

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06431

研究課題名(和文) ウシ肝類洞構成細胞株の協働による肝機能向上機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of liver function improvement by cooperation of bovine hepatic sinusoidal cell lines

研究代表者

吉岡 都 (Yoshioka, Miyako)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・室長

研究者番号：80355198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ウシ肝臓由来の肝実質細胞株と非実質細胞株の共培養において、急性期蛋白である Serum amyloid A および Haptoglobin の mRNA 発現の増強には、BH4細胞とB46細胞の組み合わせが最適であることを明らかにした。それらの共培養での増強効果には、細胞同士の接触とB46細胞から分泌される炎症性サイトカインのIL-6とIL-1 の関与が示唆された。また、細胞内代謝産物のメタボローム解析によって、共培養では単培養よりもLPS刺激によってエネルギー代謝や核酸合成が亢進していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウシ肝臓由来の肝実質細胞株と非実質細胞株の共培養において、肝機能の向上が期待できる組み合わせが明らかとなった。この共培養系を用いることで、ウシ特有の代謝機能を保持した簡便なin vitroアッセイが可能となり、ウシの肝機能を保全する飼養方法や有害物質による肝障害の予防・治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We found that the combination of BH 4 cells (a parenchymal cell line) and B 46 cells (a non-parenchymal cell line) was optimal for enhancing mRNA expression of acute-phase proteins, Serum amyloid A and Haptoglobin, in coculture of bovine liver-derived cells. It was revealed that the enhancing effect involves contact between cells and involvement of the inflammatory cytokines IL -6 and IL -1 secreted by B 46 cells. Metabolomic analysis of intracellular metabolites showed that multiple metabolites were increased by LPS stimulation in coculture compared with monoculture, suggesting that ATP production and nucleic acid synthesis were enhanced.

研究分野：獣医学

キーワード：共培養 肝類洞細胞株 急性期蛋白質 炎症性サイトカイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウシの新規飼料および飼料添加物等の安全性を評価するためには、ウシ特有の肝機能を評価可能で、かつ迅速・簡便な代替細胞を用いた *in vitro* アッセイ系が必要である。生体の代謝の中核である肝臓は、代謝の場である肝実質細胞のほかクッパー細胞、類洞内皮細胞、星細胞等の肝類洞を構成する非実質細胞から構成されている。これらの非実質細胞と肝実質細胞とのクロストークが、肝細胞壊死や脂肪肝などの病態や肝再生に関与している (Crispe et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 2009)。申請者らは、ウシの肝臓の代謝や毒性発現機構の研究に有効な *in vitro* アッセイ系を確立するため、ウシ肝臓由来不死化細胞株を作出してきた。近年、肝臓の代謝や毒性発現機構の研究に有効な手法である *in vitro* の肝実質細胞培養モデルとして、肝実質細胞のみを用いた単一培養系に比べ、非実質細胞との共培養系の有用性が示唆されている。この共培養を利用して、ウシの肝臓機能を評価可能な簡便な培養細胞による *in vitro* アッセイ系が確立できれば、ウシの肝機能を保全する飼養方法や有害物質による肝障害の予防・治療法の確立に役立つと考えられる。

2. 研究の目的

ウシの新規飼料および飼料添加物等の安全性を評価するためには、ウシ特有の薬物代謝機能を評価可能で、かつ迅速・簡便な代替細胞を用いた安全性評価試験法が必要である。本課題では、これまでに申請者らが作出してきたウシ由来肝実質細胞株 (BH4、BH5)、類洞内皮細胞株 (B46) および筋線維芽細胞株 (A26) など、複数のウシの肝臓由来不死化細胞を組み合わせた共培養系を開発する。すなわち、最適化された牛由来肝臓細胞株の共培養系を用いて、肝実質細胞と非実質細胞との相互作用により薬物代謝等の肝機能向上機序を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ウシ肝実質細胞株 (BH-4、BH-5) と非実質細胞株 (B46、A26) の共培養における急性期蛋白質産生への影響

ウシ肝実質細胞株 (BH4、BH5) のそれぞれに対して、同じくウシ肝臓由来非実質細胞である筋線維芽細胞株 (A26 細胞) または類洞内皮細胞株 (B46 細胞) を 1:2 の混合比になるようにコラーゲンコートしたプラスチックシャーレに播き、1 $\mu\text{g/ml}$ の LPS で 48 時間刺激後、ウシ特異的な急性期蛋白である Serum amyloid A (SAA) および Haptoglobin (HP) の mRNA 発現リアルタイム PCR で解析した。

(2) 培養形態における急性期蛋白質発現動態の解析

ウシ由来肝実質細胞株である BH4 細胞と非実質細胞株である B46 細胞の共培養の効果を検討するため、培養形態を以下の 4 つに分けて実験を行った (①BH4 細胞単培 (Mono)、②BH4 細胞単培養への B46 細胞の単培養上清の添加培養 (Sup)、③BH4 細胞と B46 細胞のトランスウェルを用いた非接触型共培養 (Trans)、④BH4 細胞および B46 細胞の共培養 (Co-culture)) (図 1)。培養形態①、③および④については、1 $\mu\text{g/ml}$ の LPS で 48 時間刺激後、培養上清を回収し、培養上清中の炎症性サイトカイン等を ELISA で測定した。②については、B46 細胞を 1 $\mu\text{g/ml}$ の LPS で 48 時間刺激後、回収した培養上清を BH4 細胞に添加し、さらに 48 時間暴露後の培養上清中の炎症性サイトカイン等の生理活性物質を測定した。また、①、②および③については BH4 細胞から、④については BH4 および B46 細胞から tRNA を抽出し、IL-1 β および IL-6 の mRNA 発現リアルタイム PCR で解析した。

(3) 共培養でのメタボローム解析

ウシ由来非実質細胞株である B46 細胞の単独培養、ウシ由来肝実質細胞株である BH4 細胞の単独培養または BH4 細胞と B46 細胞の共培養の 3 つの培養形態において、1 $\mu\text{g/ml}$ の LPS で 48 時間刺激後、細胞中の 116 種の代謝物質を CE-TOFMS または CE system および TripleQuad LC/MS (CE-QqQMS) で測定した。ピーク情報から得られたピーク面積値は相対面積値に変換後、標準部物質を用いて絶対定量値に換算し、各代謝物質について三点検量線より濃度を算出した。

4. 研究成果

(1) ウシ由来肝細胞株の単独培養では、LPS 刺激による SAA 遺伝子発現は肝実質細胞株よりも非実質細胞株である B46 細胞で高い誘導が認められ、HP 遺伝子はすべての肝細胞株で誘導が認められなかった。しかし、肝実質細胞株と非実質細胞株の共培養においては、BH4 および BH5 細胞ともに、SAA 遺伝子の誘導が上昇し、とくに B46 細胞との共培養で高い誘導が認められた。一方、HP の誘導は、BH4 細胞と B46 細胞の組み合わせでのみ発

現が認められた。このことから、LPS による急性期蛋白質遺伝子発現には、BH4 細胞 B46 細胞の組み合わせが最適と考えられた。

(2) BH4 細胞と B46 細胞の共培養効果について、培養形態による発現動態への影響要因の検索を行った。LPS 刺激した B46 細胞の培養上清は、BH4 細胞単独培養に対して、SAA および HP 遺伝子を誘導したが、SAA では共培養時の 1/6、HP では 2/3 にとどまった。このことから、共培養時の肝機能向上には B46 細胞が分泌する液性因子の関与が示唆された。また、トランスウェルを用いた BH4 細胞と B46 細胞の非接触型共培養 (Trans) では、HP のみ BH4 細胞の単独培養に比べて上昇したが、その効果は共培養の 1/3 程度であり、培養上清添加時の約 1/2 であった (図 2)。これらのことから、ウシ肝臓由来肝実質細胞株 (BH4) と非実質細胞株 (B46) の共培養において、SAA および HP の急性期蛋白質遺伝子発現の増強は、一部 B46 細胞から分泌される液性因子の関与と、細胞同士の接触による機能向上の可能性が示唆された。

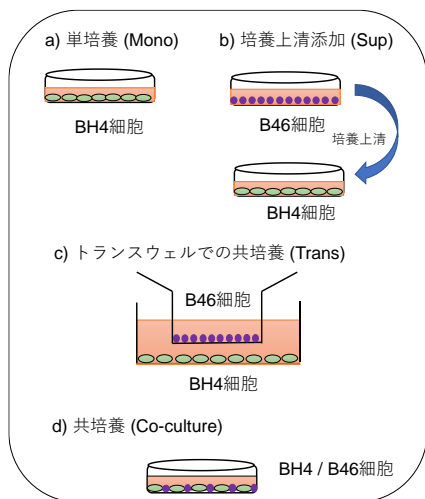


図 1 BH4 細胞と B46 細胞の培養形態模式図

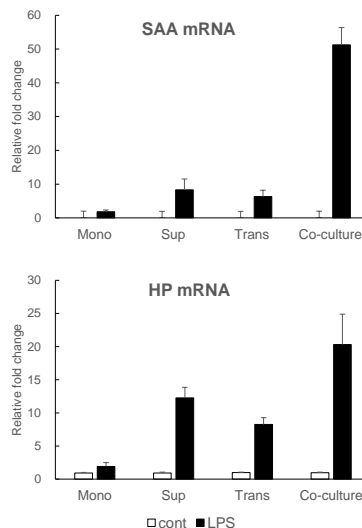


図 2 BH4 細胞の培養形態における LPS 刺激時の急性期蛋白質遺伝子発現

(3) 培養上清中の生理活性因子を探索しところ、Co-culture の培養上清中には IL-1 β および IL-6 が検出され、Sup および Trans よりも高濃度であった。培養細胞での IL-1 β および IL-6 mRNA は、Co-culture で著しく発現しており、Co-culture におけるこれらのサイトカインの産生細胞は B46 細胞と考えられた (図 3)。これらのことから、共培養における急性期蛋白質合成能の向上には、B46 細胞で産生される IL-1 β および IL-6 の関与が示唆された。

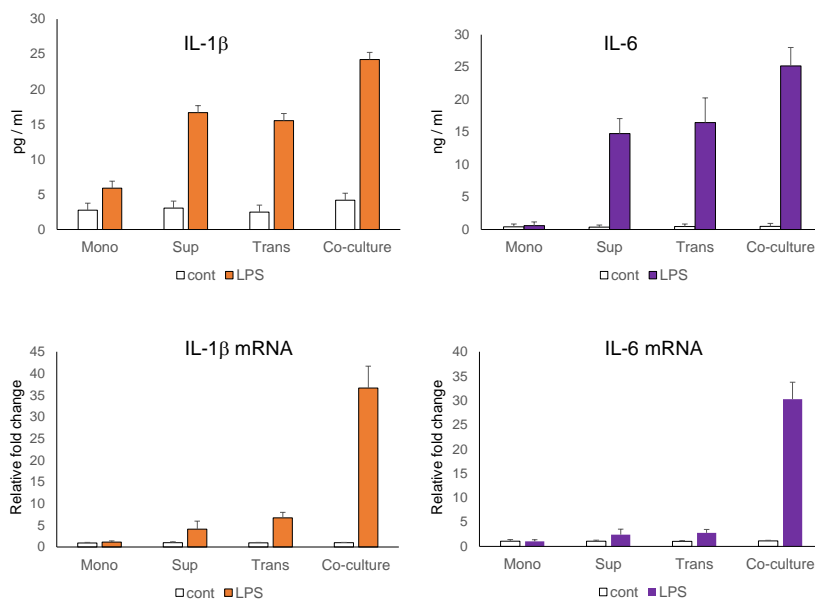


図 3 BH4 細胞と B46 細胞の培養形態における培養上清中のサイトカイン産生量 (上) とサイトカイン mRNA 発現 (下)

(3) メタボローム解析の結果、共培養では BH4 細胞単独培養と比べて、複数の代謝経路で LPS 刺激によって代謝産物が増加していることが確認された。代表例として、解糖系では Fructose-6-phosphate (F1,6P)、3-Phosphoglyceric acid (3-PG)、2-Phosphoglyceric acid (2-PG)、Phosphoenolpyruvate (PEP) および Pyruvate の上昇が、TCA 回路では cis-Aconitic acid、Isocitric acid、Fumarate および Malate の上昇が認められた。また、プリオンヌクレオチド合成経路では核酸合成の促進因子である Phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) が増加していた。これらのことから、共培養系では ATP 産生が増加し、エネルギー代謝や核酸合成が亢進していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yoshioka M, Takenouchi T, Kitani H, Guruge KS, Yamanaka N	4. 巻 56(1)
2. 論文標題 Synergistic induction of drug-metabolizing enzymes in co-cultures of bovine hepatocytic and sinusoidal cell lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vitro Cell Dev Biol Anim	6. 最初と最後の頁 2-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11626-019-00408-6.	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------