

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16226

研究課題名（和文）Pile-up型増殖に着目した新規肝細胞培養法確立および肝がん治療化合物の探索

研究課題名（英文）Establishment of a Novel Hepatocyte Culture Method Focused on Pile-Up Proliferation and Exploration of Compounds for Liver Cancer Treatment

研究代表者

宇留島 隼人（Urushima, Hayato）

大阪公立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：90755745

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々は肝がん細胞株HepG2細胞に重層増殖タイプ(Pile-up型)と平面単層増殖タイプ(Flat型)が混在することに気づき、各々を分離し2系統の株として培養することに成功した。Flat型に比べPile up型の方がアルブミン合成能が高く、肝細胞の機能発揮に重要な形態構造であることが示唆された。Flat型からPile up型へと変化させる化合物をスクリーニングし、ヒット化合物がアルブミン合成能を増強することを確認した。次世代シーケンス解析の結果、このヒット化合物はアルブミン特異的転写因子発現増強を介してアルブミン発現を増加したことから、この化合物は低アルブミン血症改善薬として有望と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請研究によって、アルブミン産生能改善薬候補化合物がピックアップできた。血清アルブミン値は加齢と共に減少し、死亡率と逆相関することが知られているため、長期的な介入が必要である。本化合物は既にFDAに承認されており既に他疾患治療のため臨床利用されているため、速やかな臨床試験の実施が可能であり、アンメットメディカルニーズである低アルブミン血症改善薬として期待できる。また本化合物は複数の肝がん悪性マーカー発現も減弱させた。いまだ死亡者数の多い肝がんに対して、形態変化に着目してピックアップした化合物による「がん細胞の形態良性化」という新しいコンセプトの抗肝がん剤の候補分子となり得る。

研究成果の概要（英文）：We noticed that the hepatocellular carcinoma cell line HepG2 contains both pile-up proliferation type and flat monolayer proliferation type cells. We successfully isolated and cultured these two types as separate strains. The pile-up type exhibited higher albumin synthesis ability compared to the flat type, suggesting that the pile-up morphology is crucial for the functional expression of hepatocytes. We screened compounds that can induce the transformation from the flat type to the pile-up type and confirmed that the hit compounds enhanced albumin synthesis ability. Next-generation sequencing analysis revealed that these hit compounds increased albumin expression by enhancing the expression of albumin-specific transcription factors. Therefore, these compounds are considered promising candidates for improving hypoalbuminemia.

研究分野：肝臓病態学

キーワード：肝細胞 アルブミン 肝がん

## 1. 研究開始当初の背景

手技的に簡便で低コストの長期的肝細胞培養法の確立は、新規創薬研究などにおいて非常に重要な役割を担う。分子生物学や再生医学が発達した近年においても未だ肝細胞を安定的に培養できない理由の一つに、「生体内における肝細胞の立体構造再現による細胞極性形成が起こっていない」ことが考えられる。HepG2 細胞は多くの肝がん細胞株で機能喪失的な変異が起きている腫瘍抑制タンパク p53 が正常であるなど、他の肝がん細胞株に比べ正常肝細胞に近い性質を持つことが知られている。この HepG2 細胞は培養皿一面に単層状に増殖するのではなく、島状に重層して増殖することが特徴である。20 数個の肝細胞同士が重層し肝細胞索を形成する組織学的特徴を併せると、正常肝細胞は生体内において基底膜上に平面単層的に増殖するのではなく、重層状に増殖していること、またこの重層構造による細胞極性形成が肝機能発揮のために重要であるのではないかと仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

我々はこの Pile up type と Flat type をそれぞれ単離培養し2系統に分けることに成功した。この2系統をマイクロアレイで比較したところ、肝がん悪性マーカーや、アルブミンなどの肝細胞特異的機能関連遺伝子発現が著しく異なることが明らかとなった。そこで、Flat type から Pile up type へと形態変化を引き起こす化合物を探索するためのスクリーニングシステムを構築し、肝がん抑制剤、あるいは肝機能改善薬の候補化合物探索を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)の支援を受け、FDA 承認済1134種類の化合物を96ウェルプレートで培養した Flat type に添加し7日間実体顕微鏡で観察した。Flat type から Pile up type へと形態変化を引き起こす化合物をピックアップした。ピックアップされた化合物の肝がん悪性マーカーおよび肝細胞特異的機能関連遺伝子の発現を調べた。

## 4. 研究成果

Flat type から Pile up type へと形態変化を引き起こす化合物が複数ピックアップできた。それらの化合物は肝がん悪性マーカー分子の発現を減弱することも確認できた。また Flat type にこの化合物を添加した時の遺伝子変化を解析したところ、アルブミン遺伝子の転写因子が発現変動していることが確認できた。血清アルブミン値は加齢とともに減少するため、高齢者では低アルブミン血症の割合が増える (*Age and ageing*, 1991)。また、高齢者において、血清アルブミン値は死亡率と逆相関 (*Maturitas*, 2015) するため低アルブミン血症への早期介入が重要である。現在、低アルブミン血症の治療としてアルブミン製剤や分枝鎖アミノ酸製剤など「アルブミンそのもの」や「アルブミンの原料」が保険適応されているが、アルブミン産生誘導能をもつ薬剤はない。さらにアルブミン製剤などの適応は重症時に限られており、初期の低アルブミン血症へ使用できない。また、低アルブミン血症はサルコペニアなどの他の高齢者特有の疾患の原因にもなるため、低アルブミン血症に対して早期から介入可能かつ効果の高い薬剤の開発は喫緊の課題といえる。本申請研究でピックアップできた化合物はアンメットメディカルニーズである低アルブミン血症の治療薬候補分子として期待できる。

またピックアップ化合物は肝がん悪性マーカー発現を減弱させることも明らかになった。これまで開発された抗肝がん薬は分子変化を基にピックアップされたものである。本申請研究は肝がん細胞株の形

態変化に着目して探索したものであり、「がん細胞形態の良性化」という新しいコンセプトの抗肝がん剤候補分子として期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayato Urushima, Tsutomu Matsubara, Masaaki Miyakoshi, Shioko Kimura, Hideto Yuasa, Katsutoshi Yoshizato, Kazuo Ikeda	4. 巻 324(3)
2. 論文標題 Hypo-osmolarity induces apoptosis resistance via TRPV2-mediated AKT-Bcl-2 pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.	6. 最初と最後の頁 G219-G230
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpgi.00138.2022	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 該当する
1. 著者名 Huu Hoang T, Sato-Matsubara M, Yuasa H, Matsubara T, Thuy LTT, Ikenaga H, Phuong DM, Hanh NV, Hieu VN, Hoang DV, Hai H, Okina Y, Enomoto M, Tamori A, Daikoku A, Urushima H, Ikeda K, Dat NQ, Yasui Y, Shinkawa H, Kubo S, Yamagishi R, Ohtani N, Yoshizato K, Gracia-Sancho J, Kawada N.	4. 巻 8(39)
2. 論文標題 Cancer cells produce liver metastasis via gap formation in sinusoidal endothelial cells through proinflammatory paracrine mechanisms.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Adv	6. 最初と最後の頁 5525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abo5525	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 該当する
1. 著者名 Kawamura E, Matsubara T, Daikoku A, Deguchi S, Kinoshita M, Yuasa H, Urushima H, Odagiri N, Motoyama H, Kotani K, Kozuka R, Hagihara A, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Tanaka S, Takemura S, Iwaisako K, Enomoto M, Taguchi YH, Tamori A, Kubo S, Ikeda K, Kawada N.	4. 巻 12(12)
2. 論文標題 Suppression of intrahepatic cholangiocarcinoma cell growth by SKI via upregulation of the CDK inhibitor p21.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 2122 - 2135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13489	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 Nakanishi T, Iida S, Maruyama J, Urushima H, Ichishi M, Matsushima Y, Mizutani K, Nakayama Y, Sugioka K, Nishimura M, Umaoka A, Iwakura Y, Kondo M, Habe K, Tsuruta D, Yamamoto O, Imai Y, Yamanaka K	4. 巻 24(6)
2. 論文標題 Arteriosclerosis Derived from Cutaneous Inflammation Is Ameliorated by the Deletion of IL-17A and IL-17F.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 5434
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24065434.	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 Dong MP, Thuy LTT, Hoang DV, Hai H, Hoang TH, Sato-Matsubara M, Hieu VN, Daikoku A, Hanh NV, Urushima H, Dat NQ, Uchida-Kobayashi S, Enomoto M, Ohtani N, Tamori A, Kawada N.	4. 巻 192(10)
2. 論文標題 Soluble Immune Checkpoint Protein CD27 Is a Novel Prognostic Biomarker of Hepatocellular Carcinoma Development in Hepatitis C Virus-Sustained Virological Response Patients.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 1379-1396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2022.07.003.	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 Urushima Hayato, Yuasa Hideto, Matsubara Tsutomu, Kuroda Noriyuki, Hara Yaiko, Inoue Kouji, Wake Kenjiro, Sato Tetsuji, Friedman Scott L., Ikeda Kazuo	4. 巻 191
2. 論文標題 Activation of Hepatic Stellate Cells Requires Dissociation of E-Cadherin?Containing Adherens Junctions with Hepatocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 438 ~ 453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2020.12.007	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 該当する

[学会発表] 計30件(うち招待講演 0件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Hayato Urushima, Hideto Yuasa, Tsutomu Matsubara, and Kazuo Ikeda
2. 発表標題 AHCC inhibited hepatic stellate cells activation and suppressed liver fibrosis progression via induction of cytoglobin
3. 学会等名 International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideto Yuasa, Hayato Urushima, Tsutomu Matsubara, Kazuo Ikeda
2. 発表標題 Oligonol, a standardized oligomerized-polyononol from Litchi chinensis fruit extract, increases E-cadherin expression in hepatocyte
3. 学会等名 International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上喜来々、松原三佐子、松原勤、宇留島隼人、湯浅秀人、大黒敦子、池田一雄、吉里勝利、鈴木孝幸、河田則文
2. 発表標題 肝細胞膜による肝星細胞活性化抑制作用
3. 学会等名 肝類洞壁細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 湯浅秀人、太田啓介、大黒敦子、宇留島隼人、松原勤、池田一雄
2. 発表標題 電子顕微鏡を用いた肝類洞壁構成細胞の三次元的構造解析
3. 学会等名 肝類洞壁細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大黒敦子、松原勤、松原三佐子、湯浅秀人、宇留島隼人、河田則文、池田一雄
2. 発表標題 Lawsoneが示す抗線維化作用機序の解明
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nguyen Duc Vien, 松原勤、大黒敦子、安藤美玖、門野千穂、中居暉、湯浅秀人、宇留島隼人、池田一雄
2. 発表標題 Age-related changes in hepatic mesenchymal cells
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Vu Thai Hung, 松原勤、大黒敦子、安藤美玖、門野千穂、樋口萌、湯浅秀人、宇留島隼人、池田一雄
2. 発表標題 Gene expression analysis related to pathological changes in non-alcoholic steatohepatitis
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宇留島隼人 松原勤 湯浅秀人 和氣健二郎 池田一雄
2. 発表標題 上皮 - 間葉転換に着目した新規肝星細胞脱活性化候補化合物の探索
3. 学会等名 第35回肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和氣健二郎、宇留島隼人、湯浅秀人、松原勤、池田一雄
2. 発表標題 肝星細胞と肝実質細胞との相関関係
3. 学会等名 第35回肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 翁良徳、松原三佐子、宇留島隼人、松原勤、池田一雄、吉里勝利、河田則文
2. 発表標題 Cytoglobin欠損マウスの肝星細胞に由来する一酸化窒素は肝細胞のミトコンドリア機能障害を引き起こす
3. 学会等名 第35回肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 湯浅秀人、宇留島隼人、松原勤、池田一雄
2. 発表標題 肝星細胞の微小突起形成機構について
3. 学会等名 第35回肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋口萌、松原勤、湯浅秀人、宇留島隼人、池田一雄
2. 発表標題 アセトアミノフェン誘発急性肝炎におけるC/EBP homologous proteinの役割
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇留島隼人 和氣健二郎 湯浅秀人 松原勤 池田一雄
2. 発表標題 肝星細胞の活性化時における上皮-間葉転換と機能変化との相関
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 湯浅秀人、宇留島隼人、松原勤、池田一雄
2. 発表標題 肝星細胞の微小突起形成におけるCdc42の役割について
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hayato Urushima, Tsutomu Matsubara, Gu Qiongya, Atsuko Daikoku, Chiho Kadono, Hideto Yuasa, Kazuo Ikeda
2. 発表標題 AHCC inhibited hepatic stellate cells activation by induction of cytoglobin expression through Toll-like receptor 2-JNK pathway and suppressed liver fibrosis
3. 学会等名 The 31st Annual Meeting of International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Qiongya Gu, Hayato Urushima, Chiho Kadono, Atsuko Daikoku, Hideto Yuasa, Tsutomu Matsubara, Kazuo Ikeda
2. 発表標題 Hepatocyte Regeneration-Promoting Effects of AHCC in a Partial Hepatectomy Model
3. 学会等名 The 31st Annual Meeting of International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hideto Yuasa, Hayato Urushima, Tsutomu Matsubara, Kazuo Ikeda
2. 発表標題 Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma-derived cells by Oligonol, a low-molecular-weight polyphenol derived from lychee fruit
3. 学会等名 The 31st Annual Meeting of International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Vu Thai Hung, Tsutomu Matsubara, Atsuko Daikoku, Miku Ando, Chiho Kadono, Moe Higkuchi, Hideto Yuasa, Hayato Urushima, Kazuo Ikeda
2. 発表標題 Gene Expression Analysis Related to Pathological Changes in Non-alcoholic Steatohepatitis
3. 学会等名 第1回複雑生命系秩序懇談会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nguyen Duc Vien, Tsutomu Matsubara, Atsuko Daikoku, Miku Ando, Chiho Kadono, Moe Higuchi, Hikaru Nakai, Hideto Yuasa, Hayato Urushima, Kazuo Ikeda
2. 発表標題 Aged-Related Changes in Hepatic Mesenchymal Cells (HMCs)
3. 学会等名 第1回複雑生命系秩序懇談会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安藤美玖、松原勤、大黒敦子、VU THAI HUNG、門野千穂、湯浅秀人、宇留島隼人、池田一雄
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎の病態変化に関連した因子の探索
3. 学会等名 第30回肝細胞研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上 喜来々、松原 三佐子、松原 勤、宇留島 隼人、湯浅 秀人、大黒 敦子、池田 一雄、吉里 勝利、河田 則文、鈴木孝幸
2. 発表標題 肝星細胞のスパイン形成および活性化抑制に関わる細胞膜タンパク質の同定と機能解明
3. 学会等名 第30回肝細胞研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中居 暉、松原 勤、高田 さゆり、安藤 美玖、宇留島 隼人、湯浅 秀人、池田 一雄
2. 発表標題 老化肝星細胞におけるERKリン酸化亢進の意義
3. 学会等名 第30回肝細胞研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名	宇留島隼人、松原勤、湯浅秀人、大黒敦子、Gu Qiongya、Hung Vu Thai、Nguyen Duc Vien、安藤美玖、中居暉、池田一雄
2. 発表標題	増殖様式が異なるHepG2細胞2系統間の遺伝子発現比較と肝機能改善剤スクリーニングシステムの構築
3. 学会等名	第37回肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	肝細胞脂質代謝におけるプリオンの機能解析
2. 発表標題	辜 瓊雅、宇留島 隼人、松原 勤、湯浅 秀人、大黒 敦子、Hung Vu Thai、Nguyen Duc Vien、安藤 美玖、中居 暉、池田 一雄
3. 学会等名	第37回肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	中居 暉、松原 勤、宇留島 隼人、湯浅 秀人、池田 一雄
2. 発表標題	老化肝星細胞におけるERKリン酸化亢進とSMAD4発現抑制の分子機序解明
3. 学会等名	第37回肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	活性型肝星細胞の生体内における三次元的構造解析
2. 発表標題	湯浅 秀人、宇留島 隼人、大黒 敦子、松原 勤、池田 一雄
3. 学会等名	第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名 大黒 敦子、松原 勤、松原 三佐子、湯浅 秀人、宇留島 隼人、河田 則文、池田 一雄
2. 発表標題 肝線維化におけるLawsone結合タンパク質の同定ならびに機能解析
3. 学会等名 129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Vu Thai Hung、松原 勤、大黒 敦子、安藤 美玖、湯浅 秀人、宇留島 隼人、池田一雄
2. 発表標題 Unveiling of Epithelial Membrane Protein 1 function in Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Vu Thai Hung、松原 勤、大黒 敦子、安藤 美玖、湯浅 秀人、宇留島 隼人、池田一雄Nguyen Duc Vien、松原 勤、安藤 美玖、大黒 敦子、中居 暉、湯浅 秀人、宇留島 隼人、池田 一雄
2. 発表標題 CHOP-Mediated FOS Expression Can Be Involved In Protection Against Acetaminophen-Induced Liver Injury
3. 学会等名 129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松原 勤、大黒 敦子、松原 三佐子、湯浅 秀人、宇留島 隼人、河田 則文、池田 一雄
2. 発表標題 LawsoneはYAPシグナルを減弱することで肝線維化を抑制する
3. 学会等名 第144回日本薬学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Jordi Gracia-Sancho BSc PhD (編集)	4. 発行年 2024年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 562
3. 書名 Sinusoidal Cells in Liver Diseases: Role in their Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment	

〔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
---------	---------