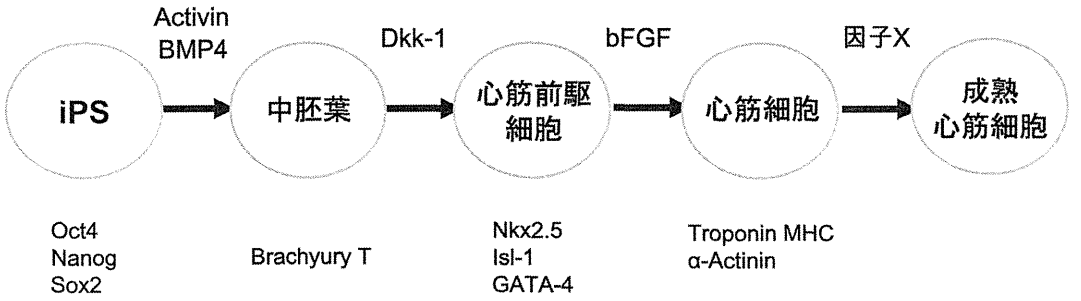

図1　ヒトiPS細胞から成熟心筋細胞の分化誘導法
ヒトiPS細胞からサイトカインなどの液性因子や遺伝子導入などの方法を用いて、段階的に心筋細胞に分化誘導できる。

る[5]。我々は成体心室筋と比較してiPS由来分化心筋細胞において不足している因子Xに着目し、心筋細胞の成熟化を誘導できる方法を明らかにしている(論文投稿中)。我々が検討した範囲では、アデノウイルスは未分化iPS細胞よりも分化が進んだ細胞の方が高い感染効率を示したことから、iPS由来分化心筋細胞にアデノウイルスを用いて因子Xを遺伝子導入することにより、成熟心筋を誘導することに成功した。ただし、医薬品の催不整脈作用を評価する上で成熟心筋の方がいいのかはまだ分かっていない。一般的にはヒト成体の心筋細胞に近ければ近い方が創薬のモデルとして良さそうであるが、本当に成熟した特性が必要なのかは以下に述べるような薬理作用の観点から判断すべきであろう。

4. 分化心筋細胞を用いた*in vitro*心毒性試験

*In vitro*心毒性試験に用いるiPS由来分化心筋細胞の形状としては、個々の細胞、EBなどの細胞塊、高密度培養によるシート状の標本などがあげられる。個々の細胞の場合は、パッチクランプで一つ一つの細胞の活動電位の波形をもとにQT間隔を評価するため、心室筋などのサブタイプの情報も得られる。しかしながら、スループット性は極めて低いこと、個々の細胞のバラつきの問題があること、長時間曝露による薬理作用も検討できないことなど多くの問題があり、現実的ではないように思われる。

一方、細胞塊やシート状の標本に関しては、多点電極システムを用いて、電極を埋め込んだディッシュに細胞塊やシートを接着させることによりQT間隔に相当する細胞外電位(Field Potential：FP)の測定が可能である。個々の心筋細胞のバラつきが平均化されるため、比較的安定したデータが得られること、侵襲がないため長時間曝露による薬理作用が調べられること、電気生理学特有の敷居の高さはなく比較的簡便であることなど、先程の問題点はかなり克服できる。我々が検討した範囲では、細胞塊は電極の上にうまく乗せられなかったり、細胞塊と電極の接触が不十分でシグナルが得られないようなケースがあったことから、シート状の標本の方がベターではないか、と考えている。ただし、多点電極システムを用いるにしても、一日で解析できる数に限界があり、大規模な医薬品候補化合物のスクリーニングには向いていない。今後、スループット性を上げるために改良が必要である。

我々は、iPS由来分化心筋細胞を用いた試験系の検出感度を明らかにするため、シート状に播種したiCell心筋細胞をモデル細胞として用いて、細胞外電位装置による評価を行った[6]。産官学の3施設で検証した結果、どの施設においてもhERG阻害剤E-4031の添加により濃度依存的にFPD(Field Potential Duration)延長が観察された(**図2**)。さらに、E-4031によりEarly afterdepolarization (EAD)やtriggered activityなどの異常な波形を検出できることが明らかになった(**図3**)。こちらはFPDとは異なり、既存の*in vitro*評価系では検出できないような不整脈のリスク評価につながると考えられ、非常に興味深い。現在、我々は成熟した分化心筋細胞を用いて同様のアッセイを行っており、催不整脈作用の評価に成熟心筋の特性が必要なのか明らかにする予定である。

今後、多点電極システムを用いた試験法の確立に向けて大規模なバリデーションを実施する場合、様々な実験条件を揃える必要がある。例えば、自律拍動なのかペーシングなのか、細胞の播種密度や培養期間、FPDの解析パラメーターの選択、EADの波形基準などがあげられる。特に、EADにおいては統一的な波形の判定基準の見解が得られていないので、波形の目合わせを行って情報を共有しながら

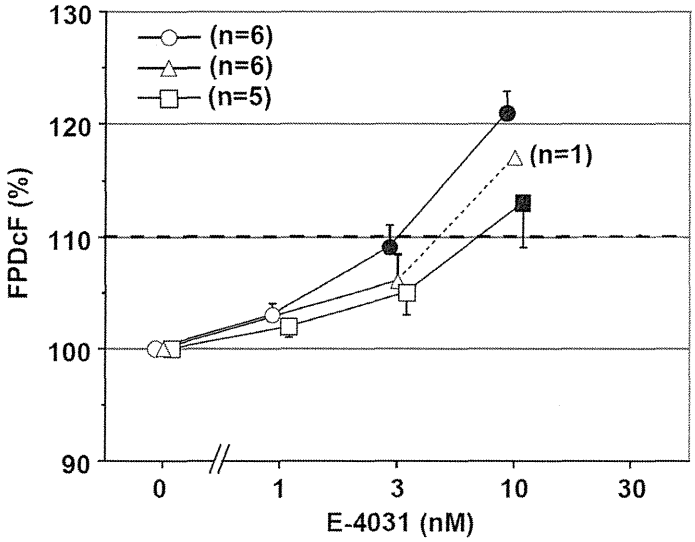

図2　E-4031によるFPD延長
各施設において、hERG阻害剤E-4031によってFPDの延長が認められた。

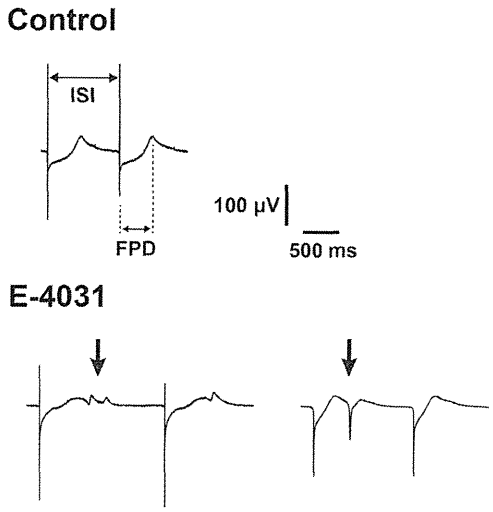

図3　E-4031による異常波形
E-4031によって、Triggered activityやEarly afterdepolarizationなどの異常な波形が認められた。

設定する必要があると思われる。

なお、今回は多点電極のデータを紹介したが、それ以外にも膜電位感受性色素やカルシウムイメージング、心収縮など様々な薬理評価法があり、陽性対照物質、陰性対照物質などのデータをもとに再現性や信頼性を評価していく必要がある。2013年に発足した製薬協タスクフォース(TF-5)においても様々な検証が行われており、今後の解析を待ちたい。

5. ガイドラインに向けた展望

ここ数年、ヒトiPS細胞を使った心毒性試験に関する発表が相次ぎ、iPS由来分化心筋細胞が催不整脈作用の評価に使えるのではないか、という機運が高まってきている。さらに、2013年7月から、FDA/HESI/CSRC*においてCiPA (Comprehensive *in vitro* Proarrhythmia Assay) の枠組みが発足し、薬剤による不整脈誘発リスク評価に関して国際的な議論も開始された[7,8]。特に、S7Bガイドラインの改定やE14ガイドラインの廃止などを見据えることを明言している。現在市販されている分化心筋細胞はメーカーの差やロット差等があるとされるが、良い細胞がないから議論できない、では全く前に進まないので、発想を変えて、今ある細胞で何ができるのか？を考える時期に来ている。日本としても、国内におけるiPS由来分化心筋細胞の大量かつ安定な供給体制を整備するとともに、多くの薬剤に対する心毒性データを揃えて、国際協調をはかりながらiPS細胞の実用化をすすめていく必要がある。

6. まとめ

ヒトiPS細胞の分化誘導技術などの研究が進展し、またCiPAなどの国際的な議論も開始されたことにより、ヒトiPS細胞を心毒性試験に利用する機運が高まってきている。日本としても、ガイドライン化を見据えて科学的な根拠をしっかりと確保しておかなければならない。将来的には、日本発のヒトiPS細胞技術を用いて、心毒性の発生を回避することが可能となり、より安全な医薬品が提供されることを期待したい。

7. 謝辞

本研究は、国立医薬品食品衛生研究所薬理部　関野祐子先生、東京医科歯科大学難治疾患研究所生体情報薬理分野　古川哲史先生　黒川洵子先生、東邦大学医学部薬理学講座　杉山篤先生　安東賢太郎先生　中村裕二先生、エーザイ株式会社　澤田光平先生　宮本憲優先生、株式会社新日本科学　松尾純子先生との共同研究です。深く感謝申し上げます。また、2014年1月に開催された第1回心臓安全性に関するシンクタンクミーティング2014 in 霧島に参加

* FDA：Food and Drug Administration
HESI：Health and Enviromental sciences Institute
CSRC：Cardiac Safety Research Consortium

された方々との討論も大変参考になりました。この場をお借りして感謝申し上げます。

参考文献

1) Bock C, Kiskinis E,et al：Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. Cell 2011.144.439-452.
2) Ferri N, Siegl P,et al：Drug attrition during pre-clinical and clinical development: understanding and managing drug-induced cardiotoxicity. Pharmacol Ther 2013.138.470-84.
3) Burridge PW, Keller G,et al：Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. Cell Stem Cell 2012.10:16-28.
4) Uosaki H, Fukushima H, et al：Efficient and scalable purification of cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells by VCAM1 surface expression. PLoS ONE 2011;6:e23657.
5) Lieu DK, Fu JD, et al: Mechanism-based facilitated maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Circ Arrhythm Electrophysiol 2013.6.191-201.
6) Nakamura Y, Matsuo J, et al：Assessment of testing methods for drug-induced repolarization delay and arrhythmias in an iPS cell-derived cardiomyocyte sheet: multi-site validation study. J Pharmacol Sci 2014.124.494-501.
7) Chi KR. Revolution dawning in cardiotoxicity testing. Nat Rev Drug Discov 2013.12.565-567.
8) Sager PT, Gintant G, et al：Rechanneling the cardiac proarrhythmia safety paradigm:a meeting report from the Cardiac Safety Research Consortium. Am Heart J 2014.167.292-300.

再生医療における臨床研究と製品開発

諫田　泰成

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第二室 室長

(株)技術情報協会

「再生心筋細胞を用いた安全性薬理評価系の開発」　抜刷

2013年9月発刊

第3節　再生心筋細胞を用いた安全性薬理評価系の開発

はじめに

ヒト iPS 細胞は，今まで入手が困難であったヒト細胞の作製が可能となるため，「再生医療」と「創薬」の実用化が期待されている（図 1）。再生医療への注目度は非常に高く，ヒト iPS 細胞から作成した網膜色素上皮細胞を移植する臨床研究が 2012 年度に申請され，正式に承認された。創薬応用としては，医薬品の安全性や有効性の評価に対する利用が考えられ，創薬プロセスの早い段階で医薬品候補化合物の副作用などを予測できれば，臨床試験における予測性の向上や安全性確保，開発コスト削減などが期待される（図 1）。

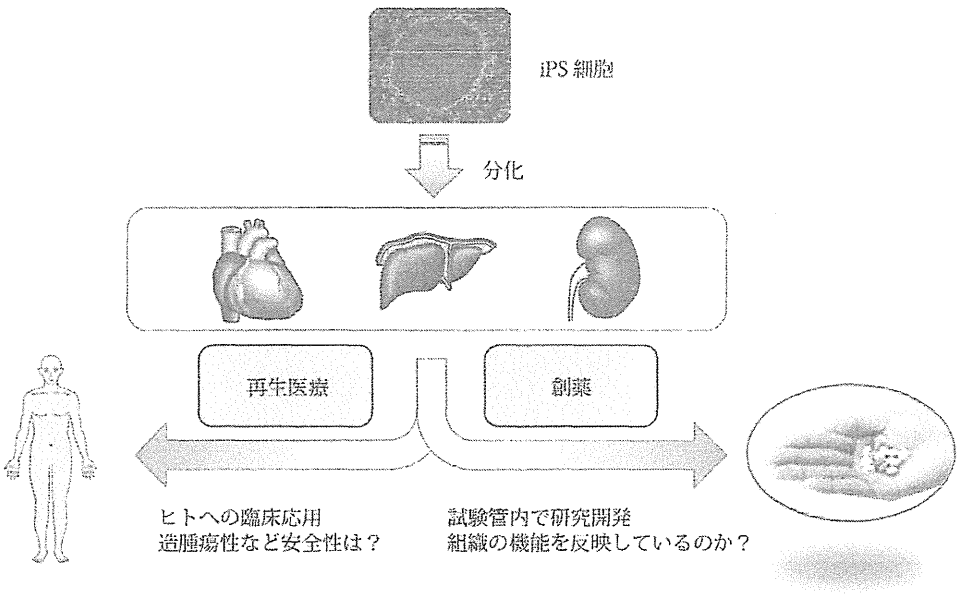

図 1　ヒト iPS 細胞の医療応用への可能性

これらのヒト iPS 細胞の実用化に向けた課題として，ヒト未分化 iPS 細胞の品質，すなわち株間の差，継代数や研究室間の差などが明らかになり，国内外のプロジェクトにより標準化の作業が進められている[1]。しかし，ヒト iPS 細胞由来の分化細胞に関してはほとんど標準化が手付かずであり，分化誘導の標準プロトコールや分化細胞の品質評価，分化指向性などあまり明らかになっていない。

また，再生医療と創薬応用でそれぞれ克服すべき課題も明らかになってきている。再生医療においては，分化細胞の安全性の確保が必須であり，残存している未分化 iPS 細胞の検出など造腫瘍性の評価法の開発が進められている[2]。分化心筋細胞に関しては，移植によって不整脈が誘発されないかなどの検証も必要である。創薬応用は，in vitro のアッセイ系で分化細胞を使用するため再生医療とは異なり安全面のハードルが低く分化製品に対するウイルス導入などの加工も可能であるが，元の臓器の性質を反映した成熟した細胞が必要と考えられる。

そこで本稿では，ヒト iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導技術ならびに分化心筋細胞の電気生理学的特性を概説し，将来的にヒト iPS 細胞の創薬応用実用化に向けて整備すべき課題について考察したい。

1.　ヒト iPS 細胞の心筋分化誘導法

1.1　EB 形成法

ヒト iPS 細胞から分化心筋細胞の一般的な作製法として，図 2A に示すような胚様体（Embryoid body, EB）を形成させる方法が知られている。胚の発生過程を in vitro で模倣するためにマウス ES 細胞から擬似的な胚である EB を形成さ

せる方法が開発され，ヒト iPS 細胞にも応用されている。

マウス ES 細胞の場合には，未分化 ES 細胞をトリプシン処理により single cell にして，非接着コート処理済の 96 ウエルプレートなどを用いて EB を形成する。一方，ヒト iPS 細胞の場合には single cell にすると細胞死が起きるため，最初は小さな細胞塊を用いて EB を作成する必要がある。小さな細胞塊はヒト iPS 細胞のコロニーを CTK 溶液（トリプシン，コラーゲナーゼを含む分散液）などで処理した後ピペッティングすることによって作製し，低接着ディッシュに移す。すぐに 10% 血清を含む DMEM などの分化培地に変更すると細胞死が誘導されることがあるため，我々は basic fibroblast growth factor（bFGF）を含む未分化維持培地で数日間培養して EB を形成させてから，3 日ごとに半量を分化培地（10%血清，0.1mM 2- メルカプトエタノール，非必須アミノ酸を添加した DMEM）に切り替えている。未分化維持に重要な bFGF の除去により分化スイッチが ON になり，外・中・内胚葉の三方向へ分化が誘導される。中胚葉を経由して心筋にも分化が誘導され，分化培地で EB の培養を続けると 2 ～ 3 週間後に拍動する EB が観察される。

EB 法の欠点は，三方向へ分化が誘導されるため，特定の細胞への分化効率が低いことである。EB の中でも心筋細胞は 10%程度しか含まれていない。そこで，心筋分化効率を高くするために分化を亢進する液性因子が探索され，BMP-4，Wnt3a，G-CSF など様々な因子が報告されている[3-5]。もう一つの欠点は，EB のサイズが不均一で形状もばらばらであるため，EB 間の差が大きく拍動数などもバラつくことである。我々は EZ passage（Invitrogen #23181-010）を使用してコロニーを処理し，できる限り均一なサイズとなるように心掛けている。最近，V 字型ウエルの中で強制的に EB を形成させるプレートがいくつか報告されており，形やサイズのそろった EB 作成法の開発が期待される。

このように EB 形成を介する分化プロトコールは比較的簡便であり，特別な試薬を用いることなく血清を含む培地で分化誘導も可能であるが，問題点として，ヒト iPS 細胞には分化指向性が存在し，株間で心筋分化能に差が認められることがあげられる。公的な細胞バンクから入手可能な株の中で，201B7 株，253G1 株は心筋分化能が高いが，Tic 株（JCRB1331）はほとんど拍動が認められないことから，ヒト iPS 細胞には分化の方向性を規定する特性（分化指向性）があると考えられる。Tic 株は肝臓への分化効率が高いと報告されており[6]，心筋に対しては分化抵抗性を有する可能性がある。分化指向性に関するメカニズムや選別のマーカーなどは明らかになっていないので，今後の研究の進展が待たれる。目的に応じて最適なヒト iPS 細胞株を入手できるように、分化特性も含めた細胞バンクの整備が望まれる。また、そのような情報を共有するシステムも必要である。

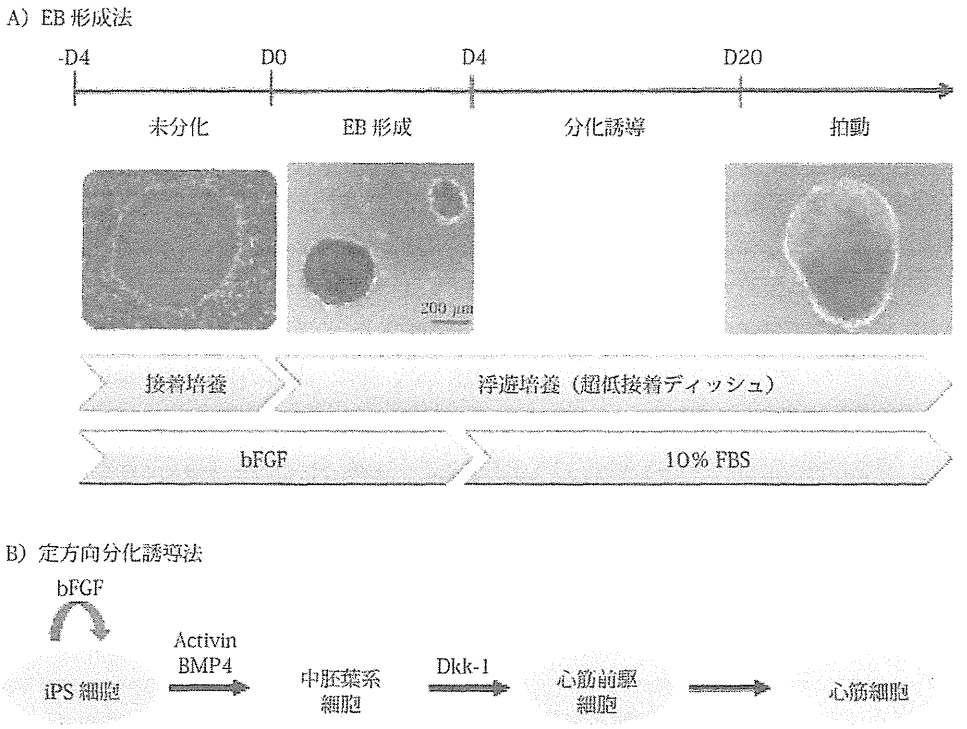

図 2　ヒト iPS 細胞の心筋分化誘導法

1.2 定方向分化誘導法

定方向分化誘導法とは，液性因子などを用いて特定の方向へ分化を特徴付ける方法であり，心筋細胞の場合は，中胚葉⇒心筋前駆細胞⇒心筋細胞，と段階的に分化誘導を行うことを指す（図 2B）。この際，各ステップで添加する液性因子は，心筋細胞の発生過程や ES 細胞由来分化細胞に発現している受容体などを元にして，液性因子のスクリーニングや最適化が行われている[7]。

まず，ヒト iPS 細胞をマトリゲルでコートしたディッシュに高密度で播種して，数回継代を行うことによりフィーダーをできる限り除去した後，Activin により中胚葉や内胚葉の元となる原条へ分化誘導する。BMP-4 の添加により中胚葉へ分化誘導がかかる。次に，Wnt antagonist である Dickkopf-1（Dkk-1）などにより心筋前駆細胞の方向へ分化を行い、最終的には心筋細胞の拍動が観察される。

EB 形成法と比較すると，定方向分化誘導法は拍動までの期間が約 1 週間と顕著に短縮できる特徴がある。実際，酵素処理により分散しトロポニンで染色すると 40% 以上の細胞が心筋細胞であることから，分化効率も非常に高いことを確認している。また，接着したまま分化誘導を行うのでシートのような状態となり，ダイナミックな拍動が観察できる。欠点は，分化誘導のステップが増えて EB 形成法よりも手間とコストがかかること、ヒト iPS 細胞のコロニーの密度により分化効率が大きく異なることなどがあげられる。また，添加する因子は濃度に加えてタイミングも重要である。Wnt シグナルは心筋分化の初期には促進的に作用し，後期では抑制的に作用することが知られており、タイミングが合わない場合には全く逆の作用をもたらすことが起こり得る。従って，液性因子を添加する時期・濃度・順序などに関して慎重に最適化する必要がある。

このように心筋細胞への分化プロトコールは EB 法，定方向分化法ともに改良が加えられてきているが，分化心筋細胞における遺伝子発現やイオンチャネルの発現は幼若タイプである[8,9]。後述するように、分化心筋細胞は電気生理学的にも未成熟であるため，現在，我々は成熟させる分化誘導法を構築中である（投稿準備中）。再生医療においては細胞移植により心機能が回復するのかが焦点となるので分化細胞の成熟度はあまり問題にならず，むしろ液性因子の産生が重要と言われているが，創薬応用の場合は成熟度が薬剤のスクリーニング効率に影響をあたえる可能性があり，今後の研究に進展が期待される。

2. 分化心筋細胞の電気生理学的な特性

一般的に細胞の特性の指標として遺伝子発現やマーカー分子の発現などがあげられるが，心筋細胞で最も重要なことは電気生理学的な特性である。筆者らは創薬応用に向けて，国内の公的な細胞バンクよりヒト iPS 細胞株を入手して，分化心筋細胞の品質を検証している。

201B7 株由来の拍動 EB をピンセットで引っ張るかカッターで刻んだ後にトリプシン処理をすると single cell を単離でき，ラミニンでコートしたディッシュに再播種すると拍動する細胞が得られる。この単離拍動細胞を用いてマニュアルパッチクランプにより活動電位を測定したところ，結節，心房，心室型の各サブタイプが存在していることが明らかになった。しかし，心筋細胞の静止膜電位が通常は -90mV 程度であるのに対して分化心筋細胞はいずれも -40mV 程度と浅いことから，成熟が不十分である可能性が考えられる（図 3A）。次に，米国 Cellular Dynamics International 社で販売されているヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞（iCell）を iPS アカデミアジャパン株式会社経由で入手し，同様に活動電位の測定を行った。その結果，やはり静止膜電位が浅かったことから（図 3B），元となる iPS 細胞の株によるのではなく分化心筋細胞の共通の課題であることが示唆された。

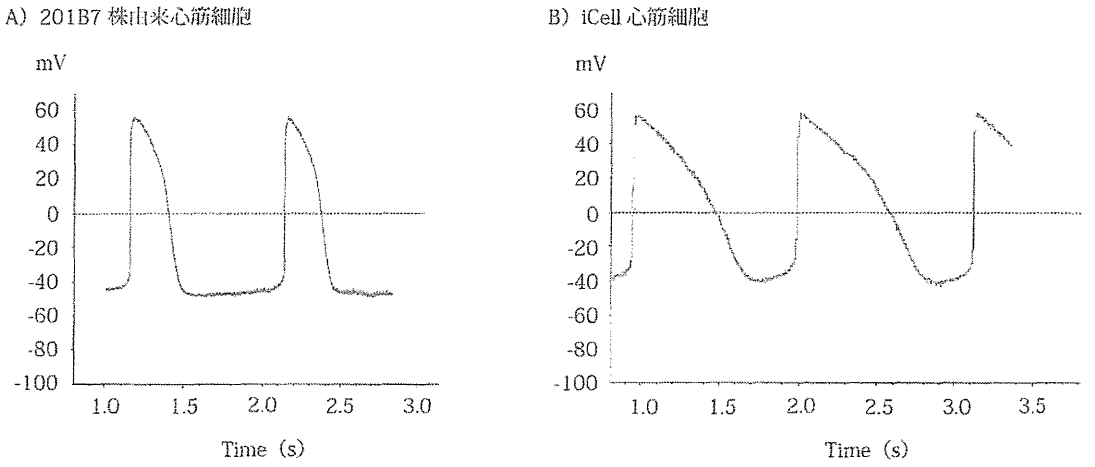

図3　分化心筋細胞の活動電位

このような分化心筋細胞を用いた薬理作用の評価においては，様々なヒト iPS 細胞株から種々の手法を用いて心筋へ分化誘導すると，心筋細胞のサブタイプの割合や成熟度が不均一となり，薬剤に対する反応性についてもばらつくことが予想される。同一の化合物に対して同様の薬理作用が観察できない限り、催不整脈の予測が困難であり、バラつきを抑える必要がある。そこで，我々は次に述べるように，心筋シートを用いた実験プロトコールを整備している。

3.　分化心筋細胞を用いた安全性薬理試験

分化心筋細胞を用いた創薬応用の例として，薬剤性不整脈のリスク評価が考えられる。医薬品によって発生する副作用の中でもトルサード・ド・ポアント（TdP）とよばれる重篤な不整脈は重要で，発生頻度は極めて少ないもののまれに心室細動に移行し突然死に至る[10]。TdP は QT 間隔（心室の興奮から再分極までの時間）の延長を伴うことから，現在 TdP のリスクは，非臨床試験としてカリウムチャネル（IKr）を発現させた HEK293 細胞を用いてカリウム電流阻害作用を検討し（hERG 試験法），次いで in vivo で動物の QT 延長作用を評価し，その後臨床において Thorough QT/QTc 試験により厳密にヒトの QT 間隔に対する作用を調べることにより，一定の評価が可能である（図5）。しかしながら，hERG 試験法は疑陽性が多く，有用な化合物を化合物のスクリーニングのプロセスで除外してしまう可能性がある。ヒト iPS 細胞由来の分化心筋細胞は，カリウム（IKs/IKr）に加えて，カルシウム，ナトリウムなど複数のチャネルが発現しているため再分極電流への影響を総合的に評価できる利点があり，疑陽性が減少して予測性が向上することが期待される。今までは，心筋への分化誘導条件（細胞株、分化誘導分化誘導法、日数，培養細胞密度など）が異なるばかりではなく，心筋細胞の電気生理学的機能の測定方法も異なっていたために，実験データを研究間で比較検討ができず，実験結果の再現性を確かめることが困難であった。そこで，我々は電気生理学的特性の解析法を比較検討し、不整脈検出プロトコルの標準化作業を行っている。

個々の心筋細胞の場合は，パッチクランプで解析が可能である。一つ一つの細胞の活動電位の波形をもとに QT 間隔を評価するため，心筋細胞のサブタイプの情報も同時に得られる利点がある。さらに，QT 延長などに起こることが多い早期後脱分極も直接検出することができる。しかし，前述したように個々の波形にバラつきが認められること，スループット性が低く大規模なスクリーニングには向かないこと，侵襲があるので短時間の薬理作用に限定されてしまうことなどを考慮すると，現実的には薬理作用の検出には向かないと考えられる。

細胞塊の場合は，図 4A に示すような多点電極システムを用いて心電図の解析が可能である。電極を埋め込んだディッシュに細胞塊を接着させると，細胞外電位（Field Potential; FP）が測定できる。FP は細胞内で記録される活動電位の微分波形に一致し，心電図によって得られる信号と同様の変化を記録する事ができる[11]。従って，ナトリウムによるピークから活動電位再分極時に観察されるカリウムのピークまでの時間である FPD は，心電図における QT 間隔に相当する。

FPD を用いる利点は，侵襲がないため医薬品候補化合物の長時間曝露による薬理作用が調べられることである。しかし，細胞塊ごとの FP の波形が一定の範囲内になるよう均一な塊の作製技術が必要不可欠である。さらに，EB が電極に接していなければシグナルが取得できない。もともと心筋細胞はガラスに張り付きにくい性質がある上に，拍動によってディッシュから剥がれたり接着場所が変わったりするので，ディッシュをコートする基材やデバイスの改善が求められる。我々が作製したヒト iPS 細胞由来の拍動 EB も市販のヒト ES 細胞由来細胞塊（スウェーデン Cellectis 社）も細胞外電位の測定に手間と時間がかかり，スループット性も低く，現時点では薬理作用の検出にはまだまだ遠いと言わざるを得ない。

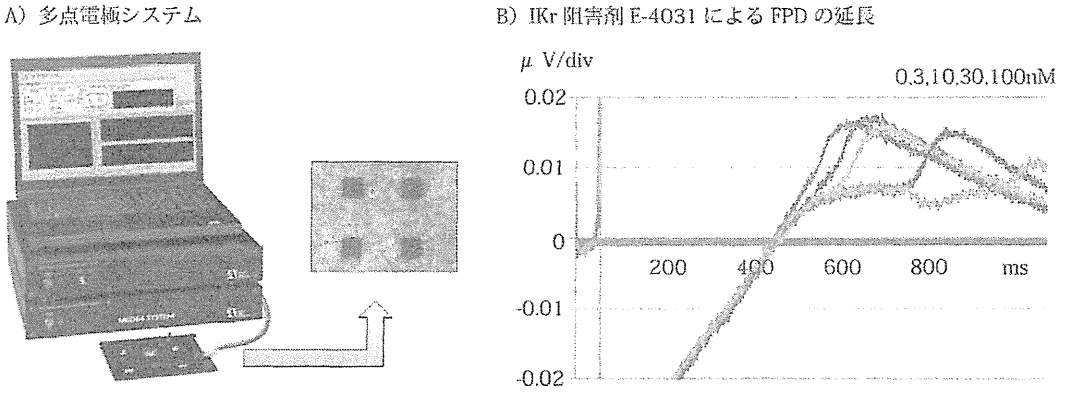

図 4　心筋シートにおける FP の解析

そこで，我々は心筋シートを用いて多点電極システムによる QT 延長評価系の開発に着手した。心筋シートは分化心筋細胞を密に播種することで容易に作成することができ同期した拍動が観察される。シート形成により EB 間や個々の心筋細胞などのバラつきが平均化されるため安定したデータが得られると期待される。また，シートは多点電極全体を覆うことになるので，FP のデータ取得も大幅に改善される。実際例として，陽性対照物質である IKr 阻害剤 E-4031 によって心筋シートの FPD 延長が検出できる（図 4B）。現在、産官学の枠組みで市販の分化心筋細胞を用いて、薬理作用の再現性，メーカの相違，ロット間差など比較を行っており、不整脈検出プロトコールの標準化を行っている。

最終的に、分化心筋細胞を用いた試験法として確立するためには，検出感度，再現性，信頼性などを検証する必要がある。検出感度に関しては，今のところ，分化心筋細胞を用いた評価系は感受性が高いような結果が得られており，hERG 試験で落とされた医薬品候補化合物を拾えるようなフォローアップに使用できるのかは不明である。再現性や信頼性を明らかにするためには，特定のラボ内のデータのみでは評価できないので，施設内及び多施設間で多くの化合物を用いたバリデーションを行う必要がある。本当に分化心筋細胞を用いる試験系が hERG 試験よりも優位性があるのか？分化心筋細胞の試験法が手間やコストをかけるだけの価値があるのか？ヒトにおける予測性が向上するのか？臨床試験を代替しうるのか？などを明らかにしなければならない。

おわりに

ヒト iPS 細胞の分化誘導技術などの研究の進展により，ヒト iPS 細胞の実用化に向けた動きが盛んである。創薬応用の実用化に向けては，ヒト iPS 細胞の株間の差，分化細胞の規格，安全性薬理試験のプロトコール整備など再生医療とは異なる多くの課題が残されている。薬剤性不整脈のリスク評価に関しては，現行の hERG 試験法に対する優位性も重要なポイントである。これらの課題を克服することにより、創薬プロセスの効率が向上し，将来的には承認審査の迅速化が実現することが期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり，貴重なご助言とご指導を賜りました国立医薬品食品衛生研究所薬理部　関野祐子部長，東京医科歯科大学難治疾患研究所生体情報薬理分野　古川哲史教授，黒川洵子准教授，エーザイ株式会社　澤田光平博士，宮本憲優博士，株式会社 Ion Chat Research　齋藤光義博士に深く感謝申し上げます。

文　　献

1) Bock C, Kiskinis E, Verstappen G, Gu H, Boulting G, Smith ZD, Ziller M, Croft GF, Amoroso MW, Oakley DH, Gnirke A, Eggan K, Meissner A.Cell 144:439-452 (2011)
2) Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Hirata N, Kanda Y, Suzuki K, Takahashi M, Nishikawa S, Kawamata S, Sato Y.PLoS ONE 7:e37342 (2012)
3) Takei S, Ichikawa H, Johkura K, Mogi A, No H, Yoshie S, Tomotsune D, Sasaki K.Am J Physiol. 296:H1793-H1803 (2009)
4) Tran TH, Wang X, Browne C, Zhang Y, Schinke M, Izumo S, Burcin M.Stem Cells 27:1869-1878 (2009)
5) Shimoji K, Yuasa S, Onizuka T, Hattori F, Tanaka T, Hara M, Ohno Y, Chen H, Egasgira T, Seki T, Yae K, Koshimizu U, Ogawa S, Fukuda K.Cell Stem Cell 6:227-237 (2010)
6) Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H.MolTher. 19: 400-407 (2011)
7) Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, Fukushima H, Kuwahara K, Harada M, Matsuda H, Matsuoka S, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Ikeda T, Sakata R, Mummery CL, Nakatsuji N, Yamanaka S, Nakao K, Yamashita JK.PLoS ONE, 6:e16734 (2011)
8) Beqqali A, Kloots J, Ward-van Oostwaard D, Mummery C, Passier R.Stem Cells, 24:1956-1967 (2006)
9) Cao F, Wagner RA, Wilson KD, Xie X, Fu JD, Drukker M, Lee A, Li RA, Gambhir SS, Weissman IL, Robbins RC, Wu JC.PLoS ONE, 3:e3474 (2008)
10) Yap YG and CammAJ.Heart 89:1363-1372 (2003)
11) Kamp TJ and January CT. Drug Discovery Today: Disease Mechanisms 1:45 (2004)

The Journal of Toxicological Sciences (J. Toxicol. Sci.)
Vol.39, No.5, 717-723, 2014

Original Article

Comparative metabolome analysis of cultured fetal and adult hepatocytes in humans

Su-Ryang Kim[1], Takashi Kubo[1,4], Yukie Kuroda[1], Maki Hojyo[1], Takuya Matsuo[2], Atsuko Miyajima[3], Makoto Usami[1], Yuko Sekino[1], Taku Matsushita[2] and Seiichi Ishida[1]

[1]Division of Pharmacology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
[2]Faculty of Biotechnology and Life Science, Sojo University, 4-22-1 Ikeda, Nishi-ku, Kumamoto 860-0082, Japan
[3]Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
[4]Present address: Division of Translational Research, Exploratory Oncology Research & Clinical Trial Center, National Cancer Center, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan

(Received May 19, 2014; Accepted July 6, 2014)

ABSTRACT — The liver is the central organ of metabolism, but its function varies during development from fetus to adult. In this study, we comprehensively analyzed and compared metabolites in fetal and adult hepatocytes, the major parenchymal cell in the liver, from human donors. We identified 211 metabolites (116 anions and 95 cations) by capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS) in the hepatocytes cultured *in vitro*. Principal component analysis and hierarchical clustering analysis of the relative amounts of metabolites clearly classified hepatocytes into 2 groups that were consistent with their origin, i.e., the fetus and adult. The amounts of most metabolites in the glycolysis/glyconeogenesis pathway, tricarboxylic acid cycle and urea cycle were lower in fetal hepatocytes than in adult hepatocytes. These results suggest different susceptibility of the fetal and adult liver to toxic insults affecting energy metabolism.

Key words: Metabolome, CE-TOFMS, Human fetal hepatocytes, Human adult hepatocytes

INTRODUCTION

The liver is the central organ of human metabolism. The liver performs several complex reactions such as plasma protein synthesis, bile production, nutrient metabolism, energy metabolism, and disposal of waste products of intermediary metabolism. In addition, the liver performs detoxification of xenobiotic compounds through phase I and II biotransformation (Arias *et al.*, 2009).

Hepatocytes are the predominant cell type in the liver, accounting for approximately 70% of the mass of the adult organ. Hepatocytes, along with biliary epithelial cells, are derived from the embryonic endoderm, while stromal cells, stellate cells, Kupffer cells and blood vessels, are of mesodermal origin (Zaret, 2008; Zhao and Duncan, 2005).

The fetal liver is important for development, and its function is distinct from that of the adult liver, functioning primarily as a hematopoietic organ. Chinnici *et al.* (2014) reported that cell suspensions obtained after collagenase digestion of human fetal livers contained approximately 35% of hepatocytic/epithelial lineage cells, while the remaining cells were mainly erythroid cells. In rodents, fetal hepatocytes are glycolytic and have few mitochondria, suggesting that their energy production is lower than that of adult hepatocytes (Burch *et al.*, 1963; Oliver *et al.*, 1983; Vergonet *et al.*, 1970). A comparison of metabolic function between rat fetal and adult hepatocytes revealed lower activity of key metabolic enzymes in the fetal hepatocytes, including phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose 6-phosphatase for gluconeogenesis, carnitine palmitoyltransferase I and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase for fatty acid oxidation, and cytochrome c and β-ATP synthase for mitochondrial energy metabolism (Sharma *et al.*, 2008).

It is also known that the expression of liver-specific genes changes transcriptionally and post-transcriptionally during rat development (Panduro *et al.*, 1987). In humans, several cytochrome P450 enzymes such as CYP1A1, 1A2, 2A6, 2C9, 2E1, and 3A4 were expressed in adult livers, whereas fewer forms of cytochrome P450, namely CYP1A1 and 3A7, were detected in fetal livers

Correspondence: Seiichi Ishida (E-mail: ishida@nihs.go.jp)

(Shimada *et al.*, 1996).

In recent years, comprehensive transcriptome analysis of rat liver and primary cultured hepatocytes treated with several chemicals was carried out and the gene expression database was used for identification of predictive biomarkers for drug-induced toxicity at or before the pre-clinical stage of drug development (Uehara *et al.*, 2010).

The metabolome is the complete set of small molecules (metabolites) in cells in a particular physiological condition and considered to be closely related to the phenotype. Thus, metabolome analysis plays a critical role in understanding complex biochemical and biological systems (Delneri *et al.*, 2001).

Recently, metabolome analysis using capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) has been developed (Monton and Soga, 2007) and applied to the characterization of ionic metabolites from several diseases, including cancer (Hirayama *et al.*, 2009; Kami *et al.*, 2013).

Global metabolome analysis of liver has been performed in several animal models. The differences of metabolic profile in an alcoholic fatty liver in zebrafish were analyzed by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (Jang *et al.*, 2012). Metabolome profile alterations in fatty liver induced by a high-fat diet in rats were analyzed by GC-MS (Xie *et al.*, 2010). The metabolic profile changes in the liver were also analyzed in aging mice (Houtkooper *et al.*, 2011) and undernourished neonate mice (Preidis *et al.*, 2014). In humans, metabolic profiling and systems biological approaches were used to elucidate the mechanisms of metabolic syndrome and fatty liver disease (Dumas *et al.*, 2014). However, metabolome analysis of prenatal or neonatal human liver has not been investigated.

In this study, to clarify the differences of the basal metabolic functions along with the development of the liver, *in vitro* cultured human fetal and adult hepatocytes were compared by metabolome analysis using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS).

MATERIALS AND METHODS

Cells and culture conditions

Human fetal hepatocytes (Hc cells, CS-ABI-3716) were purchased from DS Pharma Biomedical (Osaka, Japan). Hc cells were originally prepared from six normal fetal livers (gestation average 16 weeks) by Applied Cell Biology Research Institute (Kirkland, WA, USA). The cells were maintained in CS-C medium kit R (DS Pharma Biomedical) as described previously (Matsushita *et al.*, 2003). The Hc cells were divided into three aliquots that were cultured separately.

Primary human hepatocytes (HEP220) from three adult donors were purchased from Biopredic International (Rennes, France). The primary human hepatocytes were obtained from patients undergoing resection for primary or secondary tumors, and isolated by collagenase perfusion of histologically normal liver fragment. Patient information is listed in Supplementary Table S1. The cells were maintained in Incubation Medium (MIL214; Biopredic International).

Metabolite extraction

Ionic metabolites were extracted from 2-3 x 10^6 cells of human fetal and adult hepatocytes. Cells were washed twice with 5% mannitol solution and suspended in 1 mL of cold methanol containing 10 μM internal standards (Human Metabolome Technologies, Inc., Yamagata, Japan). The number of cells in the same culture condition was counted with a haemocytometer. The cell suspension diluted to 2 mL with methanol was mixed with 2 mL of chloroform and 0.8 mL of Milli-Q water. After centrifugation, the separated methanol–water layer was ultrafiltered using an ultrafiltration tube (Ultrafree-MC, UFC3 LCC; Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) with a molecular weight cut-off of 5 kDa to remove proteins. The filtrate was evaporated, dissolved in 50 μL of Milli-Q water, and analyzed using CE-TOFMS.

Measurement of ionic metabolites using the CE-TOFMS system

CE-TOFMS experiments were performed using an Agilent Capillary Electrophoresis System equipped with an Agilent 6210 Time of Flight mass spectrometer, Agilent 1100 isocratic HPLC pump, Agilent G1603A CE-MS adapter kit, and Agilent G1607A CE-ESI-MS sprayer kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

Cationic metabolites were analyzed using a fused silica capillary i.d. 50 μm × 80 cm, with Cation Buffer Solution (Human Metabolome Technologies, Inc.) as the electrolyte. The sample was injected at a pressure of 5.0 kPa for 10 sec. The applied voltage was set at 27 kV. Electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) was conducted in the positive ion mode, and the capillary voltage was set at 4,000 V. The spectrometer was scanned from *m/z* 50 to 1,000.

Anionic metabolites were analyzed using a fused silica capillary i.d. 50 μm × 80 cm, with Anion Buffer Solution (Human Metabolome Technologies, Inc.) as the electrolyte. The sample was injected at a pressure of 5.0 kPa for 25 sec. The applied voltage was set at 30 kV. ESI-MS was conducted in the negative ion mode, and the cap-

illary voltage was set at 3,500 V. The spectrometer was scanned from *m/z* 50 to 1,000. Other conditions for CE-TOFMS experiments were described previously (Soga *et al.*, 2007).

Data analysis

The raw data obtained by CE-TOFMS were processed with MasterHands software (Human Metabolome Technologies, Inc.; Sugimoto *et al.*, 2010). Peak information including *m/z*, migration time (MT) and area was obtained. The migration time of each sample was normalized relative to the internal standards. The resulting relative area values were further normalized based on the total number of cells. Each peak was aligned according to similar migration time on CE and the *m/z* value was determined by TOFMS. Metabolites in the samples were identified by comparing the migration time and *m/z* ratio with those of authentic standards, in which differences of ± 0.5 min and ± 10 ppm were permitted, respectively. Quantitative values of metabolites are the mean ± S.D. for 3 replicates.

The relative quantitation data of identified metabolites were imported into GeneSpring GX software (Version 12.0; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), and subjected to principal component analysis (PCA). The relative amounts of metabolites were compared by Welch's *t*-test between fetal and adult hepatocytes, with $p < 0.05$ considered to be statistically significant. Hierarchical clustering analysis and heatmap representations were also performed with GeneSpring GX software.

RNA isolation and quantitative RT-PCR analysis

Total RNA was isolated from hepatocytes with TRIzol reagent (Invitrogen, Breda, the Netherlands), followed by purification using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). The concentration and purity of RNA were measured by Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nyxor Biotech, Paris, France). First-strand cDNA was prepared from 1 μg of total RNA using the High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with random primers. Real-time PCR assays were performed with the ABI7900 Real Time PCR System (Applied Biosystems) using the TaqMan Gene Expression Assay for ASS1 (argininosuccinate synthase 1, Hs01597989_g1), ASL (argininosuccinate lyase, Hs00902699_m1), ARG1 (arginase, Hs00968979_m1) and OTC (ornithine transcarbamylase, Hs00166892_m1), according to the manufacturer's instructions. The relative mRNA levels were determined using calibration curves obtained from serial dilutions of the pooled hepatocyte cDNA. Transcripts of β-actin were quantified as internal controls using TaqMan β-Actin Control Reagent (Applied Biosystems). The *t*-test was applied to the comparison of the average values of mRNA levels of urea cycle enzymes between fetal and adult hepatocytes.

RESULTS AND DISCUSSION

Metabolome analysis

We performed metabolome analysis of human fetal and adult hepatocytes using CE-TOFMS. Based on *m/z* values and migration times, 211 metabolites (116 anion and 95 cation) were identified (Supplementary Table S2), and visualized on a large-scale metabolome pathway map (Supplementary Fig. S1), using VANTED software (Junker *et al.*, 2006). Using the whole data set of identified metabolites, we performed a principal component analysis (PCA, Fig. 1) and a hierarchical clustering analysis (HCA, Supplementary Fig. S2) to reveal the similarities/dissimilarities of 2 groups regarding variations in metabolite amounts. From the PCA score plot, fetal and adult hepatocytes were separated in the first principal component (PC1, 47% proportion). The PCA plot indicated that the metabolomic profile of the adult hepatocytes was much more heterogeneous than that of the fetal hepatocytes (Fig. 1). This may reflect the individual differences of donor patients. Metabolites with high absolute values of factor loadings for PC1 included amino acids, glycolysis/glyconeogenesis and tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediates, and urea cycle intermediates (data not shown). A heat map representation of HCA was per-

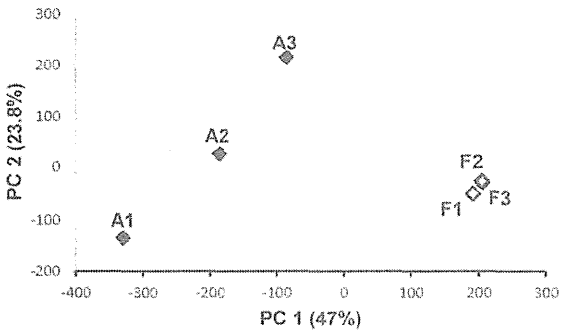

Fig. 1. PCA score plot using the normalized metabolomic data from human fetal and adult hepatocytes. The samples were fetal (F1 to F3, open diamonds) and adult (A1 to A3, filled diamonds) hepatocytes. Percentage values indicated on the axes represent the contribution rate of the first (PC1) and the second (PC2) principal components.

Table 1. Highly increased or decreased metabolites in the adult hepatocytes compared to those in the fetal hepatocytes

Compound name	Relative area[a]				Fold change (Adult/Fetal)	
	Fetal hepatocytes		Adult hepatocytes		Ratio	*P* value[b]
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		
increased						
Cys	4.3E-04	1.6E-04	2.9E-02	1.1E-02	66.3	0.050
Ornithine	4.2E-03	1.1E-03	2.5E-01	1.1E-01	59.8	0.057
Cysteine glutathione disulphide	6.3E-04	1.3E-04	2.9E-02	2.1E-02	46.1	0.139
Thiaproline	1.9E-03	1.7E-04	6.6E-02	2.6E-02	34.6	0.050
Glycerophosphocholine	5.6E-02	9.8E-03	1.1E+00	1.0E+00	20.6	0.203
O-Phosphoserine	2.1E-04	4.3E-05	4.1E-03	1.3E-03	19.1	0.038
Glycerol 3-phosphate	4.3E-03	3.4E-04	7.5E-02	4.2E-02	17.7	0.098
Urea	1.8E-02	2.3E-03	2.0E-01	1.1E-01	11.1	0.111
Ala	2.4E-01	6.1E-03	2.3E+00	1.2E+00	9.4	0.102
Glucuronic acid	2.9E-04	2.1E-05	2.6E-03	1.7E-03	9.1	0.138
2-Hydroxybutyric acid	3.7E-04	1.1E-04	3.1E-03	2.4E-03	8.4	0.184
3-Hydroxybutyric acid	2.5E-03	3.3E-04	2.1E-02	1.6E-02	8.3	0.189
Guanidoacetic acid	1.5E-03	1.6E-04	1.2E-02	5.1E-03	8.1	0.069
N-Acetylneuraminic acid	1.4E-03	1.1E-04	1.1E-02	9.8E-03	8.0	0.235
Thiamine	1.0E-03	1.7E-04	8.2E-03	3.7E-03	7.8	0.078
Uric acid	1.3E-04	1.9E-05	9.2E-04	7.3E-04	7.2	0.201
Pyridoxamine 5'-phosphate	5.1E-04	5.7E-05	3.7E-03	1.8E-03	7.1	0.094
N^8-Acetylspermidine	2.5E-03	9.5E-04	1.8E-02	6.4E-03	7.1	0.051
Citrulline	4.3E-03	3.7E-04	2.6E-02	1.0E-02	6.1	0.062
Fumaric acid	5.5E-03	3.7E-04	3.2E-02	2.1E-02	5.8	0.166
Glucaric acid	2.3E-04	5.0E-05	1.2E-03	8.9E-04	5.2	0.200
$NADP^+$	2.2E-03	9.7E-05	1.2E-02	8.0E-03	5.2	0.181
decreased						
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol	3.3E-03	2.5E-04	1.1E-03	3.8E-04	0.3	0.036
2-Oxoisovaleric acid	2.5E-03	2.3E-05	7.6E-04	6.0E-04	0.3	0.040
Gly-Gly	2.2E-03	2.4E-04	6.3E-04	N.A.	0.3	N.A.
Pyridoxine	2.1E-03	1.9E-04	5.9E-04	4.2E-04	0.3	0.091
Carnitine	7.7E-02	1.6E-03	2.1E-02	1.3E-02	0.3	0.015
Gly-Asp	4.5E-03	3.3E-04	1.2E-03	6.9E-04	0.3	0.006
Diethanolamine	5.1E-03	1.6E-03	1.2E-03	1.8E-04	0.2	0.053
Pantothenic acid	3.2E-02	2.3E-03	7.1E-03	6.8E-03	0.2	0.017
Cyclohexylamine	7.2E-03	1.7E-03	1.5E-03	3.4E-04	0.2	0.026
GABA	1.2E-02	9.4E-04	2.7E-03	1.8E-03	0.2	0.004
Phosphocreatine	3.0E-02	4.9E-04	5.5E-03	5.0E-03	0.2	0.014
O-Acetylcarnitine	3.3E-02	1.0E-03	6.0E-03	6.1E-03	0.2	0.015
Fructose 1,6-diphosphate	1.5E-02	1.5E-03	2.4E-03	1.6E-03	0.2	0.009
PRPP	4.4E-03	1.5E-03	6.8E-04	N.A.	0.2	N.A.
β-Ala	1.7E-01	1.2E-02	1.0E-02	1.1E-02	0.1	6.0E-05

[a]S.D., standard deviation; N.D., not detected; N.A., not available.

[b]*p* values are calculated by Welch's t-test between fetal and adult hepatocytes.

formed on both the metabolite and sample axes. The dendrogram of HCA showed that the adult hepatocytes were well-distinguished from the fetal hepatocytes (Supplementary Fig. S2).

Next, the relative amounts of metabolites were compared between fetal and adult hepatocytes and those that displayed greater than 5-fold or less than 0.3-fold change in adult hepatocytes were listed (Table 1). Highly increased metabolites in the adult hepatocytes included glycolysis/glyconeogenesis intermediates, some amino acids, and TCA and urea cycle intermediates; decreased metabolites were glycolysis/glyconeogenesis intermediates and metabolites involved in β-oxidation of fatty acids. This trend was consistent with the PCA results described

above. Statistically significant differences in the relative amounts of metabolites between fetal and adult hepatocytes were not found in metabolites that were increased in the adult hepatocytes, because of the variation between adult hepatocyte samples.

Energy metabolism

We first compared the relative amounts of glycolysis/glyconeogenesis and TCA cycle metabolites between human fetal and adult hepatocytes (Fig. 2), because it was previously reported that fetal hepatocytes are glycolytic and have few mitochondria, suggesting their energy production is lower than that of adult hepatocytes in rat (Burch *et al.*, 1963; Oliver *et al.*, 1983; Vergonet *et al.*, 1970). Our results showed that the levels of glucose 6-phosphate (3.5-fold), fructose 6-phosphate (2.3-fold) and phosphoenolpyruvic acid (2.1-fold) in glycolysis/glyconeogenesis, and fumaric acid (5.8-fold), 2-oxoglutaric acid (4.8-fold), malic acid (4.2-fold) and succinic acid (3.5-fold) in the TCA cycle were higher in the adult compared with the fetal hepatocytes. In contrast, fructose 1,6-diphosphate in glycolysis/glyconeogenesis was significantly lower (0.2-fold, $p = 0.009$) (Fig. 2, Table 1 and Supplementary Table S2). In addition, among the metabolites involved in β-oxidation of fatty acids, the level of glycerol 3-phosphete which is required for synthesis of diacylglycerol and triacylglycerol, was 17.7-fold higher in the adult compared with the fetal hepatocytes, whereas levels of carnitine and *O*-acetylcarnitine which are required for transport of fatty acids into mitochondria from the cytoplasm, were lower (0.3-fold, $p = 0.015$ for carnitine, and 0.2-fold, $p = 0.015$ for *O*-acetylcarnitine, respectively) (Table 1). These results are consistent with previous findings that fetal hepatocytes are glycolytic and possess low mitochondrial activity, and suggest that the pathways of glyconeogenesis and β-oxidation of fatty acid are activated in adult hepatocytes. In fact, the fetus depends on the umbilical supply of glucose via the placenta. Under physiological condition, glucose is not only oxidized to CO_2 but also used to synthesis of new structural components and energy storage materials such as glycogen and fat (Fowden, 1994).

Urea cycle

The relative amounts of urea cycle metabolites were compared between fetal and adult hepatocytes (Fig. 3). The relative amounts of ornithine (59.8-fold), urea (11.1-fold) and citrulline (6.1-fold) were higher in adult compared to fetal hepatocytes (Table 1). The expression levels of urea cycle enzymes were measured by real-time PCR assays and compared between fetal and adult

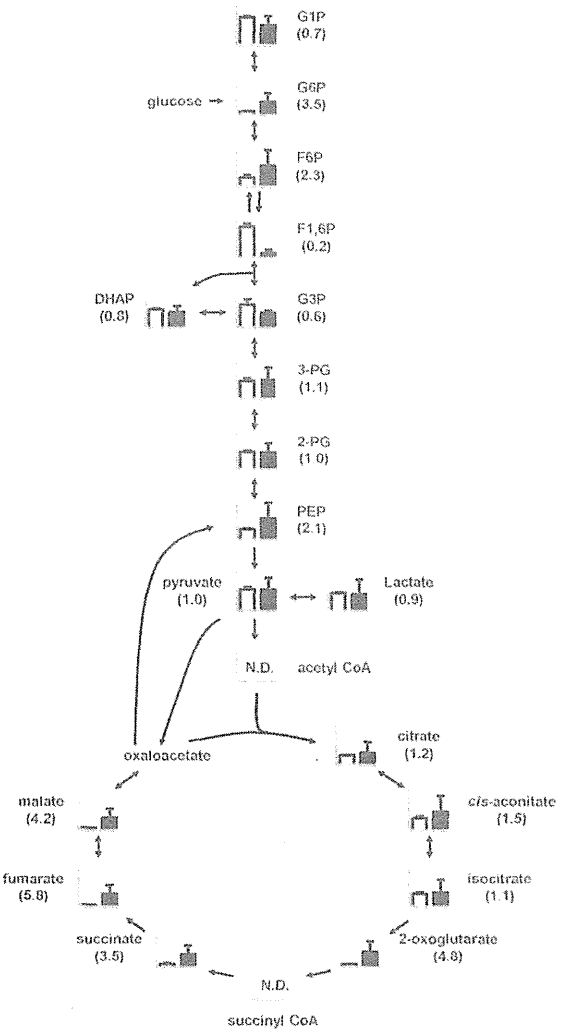

Fig. 2. Comparison of relative amounts of glycolysis and TCA cycle-related metabolites in human fetal (open box) and adult (closed box) hepatocytes using CE-TOFMS. N.D. indicates "not detected". The columns represent relative average amounts and error bars indicate SD. Numbers below the metabolite name represent the ratio of relative amounts of metabolites from the adult hepatocytes to those from the fetal hepatocytes. The abbreviations are as follows: G1P, glucose 1-phosphate; G6P, glucose 6-phosphate; F6P, fructose 6-phosphate; F1,6P, fructose 1,6-diphosphate; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; 3-PG, 3-phosphoglycerate; 2-PG, 2-phosphoglycerate; PEP, phosphoenolpyruvate.

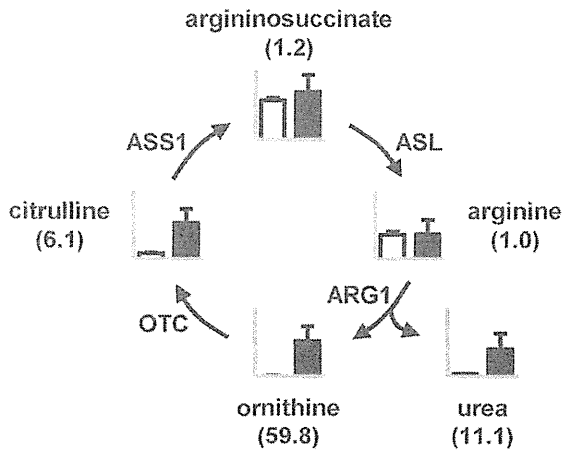

Fig. 3. Comparison of relative amounts of urea cycle metabolites in human fetal (open box) and adult (closed box) hepatocytes using CE-TOFMS. The columns represent relative average amounts and error bars indicate SD. Numbers below the metabolite name represent the ratio of relative amounts of metabolites from the adult hepatocytes to those from the fetal hepatocytes. The abbreviations are as follows: ASS1, argininosuccinate synthase 1; ASL, argininosuccinate lyase; ARG1, arginase; OTC, ornithine transcarbamylase.

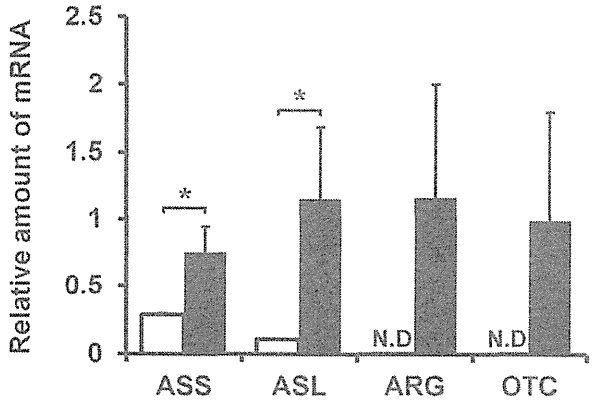

Fig. 4. Quantification of mRNA of urea cycle enzymes by TaqMan real-time RT-PCR in human fetal (open box) and adult (closed box) hepatocytes. mRNA expression levels of urea cycle enzymes were normalized with β-actin mRNA levels. The results indicate the mean ± S.D. *, $p < 0.05$ and N.D., not detected. The abbreviations are as in Fig. 3.

hepatocytes (Fig. 4). The results showed that the expression levels of ASS1 and ASL were significantly higher in the adult compared to the fetal hepatocytes (2.6-fold, $p = 0.014$ for ASS1, and 10.4-fold, $p = 0.027$ for ASL, respectively). Moreover, expression of ARG1 and OTC was detected only in the adult, and not in the fetal hepatocytes. These results indicated that the adult hepatocytes could metabolize the ammonium produced during amino acid metabolism through the urea cycle, whereas the fetal hepatocytes could not.

The lower levels of the urea cycle and TCA cycle metabolites in the fetal hepatocytes are closely related to mitochondrial function. The numbers of mitochondria in mouse hepatocytes were low in the prenatal stage and increased through development and aging of animals (Nagata, 2006). This indicates that energy metabolism differs in fetal and adult hepatocytes and is consistent with previous findings that fetal hepatocytes are glycolytic (Vergonet *et al.*, 1970).

The liver is the first site of contact with xenobiotics, it possesses a high metabolic capacity and has been frequently investigated as a target of toxicity. In adults, the mechanisms of hepatotoxicity are well understood for many hepatotoxicants. However, it is known that the sensitivity of fetal hepatocytes to chemical compounds is distinct from that of adult hepatocytes (Shankar and Mehendale, 2010). Most drugs and xenobiotics have molecular weight less than 500 Da and easily cross the placenta to enter the fetal compartment (Evans and Ganjam, 2011). Although systems for evaluating the toxicity of several drug and chemical compounds have been studied for adult liver, such systems have not been elucidated for prenatal or neonatal human liver. Progressive changes in the production of liver-specific enzymes and proteins during normal development generally occur at three specific developmental stages: (1) late gestation, (2) at or directly following birth, and (3) just prior to weaning (Greengard, 1977). We are now proceeding with experiments to construct evaluation systems for toxicity of drugs and chemical compounds in the prenatal period, based on the differences of basal metabolic functions between fetal and adult hepatocytes.

In conclusion, comprehensive metabolome analysis of human fetal and adult hepatocytes was performed by CE-TOFMS and 211 ionic metabolites (116 anion and 95 cation) were identified. Comparison of the relative amounts of metabolites between fetal and adult hepatocytes showed that some metabolites in glycolysis/glyconeogenesis, the TCA cycle and the urea cycle were lower in fetal hepatocytes than in adult hepatocytes. These results provide useful, fundamental information for stud-

ies on the basal metabolic functions of human fetal and adult hepatocytes.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by a Health and Labor Science Research Grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare in Japan.

Conflict of interest---- The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

Arias, I., Wolkoff, A., Boyer, J., Shafritz, D., Fausto, N., Alter, H. and Cohen, D. (2009): The Liver: Biology and Pathobiology, 5th edition. Wiley-Blackwell, New Jersey.

Burch, H.B., Lowry, O.H., Kuhlman, A.M., Skerjance, J., Diamant, E.J., Lowry, S.R. and Von Dippe, P. (1963): Changes in patterns of enzymes of carbohydrate metabolism in the developing rat liver. J. Biol. Chem., **238**, 2267-2273.

Chinnici, C.M., Timoneri, F., Amico, G., Pietrosi, G., Vizzini, G., Spada, M., Pagano, D., Gridelli, B. and Conaldi, P.G. (2014): Characterization of liver-specific functions of human fetal hepatocytes in culture. Cell Transplant., DOI:10.3727/096368914X680082.

Delneri, D., Brancia, F.L. and Oliver, S.G. (2001): Towards a truly integrative biology through the functional genomics of yeast. Curr. Opin. Biotechnol., **12**, 87-91.

Dumas, M.E., Kinross, J. and Nicholson, J.K. (2014): Metabolic phenotyping and systems biology approaches to understanding metabolic syndrome and fatty liver disease. Gastroenterology, **146**, 46-62.

Evans, T.J. and Ganjam, V.K. (2011): Reproductive anatomy and physiology. In Reproductive and Developmental Toxicology. (Gupta R.C., ed.), pp.7-32, Academic Press/ Elsevier, Inc., New York.

Fowden, A.L. (1994): Fetal metabolism and energy balance. In Textbook of Fetal Physiology. (Thorburn, G.D. and Harding, R., ed.), pp.70-82, Oxford Medical Publications, Oxford.

Greengard, O. (1977): Enzymic differentiation of human liver: comparison with the rat model. Pediatr. Res., **11**, 669-676.

Hirayama, A., Kami, K., Sugimoto, M., Sugawara, M., Toki, N., Onozuka, H., Kinoshita, T., Saito, N., Ochiai, A., Tomita, M., Esumi, H. and Soga, T. (2009): Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. Cancer Res., **69**, 4918-4925.

Houtkooper, R.H., Argmann, C., Houten, S.M., Cantó, C., Jeninga, E.H., Andreux, P.A., Thomas, C., Doenlen, R., Schoonjans, K. and Auwerx, J. (2011): The metabolic footprint of aging in mice. Sci. Rep., 134.10.1038/srep00134.

Jang, Z.H., Chung, H.C., Ahn, Y.G., Kwon, Y.K., Kim, J.S., Ryu, J.H., Ryu, D.H., Kim, C.H. and Hwang, G.S. (2012): Metabolic profiling of an alcoholic fatty liver in zebrafish (Danio rerio). Mol. Biosyst., **8**, 2001-2009.

Junker, B.H., Klukas, C. and Schreiber, F. (2006): VANTED: A system for advanced data analysis and visualization in the context of biological networks. BMC Bioinformatics, **7**, 109.

Kami, K., Fujimori, T., Sato, H., Sato, M., Yamamoto, H., Ohashi, Y., Sugiyama, N., Ishihama, Y., Onozuka, H., Ochiai, A., Esumi, H., Soga, T. and Tomita, M. (2013): Metabolomic profiling of lung and prostate tumor tissues by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. Metabolomics, **9**, 444-453.

Matsushita, T., Nakano, K., Nishikura, Y., Higuchi, K., Kiyota, A. and Ueoka, R. (2003): Spheroid formation and functional restoration of human fetal hepatocytes on poly-L-amino acid-coated dishes after serial proliferation. Cytotechnology, **42**, 57-66.

Monton, M.R. and Soga, T. (2007): Metabolome analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. J. Chromatogr. A, **1168**, 237-246.

Nagata, T. (2006): Electron microscopic radioautographic study on protein synthesis in hepatocyte mitochondria of aging mice. ScientificWorldJournal, **6**, 1583-1598.

Oliver, I.T., Martin, R.L., Fisher, C.J. and Yeoh, G.C. (1983): Enzymic differentiation in cultured foetal hepatocytes of the rat. Induction of serine dehydratase activity by dexamethasone and dibutyryl cyclic AMP. Differentiation, **24**, 234-238.

Panduro, A., Shalaby, F. and Shafritz, D.A. (1987): Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of liver-specific gene expression during rat development. Genes Dev., **1**, 1172-1182.

Preidis, G.A., Keaton, M.A., Campeau, P.M., Bessard, B.C., Conner, M.E. and Hotez, P.J. (2014): The undernourished neonatal mouse metabolome reveals evidence of liver and biliary dysfunction, inflammation, and oxidative stress. J. Nutr., **144**, 273-281.

Shankar, K. and Mehendale, H.M. (2010): Developmental toxicology of the liver. In Reproductive Toxicology, third edition. (Kapp, Jr., R.W. and Tyl, R.W., ed.), pp.205-222, Informa Healthcare, London.

Sharma, N., Schloss, R. and Yarmush, M. (2008): What came first: fully functional or metabolically mature liver? Crit. Rev. Biomed. Eng., **36**, 413-439.

Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Wakamiya, N., Ueng, Y.F., Guengerich, F.P. and Inui, Y. (1996): Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal liver and adult lungs. Drug Metab. Dispos., **24**, 515-522.

Soga, T., Ishikawa, T., Igarashi, S., Sugawara, K., Kakazu, Y. and Tomita, M. (2007): Analysis of nucleotides by pressure-assisted capillary electrophoresis-mass spectrometry using silanol mask technique. J. Chromatogr. A, **1159**, 125-133.

Sugimoto, M., Wong, D.T., Hirayama, A., Soga, T. and Tomita, M. (2010): Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. Metabolomics, **6**, 78-95.

Uehara, T., Ono, A., Maruyama, T., Kato, I., Yamada, H., Ohno, Y. and Urushidani, T. (2010): The Japanese toxicogenomics project: application of toxicogenomics. Mol. Nutr. Food Res., **54**, 218-227.

Vergonet, G., Hommes, F.A. and Molenaar, I. (1970): A morphometric and biochemical study of fetal and adult rat liver cells, with special reference to energy metabolism. Biol. Neonate, **16**, 297-305.

Xie, Z., Li, H., Wang, K., Lin, J., Wang, Q., Zhao, G., Jia, W. and Zhang, Q. (2010): Analysis of transcriptome and metabolome profiles alterations in fatty liver induced by high-fat diet in rat. Metabolism, **59**, 554-560.

Zaret, K.S. (2008). Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. Nat. Rev. Genet., **9**, 329-340.

Zhao, R. and Duncan, S.A. (2005). Embryonic development of the liver. Hepatology, **41**, 956-967.

Congenital Anomalies

THE JAPANESE TERATOLOGY SOCIETY

184 *Congenital Anomalies* 2014; **54**,184–188 doi:10.1111/cga.12059

SHORT COMMUNICATION

Simple *in vitro* migration assay for neural crest cells and the opposite effects of all-*trans*-retinoic acid on cephalic- and trunk-derived cells

Makoto Usami[1], Katsuyoshi Mitsunaga[2], Tomohiko Irie[1], Atsuko Miyajima[3], and Osamu Doi[4]

Divisions of [1]Pharmacology and [3]Medical Devices, National Institute of Health Sciences, Tokyo, [2]School of Pharmaceutical Sciences, Toho University, Chiba, and [4]Laboratory of Animal Reproduction, United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University, Gifu, Japan

ABSTRACT **Here, we describe a simple *in vitro* neural crest cell (NCC) migration assay and the effects of all-*trans*-retinoic acid (RA) on NCCs. Neural tubes excised from the rhombencephalic or trunk region of day 10.5 rat embryos were cultured for 48 h to allow emigration and migration of NCCs. Migration of NCCs was measured as the change in the radius (radius ratio) calculated from the circular spread of NCCs between 24 and 48 h of culture. RA was added to the culture medium after 24 h at embryotoxic concentrations determined by rat whole embryo culture. RA (10 μM) reduced the migration of cephalic NCCs, whereas it enhanced the migration of trunk NCCs, indicating that RA has opposite effects on these two types of NCCs.**

Key Words: developmentaltoxicity,embryo,migrationassay, neuralcrestcell,rat

INTRODUCTION

Invertebratedevelopment,neuralcrestcells(NCCs)migratefrom theneuralprimordiathroughouttheembryoandcontributeto morphogenesis(DouarinandKalcheim1999).Malfunctionof NCCsleadstodysmorphologies,tumors,andsyndromescalled neurocristopathies(Hall2009).Indevelopmentaltoxicology,ithas beenproposedthatalteredmigrationofcephalicNCCsinducedby chemicalsleadstofetalmalformation.Forexample,retinoicacids andfluconazoleinhibitedthemigrationofcephalicNCCs,causing branchialabnormalitiesinculturedratandmouseembryos(Pratt etal.1987;Menegolaetal.2004).Theseabnormalitiesareconsidered toresultin *in vivo* craniofacialmalformations,suchasthecleft palate,cleftlip,micrognathia,andthymicagenesis(Hall2009).

However,theeffectsofdevelopmentaltoxicantsonthemigration ofNCCsinmammalshavenotbeenfullyinvestigatedbecauseno convenientexperimentalmethodsareavailable.MigrationofNCCs isusuallyexaminedbytime-lapsevideoimagingof *in vitro* cultured cells(Fulleretal.2002)or *in vivo* fluorescentlylabeledcells (Kawakamietal.2011).Thesemethodsaretime-consumingandare notsuitablefordevelopmentaltoxicityinvestigationsofchemicals.

Inthepresentstudy,wehavedescribedasimplemigrationassay thatenablesinvestigationoftheeffectsofchemicalsonratNCCs. CephalicortrunkNCCswereculturedasemigrantsfromisolated neuraltubesofday10.5ratembryos.TheculturedNCCswere exposedtotestchemicalsfor24to48h,andtheirmigrationwas determinedasthechangeintheradiuscalculatedfromthecircular spreadoftheNCCsduringexposure.Byusingthisassaymethod, wefoundthatRAhasoppositeeffectsonthemigrationofcephalic andtrunkNCCs.

Correspondence:MakotoUsami,PhD,DivisionofPharmacology,National InstituteofHealthSciences,1-18-1,Kamiyoga,Setagaya,Tokyo158-8501, Japan.Email:usami@nihs.go.jp

ReceivedJanuary8,2014;revisedandacceptedMarch31,2014.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Wistarrats(Crj:WI;CharlesRiverJapan,Kanagawa,Japan)were usedintheseassays.Pregnantratswereobtainedbymatingfemale andmaleratsovernight,andtheplugdaywasdesignatedasday0.5 ofgestation.AlltheanimalexperimentswereperformedinaccordancewiththeguidelinesforanimalexperimentsoftheNational InstituteofHealthSciences.

Rat whole embryo culture

Ratembryosonday10.5ofgestationwereculturedfor24hbythe rollerbottlemethodasdescribedpreviously(Usamietal.2008). All-*trans*-retinoicacid(RA,CAS302-79-4;WakoPureChemical Industries,Osaka,Japan)wasdissolvedindimethylsulfoxide beforeaddingittotheculturemedium,whichwasratserum. Controlembryoswereculturedinthepresenceofthesameconcentrationofdimethylsulfoxide.

NCC culture

Neuralcrestcellswereculturedasemigratedcellsfromtheneural tubesofday10.5ratembryos,asoutlinedinFigure1A.Neural tubeswereexcisedfromtherhombencephalicortrunkregionofthe embryosinHanks'balancedsaltsolutionwithsharpenedtungsten needles.Theexcisedneuraltubes(approximately0.7mmlong) werecutopendorsallyandattachedtothe35-mmculturedishes (BDPrimaria;BectonDickinson,FranklinLakes,NJ,USA)containing2mLofDulbecco'sModifiedEagleMediumwithhigh glucose(DMEM;Gibco,LifeTechnologies,Carlsbad,CA,USA) and10%(v/v)fetalbovineserum(Gibco)(Fig.1B,C).Thedishes wereincubatedat37°Cwith5%CO_2for48h.After24hofculture, themediumwasreplacedwithmediumcontainingRAdissolvedin dimethylsulfoxide(finalconcentration,0.1%v/v).

Observation and analysis of cultured NCCs

Neuralcrestcellsemigratedfromtheneuraltubeswereobserved fortheirattachmenttothesurfaceoftheculturevesselsandthe extentofmigration.ImagesofculturedNCCswererecordeddigitallywithaphase-contrastmicroscope(BZ-9000;Keyence,Osaka, Japan)after24and48hofculture.NCCsthatdidnotcompletely surroundtheneuraltubeafter24hofcultureandthoseculturesin

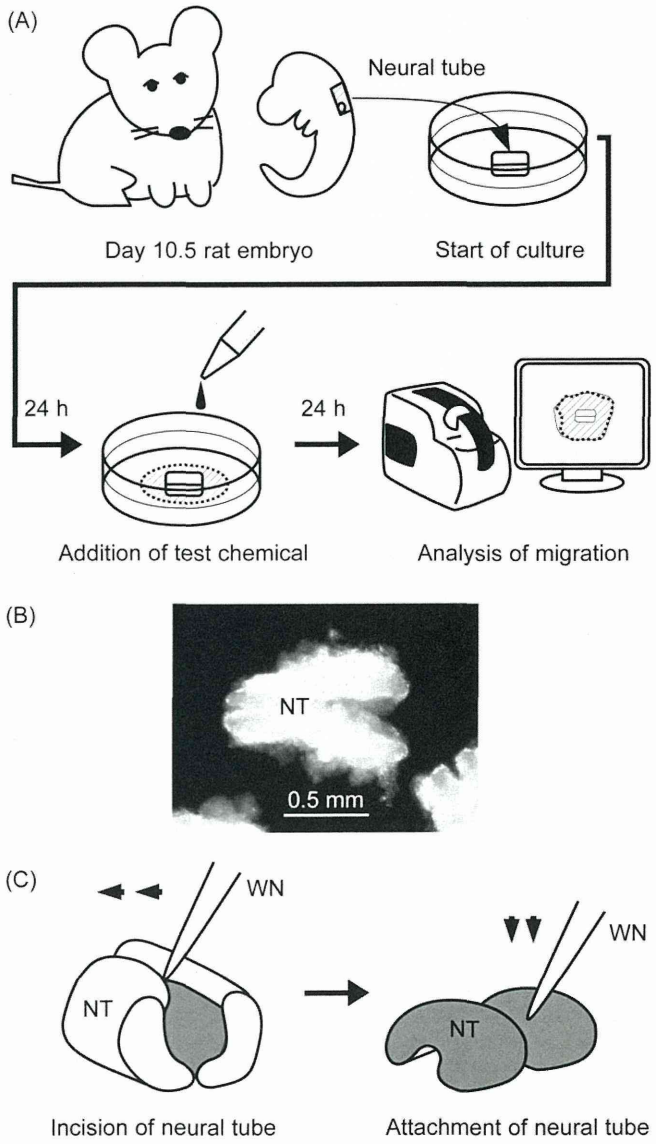

Fig. 1 Outlineoftheneuralcrestcell(NCC)migrationassay.(A)Neural tubeswereexcisedfromtherhombencephaliclregionofday10.5rat embryosandculturedfor48htoallowemigrationoftheNCCs. Testchemicalswereaddedtotheculturemediumafter24hof culture.Migrationindiceswerecalculatedasthecircularspreadof NCCsafter24and48hofculture.(B)Adorsalviewofaneural tubepreparedforculture.Therightsideiscranial.(C)Neuraltubes wereinciseddorsallyandpressedtothecultureplatesurfacewith theouterwalldownwardusingatungstenneedle.Itshouldbenoted thattheneuraltubesbecameconcaveoutwardaftertheincision. NT,neuraltube.WN,tungstenneedle.

whichtheneuraltubedetachedfromthesurfaceoftheculture vesselbeforetheendofthecultureperiodwereomittedfromthe analysesbecausetheyshowedlittlemigration.

ThemigrationdistanceoftheNCCswascalculatedasthe increaseintheradiusofthecircularspreadbetween24and48hof culture.ThedigitalimagesofculturedNCCswereanalyzedby usingImageJsoftware(http://rsb.info.nih.gov/ij/,1997–2009; Rasband,W.S.,ImageJ,U.S.NationalInstitutesofHealth, Bethesda,MD,USA).TheoutermostNCCsineachofthecultured neuraltubeswereconnectedwiththepolygontoolasifarubber bandwereplacedaroundthecells,andthepixelcountinsidethe polygonwasmeasured.Consideringthepolygonasacircle,its radiuswascalculatedasfollows:

$$\text{Radius} = \sqrt{(\text{number of pixels in polygon} / \pi)}.$$

ToassessNCCmigration,theradiusratiowascalculatedusingthe followingformula:

$$\text{Radius ratio} = (\text{radius at 48 h} - \text{radius at 24 h}) / \text{radius at 24 h}.$$

Thisratiowasthennormalizedtothecontroltoallowforcomparisonsbetweenexperiments.

Immunocytochemistry

Attheendofthecultureperiod,theneuraltubesandnon-NCCs derivedfromsurroundingtissueswereremovedwithtungsten needlesunderastereomicroscope,leavingtheemigratedcellsinthe dish.Theemigratedcellswerefixedwith4%(w/v)paraformaldehydeinphosphate-bufferedsaline(PBS)for20min,permeated with0.1%TritonX-100inPBSfor2min,andblockedwith3% (w/v)bovineserumalbumin(BSA)inPBSfor30minatroom temperature.Thetreatedcellswereincubatedwithaprimaryantibodyin1%(w/v)BSA-PBSfor1h,andthenincubatedwitha secondaryantibodyin1%(w/v)BSA-PBSfor1hatroomtemperature.Theprimaryantibodiesusedwereananti-HNK-1mouse IgMmonoclonalantibody(CBL519;MerckKGaA,Darmstadt, Germany)andananti-SOX10mouseIgGmonoclonalantibody (MAB2864; R & D Systems,Minneapolis,MN),andthesecondary antibodiesusedwerefluorescentlylabeledanti-mouse(AlexaFluor 488goatanti-mouseIgM,A-21042;Invitrogen,LifeTechnologies) andanti-rabbit(AlexaFluor594goatanti-mouseIgG(H + L), A-11005;Invitrogen)antibodies.Tostainthecellnuclei,4',6-diaminodino-2-phenylindole(DAPI,D-1306;Invitrogen)dissolved inmethanol(2mg/mL)wasaddedtothesecondaryantibodysolutionsataconcentrationof0.1%(v/v).Theimmunostainedcells werephotographedwithafluorescencemicroscope(BZ-9000, equippedwiththeDAPI-BP,GFP-BP,andTexasRedfilters; Keyence).

Statistical analysis

Statisticalsignificanceofthedifferencebetweentheexperimental groupswasexaminedbytheStudent's *t*-testorFisher'sexacttest.

RESULTS

Identification of NCCs

Cellsemigratedfromexplantedrhombencephalicandtrunkneural tubesduringculturewereidentifiedasNCCsbyimmunocytochemistryofthefollowingmarkerantigens,HNK-1(Nagaseetal.2003) onthecellmembraneandSOX10(Kimetal.2003)inthecell nucleus.ThenucleioftheemigratedcellswerestainedbyDAPI andtheanti-SOX10antibody,andthecellswerestainedbythe anti-HNK-1antibody(Fig.2A–C).Themergedimagesshowedthe co-expressionofHNK-1andSOX10intheemigratedcellsatleast intheperipheryofthecircularspread(Fig.2D).Thus,theemigratedcellswereidentifiedasNCCs.

Analysis of NCC migration

Figure3AshowsimagesofNCCsafter24and48hofculture.The migrationofNCCswascalculatedasthedifferenceintheradiusof thecircularspreadofthecellsbetween24and48hofculture becauseitwasimpossibletodeterminethemigrationdistancefrom

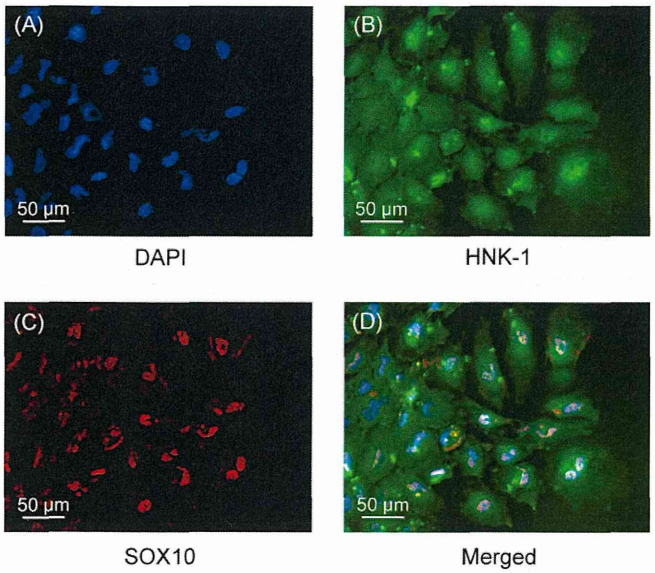

Fig. 2 Immunocytochemicalidentificationofneuralcrestcells(NCCs). (A)Nuclearstainingwith4′6′-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride(DAPI).(B)Stainingofthecellmembranewithan anti-HNK-1antibody.(C)Stainingofnucleiwithananti-SOX10 antibody.(D)AmergedimageofA,B,andC.

theneuraltubesinceitsoutlinewasobscuredduringculture,and individualNCCscouldnotbedistinguished.Themeanmigration distanceoftheNCCscalculatedusingthismethodwasapproximately500 μmduringthe24-hcultureperiod.ToevaluateNCC migration,theradiusratiowasusedbecausethisratioshowedless variabilitythantheradiusdifferenceasdeterminedbythecoefficientofvariation,suggestingthedependenceofNCCmigrationon thesizeoftheexplantedneuraltubes(Fig.3B).

Effects of RA on cultured rat embryos

EmbryotoxicconcentrationsofRAweredeterminedbyratwhole embryoculturetocompareRA-inducedembryotoxicitytothe effectsofRAonNCCmigration.RAwastoxictoculturedrat embryosatconcentrations ≥3 μM,whichcausedareductioninthe numberofsomitepairsandanincreasedincidenceofmorphologicalabnormalities(Table1).Deformedbranchialarches,morespecifically,thehypoplastic3rdbranchialarch,wereobservedat 10 μMRAbutnotat3 μM(Fig.4).Theseembryotoxicconcentrationswerecomparabletothoseinthematernalplasma(about 4.5 μg/mL = 15 μM)obtainedbytheadministrationofateratogenicdose(10mg/kg)ofRAtomice(Kraft1992),andthe observedabnormalitiescorrespondedto *in vivo* malformationsof theear,eye,andthymus.Basedontheseresults,RAwasaddedat 0,3,and10 μMduringthe24-hexposureperiodinthefollowing NCCmigrationexperiments.

Effects of RA on NCC migration

RatNCCsemigratedfromtheneuraltubewereexposedto embryotoxicconcentrationsofRAfor24h.RAreducedthemigrationofcephalicNCCsinaconcentrationdependentmanner,and 10 μMRAreducedthemigrationbyapproximately10%(Fig.5A). Incontrast,RA(10 μM)enhancedthemigrationoftrunkNCCsby

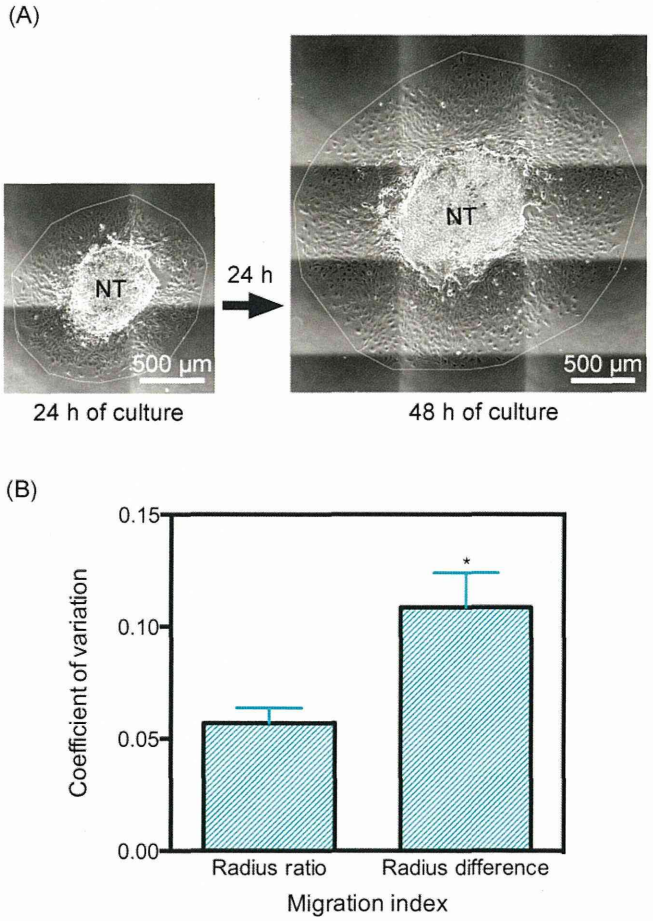

Fig. 3 Analysisofneuralcrestcell(NCC)migration.(A)CulturedNCCs wereenclosedinapolygontocalculatethemigrationindicesafter 24and48hofculture.(B)Comparisonofmigrationindices.The means ± standarderrorofthemean(SEM)ofthecoefficientof variationfromeightcontrolculturesareshownforthemigration indices:theradiusratioandtheradiusdifference.

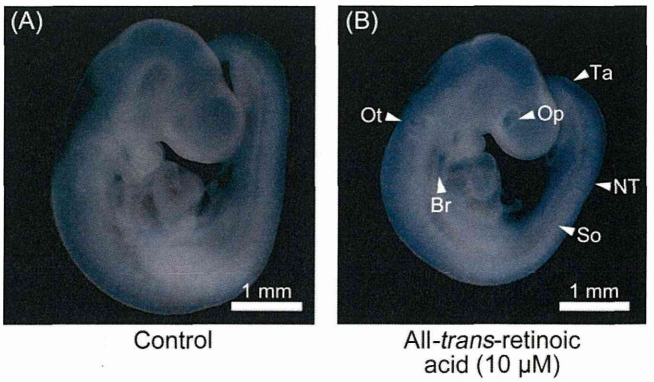

Fig. 4 Appearanceofratembryosculturedinthepresenceofall *-trans*-retinoicacid.Ratembryosafter24hofculturearesshownafter removaloftheembryonicmembranes.Arrowheadsindicate deformedorgans.Br,branchialarch;NT,neuraltube;Op,optic vesicle;Ot,oticvesicle;So,somite;Ta,tail.