

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659067

研究課題名(和文)三種温度感受性ヒト不死化細胞を用いた Human Mini Liver 構築の試み

研究課題名(英文) A challenge to construct human mini liver using temperature sensitive immortalized human liver cells

研究代表者

千葉 寛 (Kan, Chiba)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40159033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究の結果、ヒト類洞内皮細胞に不死化遺伝子を導入し、独自の新規ヒト不死化類洞内皮細胞を樹立することに成功した。一方、ヒト不死化肝細胞については現在まだ推進中であるが、この過程において我々はヒト肝がん由来細胞の分化形質を大きく向上させる手法を得た。したがって今後は、この分化させたヒト肝がん由来細胞と上述のヒト不死化類洞内皮細胞を共培養することにより、新たな *in vitro* ヒト肝モデルを構築することが可能であると期待される。このモデルを用いることにより新たな薬物動態・毒性研究が可能となるばかりでなく、ヒト肝分化・病態の機序解明および肝疾患治療標的の探索なども可能となると期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have successfully developed novel human immortalized liver sinusoidal endothelial cells (hiLSEC) using a two immortalization gene introduction method. The cells show high proliferation ability as well as cell differentiation characteristics. In addition, we have obtained a new easy and effective culture method for use in hepatic-cell differentiation. Therefore, a new *in vitro* human liver model can be developed using hiLSEC in conjunction with hepatic cells cultured using the new method, and it can be predicted that the novel *in vitro* human liver model will represent a significant and useful advancement in the science of *in vitro* liver modeling. We hope that this new model will facilitate studies of pharmacokinetics/toxicity research as well as those aimed at clarifying hepatic differentiation mechanisms and exploring new drug targets for liver diseases, such as liver fibrosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：評価系 不死化細胞 肝臓

1. 研究開始当初の背景

肝臓は、糖、脂質、たんぱく質の代謝・貯蔵、薬物の解毒・胆汁排泄、体液の恒常性維持など多くの機能を担う臓器である。肝臓は約 60-65%の肝実質細胞（肝細胞）と約 35-40%の非実質肝細胞から構成されており、非実質肝細胞は類洞内皮細胞、星細胞、クッパー細胞、Pit 細胞、胆管上皮細胞等からなる。糖、脂質、異物代謝など、代表的な肝機能は主に肝細胞が、ビタミン A の貯蔵や血中ヒアルロン酸の分解などは非実質肝細胞が担っており、これらの機能に対して、各細胞は協調的に働いていることが知られている。また、これら機能を担う分化形質は細胞間の相互作用により維持されていると考えられており、肝細胞を肝星細胞や類洞内皮細胞と共培養すると、肝細胞特異的遺伝子の発現および機能が上昇することが報告されている。

一方、これら細胞間の協調作用は肝生理的機能維持ばかりでなく、薬剤性肝障害やそれに続く肝線維症の発症にも重要な役割を担っている。例えばアセトアミノフェン誘発肝障害では、肝細胞と類洞内皮細胞に障害が生じ、これに起因する類洞構造の破綻と回復が最終的な肝障害発現を規定する要因のひとつであると考えられている。また、肝星細胞の活性化は肝線維化の中心的な役割を担うと考えられており、肝細胞または類洞内皮細胞との共培養下において肝星細胞は不活性化状態に維持されていることが報告されている。さらに最近では、肝星細胞から分泌される何らかのタンパク質性因子は活性酸素曝露による肝細胞死に対して保護効果を示すことも報告されている。

これらのことから、肝臓の生理機能や薬剤性肝障害とそれに続く線維化制御に関わる分子機構を解明するには、肝細胞と非実質肝細胞が共存し、相互に連携した機能や

分子応答を示す系が必要と考えられる。しかしながら、従来の多くの肝臓モデルは肝実質細胞単独で構成されており、肝細胞の機能解析しか行うことができない。肝細胞と非実質肝細胞の共培養モデルも報告されているが、そのほとんどが動物由来細胞によるものであり、ヒトとの間に種差が存在する。しかしヒト肝細胞や非実質肝細胞は入手が困難で、長期経代培養可能なヒト非実質肝細胞もないため、ヒト生体肝を反映する肝モデル構築は現時点では極めて困難である（近年は iPS・ES 細胞から肝細胞へ分化させる研究が進んでいるが、その肝細胞を大量使用することは難しく、また非実質肝細胞への分化法は確立していない）。

2. 研究の目的

これらの問題を解決するため、本研究では、温度感受性不死化三種ヒト肝臓細胞と独自に構築する培養法を用いた、ヒト生体肝の機能を反映する *in vitro* 肝モデル、human mini liver (HML)の構築を目的とした。

温度感受性不死化技術を用いることにより、これまで入手不能であった初代培養細胞に匹敵する機能を持つ、不死化肝実質細胞と不死化非実質肝細胞を安定的に供給することが可能となる。そして、これらの細胞の立体的な構造構築を可能にする三次元培養法を用いて共培養することにより、*in vitro* ヒト肝臓モデルである HML を確立できることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 細胞および培養法

ヒト肝細胞は、市販品を購入し、付属の培地または小型肝細胞用培地を用いて培養

した。ラット肝細胞は雄性 SD ラット 5 週齢からコラゲナーゼかん流法を用いて調製し、Williams' E 培地を用いて培養した。ヒト類洞内皮細胞は市販品を購入し、付属の培地を用いて培養した。また、ヒト肝星細胞様 LI-90 細胞は Riken Cell bank より入手し、Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) を用いて培養した。ヒト肝がん由来 HepG2 細胞および FLC5 細胞は、それぞれ DMEM および DMEM/Ham ' s F-12 を用いて培養した。ヒト胎児由来 HEK293 細胞は DMEM を用いて培養した。これら培地 (付属以外のもの) には 10% 牛胎児血清および抗生物質を添加し、上記全ての細胞は 37 °C の CO₂ インキュベーターにて培養した。

(2) 不死化遺伝子発現ベクターの調製とトランスダクション

Temperature-sensitive simian virus 40 large T antigen (tsSV40T) および human telomerase catalytic subunit (hTERT) 発現用レンチウイルスは、ViraPower Lentivirus Packaging Mix を用いて調製した。コントロールとして green fluorescent protein (GFP) を用いた。

各細胞への遺伝子導入のため、まず GFP ウイルスを用いて導入効率およびポリプレキシ毒性を検討し、遺伝子導入条件の最適化をおこなった。これにより決定した条件にしたがい、各細胞へまず tsSV40T の導入をおこなった。導入 1 週間後に培養温度を 33 °C とし、細胞の増殖を待った。継続的な培養が認められた細胞には、hTERT の導入をおこなった。この導入から 1 週間後に培地にプラストサイジン (最終濃度 4 μg/mL) を加え、細胞選択をおこなった。

(3) 遺伝子発現解析法

tsSV40T および hTERT の mRNA 発現は、各遺伝子に特異的なプライマーを設計し、reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) により解析した。

Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) および organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1) の mRNA 発現は、それぞれの遺伝子特異的プライマーを設計し、RT-PCR または定量的 PCR により解析した。

(4) 肝細胞分化の可視化評価ツールの構築

遺伝子発現モニタータンパク質として赤色蛍光タンパク質 mCherry を用い、これを pcDNA3.1(-)/Zeo ベクターに導入した。このベクターからプロモーター領域を除去し、代わりにヒトアルブミン遺伝子のプロモーターとエンハンサーを結合したゲノム領域を導入した (mCherry/pcDNA3.1^{Alb(P/E)})。遺伝子配列は DNA シークエンスにより確認した。

mCherry/pcDNA3.1^{Alb(P/E)} の HepG2 細胞および HEK293 細胞への導入は LipofectamineLTX を用いてメーカープロトコールにしたがっておこなった。mCherry の発現は共焦点レーザー顕微鏡により解析した。

(5) 新規肝細胞分化法の検討

ヒト FLC5 細胞に化合物 X (契約上非公開とする) を 0 - 10 μM で持続的に曝露した。細胞から cDNA を調節し、上述の方法に基づいて遺伝子発現解析をおこなった。

4 . 研究成果

これまでの検討により、非増殖性細胞であるヒト肝細胞への遺伝子導入は困難であることが明らかであったことから、まず実

験条件の最適化をおこない、ラット肝細胞において約50%のGFP導入効率が得られる条件を用いてヒト肝細胞へのtsSV40遺伝子導入をおこなった。しかしながら、その条件をもってしてもヒト肝細胞への遺伝子導入効率は低く、不死化形質の獲得には至らなかった。現在、これら経験を活かして培養条件の改良をおこなっている。また、ヒト星細胞モデルであるLI-90細胞については元来増殖能を有することから、hTERT遺伝子の導入をおこなった。その結果、hTERT遺伝子導入は成功したものの、長期的な継代培養に至らなかった。したがって、LI-90細胞（さらにはヒト星細胞も）はhTERT遺伝子導入のみでは不死化形質の獲得に不十分であると考えられ、再度tsSV40T遺伝子導入から進める予定である。

一方、ヒト類洞内皮細胞については、tsSV40T遺伝子の導入後において33での継続的な細胞増殖が認められ、さらに初代培養細胞と類似した形態を保っていた。そこでhTERT遺伝子導入もおこなったところ、初代培養細胞が死滅する継代培養以上の継続的な細胞増殖が認められ、抗生剤による選択も可能であった。この細胞における不死化遺伝子の発現を解析したところ、tsSV40TおよびhTERT mRNAいずれの発現も認められた。そこで本細胞をヒト不死化肝類洞内皮細胞 conditionally immortalized human liver sinusoidal endothelial cells (ciHLSEC)とした。これまでにヒト不死化肝類洞内皮細胞として2種類報告されており、ひとつは疾患患者よりhTERTのみで不死化した細胞、もうひとつはSV40TとhTERTを用いて作成した細胞である。したがって、tsSV40TとhTERTを用いて作成したヒト不死化肝類洞内皮細胞としてciHLSECは世界初の細胞である。現在、ciHLSECから最も細胞分化機能の高いクローンを分取しているところである。

一方、上述のとおり肝不死化細胞の樹立は進行中であるが、それと並行して肝細胞分化の可視化評価ツールの構築および新規肝細胞分化法の検討をおこなった。

成熟肝細胞の代表的な分化マーカーとしてアルブミン遺伝子がある。アルブミン遺伝子は肝細胞特異的に発現することが知られており、したがってその発現には肝細胞分化特異的な機序が存在すると考えられる。そこでヒトアルブミン遺伝子のエンハンサー領域とプロモーター領域のクローニングをおこない、その制御下でmCherryの発現を可能とするプラスミドを構築した。このプラスミドを胎児性腎細胞であるHEK293細胞に導入してもmCherry由来の蛍光は認められなかったが、ヒト肝癌細胞であるHepG2細胞においてはmCherryの強い蛍光が認められた。したがって、本プラスミドを用いることにより、培養を継続しながら肝細胞分化度を非侵襲的に可視化することが可能であると考えられた。

一方、新規肝細胞分化法については、化合物XをFLC5細胞に継続的に細胞に曝露した。その結果、FLC5細胞におけるCYP3A4およびOATP1B1のmRNA発現は非曝露細胞と比較してそれぞれ5倍、9倍に増加した。CYP3A4およびOATP1B1は代表的な薬物代謝酵素・薬物トランスポーターであり、成人肝細胞に強く発現することが知られている。したがって、これらの発現増強は肝細胞分化レベルの亢進を意味すると考えられる。

以上、本研究の結果、ヒト類洞内皮細胞に不死化遺伝子を導入し、独自の新規ヒト不死化類洞内皮細胞を樹立することに成功した。一方、ヒト不死化肝細胞については現在まだ推進中であるが、この過程においてヒト肝がん由来細胞の分化形質を大きく向上させる手法、および肝細胞分化度を非侵襲的に可視化するツールを構築した。し

たがって今後は、この分化させたヒト肝がん由来細胞と上述のヒト不死化類洞内皮細胞を共培養し、その分化を簡便かつ効率的にモニターして培養法の改良をおこなうことにより、新たな *in vitro* ヒト肝モデルを確立することが可能であると期待される。このモデルを用いることにより新たな薬物動態・毒性研究が可能となるばかりでなく、ヒト肝分化・病態の機序解明および肝疾患治療標的の探索なども推進できると期待される。また、本研究の検討結果を踏まえて今後さらにヒト不死化肝細胞およびヒト不死化星細胞の構築に取り組み、当初目的であった三種ヒト肝温度感受性不死化細胞による三次元培養法を応用した *in vitro* ヒト肝臓モデルである HML の確立を目指す予定である。

5．主な発表論文等

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

千葉 寛 (CHIBA KAN)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：40159033

(2)研究分担者

降幡 知巳 (FURIHATA TOMOMI)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：80401008