

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K20038

研究課題名(和文)野生動物iHep細胞の作成とトッププレデターのMetabolism評価法の開発

研究課題名(英文) Contraction of wild-life iHep cell and development of the evaluation method for metabolism of the top predator

研究代表者

池中 良徳(Ikenaka, Yoshinori)

北海道大学・獣医学研究院・准教授

研究者番号：40543509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、化学物質感受性のキーであるMetabolismの評価法を開発し、希少野生動物の感受性を明らかにする事である。この評価のためには、新鮮肝が必要であるが、希少種ではその入手が困難である。そこで、皮膚線維芽細胞からダイレクトリプログラミングにより肝臓様(iHep)細胞への誘導を試みた。先ずiHep作成に先立ち、本研究では数種のトッププレデターの線維芽細胞を入手し、その培養に成功した。培養した線維芽細胞を用い、iHep細胞への誘導を試みた結果、特定の因子を導入する事でアルブミンを発現する上皮細胞に変化する事を見出した。本研究を通じて、初めて野生動物iHep細胞の作成に成功した可能性が高い。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トッププレデターの化学物質感受性を適切に評価できる実験系は無く、その評価法を確立する必要があった。本研究で一部誘導に成功した野生動物iHep細胞は、野生動物の化学物質感受性を非侵襲的かつ迅速に実施できる。更に、iHep細胞は様々な野生動物獣医療にも応用可能である。例えば、投薬や麻酔による不動化の初期スクリーニングに応用する事で、経験則では無く、科学的根拠に基づいた投与doseの決定が可能となる。これにより、獣医療現場における麻酔中の死亡事故などの減少に通じるだけでなく、将来的には各動物種に応じた創薬への応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop the evaluation method of metabolism, which is the key to chemical sensitivity, and to clarify the chemical metabolic ability of rare top predator. Fresh liver is required for the evaluation of metabolism, but rare species are difficult to obtain. Therefore, in this study, we attempted to differentiate and induce liver-like cells (iHep cells) from skin fibroblasts by direct reprogramming. First, as a result of this study, we succeeded in culturing fibroblasts of several top predators such as brown bear and Sea lion. Furthermore, as a result of attempting to induce iHep cells using cultured fibroblasts, it was found that the cells were transformed into epithelial cells expressing albumin by introducing a specific factor. In this study, it is highly probable that iHep cells were successfully generated starting from wild animals.

研究分野：環境毒性学

キーワード：野生動物 iHep Metabolism トッププレデター P450 UGT SULT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

化学物質の感受性の差は種により数千倍に及ぶこともあり、実験動物を用いた毒性試験の結果を野生動物にそのまま外挿することは難しい。しかし、現実には実験動物で得られたデータが根拠となり、野生動物種の化学物質感受性が推定されている。そのため、多くの場合、薬剤の非ターゲット種となる野生動物種が予期せぬ中毒や、時に Mass Death を被る。また、動物園や野生動物獣医療の現場では、投薬や麻酔による不動化の dose を設定する事は未だに難しく、しばしば over dose による事故死も報告されている。これまで、申請者らは野生動物種の化学物質感受性の決定メカニズムに関する研究を実施してきた中で、ライオンなどのネコ科動物やハイエナ、アザラシなどの鱈脚類では薬物代謝酵素のうち第 I 相反応を担う Cytochrome P450 が実験動物に比べ極めて低活性であることを明らかにした。また、第 II 相反応を担う酵素であるグルクロン酸転移酵素(UGT)の一部遺伝子欠損や、実際の酵素活性が著しく低下していることを見出した。更に猛禽類でも、その薬物代謝酵素活性が哺乳類とは異なることが明らかになってきている。すなわち、化学物質感受性は種により様々であり、各生物種が持つ化学物質感受性、特に Key となる ADME を適切に評価できる系の構築が必要である。ここで、各動物種の“Metabolism”を評価するためには、通常、極新鮮肝を用いたトキシコカインेटィックス解析、もしくは個別遺伝子の発現解析が必要となる。しかし、これらの方法はサンプル入手や実験系の構築が困難であり、それが in vivo では実質的に実験が出来ない野生動物種の評価を困難にしてきた。一方、当該研究で作成する野生動物 iHep 細胞: induced hepatocyte like cell は、検査時等に入手可能な皮膚線維芽細胞からダイレクトリプログラミングにより肝臓様細胞を分化・誘導する技術であり、これまで極新鮮肝無しでは困難であった化学物質感受性の key factor である“Metabolism”の評価が可能となる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、環境化学物質の影響を受けやすい希少トッププレデターの iHep 細胞を作成し、“iHep Zoo”を構築することで、様々な動物種の“Metabolism”の“種差”をスクリーニングすることである。ここで、ダイレクトリプログラミングによる iHep 細胞の作成には、齧歯類において Hnf4 と Foxa (Foxa1, Foxa2, Foxa3 のいずれかひとつ)という肝細胞分化に関連した 2 つの転写因子が少なくとも必要である事が分担研究者らの先行研究により明らかになっている (Nature 2011)。一方、本研究がチャレンジする野生動物における iHep 細胞への誘導は、先行研究において、ハイエナの皮膚線維芽細胞に上記因子を導入することで、肝臓マーカーであるアルブミンや E-cadherin の顕著な発現が確認できている。しかし、iHep 細胞への転換頻度が非常に低いことや、cytochrome P450 や UGT 等、異物代謝に関与する酵素群の発現量が低い事など、クリアしなければならない“種差の壁”が存在する。そこで、当該研究では、種を問わず iHep 細胞へ誘導できる因子および培養条件を進化化学的・比較生物学的な視点で探索する。それゆえ、当該研究の目的は“種差”の評価であるが、その実として、各動物種が“共通”に必要な iHep 細胞への誘導および薬物代謝系獲得因子の探索に他ならない。

## 3. 研究の方法

当該研究の目標は様々な野生動物種の iHep 細胞を用いた“Metabolism”の評価であるが、ポジティブコントロールとして、極新鮮肝(死亡直後の個体から肝臓を採材し、液体窒素で瞬間凍結後、-80 で保存した肝臓)の代謝酵素画分を用いたトキシコカインेटィックス解析を実施した。これにより、特に化学物質代謝能の低い又は高い生物種をモデル動物種として選定する。また、同時に各動物種の肝誘導因子や異物代謝系に関与する代謝酵素および核内受容体、トランスポーターの遺伝子発現解析を実施する。これらの解析により野生動物種で重要な異物代謝系の因子を進化・系統学的、比較生物学的な視点で特定を行った。野生動物 iHep 細胞の作成には、誘導因子として Hnf4 と Foxa を使い、先行研究で実施したハイエナのみでなく、他の動物種でも検討を行った。特に UGT 活性が非常に低いという特徴を持つネコをモデル動物として iHep 細胞誘導実験を試みた。さらに、多くの絶滅危惧に瀕している動物種から iHep 誘導に必要な皮膚線維芽細胞の収集を行った。

## 4. 研究成果

本研究では iHep 細胞誘導時を試みているが、誘導分化成功時に現存の in vitro 実験系による Metabolism 評価との比較が必要不可欠となる。そこで当該研究ではグルクロン酸転移酵素(UGT)および硫酸転移酵素(SULT)における動物種差を、遺伝的性状解析、および極新鮮肝の代謝酵素画分を用いたトキシコカインेटィックス解析より明らかにした。その結果グルクロン酸転移酵素である UGT では、先行研究より活性が弱いとされていた UGT1 ファミリーに加え、ネコ科動物において UGT2B ファミリーと呼ばれる分子種が遺伝的に完全欠損強いることが明らかとなった。トキシコカインेटィックス解析の結果からも活性も著しく低いことが明らかとなり、ネコ科動物では UGT2B ファミリーが著しく機能を損う可能性が判明した。同様に先行研究で UGT1 ファミリーの活性が低い報告のあった一部の鱈脚類、特にアザラシ科動物では UGT2B ファミリー遺伝的欠損はさほど激しくないものの、トキシコカインेटィックス解析による活性が低いことが明らかとなった。この結果ネコ科動物やアザラシ科動物が当初想定されていたよりも顕著な UGT 欠損を有しており、これにより、広範な化学物質への代謝能が低いことが示唆される。

更に、分担研究者の川合らは、鳥類 43 種における UGT1 および UGT2 ファミリーの分類およ

び配列解析を行った。その結果、肉食性鳥類では哺乳類と同様、UGT1 ファミリー遺伝子数が減少していること、一方で UGT2 ファミリー遺伝子の数は、哺乳類と異なり、食性と関連がないことを示した(Kawai et al., 2018 Plos One)。さらに肝臓酵素画分を用いたトキシコカインेटクス解析の結果、UGT1 ファミリーの数が少ない肉食性の猛禽類では、他の食性の鳥類と比較してエストロゲン(内因性物質)、ヒドロキシピレン(外来異物)、アセトアミノフェン(外来異物)を基質とするグルクロン酸抱合活性が低い傾向にあることが明らかとなった(Kawai et al., 2018, CBP)。これらの結果から肉食性の鳥類では、哺乳類と同様、広範な化学物質に対してグルクロン酸代謝活性が低いことが示唆された。

一方、硫酸抱合酵素である SULT では野生哺乳類で大きな動物種差がみられることが明らかとなった。特に鱗脚類動物では、エストロゲン代謝に重要な分子種である SULT1E1 を欠損しており、*in vitro* 活性も非常に低いことが明らかとなった。この結果は鱗脚類動物が SULT1E1 用いた解毒反応を行うことができず、多くの化学物質に対して低解毒能を持つことを示唆している。さらに内因性代謝に重要な酵素の欠損が見られたため、食肉目においてエストロゲン代謝経路に大きな種差がある可能性が示唆された。これらの結果は野生動物における環境化学物質に対する感受性を推定するうえで非常に重要な知見になるとともに、哺乳類のエストロゲン代謝における新たな比較生物学的知見を与えるものである。

野生動物での iHep 細胞誘導に使用する皮膚線維芽細胞の採取を精力的に行った。特にヒゲマ、現在 iHep 細胞誘導を行っているネコと比較的近縁の種であり絶滅危惧に頻しているツシヤマネコ由来の皮膚線維芽細胞の培養に成功しており実験に供試する準備が整っている。誘導実験に関しては UGT 欠損を特徴と持つモデル動物であるネコの線維芽細胞由来の iHep 細胞の誘導を試みた。ネコ由来誘導因子及びマウス由来誘導因子をクローニングに成功し、それを用いて誘導条件検討を行っており、今後も継続予定である。

一方、分担研究者の鈴木らは、代表研究者の池中から提供されたネコの線維芽細胞を用いて、iHep 細胞誘導を試みた。その結果、特定の因子を導入することでネコの線維芽細胞がアルブミンを発現する上皮細胞に変化することを見出した。マウスやヒトに比べ、ネコの肝細胞を調べる上で必要な実験ツールや遺伝子情報が大幅に不足していることから、誘導した細胞の性状を詳しく調べることは困難である。しかし、マウスやヒトを用いたこれまでの研究を考慮すると、ネコの線維芽細胞から誘導された細胞は、アルブミンの発現以外にも肝細胞の特徴を有することが強く示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Uno Yasuhiro, Takahira Rika, Murayama Norie, Onozeki Shunsuke, Kawamura Shu, Uehara Shotaro, Ikenaka Yoshinori, Ishizuka Mayumi, Ikushiro Shinichi, Yamazaki Hiroshi,: Functional and molecular characterization of UDP-glucuronosyltransferase 2 family in cynomolgus macaques, *Biochemical Pharmacology*, 2019, 163, 335-344 (査読あり) DOI: 10.1016/j.bcp.2019.03.002
2. Kawai, YK.\*, Shinya, S.\* , Ikenaka, Y., Saengtienchai, A., Kondo, T., Darwish, WS., Nakayama, SMM., Mizukawa, H., Ishizuka, M.: Characterization of function and genetic feature of UDP-glucuronosyltransferase in avian species. *Comparative biochemistry and physiology. Part C*, 2018, 217, 5-14. \* Equal contribution. (査読あり) DOI:10.1016/j.cbpc.2018.11.001
3. Kawai, YK., Ikenaka, Y., Ishizuka, M., Kubota, A.: The evolution of UDP-glycosyl/glucuronosyltransferase 1E (UGT1E) genes in bird lineages is linked to feeding habits but UGT2 genes is not. *PLoS One*, 2018, e0205266. (査読あり) DOI: 10.1371/journal.pone.0205266
4. Saengtienchai A, Ikenaka Y, Kawata M, Kawai Y, Takeda K, Kondo T, Bortey-Sam N, Nakayama, S.M.M, Mizukawa H, Ishizuka M: Comparison of xenobiotic metabolism in phase I oxidation and phase II conjugation between rats and bird species, *Comparative Biochemistry & Physiology Part C*, 2018 (in press) (査読あり) DOI:10.1016/j.cbpc.2018.08.007
5. Kondo Takamitsu, Ikenaka Yoshinori, Nakayama Shouta M. M., Kawai Yusuke K., Mizukawa Hazuki, Mitani Yoko, Nomiyama Kei, Tanabe Shinsuke, Ishizuka Mayumi: Uridine Diphosphate-Glucuronosyltransferase (UGT) 2B Subfamily Interspecies Differences in, Carnivores, *Toxicological Sciences*, 2017, 158, 90-100 (査読あり) DOI: 10.1093/toxsci/kfx072

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Takamitsu Kondo, Yoshinori Ikenaka, Shouta M.M. Nakayama, Hazuki Mizukawa, Yoko Mitani, Kei Nomiyama, Shinsuke Tanabe, and Mayumi Ishizuka  
Inter-species differences of phase II xenobiotics metabolism enzymes in carnivorans.  
The 6th Sapporo Summer Symposium for One Health (6th SaSSOH)(国際学会) 2018 年
2. 近藤誉充, 池の中良徳, 中山翔太, 水川葉月, 三谷曜子, 田辺信介, 野見山桂, 石塚真由美  
野生哺乳類における硫酸転移酵素の動物種差解明

- 第 27 回環境化学討論会 2018 年
3. 近藤誉充、池中良徳、中山翔太、水川葉月、三谷曜子、田辺信介、野見山桂、石塚真由美  
食肉目動物での第 II 相抱合酵素の遺伝的性状および酵素学的性状の解明  
第 45 回 日本毒性学会学術年会 2018 年
  4. 近藤 誉充、池中 良徳、中山 翔太、水川 葉月、三谷 曜子、田辺 信介、野見山 桂、石塚 真由美  
鱈脚類を中心とした食肉目の薬物代謝酵素である硫酸転移酵素の種差解明  
第 24 回日本野生動物医学会大会 2018 年
  5. Takamitsu Kondo, Yoshinori Ikenaka, Shouta M.M. Nakayama, Yusuke K. Kawai, Hazuki Mizukawa, Yoko Mitani, Kei Nomiya, Shinsuke Tanabe, and Mayumi Ishizuka  
UDP-glucuronosyltransferase (UGT) among Pinnipedia and other carnivores  
the 19th International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO 19)(国際学会), 2017 年
  6. Takamitsu Kondo, Yoshinori Ikenaka, Shouta M.M. Nakayama, Yusuke K. Kawai, Hazuki Mizukawa, Yoko Mitani, Kei Nomyama, Shinsuke Tanabe, and Mayumi Ishizuka  
UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B genetic feature and activities in Carnivores  
9th International Toxicology Symposium in Nigeria(国際学会), 2017 年
  7. Takamitsu Kondo, Yoshinori Ikenaka, Shouta M.M. Nakayama, Yusuke K. Kawai, Hazuki Mizukawa, Yoko Mitani, Kei Nomyama, Shinsuke Tanabe, and Mayumi Ishizuka  
Drug metabolism enzymes in Carnivora species  
The 5th Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH)(国際学会)2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

<http://tox.vetmed.hokudai.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：石塚 真由美

ローマ字氏名：Mayumi Ishizuka

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学院獣医学研究院

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：50332474

研究分担者氏名：中山 翔太

ローマ字氏名：Shouta Nakayama  
所属研究機関名：北海道大学  
部局名：大学院獣医学研究院  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：90647629

研究分担者氏名：水川 葉月  
ローマ字氏名：Hazuki Mizukawa  
所属研究機関名：愛媛大学  
部局名：農学部  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：60612661

研究分担者氏名：鈴木 淳史  
ローマ字氏名：Atsushi Suzuki  
所属研究機関名：九州大学  
部局名：生体防御医学研究所  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：30415195

研究分担者氏名：三谷 曜子  
ローマ字氏名：Yoko Mitani  
所属研究機関名：北海道大学  
部局名：北方生物圏フィールド科学センター  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：40538279

研究分担者氏名：川合 佑典  
ローマ字氏名：Yusuke Kawai  
所属研究機関名：帯広畜産大学  
部局名：畜産学部  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：10709546

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。