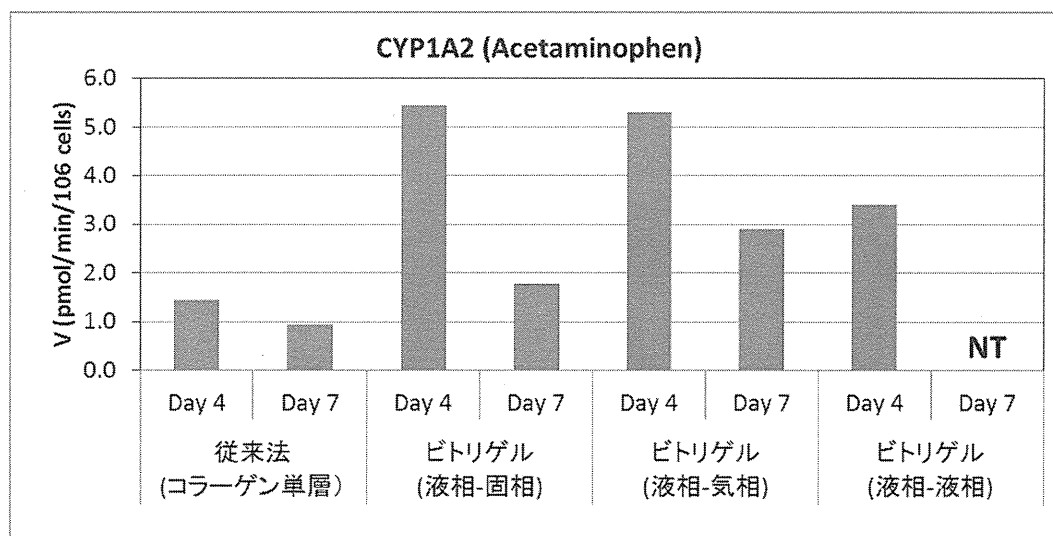


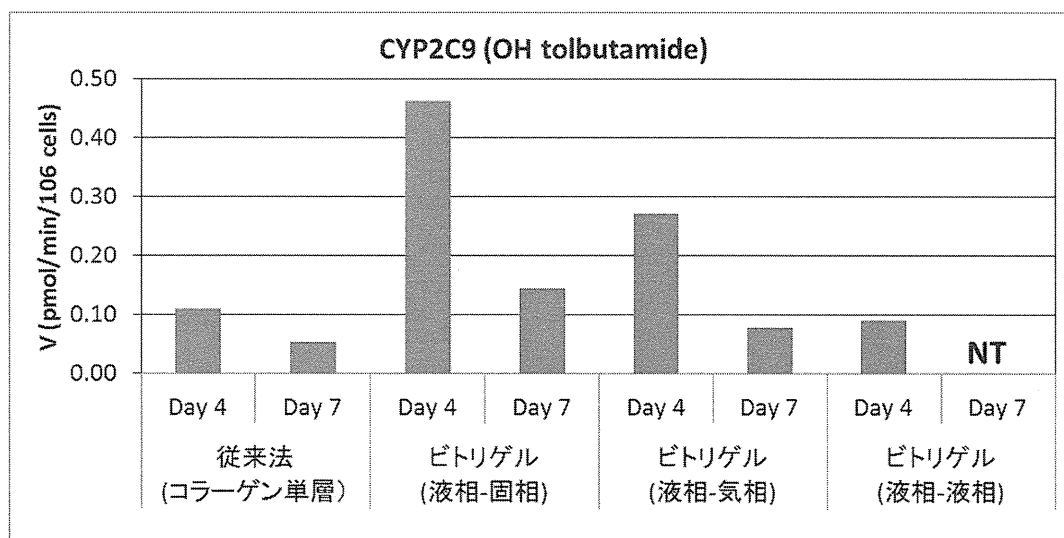
(1) 培養 4 日及び 7 日後の CYP1A2 代謝酵素活性の比較



備考：データは 3well の平均値

表中の「NT」は ad-MED ビトリゲル®培養の培養 7 日目は検討せず。

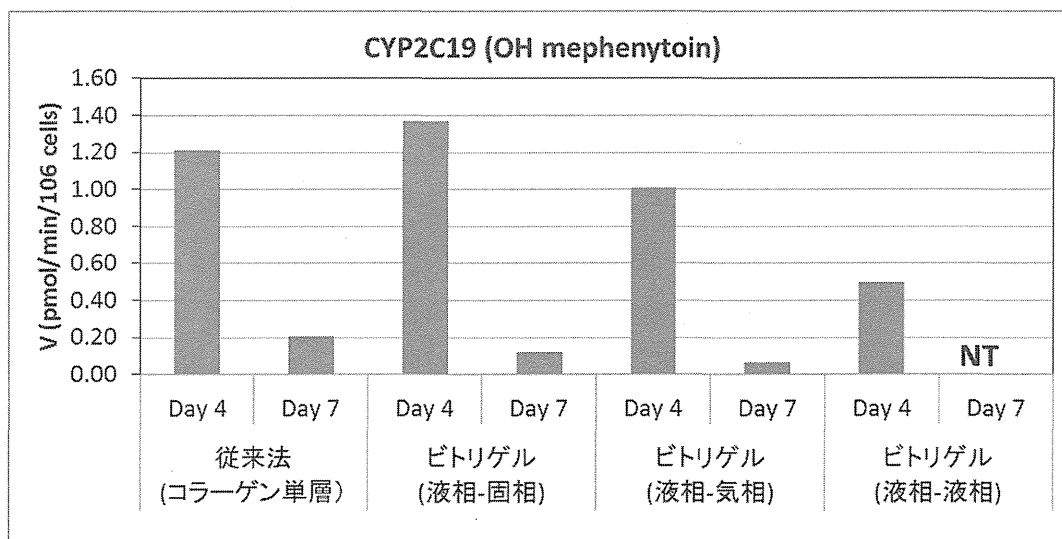
(2) 培養 4 日及び 7 日後の CYP2C9 代謝酵素活性の比較



備考：データは 3well の平均値

表中の「NT」は ad-MED ビトリゲル®培養の培養 7 日目は検討せず。

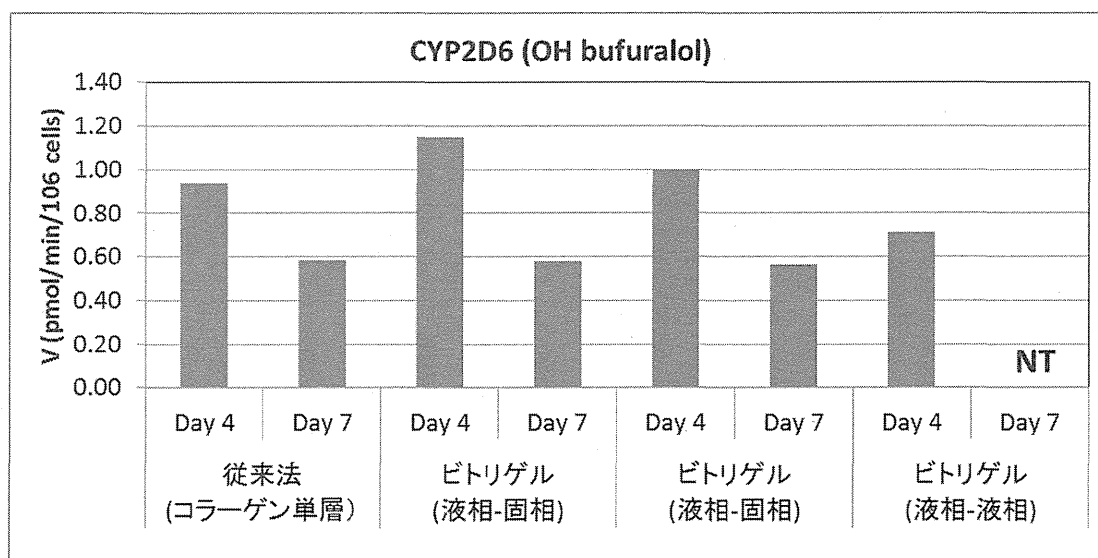
(3) 培養4日及び7日後のCYP2C19代謝酵素活性の比較



備考：データは3wellの平均値

表中の「NT」はad-MED ビトリゲル®培養の培養7日目は検討せず。

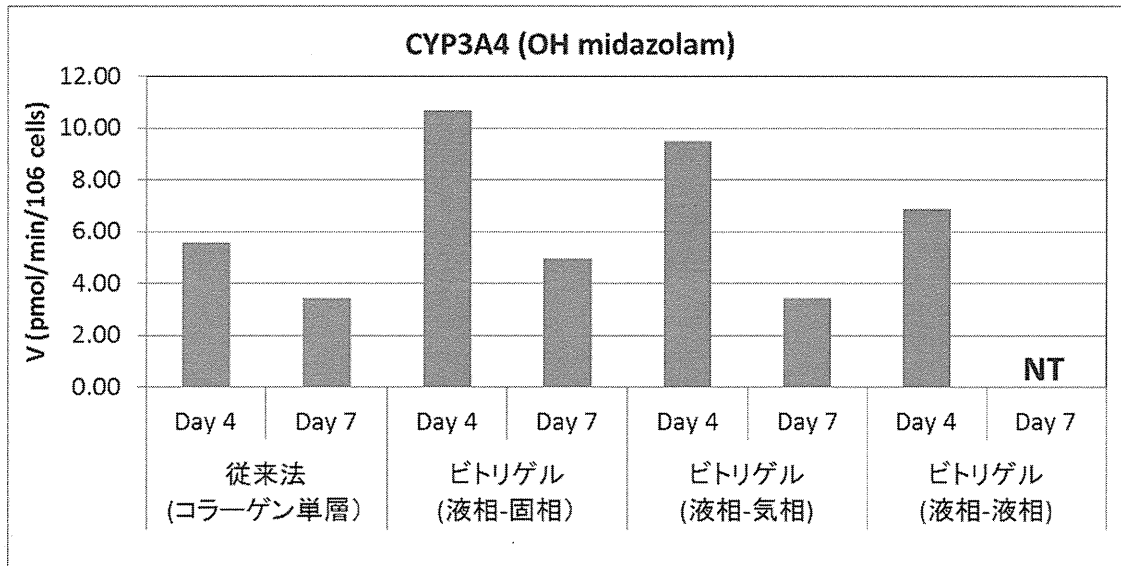
(4) 培養4日及び7日後のCYP2D6代謝酵素活性の比較



備考：データは3wellの平均値

表中の「NT」はad-MED ビトリゲル®培養の培養7日目は検討せず。

(5) 培養 4 日及び 7 日後の CYP3A4 代謝酵素活性の比較



備考：データは 3well の平均値

表中の「NT」は ad-MED ビトリゲル®培養の培養 7 日目は検討せず。

(6) ヒト CYP 特異的基質を用いた代謝酵素活性値まとめ

培養法	培養日数 (Day)	代謝酵素活性 (pmol/min/10 ⁶ cells)				
		CYP1A2 (AAP)	CYP2C9 (OHTB)	CYP2C19 (OHMP)	CYP2D6 (OFBF)	CYP3A4 (OHMDZ)
従来法 (コラーゲン単層)	Day 4	1.45	0.11	1.21	0.94	5.61
	Day 7	0.95	0.05	0.21	0.59	3.43
ビトリゲル (液相-固相)	Day 4	5.45	0.46	1.37	1.15	10.70
	Day 7	1.79	0.15	0.12	0.58	4.96
ビトリゲル (液相-気相)	Day 4	5.30	0.27	1.01	0.99	9.50
	Day 7	2.91	0.08	0.07	0.56	3.46
ビトリゲル (液相-液相)	Day 4	3.40	0.09	0.50	0.71	6.90
	Day 7	NT	NT	NT	NT	NT

備考：データは 3well の平均値

表中の「NT」は ad-MED ビトリゲル®培養の培養 7 日目は検討せず。

担当研究課題 キメラ動物由来ヒト肝細胞の特性解析

担当責任者 立野（向谷）知世 株式会社フェニックスバイオ 研究開発部長

研究要旨

異なる3ドナー（ドナーA：Hispanic、2歳、女兒、ドナーB：Caucasian、2歳、女兒、ドナーC：African American、5歳、男児）由来の凍結ヒト肝細胞を用いてそれぞれ作製された置換率90%前後のヒト肝細胞キメラマウス（PXB-mouse®）から2段階コラーゲンゼ灌流法によりヒト肝細胞（PXB-cells®）を回収した。PXB-cellsをI型コラーゲンコートプレート上で3週間培養し、アルブミン産生能、薬物代謝酵素〔ヒト（h）CYP1A1, hCYP2C9, hCYP2D6, hCYP3A4, hUGT1A1, hUGT2B6〕遺伝子発現量、CYP3A4活性、hCYP1A1, hCYP1A2, hCYP3A4の誘導能について解析を行った。PXB-cellsは、高い生存率とプレートへの接着性を示し、培養期間を通してアルブミン分泌能を維持していた。一般的に薬物代謝酵素の多くは培養することによりその発現レベルが著しく低下することが知られているが、PXB-cellsにおいて1) 発現低下が著しいもの、2) 軽微な発現低下を示すもの、3) 同等レベルを維持するものの3つに分類された。特にhCYP3A4については、mRNA発現および代謝活性共に、分離直後と比べても同等レベルを維持していた。また、キメラマウス由来肝細胞において、誘導剤によるhCYP1A1, hCYP1A2およびhCYP3A4遺伝子発現量の増加が確認され、この誘導能は培養期間中維持されていた。また、いくつかの肝機能において、3種類のドナー由来のキメラマウス肝細胞間で差がみられた。これは移植したドナー肝細胞が本来持つ性質を反映しているものと考えられた。以上のことからPXB-cellsは、in vitro試験利用に有用なヒト肝細胞ソースとなり得ることが示された。

研究協力者

石田雄二 研究開発部 課長

山崎ちひろ 研究開発部 研究員

柳愛美 研究開発部 研究員

吉実康美 研究開発部 研究員

景山豊 受託試験部 研究員

A. 研究目的

新鮮ヒト肝細胞は、薬物代謝・トランスポー

ター解析、毒性評価等の様々な分野において、非常に有用なツールであると考えられているものの、品質の良いヒト肝細胞を安定的に入手するのは困難である。また、市販されている新鮮ヒト肝細胞を用いる場合、同じドナーの肝細胞を用いた再現性試験を実施することも不可能である。我々は、凍結ヒト肝細胞を免疫不全肝障害（urokinase-type plasminogen activator-transgenic/SCID, uPA/SCID）マウ

スに移植する事により、70%以上をヒト肝細胞によって置換された肝臓を持つヒト肝細胞キメラマウスを(PXB-mouse®)を年間 3000 匹以上生産している。この PXB-mouse をヒト肝細胞のソースとする事で、繰り返し同じドナー由来の新鮮肝細胞を供給する事が可能となる。今回、3 種類のドナー由来の PXB-mouse 由来新鮮肝細胞(PXB-cells®)の in vitro における性状解析を目的とした。

B. 研究方法

PXB-mouse の作製

市販されている凍結ヒト肝細胞 (3 ドナー、ドナーA : Hispanic、2 歳、女兒、ドナーB : Caucasian、2 歳、女兒、ドナーC : African American、5 歳、男児) を移植ドナー肝細胞として用いた(表 1)。PXB-mouse のホストマウスである 3 週齢の cDNA-uPA/SCID マウスに対して、1 匹あたり $1\sim 5\times 10^5$ 個のヒト肝細胞を脾臓経由で移植した。移植後 3 週目と 6 週目それ以降は週 1 回、マウス尾静脈から採血しヒトアルブミン濃度をモニタリングした。

ヒト肝細胞キメラマウスからの肝細胞分離

移植後 11 週目(14 週齢)以降でマウス血中アルブミン値が 12 mg/mL 以上を示す、異なる 3 種のドナー肝細胞を移植して作製した PXB-mouse (各 3 匹/ドナー) から、二段階コラゲナーゼ灌流法により PXB-cells を分離した(表 2)。

PXB-cells の培養

分離した PXB-cells を I 型コラーゲンコートした 24 ウェルプレートに播種した(播種密度 2.1×10^5 個/cm²)。播種翌日より dHCGM 培地(Yamasaki C, et al. J Hepatol. 2006,

44:749-757)による培養を開始し、3~4 日毎に培地交換を行った。播種後 2 日目、7 日目、14 日目、21 日目に機能解析(形態観察、アルブミン分泌能、薬物代謝酵素の遺伝子発現、活性および誘導能)を行った。

ヒトアルブミン分泌能解析

培地交換翌日に回収した培養上清中のヒトアルブミン濃度をラテックス凝集免疫比濁法(LZ テスト' 栄研' U-ALB、栄研化学株式会社、東京)を用いて、自動分析装置 BioMajesty™(JCA-BM6050、JEOL、東京)により測定し、24 時間当たりのヒトアルブミン分泌量とした。

薬物代謝酵素遺伝子発現解析

プレートに播種した PXB-cells における各種薬物代謝酵素遺伝子{ヒト(h)CYP1A1, hCYP2C9, hCYP2D6, hCYP3A4, hUGT1A1, hUGT2B6}の培養期間中の発現量を経時的に測定した。hGAPDH とマウス(m)cyp3a11 の発現量も同様に測定した。遺伝子発現の測定は、定法に従い肝細胞から RNA 抽出および cDNA 合成を行った。得られた cDNA を鋳型とし、ヒトまたはマウス特異的な各薬物代謝酵素プライマーを用いて Applied Biosystems® 7500 リアルタイム PCR システム(Life Technologies Corporation)を行い遺伝子発現量の測定を実施した。

薬物代謝酵素活性解析

薬物代謝酵素 CYP3A4 の基質である Midazolam を培地に添加し、2 時間インキュベーション後に回収した培養上清中の代謝物(1'-Hydroxymidazolam)の濃度を HPLC(Lachome Elite; Hitachi High-Technology Co., Tokyo, Japan)により測定した。

薬物代謝酵素誘導解析

薬物代謝酵素に対する誘導剤を培地に添加し24時間インキュベーション後に回収した肝細胞における遺伝子発現量を上記の方法に従い解析し、誘導剤未処理肝細胞における遺伝子発現量と比較した。hCYP1A1 および hCYP1A2 の誘導剤として3-メチルコラントレン、hCYP3A4 の誘導剤としてリファンピシンを用いた。

<倫理面への配慮>

キメラマウスに移植するヒト肝細胞は、海外において適切な手続きを経て加工・販売されているものを、(株)フェニックスバイオのヒト組織利用倫理委員会において承認を得た上で、購入して使用した。

キメラマウスを用いた動物実験に関しては、(株)フェニックスバイオの動物実験倫理委員会において研究計画の承認を得た上で行った。

C. 研究結果

異なる3ドナー由来の凍結ヒト肝細胞を移植して作製された PXB-mouse から分離された PXB-cells は、いずれのマウスからも 10^8 個以上得られ、分離した生存率は75%以上を示し、プレートへの高い接着性を示していた(表2)。またプレート上に播種された PXB-cells は、培養期間中(3週間)、成熟肝細胞様の形態を呈し、アルブミン産生能を維持していた(図1)。

PXB-cells における各薬物代謝酵素の遺伝子発現を経時的に測定したところ、その発現パターンは、1) 発現低下が著しいもの(1/10以下、hCYP2D6, hUGT2B7)、2) 軽微な発現低下を示すもの(1/10以内、hCYP1A1, hCYP2C9など)、3) 同等レベルを維持するもの(hCYP3A4, hUGT1A1など)の3つに分類された。また、hUGT2B7の遺伝子発現においては、ドナー間差が認められ

た。また、mcyp3a11の発現も同様に調べたところ、2日目で分離直後の1/10に減少し、培養14日目には約1/10000に低下していた(図2)。

PXB-cells における CYP3A4 酵素活性を経時的に測定したところ、培養2日目にその酵素活性は分離直後に比べ低下するものの、その後回復し、培養3週間目には分離直後と同等の値を示した。また、CYP3A4 活性レベルにはドナー間差が認められた(図3)。

PXB-cells において、誘導剤による hCYP1A1, hCYP1A2 および hCYP3A4 遺伝子発現量の増加が確認された(表3)。この誘導能は、培養期間中維持されていた。また hCYP1A1, hCYP1A2 および hCYP3A4 誘導能にはドナー間差が認められた。

D. 考察

3種類のドナー由来の凍結肝細胞を用いて作製された PXB-mouse から分離された PXB-cells は、いずれも高い生存率とプレートへの接着性を示し、培養期間中その肝機能を非常によく維持していることが確認された。このことから PXB-cells は、in vitro 試験利用に有用なヒト肝細胞ソースとなり得ることが示された。また、いくつかの肝機能において、3種類のドナー由来の PXB-cells 間で差がみられた。これは移植したドナー肝細胞が本来持つ性質を反映しているものと考えられた。

E. 結論

PXB-cells は、in vitro において、ドナー細胞が異なっても長期間にわたり肝機能を維持し、それぞれの移植ドナー肝細胞が固有に持つ性質を有していると考えられた。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表等

論文発表等

- 1) Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tateno C, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Ikeda K, Tanaka Y, Mizuguchi H.: Efficient engraftment of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-xL mutant gene. *Cell Transplant.*, (in press)
- 2) Tateno C, Yamamoto T, Utoh R, Yamasaki C, Ishida Y, Myoken Y, Oofusa K, Okada M, Tsutsui N, Yoshizato K.: Chimeric Mice with Hepatocyte-humanized Liver as an Appropriate Model to Study Human Peroxisome Proliferator-activated Receptor- α . *Toxicol Pathol.*, (in press)
- 3) Ohtsuki S, Kawakami H, Inoue T, Nakamura K, Tateno C, Katsukura Y, Obuchi W, Uchida Y, Kamiie J, Horie T, Terasaki T.: Validation of uPA/SCID mouse with humanized liver as a human liver model: protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases by LC-MS/MS. *Drug Metab Dispos.*, 2014; 41: 1039-1043.
- 4) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K, Abe H, Wakita T, Hayes CN, Chayama K, Tateno C: Novel robust in vitro hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice. *Am J Pathol.*, (in press)
- 5) Sanoh S, Naritomi Y, Fujimoto M, Sato K, Kawamura A, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S: Predictability of plasma concentration-time curves in

humans using single-species allometric scaling of chimeric mice with humanized liver. *Xenobiotica*, (in press)

- 6) Yamazaki H, Kuribayashi S, Inoue T, Honda T, Tateno C, Oofusa K, Ninomiya S, Ikeda T, Izumi T, Horie T: Zone analysis by two-dimensional electrophoresis with accelerator mass spectrometry of in vivo protein bindings of idiosyncratic hepatotoxicants troglitazone and flutamide bioactivated in chimeric mice with humanized liver. *Toxicology Research*, (in press)

学会発表等

- 1) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Watashi K, Abe H, Wakita T, Chayama K, Tateno C.: Hepatitis B Virus Spread in Primary-cultured Human Hepatocytes Isolated from Chimeric Mice with Humanized Liver. 2014 TASL-Japan Hepatitis B Workshop (2014.4, Taipei, Taiwan).
- 2) 石田雄二 山崎ちひろ 吉実康美 柳愛美 山尾美香留 阿部弘美 茶山一彰 立野知世: キメラマウスから分離した初代培養ヒト肝細胞におけるHBVの水平感染. 第50回日本肝臓学会 (2014.5, 東京).
- 3) Ishida Y, Yamasaki C, Yoshizane Y, Kageyama Y, Iwasaki Y, Tateno C.: In vitro evaluation of fresh human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized livers (PXB-mice®). 第87回組織培養学会 (2014.5, 東京).
- 4) 立野 知世: ヒト肝細胞キメラマウスの改良と応用. 第21回肝細胞研究会 (2014.6, 東京).
- 5) 石田雄二、山崎ちひろ、吉実康美、柳愛美 田中靖人、立野知世: ヒト肝細胞キメラマ

- ウス由来新鮮ヒト肝細胞を用いた HBV genotype の性状比較. 第 21 回 肝細胞研究会 (2014. 6, 東京).
- 6) 山崎ちひろ、岩成宏子、島田卓、木村達治、岩崎由美子、加国雅和、石田雄二、立野知世：ヒト ALT-1 特異的 ELISA を用いたヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト肝毒性の検出. 第 21 回 肝細胞研究会 (2014. 6, 東京).
- 7) 柳愛美、山崎ちひろ、吉実康美、石田雄二、立野知世：ヒト肝細胞キメラマウス肝臓におけるヒト EpCAM の発現. 第 21 回 肝細胞研究会 (2014. 6, 東京).
- 8) 石田雄二 山崎ちひろ 吉実康美 柳愛美 山尾美香留 阿部弘美 茶山一彰 立野知世：ヒト肝細胞キメラマウス由来の新鮮培養ヒト肝細胞における HBV の水平感染第 10 回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム (2014. 7, 広島).
- 9) Yanagi A, Yamasaki C, Yoshizane Y, Ishida Y, Tateno C. : Characterization and proliferation assessment of hCK19- and hEpCAM-positive cells in bile duct-ligated chimeric mice with humanized livers. 2014 FASEB Summer Research Conference (2014. 7, Keystone, CO).
- 10) 内田 宅郎, 平賀 伸彦, 今村 道雄, 柘植 雅貴, 阿部 弘美, 相方 浩, 石田 雄二, 立野 知世, 茶山 一彰: cDNA-uPA/SCID マウスを用いたヒト肝細胞キメラマウスの作製および肝炎ウイルス感染. 第 18 回日本肝臓学会大会 (2014. 10, 神戸).
- 11) 平賀伸彦, 今村道雄, 内田宅郎, 柘植雅貴, 阿部弘美, 相方 浩, 石田雄二, 立野知世, 茶山一彰: 超免疫不全 TK-NOG マウスを用いたヒト肝細胞キメラマウス. 第 18 回日本肝臓学会大会 (2014. 10, 神戸).
- 12) Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Kageyama Y, Iwasaki Y, Ishida Y, Tateno C. : In vitro evaluation of human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized livers (PXB-mice®). transplanted using cells from three different donors. 19th North American ISSX Meeting/29th JSSX Meeting (2014. 10, San Francisco, CA).
- 13) Nelson CN, Abe H, Akamatsu S, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Chayama K. : Hepatitis B virus infection efficiency and immune response decrease with cell density in primary cultured hepatocytes. 65TH AASLD (2014. 11, Boston).
- 14) Uchida T, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Aikata H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Murakami K, Chayama K. : A novel humanized cDNA-iPA/SCID mouse for the study of HBV and HCV infections. 65TH AASLD (2014. 11, Boston).
- 15) Hiraga N, Imamura M, Uchida T, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Aikata H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. : A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infection. 65TH AASLD (2014. 11, Boston).
- 16) DebRoy S, Hiraga N, Imamura M, Canini L, Pohl RT, Persiani S, Uprichard SL, Perelson AS, Tateno C, Chayama K, Dahari H. : HCV kinetics in uPA-SCID chimeric mice with humanized livers during intravenous silibinin monotherapy. 65TH AASLD (2014. 11, Boston).
- 17) Ishida Y, Chung TL, Imamura M, Hiraga N, Canini L, Uprichard SL, Perelson AS, Tateno C, Dahari H, Chayama K. : HBV infection in humanized chimeric mice has multiphasic viral kinetics from inoculation to steady state and an HBV

half-life of 1 hr. 65TH AASLD (2014. 11, Boston).

- 18) 土居 茜, 佐能 正剛, 山崎ちひろ, 石田雄二, 加国雅和, 立野知世, 太田茂: ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いた CYP2D6 基質のヒト体内動態予測. 第 53 回日本薬学会中国四国支部学術大会 (2014. 11, 広島).
- 19) Tateno C.: Development of novel chimeric mice with humanized livers and infected with HBV as hosts. The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B-Recent progress in basic and clinical research (2014. 11, Hiroshima).
- 20) 山崎ちひろ, 吉実康美, 柳愛美, 景山豊, 岩崎由美子, 石田雄二, 立野知世: ヒト肝細胞キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞 "PXB-cellss" の性状解析. 細胞アッセイ研究会シンポジウム (2015. 1, 東京).
- 21) 立野知世: ヒト肝細胞を担持するキメラ非ヒト動物. 第 8 回ラットリソースリサーチ研究会 (2015. 1, 京都).
- 22) 高橋美和, 立野知世, 石田雄二, 井上薫, 吉田緑: ヒト肝細胞キメラマウス (PXB マウス) における卵胞発育不全. 第 31 回日本毒性病理学会 (2015. 1, 東京).

報道発表等

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

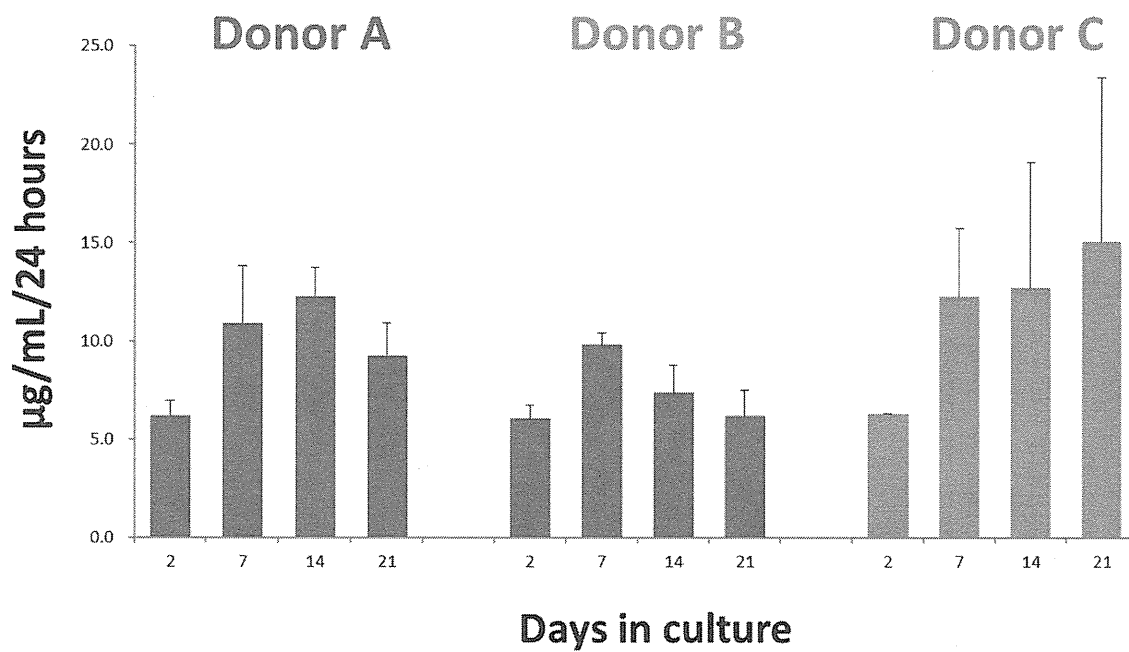


図1 PXB-cells におけるヒトアルブミン分泌能

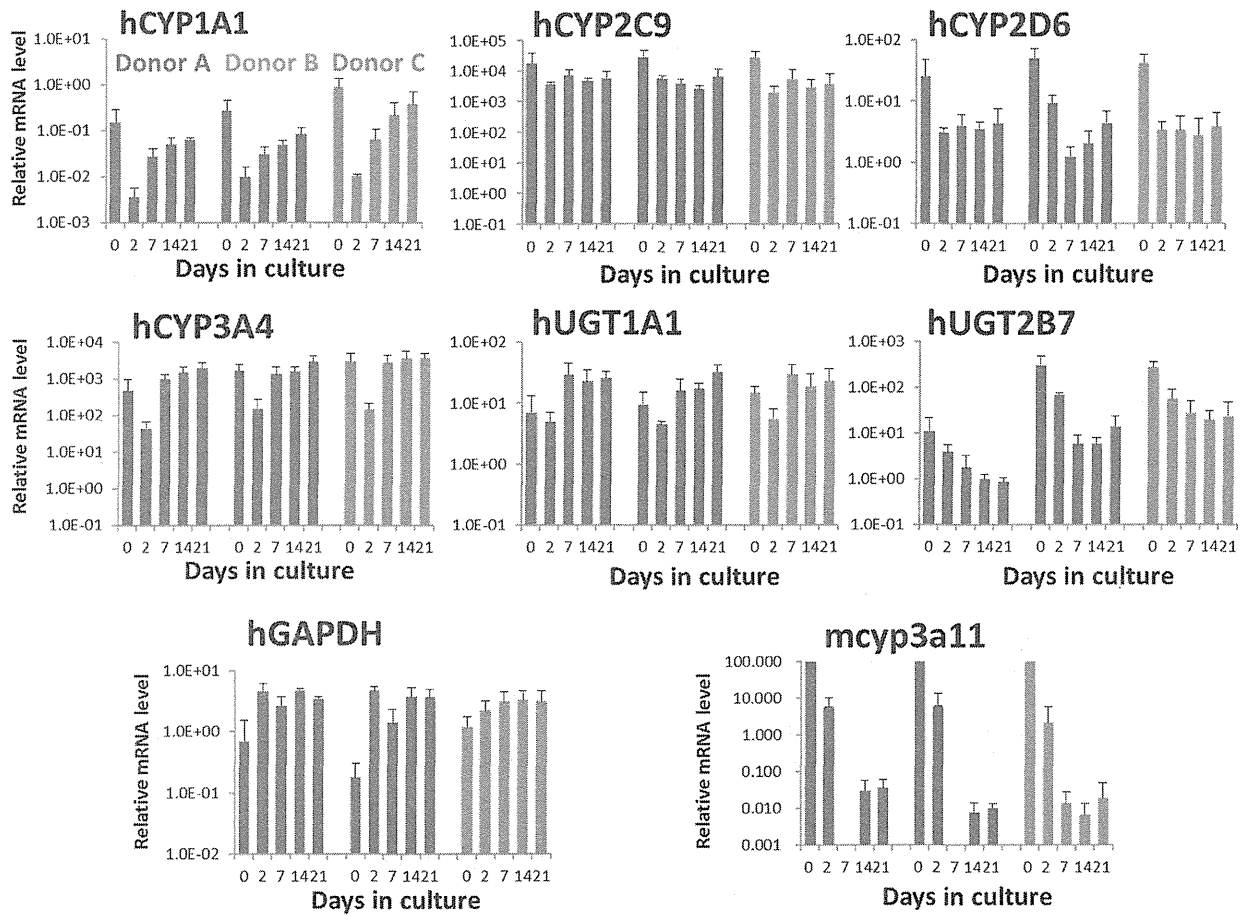


図2 PXB-cells におけるヒト薬物代謝酵素および GAPDH 遺伝子発現 (HepG2 の発現量に対する相対値) とマウス薬物代謝酵素遺伝子発現 (day 0 における発現量に対する相対値)

測定酵素	基質	処理時間	代謝物
CYP3A4	Midazolam (10 μ M)	2 hours	1'-Hydroxymidazolam

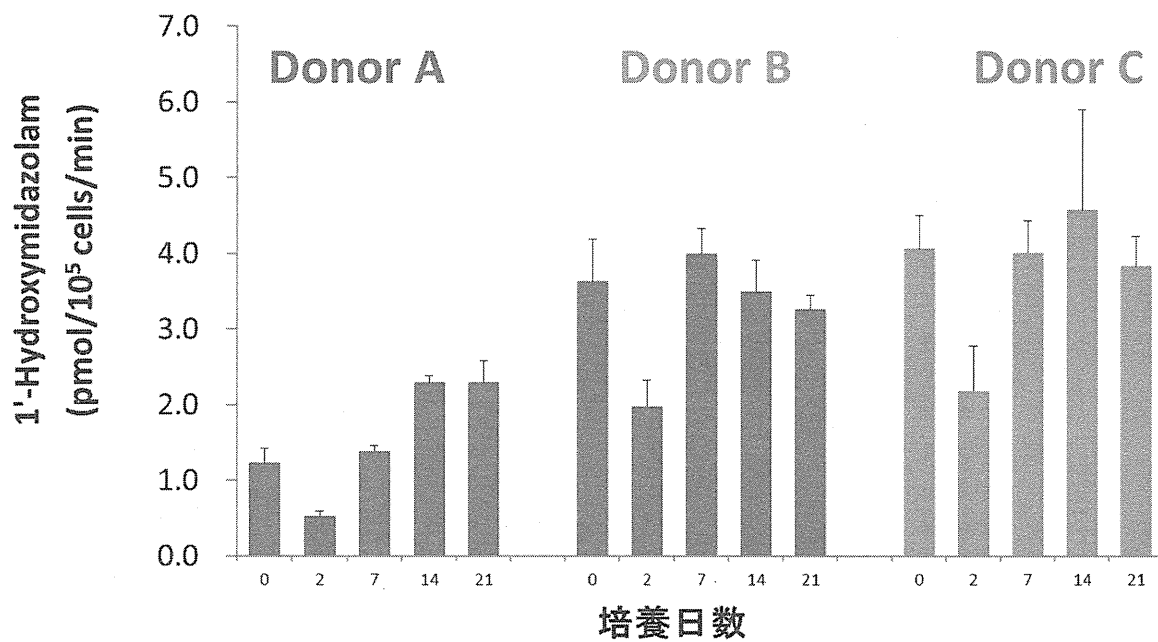


図3 PXB-cells における CYP3A4 活性

表1 移植ドナー肝細胞情報

Donor No.	Gender	Age (years old)	Race	
A	Female	2	Hispanic	Inducible-Qualified Human CryoHepatocytes
B	Female	2	Caucasian	Plateable Human CryoHepatocytes
C	Male	5	African American	Human Cryo Hepatocytes

表2 PXB-mouse 情報

Donor	Animal No.	Sex	Age (weeks old)	Body weight (g)	h-alb conc. (mg/mL)	Yield of cells (cells/mouse)	Viability (%)
A	A-1	male	15	18.79	17.2	2.24×10^8	91.7
	A-2	male	15	17.42	16.4	1.69×10^8	92.6
	A-3	male	15	19.06	17.1	1.52×10^8	83.9
B	B-1	male	16	17.45	12.6	1.31×10^8	87.5
	B-2	male	16	17.54	15.2	1.53×10^8	93.8
	B-3	male	17	17.19	12.6	1.42×10^8	87.3
C	C-1	female	14	15.3	13.0	1.42×10^8	89.5
	C-2	male	15	14.4	14.0	1.27×10^8	86.7
	C-3	male	15	20.6	14.3	1.04×10^8	79.5

表3 誘導剤処理したPXB-cellsにおける薬物代謝酵素遺伝子発現 (未処理群に対する相対値)

Donor		CYP1A1				CYP1A2				CYP3A4			
		Days in culture				Days in culture				Days in culture			
		2	7	14	21	2	7	14	21	2	7	14	21
A	Mean	2760.4	186.0	43.4	37.2	36.0	74.2	15.0	13.4	6.2	3.8	3.0	3.0
	SD	1482.5	98.8	17.5	11.6	19.2	22.0	10.5	5.9	2.7	0.6	0.7	0.5
B	Mean	705.4	103.5	36.7	31.8	6.7	20.9	14.0	15.9	1.8	2.2	2.6	2.7
	SD	334.6	75.9	14.0	15.8	4.2	8.6	4.3	11.4	1.0	0.6	0.4	0.3
C	Mean	1118.3	396.2	106.8	75.2	14.6	107.0	49.8	45.5	2.0	2.7	2.3	2.6
	SD	488.0	241.4	65.2	47.9	5.3	84.4	35.4	31.4	0.5	1.0	0.7	0.8

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

担当研究課題 リポタンパク産生系に着目した肝細胞機能評価

担当責任者 最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部長

研究要旨

リポタンパク HDL は膜トランスポーター ABCA1 が形成する。肝の ABCA1 は血中 HDL 産生に最大の寄与を持っており、加えてコレステロール搬出能の高い HDL を産生する独自の役割が予測されている。肝の ABCA1 について、担当責任者は、二種類の肝型 mRNA バリエントと肝独自の発現誘導機構を見いだしたことから、本研究では肝細胞機能の指標として新規培養基材ならびに新規培養肝細胞ソースの評価を行った。コラーゲンビトリゲル膜チャンバー (ad-Med ビトリゲル) を用いた培養により、HepG2 ならびに JHH-5 細胞の ABCA1 肝型 mRNA バリエントの発現は大きく影響されず、コレステロール低下による発現誘導は維持された。肝型バリエント発現に必須の転写因子 HNF4 α の発現は影響されなかった。HepaRG 細胞を含め、肝細胞ソース間で肝型バリエントの発現応答に差があり、コレステロール代謝回転との関連が示唆されることから、今後は培養条件等の検討を進める予定である。

研究協力者

崔 紅艶 国立医薬品食品衛生研究所生化学部
派遣研究員
石田誠一 国立医薬品食品衛生研究所生化学部
薬理部室長

A. 研究目的

VLDL や HDL などのリポタンパクの産生は、肝の主要な機能であり、血清脂質やメタボリックシンドローム改善薬などの薬効とともに、脂肪肝等の毒性発現に深く関わっている。HDL を形成する膜トランスポーター ABCA1 は広く各組織に発現しているが、肝の ABCA1 は血中 HDL 産生に最大の寄与を持っており、加えて質の高い HDL を産生する独自の役割が示唆されている。遺伝子発現制御の面でも肝の ABCA1 は他組織と

は異なっている (図 1)。担当責任者は、肝においては末梢組織と共通の ABCA1 末梢型 mRNA バリエントに加えて肝特異的な肝型バリエントが発現することを発見し、『肝型と末梢型の二重プロモーター』によるユニークな発現制御機構を、ラット・マウス (*J Biol Chem* 2007)、引き続きヒトにおいて (*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012) 明らかにしている (図 2)。

したがって、リポタンパク産生系、特にヒト肝特異的な ABCA1 mRNA バリエントの発現は、肝細胞機能の指標として極めて有用性が高いと考えられる。そこで本研究では、創薬や安全性研究に用いる新規培養肝細胞ソースならびに新規培養基材を評価するために、ABCA1 ヒト肝型バリエントの発現応答の測定を行った。

B. 研究方法

薬物代謝活性・酵素の研究において高い実用性が知られている HepaRG 細胞について、ヒト肝型 ABCA1 バリエントの発現ならびにコレステロールによる発現応答を検討した。また、ヒト肝由来細胞 JHH-5 および HepG2 について、コーゲンビトリゲル膜チャンバー (ad-Med ビトリゲル) を用いた培養方法の影響を検討した。肝型 ABCA1 mRNA L3 および L2b バリエントは特異的領域、総 ABCA1 mRNA は共通する exon12 に primer/probe を設計し (図 3)、リアルタイム RT-PCT により定量解析を行った。JHH-5 細胞は基盤研、HepG2 細胞は理化学研究所セルバンクより入手した。HepaRG 細胞は、本グループ長である国立医薬品食品衛生研究所薬理部石田室長が培養分化したものの供給を受けた。

<倫理面への配慮>

当研究においては、ヒト組織由来の細胞・材料は全て研究用の市販品あるいは領布品を使用し、倫理上の問題はない。

C. 研究結果

C.1. ad-Med ビトリゲルを用いた培養の影響

ヒト肝実質細胞に発現する ABCA1 mRNA には、末梢組織を含め広く発現する末梢型 (type P) に加え、肝に特有の二種類の肝型 (typeL3 および L2b) のバリエントが存在することが、担当責任者の研究から明らかにされている (図 2)。また、末梢型 ABCA1 mRNA については、コレステロール応答性核内受容体 LXR による発現誘導が知られているが、肝型は逆に細胞内コレステロール低下により発現誘導され、肝 ABCA1 は末梢型・肝型のプロモーターによる二重制御を受ける機構を明らかにしている (図 1, 2)。

そこで肝特異的な機能である肝型 ABCA1 mRNA バリエントの発現ならびにコレステロール低

下による誘導に対し、ad-Med ビトリゲルを用いた培養による影響を検討した。ABCA1 肝型バリエント研究に実績のあるヒト肝ガン由来細胞 JHH-5 ならびに HepG2 について、ビトリゲル、あるいは 24well 培養プレートに播種し、24 時間後に 10%脱脂ウシ血清に vehicle 添加のみ、コレステロール負荷 (10 μ g/mL コレステロールと 1 μ g/mL 25-hydroxycholesterol の混合物添加)、コレステロール低下 (50 μ M compactin)、あるいは LXR アゴニスト (10 μ M T0901317) 処理を行い、18 時間後に RNA を抽出して、ABCA1 各 mRNA バリエントの発現に及ぼす影響を解析した。結果は 18S 発現量で補正し、相対値で示した。

ad-Med ビトリゲルを用いた培養により、ABCA1 の肝型ならびに末梢型 mRNA バリエントの発現は JHH-5 ならびに HepG2 細胞のいずれでも大きく影響されず、コレステロール低下による発現応答は維持されることが判明した (図 4)。ABCA1 末梢 P 型バリエントの LXR アゴニストによる発現誘導は、ビトリゲル培養によりやや促進される傾向が認められた。ABCA1 肝型 L3 バリエントのコレステロール低下による発現誘導はわずかに低下した。肝型バリエント L3 および L2b 発現には転写因子 HNF4 α が決定的な役割を持ち、L3 および L2b 発現のコレステロール低下による誘導は HNF4 α の siRNA ノックダウンにより消失することを担当責任者は報告している。また今年度の企業からの受託研究において、L2b のプロモーター・エンハンサー領域を同定し、HNF4 α による直接制御を明らかにしている。しかしながら、ビトリゲル培養は HNF4 α mRNA 発現量には影響を与えないことが判明した。

C.2. 各培養肝細胞ソースにおける ABCA1 肝型バリエントの発現とコレステロール応答

ABCA1 肝型バリエーション L3 および L2b については、これまでヒト肝実質細胞ならびにヒト肝由来細胞である JHH-5、Hep3B、HepG2 細胞での発現を報告している。本研究では、実用性の高い肝培養細胞ソースとして注目される HepaRG 細胞における発現を、JHH-5 および HepG2 細胞と比較検討した (図)。

その結果、HepaRG 細胞における ABCA1 末梢型バリエーションの発現は JHH-5 細胞と同程度であり、LXR アゴニストに鋭敏に反応した発現上昇が判明した。一方、肝型バリエーション L2b の発現レベルは JHH-5、HepG2 と同程度であったが、主要な肝型バリエーション L3 の発現レベルは約 1/4 と低く、L2b と共にコレステロール低下による発現誘導が認められなかった。コレステロール合成の律速酵素 HMG-CoA reductase (HMGCR) については、コレステロール低下による発現誘導は認められたが、他細胞に比較して発現レベルは低いことが判明した。

D. 考察

HDL は抗動脈硬化性リポタンパクであり、血管内壁等に蓄積したコレステロールを引き抜く機能を持ち、善玉コレステロールと呼ばれている。HDL を産生する膜トランスポーター ABCA1 は、各組織に広く発現しているが、肝の ABCA1 が血中 HDL の 8 割を産生する。加えて肝の ABCA1 はコレステロール搬出能の高い HDL 産生を担う独自の役割が予測されている。遺伝子発現制御の面でも肝の ABCA1 は他組織とは異なっており、担当責任者は、肝型 mRNA バリエーション L3・L2b とともに (L3) プロモーター・エンハンサーによる制御システムを見いだしている。引き続き H26 年度企業からの受託研究において、新たに L2b プロモーター・エンハンサー領域を同定するとともに、HNF4 α による制御を示している

(図 6, 7)。

ABCA1 肝型バリエーションは、肝細胞機能マーカーとして有用が高いと考えられることから、本研究では新規培養基材 ad-MED ビトリゲル培養の影響を検討した。JHH-5 細胞および HepG2 細胞においては、肝型バリエーションの発現レベルは大きく影響されず、コレステロールによる発現応答は維持されることが判明した。末梢型バリエーションについては LXR による誘導が促進される可能性が示された。

また、新規肝培養細胞ソースである HepaRG 細胞における発現応答を JHH-5 および HepG2 細胞と比較したところ、HepaRG 細胞では、ABCA1 末梢型バリエーションの LXR による発現誘導は顕著に認められた一方、肝型バリエーション L3 の発現レベルは低く、コレステロール低下による発現誘導が認められなかった。コレステロールへの鋭敏な発現応答が知られている HMG-CoA reductase (HMGCR) の応答は認められたが、発現レベルは低かった。分化誘導され増殖停止した HepaRG 細胞ではコレステロール合成をはじめとするコレステロール代謝関連遺伝子の発現が低下し、代謝回転が抑制されている可能性が示唆される。今後は、脂質欠乏培地での培養時間延長等、培養条件等の検討を進め、ヒト初代培養細胞との比較検討を行う予定である。

E. 結論

HDL 産生膜トランスポーター ABCA1 の肝型 mRNA バリエーションの発現とコレステロール応答は、ad-MED ビトリゲル培養により維持された。細胞ソース間で発現応答に差があり、今後は培養条件等の検討を進める。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表等

論文発表等

該当なし

学会発表等

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

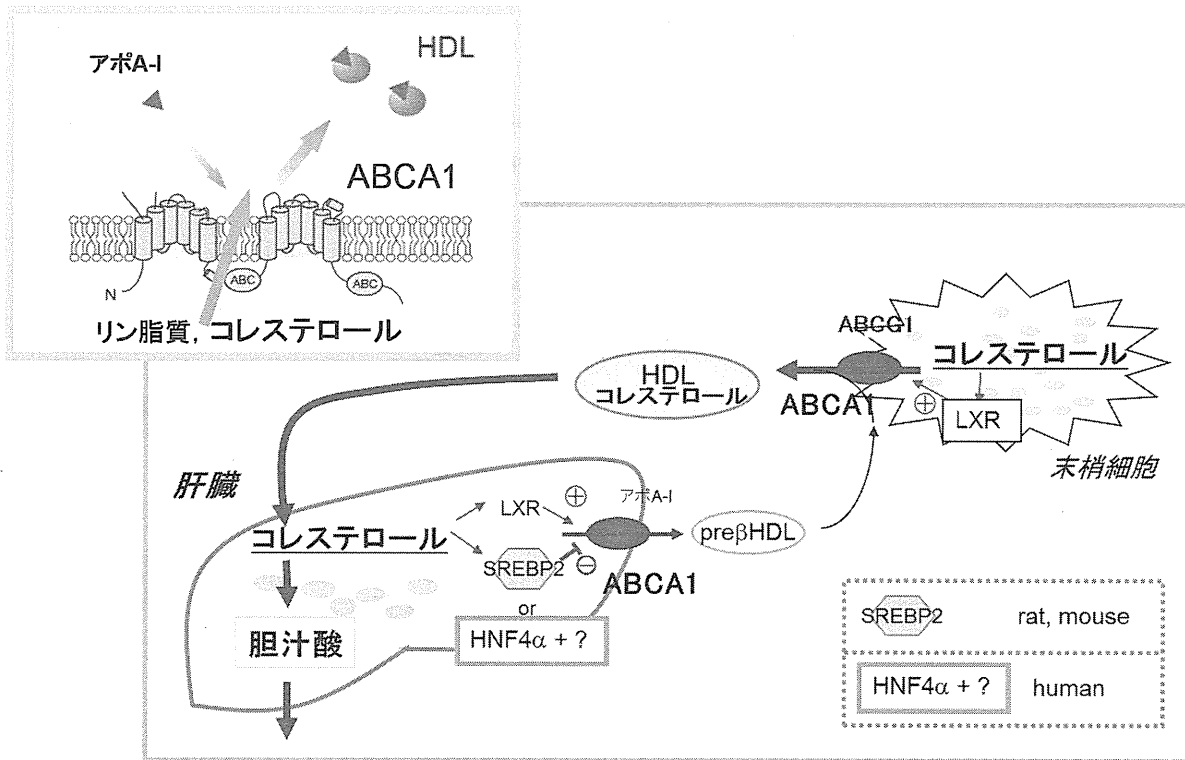


図1. 膜トランスポーターABCA1はHDLを形成する. 肝のABCA1は他組織とは異なる「二重の転写制御」を受ける. コレステロールによりアクセルに働く末梢型と、ブレーキとして働く肝型の二つのプロモーターにより発現が制御される.

Tamehiro, et al., *J.Biol.Chem.* 282:21090-21099, 2007
 Ohoka, et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32:1005-1014, 2012

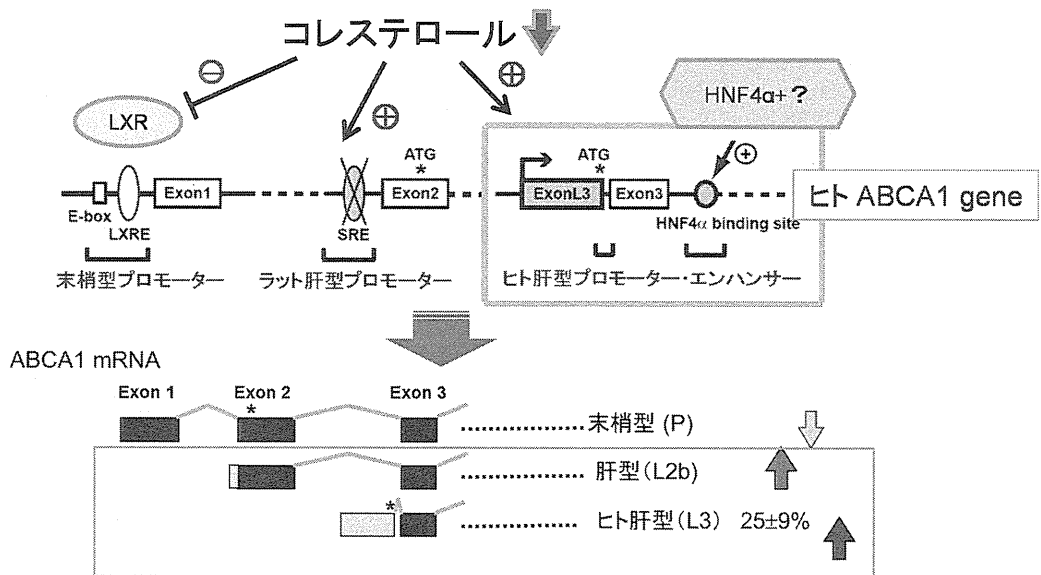


図2. ヒト肝ではABCA1 mRNAは末梢型(type P)に加え二種類の肝型 (type L3, L2b)バリエントが産生される. 肝細胞内コレステロールが低下すると、肝型L3およびL2bABCA1mRNAバリエントの産生が促進され、末梢P型バリエント産生は低下する. L3型を制御するプロモーター・エンハンサーを同定したが、L2b型はマウス・ラットと共通のプロモーターがコレステロールにตอบสนองせず、ヒト独自の制御機構の存在が示唆される. Ohoka, et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32:1005-1014, 2012

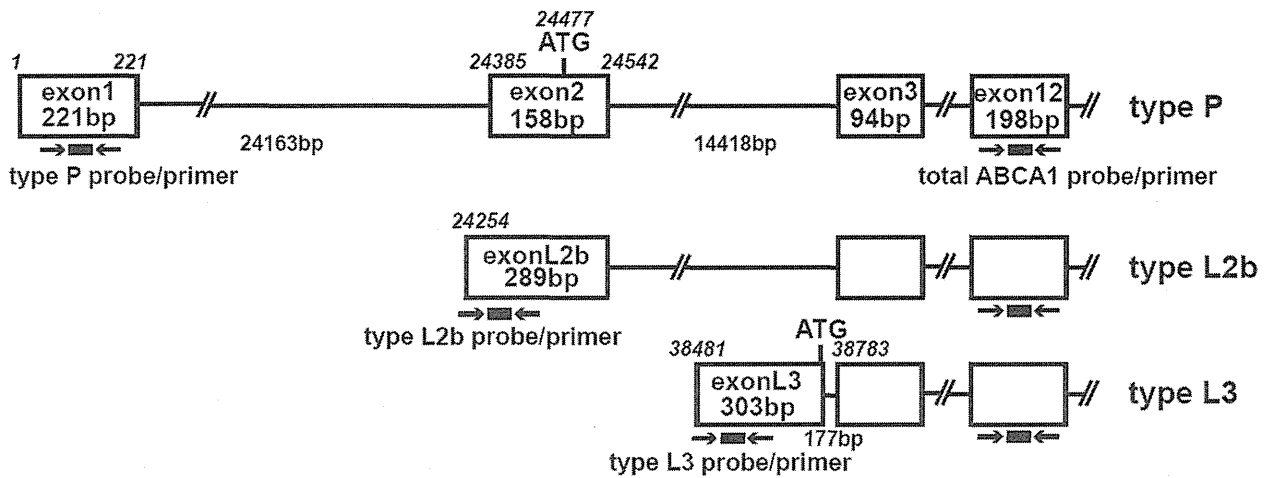


図3. リアルタイムPCRによるヒトABCA1 mRNA各バリエントの特異的測定
各バリエントは特異的領域、および総ABCA1 mRNAは共通するexon12に
primer/probeを設計した。

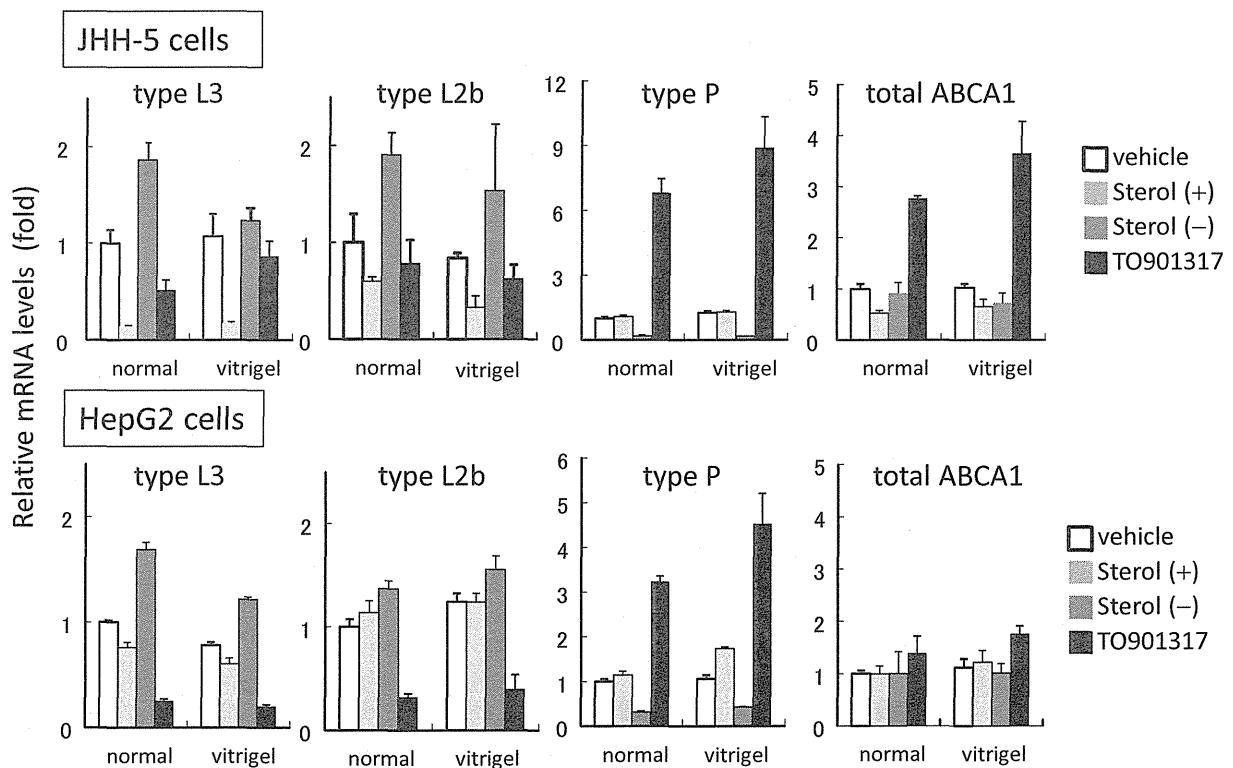


図4. ビトリゲル培養の肝型ABCA1 mRNAバリエントの発現に及ぼす影響
肝型ABCA1 mRNA (type L3, L2b); 末梢型ABCA1 mRNA (type P); 総ABCA1
mRNA (total ABCA1). normal, 培養プレート; vitrigel, ビトリゲル膜チャンバーに
播種.

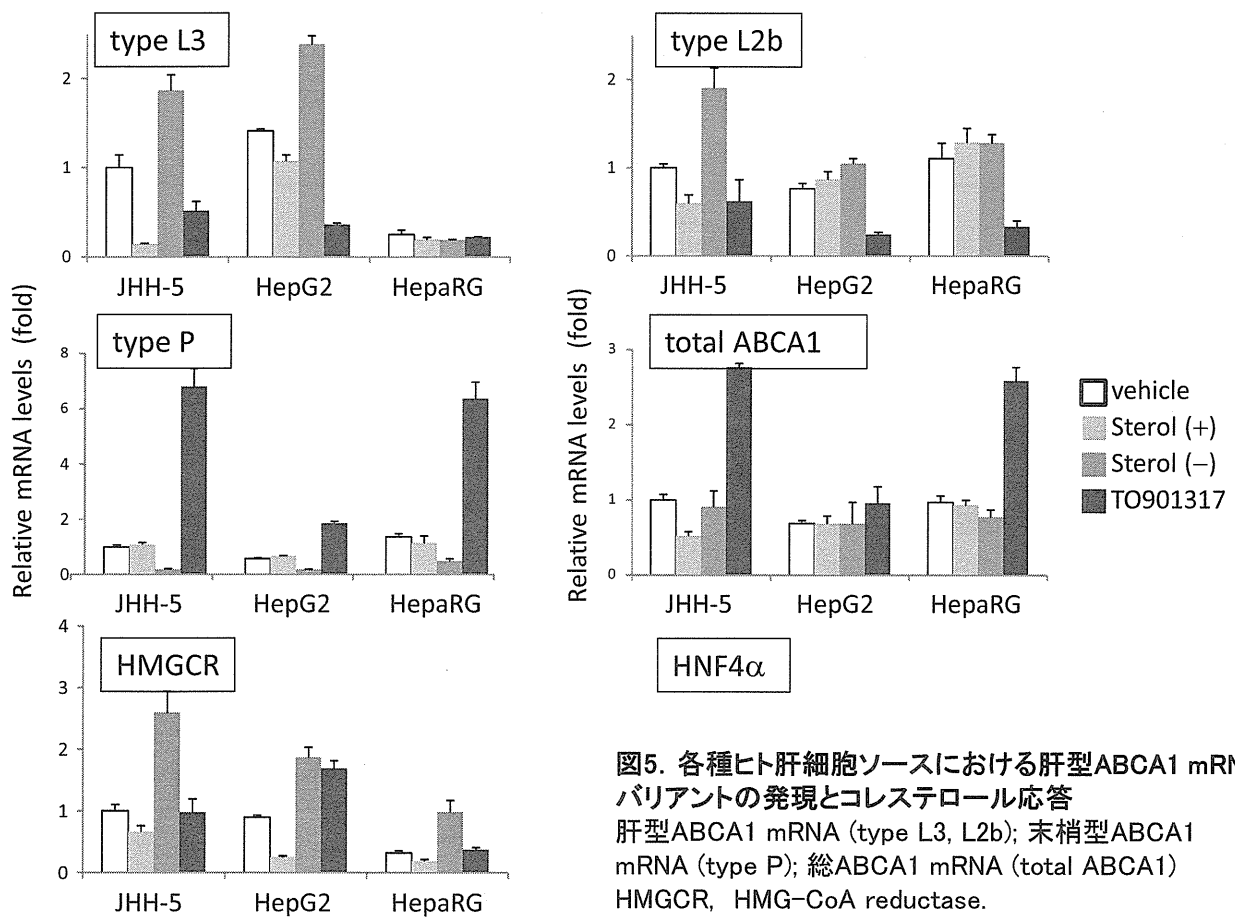


図5. 各種ヒト肝細胞ソースにおける肝型ABCA1 mRNA
 バリエーションの発現とコレステロール応答
 肝型ABCA1 mRNA (type L3, L2b); 末梢型ABCA1
 mRNA (type P); 総ABCA1 mRNA (total ABCA1)
 HMGCR, HMG-CoA reductase.