

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460088

研究課題名(和文)肝細胞特異的機能発現機構の統合的理解と高度機能維持肝細胞/培養系の構築

研究課題名(英文) Exploration of the mechanism by which regulate hepatocyte specific functions and development of high functional hepatocyte culture system.

研究代表者

中村 和昭 (Nakamura, Kazuaki)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・薬剤治療研究部・室長

研究者番号：80392356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、培養肝細胞の高機能化を目指し、肝機能特異的機能発現機構の解明と高機能肝細胞培養系の検討を行った。ヒト肝癌由来細胞株であるHepG2細胞を用いて、DNAメチル化阻害剤であるゼブラリンによる肝機能亢進とその作用機序を検討した。ゼブラリンはHepG2細胞のシトクロムP450(CYP)遺伝子発現を亢進させた。その作用機序を検討した結果、ゼブラリンはDNMT阻害とともに二重鎖RNA依存性プロテインキナーゼ(PKR)発現抑制を介してCYP発現を亢進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we explored the mechanism by which regulate hepatocyte specific functions and developed high functional hepatocyte culture system. We found that inhibitor of DNA methyltransferase, zebularine, upregulates the expression of CYP genes in HepG2 cells through inhibiting DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and double-stranded RNA dependent protein kinase (PKR). Whereas inhibition of either DNMT1 or PKR slightly upregulates CYP gene expression, combined inhibition of both DNMT1 and PKR markedly upregulates CYP gene expression. Furthermore, HepG2 cells treated with zebularine were more sensitive than control HepG2 cells to drug toxicity. Taken together, our results show that combined inhibition of DNMT1 and PKR in HepG2 cells leads to effective upregulation of expression of CYP genes, which is a novel mechanism, and also suggest that HepG2 cells treated with zebularine and thus having upregulated CYP gene expression may be useful for evaluating drug toxicity in vitro.

研究分野：実験薬理学・細胞生物学

キーワード：肝細胞培養系 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

肝臓は体内における最大の臓器であり、生命維持に必須である代謝、解毒、胆汁の分泌、血清蛋白質の産生など多様な機能を担っている。したがって、肝機能発現・制御機構の理解は生体恒常性維持に基づく生命維持の機構を理解する上で極めて重要である。また、体内での薬物の代謝は主に肝細胞の薬物代謝機能に依存しており、創薬研究や薬物動態学においても肝機能発現に関する検討は極めて重要な研究課題である。他の臓器・細胞を対象とした研究と同様に、肝細胞/肝機能の研究においても培養系での検討が有効であると考えられるが、肝細胞は単離・培養により肝特異的機能が急速に減衰してしまい、初代培養系において肝機能を維持することは難しい。また、一般的に肝細胞株は肝特異的機能を有してはいるものの、その肝機能は著しく低い。したがって、培養系における肝細胞/肝機能に関する研究は他の組織・細胞に比べ極めて困難である。このような肝細胞の性質から、ヒト iPS 細胞から肝細胞を分化させ、あるいは繊維芽細胞から肝細胞を直接誘導し、毒性評価系開発や再生医療へ応用する試みが行われている。このことは、ロット間差が少なく、肝機能を高いレベルで維持する培養系あるいは肝細胞の作製が再生医療や創薬研究においてニーズの高い研究対象であることを示している。

培養過程における肝細胞の機能低下は組織分散・細胞単離による組織形態の崩壊と細胞間コミュニケーションの消失が原因と考えられている。培養系において肝機能を維持する試みとして、これまでにマトリゲルによるサンドイッチ培養法や細胞塊を形成させるなどの組織構造を模倣するような三次元培養系が検討されてきた。研究代表者もこれまでに肝機能亢進の為に三次元培養法の検討を行い、新規の三次元培養法によって肝細胞株 HepG2 細胞およびヒト初代培養肝細胞のアルブミン産生、薬物代謝酵素発現といった肝細胞機能の培養系における亢進を示してきた^{1,2)}。三次元培養法における肝機能の亢進は、生体内における肝細胞分化・肝機能発現の分子機構を考える上でも極めて興味深い現象である。しかし、これら三次元培養法は従来の単層培養に比べ初代培養肝細胞の肝機能を維持し、また肝細胞株の肝機能を亢進させるものの、生体の肝細胞と比較してその肝機能は低いと言わざるを得ない。一方で、肝細胞の初代培養系における急速な肝機能の低下および三次元培養による肝機能維

持・亢進の分子的機序は十分に検討されていない。これまでに研究代表者は、肝細胞初代培養系において、肝特異的転写因子(C/EBP、HNF4)の発現が急速に減少すること、また三次元培養系では肝機能の亢進に先立ち、肝特異的転写因子の発現が上昇することを見出してきた²⁾。また、C/EBP、HNF4 および構成的アンドロスタン受容体(CAR)をHepG2細胞へ導入すると薬物代謝酵素であるCYP2B6発現が惹起されることから³⁾、肝細胞に発現する複数の転写因子の発現低下が肝細胞初代培養系および肝細胞株における肝機能低下に関与していると考えられる。また、三次元培養による細胞塊の形成により肝機能が亢進することから、細胞表面因子を介した肝細胞間コミュニケーションが肝機能発現に重要であると考えられるが、これらの分子的機序についても明らかになっていない。

2. 研究の目的

培養系における肝細胞/肝機能の検討は、肝機能低下の為に、生体機能の解析に適しているとは言い難い。従って、培養系における肝細胞の機能維持の観点から、肝細胞の肝特異的機能獲得の分子機序を検討し、培養系における肝機能低下の分子機構を解明することは重要である。研究代表者はこれまでの検討から培養系における肝機能低下の機序として、1)細胞単離による三次元構造の崩壊と細胞間コミュニケーションの消失、2)肝特異的転写因子の発現低下、3)DNAメチル化による肝機能遺伝子の発現抑制、の可能性を考えてきた。したがって、本研究では肝細胞内在性機序としての転写因子発現制御・DNAメチル化による肝特異的遺伝子発現制御機構を解明し、肝機能発現に対する分子機序を統合的に理解し、得られた知見をもとに肝細胞研究、創薬研究および再生医療研究に有用と考えられる高度機能維持肝細胞/培養系の構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) 肝特異的転写因子等の肝機能遺伝子発現への関与の検討

多くの組織・細胞では、細胞特異的転写因子の下流において細胞特異的遺伝子発現が制御され、細胞分化あるいは細胞特異的機能を獲得する。本研究では転写因子等による肝特異的遺伝子発現制御を考え、以下の検討を行った。

初代培養肝細胞の機能発現を制御する遺伝子の探索

ヒト新鮮初代肝細胞培養過程における遺伝子発現変動をマイクロアレイにて検討し、肝機能低下の原因となるような遺伝子変動を検討し、肝機能発現を制御する転写因子等を探索する。

肝機能制御に関わる遺伝子の同定

上記1. で得られた候補遺伝子を HepG2 への導入により、薬物代謝酵素や薬物トランスポーター等の遺伝子発現上昇を指標とし、肝機能を亢進させる遺伝子を同定する。

(2) DNA メチル化による肝特異的遺伝子発現調節の検討

DNA のメチル化は遺伝子発現調節に重要である。本研究では、DNA メチル化による肝機能発現制御の可能性を考え、以下の検討を行う。

培養肝細胞の DNA メチル化変動の解析

肝細胞培養過程におけるメチル化の変動をマイクロアレイにて検討し、肝機能低下への DNA メチル化の関与を検討する。

DNA メチル化阻害による培養肝細胞の肝機能の検討

DNA メチル化阻害剤を用いて初代肝細胞培養および HepG2 細胞の培養を行い、薬物代謝酵素や薬物トランスポーター等の遺伝子発現上昇を指標として DNA メチル化の肝機能発現への関与について検討を行う。

DNA methyltransferase (DNMT) ノックダウンによる肝機能の検討

初代培養肝細胞および細胞株において DNMT をノックダウンすることにより、培養過程における肝機能を検討し、DNA のメチル化と肝機能の関連について明らかにする。

4. 研究成果

(1) 肝特異的転写因子等の肝機能遺伝子発現への関与の検討

初代培養肝細胞の機能発現を制御する遺伝子の探索

ヒト初代培養肝細胞の培養過程における遺伝子発現変動を検討し、25 の転写因子発現が培養に伴い急速に減少することを見出した。これら遺伝子発現をリアルタイム PCR にて検討した結果、顕著に発現が減少する転写因子として 11 個を同定した。

DNA メチル化阻害による培養肝細胞の肝機能の検討

上記で見出した転写因子を HepG2 細胞に導入し、CYP 遺伝子発現変動を検討中である。

(2) DNA メチル化による肝特異的遺伝子発現

調節の検討

培養肝細胞の DNA メチル化変動の解析

DNA メチル化阻害による培養肝細胞の肝機能の検討

DNA methyltransferase (DNMT) ノックダウンによる肝機能の検討

ゼブラリンは、ゲノム DNA の脱メチル化を引き起こすシチジン類縁体の DNA メチル化阻害剤である。本研究では、ヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞を用いて、ゼブラリンによる HepG2 細胞におけるシトクロム P450 (CYP) 遺伝子発現亢進とその作用機序を検討した。ゼブラリン処理による DNA メチル化動態を検討した結果、HepG2 細胞の DNA メチル化に対するゼブラリンの作用はほとんど認められなかった。

一方、培地へのゼブラリン添加は、HepG2 細胞の CYP 遺伝子発現を亢進させた。ゼブラリンは DNA メチル基転移酵素 (DNMT) を抑制することから、ゼブラリンによる CYP 遺伝子発現亢進と DNMT 阻害との関連を検討した。HepG2 細胞において siRNA を用いた DNMT1 発現抑制による CYP 遺伝子発現変動を検討した結果、CYP 遺伝子発現はゼブラリン添加時に比べ低かった。我々はこれまでの検討により、ゼブラリンが HepG2 細胞において double stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) を抑制することを見出している。そこで、HepG2 細胞において siRNA あるいは阻害剤を用いた PKR の抑制による CYP 遺伝子発現変動を検討した結果、CYP 遺伝子発現はゼブラリン添加時に比べ低かった。一方、DNMT1 と PKR を同時に抑制した場合、ゼブラリン添加時と同程度の CYP 遺伝子発現亢進を認めた。これらの結果から、ゼブラリンは DNMT1 および PKR の両者を阻害することによって、CYP 遺伝子発現を亢進していると考えられた。HepG2 細胞は肝機能を有しているものの、その肝機能は著しく低いことが知られている。一方で、HepG2 細胞は汎用性の高い培養細胞として多くの研究者に使用されている。したがって、ゼブラリンによる CYP 発現亢進機序の解明は、HepG2 細胞の機能亢進を誘導する新たな遺伝子発現制御機構の解明につながると考えられ、HepG2 細胞の毒性研究等への応用に可能性が広がるものと期待される。

< 引用文献 >

Nakamura K, Mizutani R, Sanbe A, Enosawa S, Kasahara M, Nakagawa A, Ejiri Y, Murayama N, Miyamoto Y, Torii T, Kusakawa S, Yamauchi Y, Fukuda M, Yamazaki H, Tanoue

A. Evaluation of drug toxicity with hepatocytes cultured in a micro-space cell culture system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2011 111, 78-84.

Nakamura K, Kato N, Aizawa K, Mizutani R, Yamauchi J, Tanoue A. Expression of albumin and cytochrome P450 enzymes in HepG2 cells cultured with a nanotechnology-based culture plate with microfabricated scaffold. *Journal of Toxicological Science*. 2011 36, 625-633.

Benet M, Lahoz A, Guzmán C, Castell JV, Jover R. CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBPalpha) and hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) synergistically cooperate with constitutive androstane receptor to transactivate the human cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) gene: application to the development of a metabolically competent human hepatic cell model. *J Biol Chem*. 2010 285, 28457-71.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Nakamura K, Nakabayashi K, Kyaw Htet Aung, Aizawa K, Hori N, Yamauchi J, Hata K, Tanoue A. DNA methyltransferase inhibitor zebularine induces human cholangiocarcinoma cell death through alteration of DNA methylation status. *PLoS ONE*, 査読有, 2015, 10(3): e0120545. doi:10.1371/journal.pone.0120545.

Suemizu H, Nakamura K, Kawai K, Higuchi Y, Kasahara M, Fujimoto J, Tanoue A, Nakamura M. Hepatocytes buried in the cirrhotic livers of biliary atresia patients proliferate and function in the liver of uPA-NOG mice. *Liver Transplantation*, 査読有, 2014, 20, 1127-37.

Nakamura K, Aizawa K, Yamauchi J, Tanoue A. Hyperforin inhibits cell growth and differentiation in mouse embryonic stem cells. *Cell Proliferation*, 査読有, 2013 46, 529-537.

Nakamura K, Aizawa K, Nakabayashi K, Kato N, Yamauchi J, Hata K, Tanoue A. DNA methyltransferase inhibitor zebularine inhibits human hepatic carcinoma cells proliferation and induces apoptosis. *PLOS*

ONE, 査読有, 2013 8, e54036.

〔学会発表〕(計6件)

中村和昭、相澤和子、Kyaw Htet Aung, 田上昭人、DNAメチル化阻害剤ゼブラリンによるHepG2細胞のシトクロムP450遺伝子発現亢進、第42回日本毒性学会学術年会(2015、金沢)

中村和昭、中林一彦、相澤和子、Kyaw Htet Aung、秦健一郎、田上昭人、DNAメチル化阻害剤ゼブラリンの抗胆管癌作用の検討、日本組織培養学会第88回大会(2015、広島)

中村和昭、中林一彦、Kyaw Htet Aung、秦健一郎、田上昭人、DNAメチル化阻害剤ゼブラリンのヒト胆管癌細胞に対する抗腫瘍活性、第37回日本分子生物学会(2014、横浜)

Nakamura K, Aizawa K, Nakabayashi K, Hori N, Kyaw Htet Aung, Hata K, Tanoue A. Zebularine enhances expression of cytochrome P450 genes and induces cell death in HepG2 cells. The 87th Annual Meeting (Tokyo 2014), Japanese Tissue Culture Association (2014、東京)

中村和昭、中林一彦、秦健一郎、田上昭人、DNAメチル化阻害剤ゼブラリンのヒト肝細胞癌に対する抗腫瘍活性、第36回日本分子生物学会年会(2013、神戸)

中村和昭、中林一彦、秦健一郎、田上昭人、DNAメチル化阻害剤ゼブラリンによるヒト肝細胞癌に対する細胞毒性、第40回日本毒性学会学術年会(2013、幕張)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 和昭 (NAKAMURA, Kazuaki)

国立成育医療研究センター研究所・薬剤治療研究部実験薬理研究・室長

研究者番号：80392356

(2)研究協力者

Kyaw Htet Aung (Kyaw Htet Aung)

相澤 和子 (AIZAWA, Kazuko)