

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 3月 31日現在

機関番号：17102
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23650289
 研究課題名（和文） バイオ人工肝臓システムへの利用を目指した肝分化誘導型スーパー細胞の開発
 研究課題名（英文） Development of genetically modified hepatic cells with induced high liver functions for bioartificial liver systems
 研究代表者
 上平 正道 (KAMIHIRA MASAMICHI)
 九州大学・工学研究院・教授
 研究者番号：40202022

研究成果の概要（和文）：
 バイオ人工肝臓システムに用いるために、高い肝機能を人工的に誘導可能な細胞株の作製を目的とした。マウスヘパトーマ細胞に8種類の肝特異的転写因子遺伝子を導入し、高肝機能を誘導できる細胞株を樹立した。樹立した細胞では転写因子遺伝子の誘導発現によって、各種肝機能の著しい上昇が観察された。本研究で樹立した増殖と肝機能発現を切換え可能なヘパトーマ細胞は、バイオ人工肝臓システムにおいて有用な細胞と考えられる。

研究成果の概要（英文）：
 Here, we attempted to create genetically engineered hepatic cells with enhanced liver functions by overexpression of liver-enriched transcription factors (LETFs), which are associated with the transcription of liver-specific genes and hepatic differentiation. Mouse hepatoma Hepal-6 cells were transduced with retroviral vectors, in which inducible expression cassettes for the LETF genes were introduced. Cell clones with inducible expression of high liver functions were established. This approach may be promising for the construction of cells for use in bioartificial liver systems.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域
 科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学
 キーワード：生物・生体工学、バイオテクノロジー、発現制御、肝特異的転写因子、バイオ人工肝臓、ヘパトーマ

1. 研究開始当初の背景
 肝臓は、炭水化物・脂質代謝、タンパク合成、尿素合成、薬剤の変換、老廃物の除去など多様な機能を担っており、激症肝炎や急性肝不全など重篤な肝障害が生じた場合、機能の複雑さから、完全な人工装置で代替することができない臓器である。そのため人工肝臓システムでは、生きた細胞を使用する必要があり、バイオ人工肝臓(BAL)と呼ばれるシステムが考案された(図1)。このシステムでは、患者の血流から全血あるいは血漿を取り出し、肝臓の機能を発揮する細胞を充填したバイオリアクター(人工肝臓モジュール)の中を通して、処理した血あるいは血漿をまた

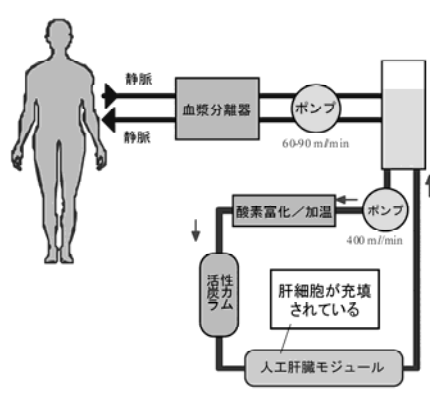


図1. バイオ人工肝臓(BAL)システムの概略

血流に戻すシステムである。日本ではまだラットやブタなどを用いた動物実験レベルでの研究であるが、アメリカではすでに臨床応用が試みられ、肝移植までの橋渡しとして数十時間の使用では大きな成果をあげており、数例ではあるがBALシステムの使用だけで回復した例も報告されている (Pascher et al., *Xenotransplantation* 2002; 9(5), 309-324)。現在、BAL システム開発における最重要課題は臨床用細胞源の確保である。臨床応用の人工肝臓には細胞源として初代ブタ肝細胞を用いるのが主流であったが、内在性ウイルスによる感染の危険性が指摘され (Fruhauf et al., *Liver Int* 2009; 29(10), 1553-1561)、代替可能な細胞がまだ開発されていないため、近年は停滞状況にある。へパトーマ細胞や ES 細胞を用いた研究もなされているが、肝機能発現が不十分であることが問題となっている。現在までに、臨床のBALシステムにおいて検討された細胞は、ブタ肝臓から取り出された初代ブタ肝細胞、移植に使われなかったドナー肝由来の初代ヒト肝細胞、肝ガンから樹立されたへパトーマ細胞である。研究レベルではあるが、マウス ES 細胞から分化誘導された細胞についても検討が行われている。初代肝細胞は、肝機能は高いものの増殖させることが非常に困難であるため、人工肝臓モジュールを作製するたびに、生体肝臓から採取する必要がある。初代ヒト肝細胞は入手が困難であるため、動物由来のものが使われるが人畜共通感染症の問題が指摘されている。また、肝ガンから樹立されたへパトーマ細胞は、培養により増殖させることが可能であるが、肝機能発現の点で初代肝細胞と比べて著しく劣っている。正常核型を有しながら旺盛な増殖能をもつ ES 細胞は魅力的な細胞源であるが、これまでの肝細胞への分化誘導では、増殖・分化因子などの添加物や培養環境による分化誘導によるものが主流で、分化効率が低く、肝機能も劣るため、人工肝臓モジュールに使用するには大量の細胞を用意する必要があり今のところ実用的ではない (Matsumoto et al., *Transplant Proc* 2008; 40(2), 614-616)。そこで本研究では、BAL システムへ適用するために、増殖と高い肝機能発現を好みのタイミングで切り換えることができる細胞の作製に挑戦する。

2. 研究の目的

本研究では、へパトーマ細胞や ES 細胞などの培養によって増殖させることが可能な細胞に、肝特異的転写因子遺伝子群を強制発現することで、肝分化による肝機能発現に必須の転写因子遺伝子の組合せを同定し、その遺伝子を誘導型の発現ユニットとして細胞ゲノムに導入することによって、細胞増殖と

肝機能発現を切り換えることができる細胞を作製する。本研究の成果は、脱分化細胞の再分化による機能性細胞の誘導における新しい方法論を提示するとともに、現在の BAL システム開発の停滞状況を打開できる可能性を有している。

3. 研究の方法

(1) 肝機能発現誘導のための肝特異的転写因子遺伝子の同定

肝細胞で発現しており、肝機能をはじめとする肝特異的な遺伝子発現に関与することがわかっている HNF ファミリー (HNF-1 α 、HNF-1 β 、HNF-3 β 、HNF-4 α 、HNF-6) や C/EBP ファミリー (C/EBP- α 、C/EBP- β 、C/EBP- γ) といった転写因子群の遺伝子をクローニングし、ウイルスベクターに発現ユニットとして導入した。このウイルスベクターを種々の組み合わせにより、へパトーマ細胞や分化誘導したマウス ES 細胞に感染させ、どの転写因子の組み合わせが肝機能を高発現させるために必要であるかについて検討した。スクリーニングのための肝機能マーカーとしては、アルブミン分泌能により評価する (アルブミンの定量は、ELISA 法やウェスタンブロット法により解析する)。

(2) 肝特異的転写因子遺伝子の誘導発現による増殖と分化を制御できる細胞の作製
上記で同定された肝特異的転写因子遺伝子群を、Tet 合成プロモーターシステムを組み込んだドキシサイクリン誘導用のベクターシステム (Urlinger et al., *PNAS* 2000; 97(14), 7963-7968) に組み込み、同遺伝子群の誘導型発現ユニットを細胞ゲノムへ導入し、薬剤によって肝機能を誘導発現できる細胞株を樹立した。作製した細胞株におけるアルブミン分泌能以外の他の肝機能について、Real-time PCR を用いた転写レベルでの評価や、市販の測定キットを使用してチトクローム P450 薬物代謝活性、尿素合成能、アンモニア代謝能力の評価を行った。

(3) 細胞の組織化による高肝機能誘導

肝細胞は、球状凝集体 (スフェロイド) のような擬似的な組織形態に組織化させながら培養することで、高い肝機能を長期間維持できることが知られている。本研究において樹立した細胞の組織化を誘導し、肝機能発現への影響を調べた。

4. 研究成果

本研究では、まず、マウス肝特異的転写因子群の遺伝子を用いて、高い肝機能を発現可能なマウスへパトーマ細胞株の樹立に取り組んだ。肝特異的転写因子としては、肝臓において高発現しており、肝発生や肝

機能発現のために重要な役割を果たすことが知られている HNF (hepatocyte nuclear factor) -1 α 、HNF-1 β 、HNF-3 β 、HNF-4 α 、HNF-6、C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) - α 、C/EBP- β 、C/EBP- γ の 8 種類の転写因子を選び、これらの遺伝子をマウス肝臓より取得して実験に供した。また、遺伝子導入に際して、導入した転写因子遺伝子の発現を外部からコントロールできるように、薬剤誘導型の発現システムである Tet-On システムを用いた。このシステムは、低分子化合物であるドキシサイクリン (Doxycycline; Dox) を細胞の培地中へ添加することによって目的遺伝子の発現を簡便に誘導するものである。Tet-On システムの構築のために、まず、Dox 依存的な転写活性化因子である reverse tetracycline-dependent transactivator (rtTA) タンパク質の遺伝子をレトロウイルスベクターによりマウスヘパトーマ細胞である Hepa1-6 細胞へ遺伝子導入し、rtTA 恒常発現の Hepa/rtTA 細胞を樹立した後、取得した各転写因子遺伝子を Dox によって誘導可能な発現ユニットとしてそれぞれレトロウイルスベクターに組み込み、Hepa/rtTA 細胞へ遺伝子導入した。

肝特異的転写因子の遺伝子導入によってヘパトーマ細胞の肝機能発現にどのような影響が現れるか観察するために、各転写因子遺伝子をそれぞれ単独で、或いは複数組み合わせ合わせて細胞に導入し、最も代表的な肝機能であるアルブミン分泌能を評価した。細胞は、Dox (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 含有培地あるいは非含有培地で 7 日間培養し、評価に用いた。その結果、HNF-3 β および HNF-6、C/EBP- β を単独で過剰発現させた場合にアルブミン分泌能の向上が見られたが、それ以上に、全 8 種類の転写因子を同時に遺伝子導入し、Dox 添加によって過剰発現させ

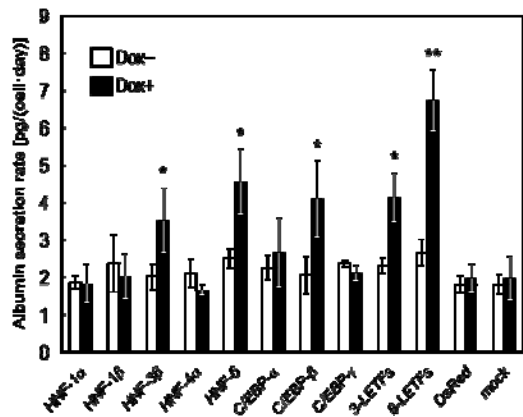


図 2. 肝特異的転写因子導入細胞におけるアルブミン分泌速度

た場合に、アルブミン分泌能の顕著な向上が認められた。これより、ヘパトーマ細胞の肝機能を効果的に向上させるために、種類の異なる肝特異的転写因子を組み合わせるのことが有効であることがわかった (図 2)。

次に、高肝機能を発現できるヘパトーマ細胞株を樹立するために、先の実験において最も顕著なアルブミン分泌能の向上が認められた全 8 因子を共導入した細胞集団より、細胞クローンの樹立を試み、限界希釈法によって 20 種類の Hepa/8F 細胞株を取得した。細胞株のスクリーニングのために、全細胞株のアルブミン分泌能を評価した結果、ほぼ全てのクローンにおいて Dox 添加によるアルブミン分泌速度の向上が観察されたが、向上率は細胞株によって異なり、特にクローン #4、#5、#16、#17 において、非常に顕著なアルブミン分泌能の向上が見られた。そこで、これら 4 種類の細胞株に対し、BAL システムにおいて要求される肝機能であるアンモニア除去能 (図 3) 及びシトクロム P450 (CYP3A) 活性 (図 4) の評価を行った。その結果、4 種類の細胞株の中でも特に、クローン #5 において非常に著しい肝機能発現の向上が認められ、培

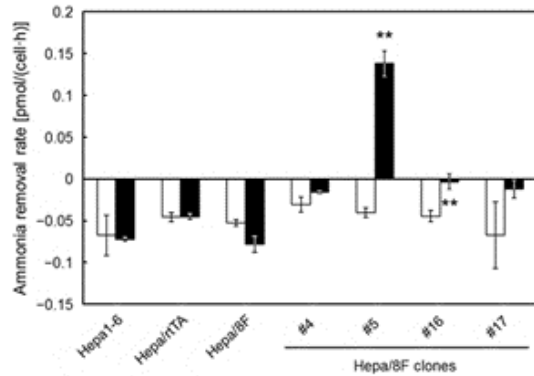


図 3. 樹立したクローンのアンモニア除去能

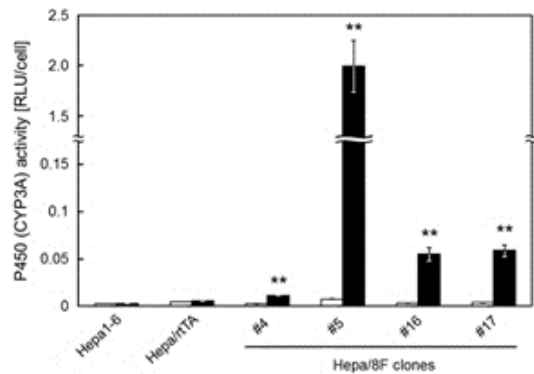
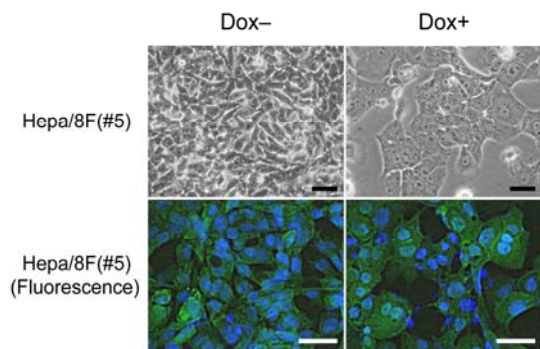


図 4. 樹立したクローンの P450 活性

養 5 日目の時点において、親細胞である Hepa1-6 細胞や Hepa/rtTA 細胞で欠落していたアンモニア除去能を獲得すると共に、薬剤代謝を担うシトクロム P450 タンパク質の活性が親細胞に比べ約 1000 倍に向上した。この際のシトクロム P450 の活性値は、マウス肝臓から採取後間もない初代肝細胞と同等のレベルであった。また、更なる評価のために 4 種類の細胞株に対して、代表的な各種肝関連遺伝子 (AFP、TTR、G6P、TAT、ALB、CYP3a) の発現解析を行ったところ、Hepa1-6 細胞や Hepa/rtTA 細胞に対して、樹立した 4 種類の Hepa/8F 細胞株では、Dox 添加を介した肝特異的転写因子群の過剰発現時において各種肝関連遺伝子の発現が誘導されている様子が観察でき、中でも特にクローン#5 で非常に顕著な発現増強が認められた。

樹立した 4 種類の Hepa/8F 細胞株では、Dox 添加による肝特異的転写因子群の過剰発現時に、細胞形態の変化が観察された。特に、クローン#5 で変化が顕著であり、Dox 存在下での 5 日間の培養によって、細胞のサイズが顕著に大きくなると共に、形態が上皮細胞様の敷石状の形に変わった (図 5)。またこの際、クローン#5 では、初代肝細胞においてよく見られる細胞核の



多核化現象も観察された。さらに、Hepa1-6、

図 5. Hepa/8F5 細胞の形態

Hepa/rtTA、クローン#5 の各細胞に対して

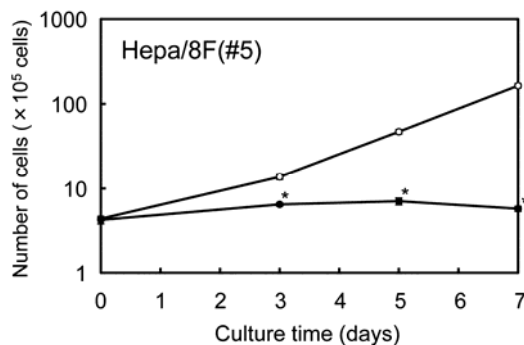


図 6. Hepa/8F5 細胞の増殖挙動

細胞増殖性の評価を行った結果、クローン#5 では Dox 添加により、培養早期の段階で細胞増殖が停止している様子が観察された。これは細胞が高機能化したことによる影響であると考えられる。一方、Dox を添加していない従来の培養環境下において、クローン#5 は親細胞と同等の増殖能を有しており (図 6)、大量培養が可能であることが示された。

さらに、Hepa/8F5 細胞におけるその他の肝機能について更に幅広く解析を行うために、定量的 PCR 法を用いて、肝機能に密接に関わる各種肝関連遺伝子の発現を転写レベルで評価した。肝関連遺伝子としては、役割の異なる多様な 11 種類の遺伝子 (ALB、TTR、AAT、TAT、G6P、Cps1、ApoAI、ApoB、ASGPR1、PPAR α 、GATA4) を選択し、Hepa1-6 細胞と Hepa/8F5 細胞を 5 日間培養して解析を行った。測定の結果、Dox 存在下で培養を行った Hepa/8F5 細胞では、Hepa1-6 細胞や Dox 非存在下の Hepa/8F5 細胞に比べ、各種肝関連遺伝子の発現が顕著に増加していることが分かった。これらの結果より、肝特異的転写因子群を過剰発現させることで、Hepa/8F5 細胞において幅広い多様な肝機能の発現を誘導できることが示された。

次に、定量的 PCR 法を用いた遺伝子発現解析により、Hepa/8F5 細胞における導入転写因子の発現特性を調べた。Hepa/8F5 細胞および他の Hepa/8F 細胞株 (クローン#4、#16、#17) に対して解析を行った結果、Hepa/8F5 細胞以外の Hepa/8F 細胞株では、発現レベルが非常に低い、もしくは全く発現していないという状況の転写因子が 2 種類以上見られたのに対し、Hepa/8F5 細胞では、遺伝子導入に用いた 8 種類の肝特異的転写因子が全て比較的高いレベルで発現誘導されていた。この結果より、へパトーマ細胞上で高い肝機能発現を誘導するためには、肝特異的転写因子群を全て高レベルで過剰発現させ、相乗的な効果を引き出すことが有効であると分かった。

ここまで Hepa/8F5 細胞は単層の状態での培養を行ってきたが、培養形態を工夫することによって肝機能発現を更に向上させることができないかと考え、Hepa/8F5 細胞株のスフェロイド培養を行った。スフェロイドは浮遊状態にある球形の細胞凝集塊であり、この形態で三次元的な培養を行うことにより、細胞間の相互作用を高め、生体内に近い培養環境を再現できる。スフェロイド培養に際し、まず、スフェロイドのサイズの検討を行った。細胞低接着処理が施してある U 字型底面の 96 ウェルプレートに対して、250、500、1000、2000 cells/well

と細胞密度を4条件変え、それぞれ5日間培養を行った。その結果、播種数 250 cells/well の条件において、直径 200 μm を下回るスフェロイド（直径約 192 μm ）が形成され、500、1000、2000 cells/well の条件においてそれぞれ直径約 231 μm 、291 μm 、395 μm のスフェロイドが形成された。次に、各播種数で形成させたスフェロイドに対して、培養5日目の時点で、アルブミン分泌能、アンモニア除去能、尿素合成能、シトクロム P450 活性といった代表的な肝機能を調べた結果、どの肝機能においても、細胞播種数が少ないほど肝機能発現が高い傾向が見られ、250 cells/well の播種数で形成させたスフェロイドにおいて最も高い肝機能発現が得られた。この原因として、直径の大きなスフェロイドでは、スフェロイド内部が低栄養・低酸素状態になって細胞が壊死してしまうために、肝機能発現レベルが低くなることが考えられる。そこで、死細胞において特異的に蛍光を発する propidium iodide (PI) 色素を用いて、死細胞の観察を行った結果、特に直径の大きい 2000 cells/well のスフェロイドにおいて、スフェロイド内部の細胞壊死が観察された（図7）。

次に、Hepa1-6 細胞および Hepa/8F5 細胞を単層またはスフェロイドの形態で培養し、各培養形態での肝機能発現レベルの比較を行った。培養は5日間行い、スフェロイド形成時は、先の実験の結果を受けて細胞播種数を 250 cells/well とした。測定の結果、評価した4種類の肝機能全てにおいて、Hepa/8F5 細胞を Dox 存在下でスフェロイド培養した場合に、単層培養時よりも有意に高い肝機能発現が得られた。Hepa/8F5 細胞を Dox 存在下でスフェロイ

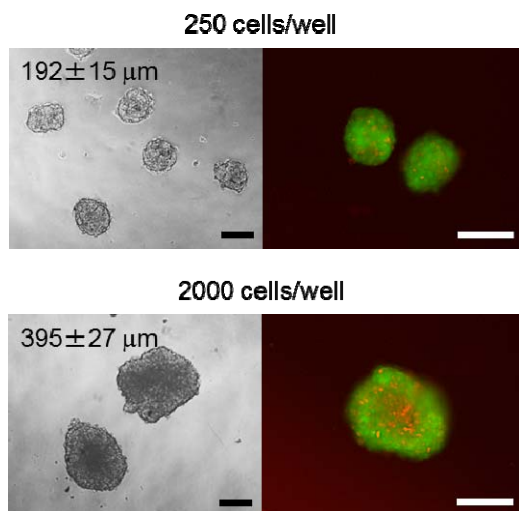


図7. Hepa/8F5 スフェロイドの形成

ド培養した場合における機能向上の効果は、Dox 存在下での単層培養時に対し、アルブミン分泌能が約 1.8 倍、アンモニア除去能が約 4.0 倍、尿素合成能が約 4.8 倍、シトクロム P450 (CYP3A) 活性が約 1.5 倍であった。また、この際、Dox 存在下にてスフェロイド培養を行った Hepa/8F5 細胞の各種肝機能発現レベルは、マウス肝臓から採取して間もない（1日後）マウス初代肝細胞と匹敵するレベルに達していた。

マウスヘパトーマ細胞における成果に基づいて、ヒト肝特異的転写因子群の導入によるヒトヘパトーマ細胞の高肝機能化に取り組んだ。マウスヘパトーマ細胞の高肝機能化のために用いたものと同様の8種類 (HNF-1 α 、HNF-1 β 、HNF-3 β 、HNF-4 α 、HNF-6、C/EBP- α 、C/EBP- β 、C/EBP- γ) のヒト肝特異的転写因子の遺伝子を独自に取得し、Dox により誘導可能な発現ユニットとしてそれぞれレトロウイルスベクターに組み込み、ヒトヘパトーマ細胞である HepG2 細胞へ遺伝子導入を行った。肝特異的転写因子群の遺伝子を全て同時に共導入し、アルブミン分泌能を指標として、HepG2 細胞の肝機能を評価したところ、Dox 添加 (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を介したヒト肝特異的転写因子群の過剰発現時において、約 3.3 倍のアルブミン分泌能の向上が認められた。この結果より、マウスヘパトーマ細胞と同様に、ヒトヘパトーマ細胞においても肝機能の向上のために、肝特異的転写因子群の導入および過剰発現が有効であることが分かった。

本研究では、ヘパトーマ細胞の肝機能を向上させるために肝特異的転写因子群の遺伝子導入及び過剰発現が有効であることを示すと共に、高肝機能発現を誘導することができるヘパトーマ細胞株の樹立に成功した。樹立した遺伝子改変ヘパトーマ細胞株は、採取して間もない初代肝細胞に匹敵するレベルの肝機能を誘導することが可能であり、且つ、従来の培養環境下において大量に培養できるため、BAL システムにおける細胞源の問題を解決し得る、非常に有用な細胞であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

(1) Hideaki Yamamoto, Yoshinori Kawabe, Akira Ito, Masamichi Kamihira, Enhanced liver functions in mouse hepatoma cells by induced overexpression of liver-enriched transcription factors, Biochemical Engineering Journal, 査読有、60、2012、

〔学会発表〕(計6件)

- (1) 山元秀晃、河邊佳典、井藤 彰、上平正道、肝特異的転写因子の過剰発現によるへパトーマ細胞の高機能化、第63回日本生物工学会大会、2011年9月26日、東京農工大学(小金井市)
- (2) 上平正道、山元秀晃、河邊佳典、井藤 彰、増殖と高肝機能発現を切换え可能なへパトーマ細胞の開発、化学工学会第77年会、2012年3月16日、工学院大学(東京都)
- (3) 三分一孝則、山元秀晃、河邊佳典、井藤彰、上平正道、相同組換えにより樹立した遺伝子導入ES細胞の肝分化誘導、第49回化学関連支部合同九州大会、2012年6月30日、北九州国際会議場(北九州市)
- (4) 三分一孝則、山元秀晃、河邊佳典、井藤彰、上平正道、高肝機能発現へパトーマ細胞の培養環境評価、化学工学会第44回秋季大会、2012年9月19日、東北大学川内キャンパス(仙台市)
- (5) Hideaki Yamamoto, Takanori Sambuichi, Yoshinori Kawabe, Akira Ito, Masamichi Kamihira、Generation of genetically engineered hepatoma cells with inducible high liver functions、The 25th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2012)、2012年11月28日、名古屋国際会議場(名古屋市)
- (6) 上平正道、山元秀晃、三分一孝則、河邊佳典、井藤 彰、高肝機能を誘導発現可能な遺伝子改変へパトーマ細胞の開発、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月12日、マリンメッセ福岡(福岡市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002690/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上平 正道 (KAMIHIRA MASAMICHI)

九州大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：40202022

(2) 連携研究者

水本 博 (MIZUMOTO HIROSHI)

九州大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：90346817