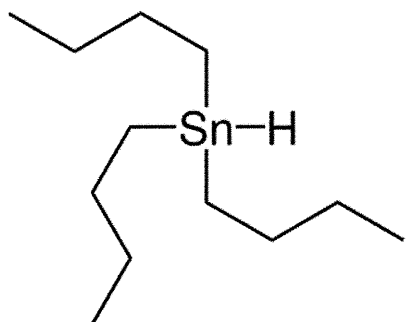
表1 暴露実験に使用した化合物の詳細

化合物	英語名	肝臓への影響、胎児への影響	機構、その他
トリブチルスズ	tributyltin	出生時の肝臓構造の破壊を導き、肝臓への脂質の蓄積が有意に増加	核内レセプターを介した内分泌系の混乱
アセトアミノフェン	acetaminophen	肝障害	CYPによる代謝産物がタンパク質、核酸と結合
バルプロ酸	valproic acid	致死的肝障害 催奇形性	脂肪酸の β -酸化を抑制 histone deacetylase (HDAC1)を直接的に阻害
酢酸鉛(II)三水和物	lead acetate trihydrate	胎盤を通過して胚に達し胎児に死亡をもたらす 催奇形性あり	チオール基(-SH)と強固に結合し、酵素の働きを阻害する
all-trans-レチノイン酸	all-trans retinoic acid	催奇形性、レチノイン酸症候群	ビタミンA誘導体
パーフルオロオクタン スルホン酸カリウム	perfluorooctanesulfonic acid, potassium salt	肝肥大	PPAR- α を介した脂肪酸代謝の異常

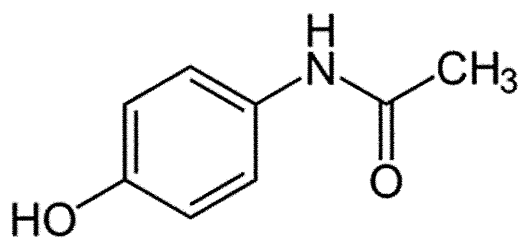
表2 胎児および成人肝細胞間で存在量が有意 (t-test, p<0.05) に
変化していた代謝産物の代謝経路ごとの分類

Pathway	Metabolite	Fold change
Urea cycle, Amino acid metabolism (Glu, Gln, His, Pro)	Ornithine	46.89
	Urea	7.70
	Guanidoacetic acid	6.39
	Citrulline	4.82
	Gln	2.82
	Urocanic acid	2.42
	Creatine	0.44
	GABA	0.15
	Phosphocreatine	0.11
Glycolysis/glyconeogenesis, Pentose phosphate pathway, TCA cycle	Fumaric acid	4.03
	2-Oxoglutaric acid	3.36
	Malic acid	2.89
	Succinic acid	2.56
	Glucose 6-phosphate	2.48
	Fructose 1,6-diphosphate	0.11
Other carbohydrate metabolism	N-Acetylneuraminic acid	5.14
	Glucuronic acid	1.87
	N-Acetylglucosamine 1-phosphate	0.47
Purine/pyrimidine metabolism	AMP	2.20
Nicotinic acid/nicotinamide metabolism	Nicotinamide	2.95
Amino acid metabolism (branched-chain amino acids)	Val	0.65
	2-Oxoisovaleric acid	0.38
Amino acid metabolism (Gly, Ser, Cys)	Cys	22.20
	Glycerophosphocholine	13.14
	Glycerol 3-phosphate	13.12
	Betaine	3.58
	O-Phosphoserine	3.16
	Met	2.07
	Gly	1.65
	Choline	1.28
Amino acid metabolism (Asp, Ala Lys)	Ala	7.12
	Asp	2.77
	Lys	1.95
	Carnitine	0.19
	O-Acetylcarnitine	0.11
	β -Ala	0.03
Others	Thiaproline	26.82
	Cysteine glutathione disulphide	19.38
	N8-Acetylspermidine	5.93
	Thiamine	5.69
	Methionine sulfoxide	2.95
	N-Acetyl- β -alanine	0.41
	Threonic acid	0.30
	Gly-Asp	0.23
	Diethanolamine	0.20
	Cyclohexylamine	0.18
	Pantothenic acid	0.13

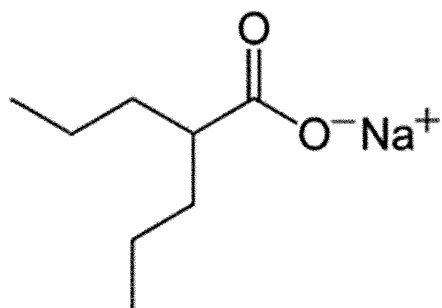
A, トリブチルスズ



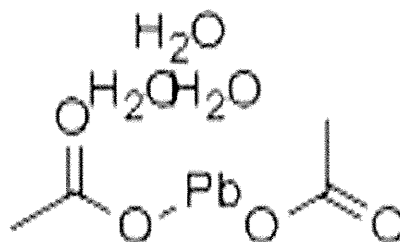
B, アセトアミノフェン



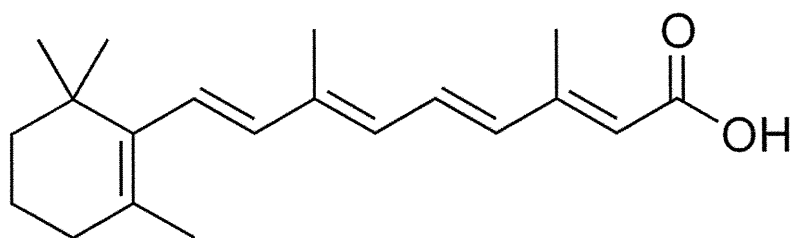
C, バルプロ酸ナトリウム



D, 酢酸鉛(II)三水和物



E, *all-trans*-レチノイン酸



F, パーフフルオロオクタンスルホン酸カリウム

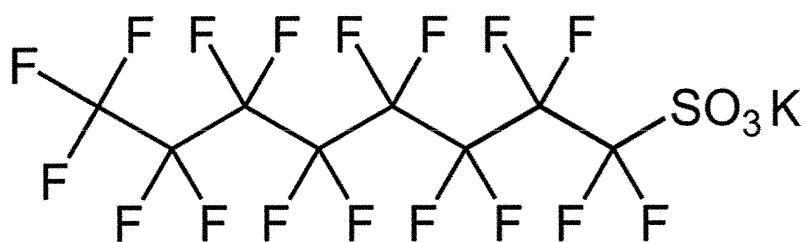


図1 暴露実験に使用した化合物。

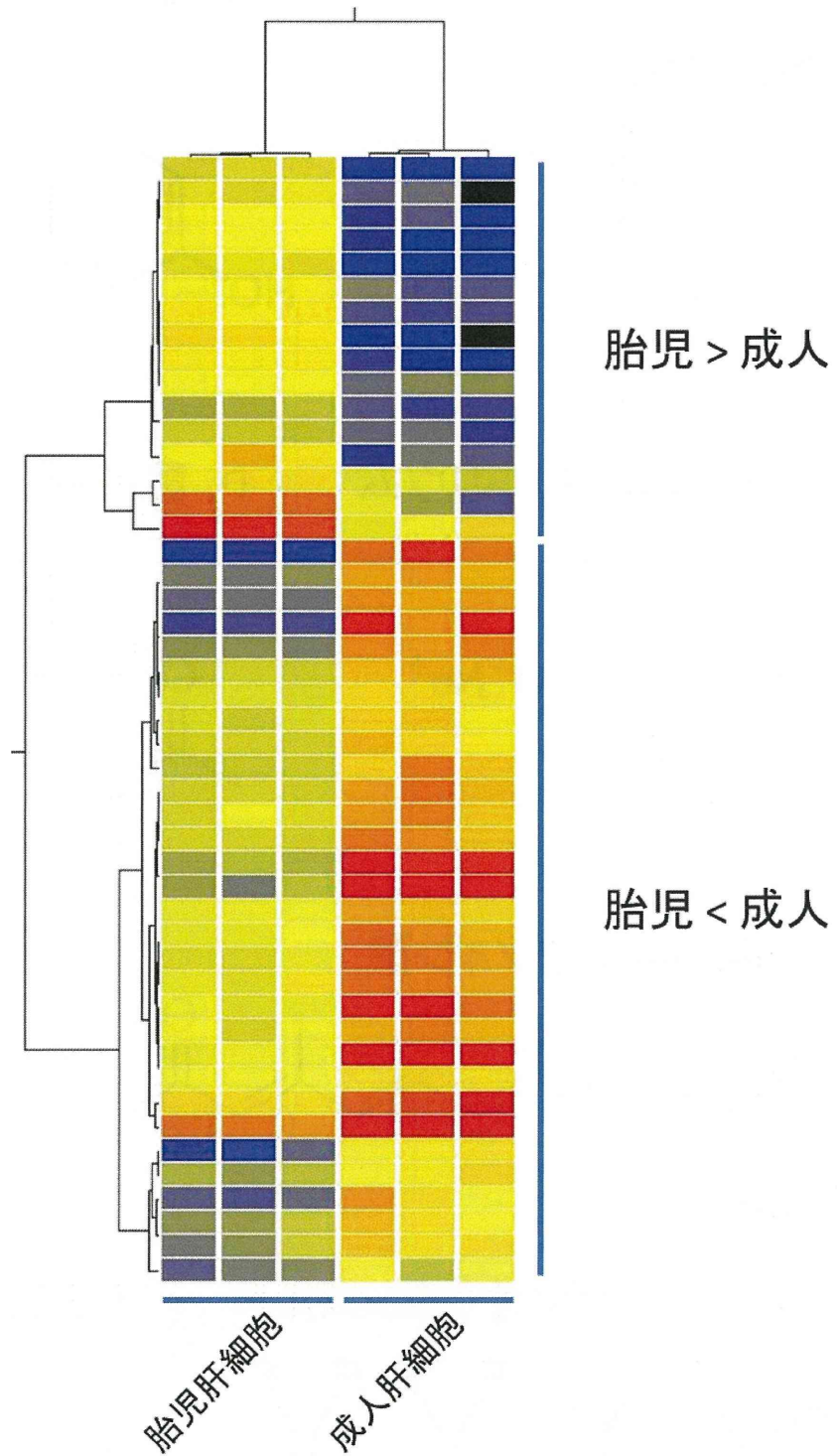


図2 胎児および成人肝細胞間で存在量が有意 (t-test, $p < 0.05$) に変化していた代謝産物の階層的クラスタリング。