

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19916

研究課題名(和文)vivo/vitro乖離を解消する肝細胞機能レストア培養法の確立

研究課題名(英文)Development the culture method for primary hepatocyte to keeping a same response range in vitro and in vivo for exogenous stimulus.

研究代表者

辻田 忠志(Tsujita, Tadayuki)

佐賀大学・農学部・講師

研究者番号：20622046

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文):生体から臓器を取り出して、初代培養細胞の調整・培養過程において、低酸素下で開腹して、初代肝細胞を調整、培養すると、細胞生存率が著明に上昇し、薬剤感受性が高く保持できた。一方で、常酸素下で調整した初代肝細胞においては、ストレス感受性転写因子Nrf1やNrf2の発現低下が起こり、外来刺激物質の解毒作用ばかりではなく、感受性なども変えてしまうことが明らかとなった。特にNrf1のタンパク質低下について解析を進めたところ、糖鎖修飾PNGaseの発現が上昇することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

10%程度の低酸素下での肝細胞を調整すると、酸化ストレス、小胞体ストレスなどの刺激に対する感受性が鋭敏になることが確認できた。今後、iPSから樹立されたヒト肝細胞を用いて、低酸素下で薬効試験等を行うことで、in vivoとin vitroとの感受性の乖離を減少させることが可能となり、早期に化合物の生体内での代謝評価を実施できると期待される。

研究成果の概要(英文):When we develop a primary hepatocyte in low oxygen condition from the beginning, the cellular motility of final hepatocyte is lower than when we conduct those strategy in normoxic condition. This method provided us to higher sensitivity for exogenous stimulus including oxidative stress and ER stress. In addition, the hepatocyte that was prepared in normoxic condition has lower levels of stress transcriptional factor, Nrf1 and Nrf2. This condition leads the hepatocyte to lower response fate for exogenous stimulus and lower detoxification activity. We have found that the glycomodifier enzyme, PNGase was contributed to controlling Nrf1 protein level during primary hepatocyte preparation in lower oxygen condition.

研究分野：生化学

キーワード：Nrf1 低酸素 肝細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

革新的な新薬を創出するためには、チェンジメーカーとなる標的分子の探索研究が最も重要である。それと同時に、すでに見つかっているシーズから低分子化合物が数多く創出されているが、上市までの成功率の低下や、それに要する時間が長くなる傾向がある。それは、私たち消費者の安全性意識の高まりであり、世界的にも、規制当局による安全性試験の厳格化につながっている。これらの相反するニーズを満たすために、ごく微量の検査薬物を健常人に投与して薬効を評価する *microdose* 試験等によって、早期にヒトにおける導入試験などが実施されており、開発期間や、開発研究費の削減に向けた現在のトレンドであると言える。加えて、*in vivo* での実験を担保する信頼性の高い安全性試験がヒト由来の細胞で実施することができれば臨床治験前の安全性を検証できるが、現状は個体と細胞から得られる値が乖離することが多い。本研究では、生体に近い薬剤感受性を保持するための、細胞の新規培養法を確立し、迅速な安全性試験へ応用可能な基礎データの提供に挑むこととした。将来的には *iPS* 技術などによって樹立した肝細胞などを活用し、テーラーメイドでの安全性試験につなげ、薬害リスク低減に貢献したい。

### 2. 研究の目的

生体から臓器を取り出して、細胞を個々に分けたのち、培養容器に移して単相培養するのが初代培養の手順である。これらの細胞の調整・培養過程では、細胞が晒される酸素分圧が変化することに着目し、可能な限り、生体内と同程度の酸素状態を保ち、培養を進めるとどのような効果が出るのかを検証することとした。本研究は、生体から取り出した肝臓を摘出する際に、常酸素下に放置した時間によって、酸化ストレス応答関連転写因子、Nrf1 および Nrf2 タンパク質の変動が著明に観察されたところにある。摘出して間を置かない臓器に関しては転写因子 Nrf1 および Nrf2 の遺伝子発現量は十分にある。Nrf2 は通常 Keap1 によって分解されているので、タンパク質は検出されないが、Nrf1 のタンパク質量が、常酸素暴露の時間が長くなると著明に低下してしまうことを見出していた。これまでの研究から、Nrf1 が発現低下すると、細胞内チオール量が上昇し、外来化合物を無毒化してしまうため、外来刺激の応答度が生体とは異なることが明らかとなっていたが、なぜ臓器から細胞にする過程での変化するのかについての知見は皆無であった。Nrf1 レベルを高く保つことができれば、生体における薬剤感受性を再現することができるのではないかと着想して、その分子メカニズムを解明し、薬理的に Nrf1 を調整することで、生体に近い薬剤感受性をもつ細胞システムの樹立が可能となるのか検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 肝臓は生体内において外来薬物の解毒代謝を司るため、肝実質細胞（肝細胞）が安全性試験に供される。生体肝における抗酸化応答タンパク質の発現レベルは、培養細胞と比較して高いため、それぞれが厳密に協調し合い、種々の刺激物に対する応答を調節している。一方で、培養細胞においては、由来する臓器や培養方法によって、外来刺激に対する転写因子の発現が生体と異なるため、応答度合いが乖離すると考えられた。本研究では、生体中における臓器と培養細胞において、各種外来刺激に対する応答能を確認することと、その応答度を決めている Nrf1 タンパク質の過不足による変化について検証する。

(2) 生体肝には豊富に存在していた Nrf1 タンパク質が、生体から取り出し後、培養を進めるにしたがって著明に減少してしまう分子メカニズムを解明する。

(3) Nrf1 タンパク質が減少すると、細胞内ヘシスチンの取り込みが亢進し、GSH 量が増加する。そのため、外来から加える試験化合物は GSH によって抱合されてしまい、反応性が低下するばかりか、体外へ速やかに排出され、薬理活性の低下につながると考えられた。そこで、

細胞内チオールを取り込みを遺伝的に調節するために、シスチントランスポーターxCTの過剰発現および欠失時の肝細胞の薬剤感受性を検証する。同時に Nrf1 の活性調節薬や xCT の阻害薬等で処理することで生体に近い感受性を維持することが可能か検証をする。

(4) 酸素濃度変化と、xCT の発現制御による細胞内チオールによる肝細胞感受性維持機構を明らかにした上で、両機構を薬理的に調整し、大気酸素濃度下で培養されている肝細胞の感受性向上が可能かどうか検証する。

#### 4. 研究成果

(1) 初代培養細胞の樹立に際して、動物を安楽死させたのち、速やかに低酸素チャンバー内(10%に設定)で肝臓をコラゲナーゼで還流し初代肝細胞を調整した。通常通りに大気下で調整した肝細胞と比較して、7日後に定着して生育する細胞の数(培養開始からの増殖%、低酸素:220%、通常法:15%)が大幅に改善した。回収した細胞に、酸化ストレス(メナジオン、DEM、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、ER ストレス(Thapsigargin)誘導剤で刺激をしたところ、低酸素下で調整、培養した細胞では通常方策で樹立したものと比較すると、EC<sub>50</sub>値として1/10~1/100倍程度感受性が高いことが示された。同時に、細胞防御反応の指標として細胞内GSH量、Nrf2の標的遺伝子(xCTやNqo1)の発現量を確認したところ、低酸素で処理した細胞はGSH量が低く、Nrf2の転写活性が低く抑えられていることが明らかとなった。肝細胞の他にも、線維芽細胞についても同様の調整法を試し、低酸素中での外来刺激に対して感受性を高く維持するが、常酸素に戻すと、細胞生存率は下がり、生存した細胞の感受性は低くなることを見出した。

(2) これまで Nrf1 タンパク質の調整に関与する因子としては、プロテアーゼ DDI-2、糖鎖修飾酵素 PNGase および OGT が報告されている。低酸素法と従来法でこれらの因子の発現を確認したところ、DDI-2 と OGT は変動しないものの、PNGase の発現が上昇傾向にあることが確認できた。すなわち、PNGase の作用によって、Nrf1 タンパク質が分解されると示唆された。PNGase 自体の発現誘導機構については現在解析中である。さらに、これら以外の因子の探索のために、マイクロアレイ解析、メタボローム解析を実施し、研究終了時点で3つほどの遺伝子を取得した。現在も Nrf1 タンパク質への作用を遺伝学的に証明するために解析を継続している。

(3) xCT の発現を欠失および過剰発現させるためのウイルスベクターを作出し、常酸素下で初代培養を開始する際に導入した。(1)と同様に各種刺激に対する感受性や細胞増殖能について観察し、xCT の抑制によって刺激感受性が上昇し、xCT の過剰発現によって、各種外来刺激に対して抵抗性を認めた。さらに、低酸素下で培養した xCT 抑制細胞においては、細胞生存率、薬剤応答度においてさらに上昇する傾向が観察された。加えて、xCT 阻害剤の効果についても検証を進めたところ、遺伝学的な阻害に比べて弱いものの、低酸素処理下での細胞生存率が上昇することが明らかとなった。

(4)xCT の遺伝子欠失マウスは、通常通りに生育し、表面上は異常をきたさないことがすでに報告されている(Sato H, et al.)。本マウスはGSHなど、細胞内チオール量が減少すると予想されたが、測定の結果、野生型マウスと遜色ないGSH量を示した。すなわち、細胞内チオール量を内因的な代謝経路から補充されていると考えられ、cysteine synthase、cystathionin  $\gamma$  lyase、cysteine transaminase 等ノックダウン細胞を樹立するなどして、システイン量の制御を進め、現在、これらの細胞の性状解析を進行している。本研究で、樹立した細胞からiPS細胞の樹立を進め、肝前駆細胞から肝細胞へ誘導するべく、実験系の構築を継続して進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawaguchi Shin-ichi, Gonda Yuhei, Yamamoto Takuya, Sato Yuki, Shinohara Hiroyuki, Kobiki Yohsuke, Ichimura Atsuhiko, Dan Takashi, Sonoda Motohiro, Miyata Toshio, Ogawa Akiya, Tsujita Tadayuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Furan- and Thiophene-2-Carbonyl Amino Acid Derivatives Activate Hypoxia-Inducible Factor via Inhibition of Factor Inhibiting Hypoxia-Inducible Factor-1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 885 ~ 885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="http://dx.doi.org/10.3390/molecules23040885">http://dx.doi.org/10.3390/molecules23040885</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sekine Hiroki, Okazaki Keito, Kato Koichiro, Alam M. Morshedul, Shima Hiroki, Katsuoka Fumiki, Tsujita Tadayuki, Suzuki Norio, Kobayashi Akira, Igarashi Kazuhiko, Yamamoto Masayuki, Motohashi Hozumi	4. 巻 38
2. 論文標題 O-GlcNAcylation Signal Mediates Proteasome Inhibitor Resistance in Cancer Cells by Stabilizing NRF1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00252-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00252-18">http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00252-18</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Ryo, Sato Ikuko, Tsujita Tadayuki, Yokoyama Atsushi, Sugawara Akira	4. 巻 489
2. 論文標題 A ubiquitin-proteasome inhibitor bortezomib suppresses the expression of CYP11B2, a key enzyme of aldosterone synthesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 21 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.05.109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 SAKAGUCHI Yuki, MINAMIKAWA Tomoka, YAMAMURO Mayuko, TSUJITA Tadayuki, UEDA Toshihisa, KAMADA Kai, SOH Nobuaki	4. 巻 33
2. 論文標題 Time-resolved Fluorescent Detection for Glucose Using a Complex of Luminescent Layered Titanates and Enzymes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anal Sci	6. 最初と最後の頁 989 ~ 991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.33.989	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko Hiroshi, Katoh Takehide, Hirano Ikuo, Hasegawa Atsushi, Tsujita Tadayuki, Yamamoto Masayuki, Shimizu Ritsuko	4. 巻 22
2. 論文標題 Induction of erythropoietin gene expression in epithelial cells by chemicals identified in GATA inhibitor screenings	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 939 ~ 952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12537	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Tadayuki Tsujita
2. 発表標題 Discovering the sunny and dark side of Nrf1 transcriptional factor and its utilization
3. 学会等名 31st annual congress of the PGIA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 園田健登, 廣津留倅一, 北川尚穂, 川口真一, 辻田忠志
2. 発表標題 HIF分解を制御するPHDタンパク質をアロステリックに阻害する新規化合物の探索.
3. 学会等名 平成 30年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒木紗英, 辻田忠志, 川口真一
2. 発表標題 分子選択的なHIF活性化低分子化合物の開発
3. 学会等名 第42回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 園田健登, 廣津留倅一, 北川尚穂, 川口真一, 辻田忠志
2. 発表標題 PHDタンパク質にアロステリックに作用し、低酸素応答因子HIFを安定化する新規化合物の探索.
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会. 国立京都国際会館
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 辻田忠志
2. 発表標題 Functional analysis and advanced application for drug discovery with environmental response transcriptional factors
3. 学会等名 第6回脳科学セミナー(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 辻田忠志
2. 発表標題 唐津地産抽出物ライブラリーに含まれる有効成分の培養細胞による評価抗酸化活性を評価できるモニター細胞の創出とその応用
3. 学会等名 第5回JCC産学交流セミナー(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 廣津留倅一, 北川尚穂, 川口真一, 辻田忠志
2. 発表標題 アロステリックなPHD活性阻害によるHIF誘導低分子化合物の創出.
3. 学会等名 第41回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 黒木紗英, 辻田忠志, 川口真一
2. 発表標題 リガンド20Gの構造に基づいた分子設計による低酸素誘導因子の活性化
3. 学会等名 第41回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

佐賀大学 農学部 生命機能科学科 生化学分野 <a href="http://seika.ag.saga-u.ac.jp/index.php?FrontPage">http://seika.ag.saga-u.ac.jp/index.php?FrontPage</a>
---

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考