

試験管内薬物代謝試験の適合を目指した
新規キメラタンパク質の発現と検証

Expression and evaluation of new
chimera protein for drug metabolic assay

2016年 2月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

ナノ理工学専攻 ナノバイオ材料研究

西田 有紀

Yuuki NISHIDA

第一章 序論

1 節	医薬品開発における薬物代謝試験の役割	4
2 節	薬物代謝におけるシトクロム P450 (CYP) の重要性	5
3 節	薬物代謝研究における肝細胞培養の有用性と問題点	10
4 節	細胞外環境を模倣した肝細胞培養法と新しいコンセプトの培養方法	12
	参考文献	23

第二章 キメラタンパク質 CBD-CAS の作成

1 節	背景	32
2 節	大腸菌による CBD-CAS の発現	34
3 節	CBD-CAS の精製とコラーゲン結合活性の評価	36
4 節	考察	38
5 節	実験方法	39
6 節	まとめ	41
	参考文献	42

第三章 二次元培養における CBD-CAS による肝細胞の機能化

1 節	背景	46
2 節	CBD-CAS 肝細胞の増殖に与える影響	47
3 節	CBD-CAS が肝細胞の機能に与える影響	48
4 節	CBD-CAS がインテグリン-ナノクラスター形成とシグナル伝達に与える	

影響	52
5節 考察	56
6節 実験方法	58
7節 まとめ	60
参考文献	61

第四章 CBD-CAS の3次元培養における肝細胞の機能化

1節 背景	64
2節 3次元培養における CBD-CAS が肝細胞に与える影響	65
3節 3次元培養における CBD-CAS が薬物代謝遺伝子発現に与える影響	71
4節 考察	73
5節 実験方法	74
6節 まとめ	75
参考文献	76

第五章 総括

1節 結論	80
2節 今後の課題研究・将来展望	81
謝辞	83
研究業績	84

略語一覧

ECM	Extracellular matrix	細胞外マトリクス
CBD	Cell binding domain	コラーゲン接着ドメイン
CAS	Cell attachment site	細胞付着領域
FN	Fibronectin	フィブロネクチン
HepG2	a human liver carcinoma cell line	ヒト肝癌由来細胞株
Matrigel	a reconstituted basement membrane extract of Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) murine sarcoma	マトリゲル基底膜マトリクス
CYP	CytochromeP450	シトクロム P450
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule	細胞間接着分子
VCAM	Vascular cell adhesion molecule	血管細胞接着分子
EGF	Epidermal growth factor	上皮増殖因子
PDGF	Platelet-derived growth factor	血小板由来増殖因子
NHF4 α	Hepatocyte Nuclear Factor 4	肝細胞核因子 4 α
c/EBP α	CCAAT-enhancer-binding proteins	CCAAT/エンハンサー結合タンパク質

第一章 序論

第 1 節：医薬品開発における薬物代謝試験の役割

薬物は生体内で薬物代謝に関与する酵素群によって化学構造が変換され薬物代謝産物を生成する。シトクロム P450 を含むこれら酵素群は肝や他臓器に分布しており、生体内物質であるステロイド、胆汁酸、脂肪酸などの合成、分解反応、体内に取り込まれた薬物や異物を代謝する(1)。

薬物代謝反応は大きく二つに分けられ、第 I 相反応は酸化反応、還元反応、加水分解反応、第 II 相反応は抱合である。薬物代謝に関与する酵素群中にシトクロム P450(CYP)があるが、薬物代謝反応の約 80%は、この CYP による酸化、還元反応である。第 I 相反応では水酸基、アミノ基、カルボキシ基などの官能基が生成する。薬物分子の極性化により作用部位への親和性が減り、排出されやすくなる。第 II 相反応は、グルクロン酸、アミノ酸、硫酸、グルタチオンなど置換基が導入される抱合反応である。第 II 相反応は第 I 相反応よりも分子の極性が高くなり、さらに薬物の排出が促進されるようになる。このように、薬物代謝は薬物の化学構造を変化させ、薬理作用や排出に大きく影響を与える。薬物代謝は同一薬剤でも異なる薬物代謝経路を持つことは多く、その代謝経路は複雑であるため予期せぬ副作用や毒作用を未然に防ぐために、薬物代謝試験を行なう事で代謝経路をモニタリングすることは薬理作用と安全性を把握するために必要である。

第2節：薬物代謝に関与するシトクロム P450 (CYP) の重要性

薬物代謝試験で大きく占めるのは CYP を対象とした試験である。CYP とは、肝細胞の小胞体に局在しており、バクテリアからヒトまで幅広く存在する酵素である。CYP は、450nm の吸収極大を示す事と可逆的に酸化還元反応を行うシトクロムの性質を持つことから P450(cytochrome P450)と命名され、CYP の略号が用いられるようになった(2)。分子量約 50,000 で、鉄が活性中心のヘム酵素である (3)。基質特異性が低いことが特徴であり、ターゲットとなる薬物は多い。この特異性の低さは基質中の部分構造を認識し、基質結合部位に対する結合性による(4)。CYP は、一次構造によるスーパーファミリーを形成している。一般的に分子種のアミノ酸配列の相同性が 40%を超える分子種を群とし数字で示し、55%を超えるグループを亜群としてアルファベット順に記し、亜群内の複数の分子種は数字を入れる (ex. CYP1A1)。ほ乳動物の薬物代謝関連 CYP は 1～4 群に存在する。図 1-1 に哺乳動物における P450 スーパーファミリーの系統樹を示す(5)。

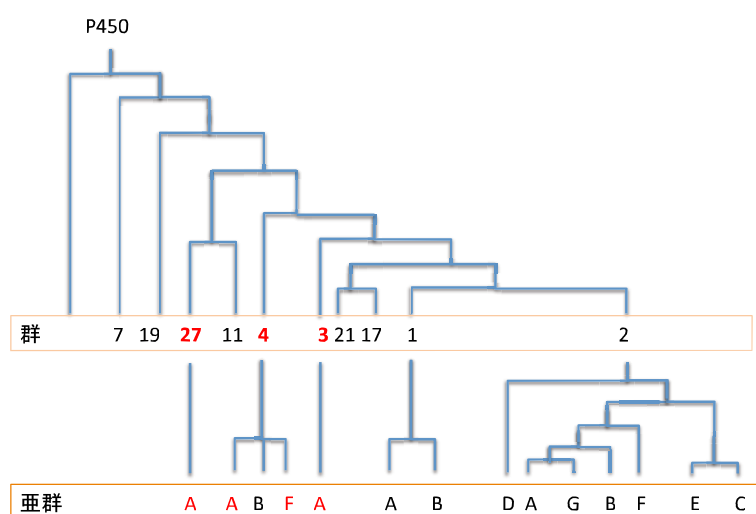


図 1-1：ほ乳動物における CYP スーパーファミリー遺伝子系統樹

ヒトの P450 分子種と代謝される薬物と反応を表 1-1 に示す(1)。1 群には、A,B 二つの群がある。ヒトにおいては、CYP1A1,CYP1A2,CYP1B1 がある。癌原物質の代謝的活性化に関連が深く、癌原性多環式芳香族炭化水素、マイコトキシンの酸化、芳香族アミン、複素環式アミンの窒素原子の水酸化などが代表的である。ヒトと実験動物の基質特異性も類似している。

2 群には、最も多くの分子種が存在し、ヒトでは、16 分子種ある。その中で薬物代謝に関与する CYP の主なものは、CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2J2 である。CYP2A6 は、ニコチン代謝や、N-アルキルニトロソアミンの活性化に関与する。2B 亜群はフェノバルビタールで発現が誘導される。実験動物において基質特異性の広さと多種の薬物に対して強い代謝活性を示す。CYP2B6 は、7-ベンジルオキシレゾルフィンの代謝活性をもつ。2C 亜群は、最も多くの分子種を有し、CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19 は、基質特異性が重複している。肝に存在する分子種の総量の 25%を占める。2D 亜群は、ヒトとラットで遺伝的多形がある。デブリソキン、スパルテイン等、塩基性窒素を有する薬物酸化の触媒をする。抗不正脈薬、β 遮断薬や抗うつ薬など多くの医薬品の代謝に関与している。2E 亜群は、エタノール、アセトンによって誘導される。アルコール多量摂取によって CYP2E1 が関与する。ほかにベンゼン、アニリン、ハロゲン化物、アセトフェノンなどを代謝する。

3 群は、A のみで亜群が存在する。ヒトでは、CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 の 3 つである。医薬品代謝の約 50%に関与している。ステロイド誘導體、グルココルチコイド及びマクロライド系抗生物質などで誘導される。CYP3A4 は、

肝での含有量は、全 P450 の約 30%、消化管では約 70%を占める。分子サイズの大きな薬物を代謝でき、同一薬物からの複数の代謝産物を生成する事も多い。CYP3A5 は、腎に存在するが、約 20%の割合で、肝にも確認される。CYP3A7 は、胎児肝の主要な分子種である。全 P450 の 50%を占めるが、成人では約 5%存在する。

4 群は、A, B 群が存在し、抗高脂血症薬 クロフィブラートで誘導される。脂肪酸、エイコサノイド類の ω 酸化を行う。

表 1-1：ヒトの P450 分子種と代謝される薬物と反応

分子種	薬物	反応
CYP1A1	環境化学物質等	ベンゾ[α]ピレン
CYP1A2	解熱鎮痛薬 抗不整脈薬 β 遮断薬 キサンチン誘導体 抗精神病薬 抗がん薬 その他 環境化学物質など	アセトアミノフェン メキシレチン プロプラノール カフェイン、テオフィリン オランザピン フルタミド タンパク質熱分解物 (Glu-P-1, IQ, MeIQ) アフラトキシン 芳香族アミン
CYP2A6	抗がん薬 その他	テガフル クマリン ニコチン
CYP2B6	抗がん薬 麻酔薬	シクロホスファミド ケタミン
CYP2C8	抗がん薬 糖尿病治療薬 抗不安・催眠薬	タキソール、パクリタキセル ロジグリタゾン ゾピクロン
CYP2C9	NSAIDs	ジクロフェナク イブプロフェン メロキシカム

	<p>糖尿病治療薬</p> <p>抗てんかん薬 抗凝固薬</p> <p>その他</p>	<p>トリブタミド グリベンクラミド</p> <p>フェニトイン (S)-ワルファリン</p> <p>ヘキソバルビタール トラセミド ロサルタン</p>	<p><i>p</i>-メチル水酸化 ヒドロキシメチル 化</p> <p>4-水酸化 7-水酸化</p> <p>3' -水酸化 メチル基水酸化 ω- 水酸化</p>
CYP2C19	<p>抗うつ薬</p> <p>抗不安薬 プロトンポンプ阻害 薬</p> <p>血小板凝集抑制薬 その他</p>	<p>アミノトリプチリン、ク ロミプラミン</p> <p>ジアゼパム オメプラゾール、ランソ プラゾール</p> <p>クロピドグレル プログアニル (S)-メトフェニトイン</p>	<p><i>N</i>-脱メチル</p> <p><i>N</i>-脱メチル 5-水酸化</p> <p>チオフェン環酸化 酸化、環化 4' -水酸化</p>
CYP2D6	<p>抗がん薬 抗不整脈薬</p> <p>抗うつ薬</p> <p>統合失調症治療薬</p> <p>β 遮断薬</p> <p>その他</p>	<p>タモキシフェン エンカイニド フロパフェノン</p> <p>アミトリプチリン フルボキサミン イミプラミン</p> <p>チオリダジン ハロペリドール</p> <p>ブフラロール プロプラノール メトプロロール</p> <p>デブリソキン デキストロメトルファン プロメタジン コデイン</p>	<p>4-水酸化 <i>O</i>-脱メチル 5-水酸化</p> <p>10-水酸化 <i>O</i>-脱メチル 2-水酸化</p> <p><i>S</i>-酸化 <i>N</i>-脱アルキル</p> <p>1-水酸化 4-水酸化 α-水酸化</p> <p>4-水酸化 <i>O</i>-脱メチル 水酸化 <i>O</i>-脱メチル</p>
CYP2E1	<p>筋弛緩薬 全身麻酔薬</p> <p>その他</p> <p>環境化学物質など</p>	<p>クロルゾキサゾン エンフルラン ハロタン アセトアミノフェン アセトン エタノール <i>o</i>-, <i>m</i>-, <i>p</i>-, キシレン トルエン</p>	<p>6-水酸化 脱フッ素 酸化 キノンイミン生成 1-水酸化 酸化 メチル基水酸化 メチル基水酸化</p>

		ベンゼン	酸化
CYP3A4	抗不整脈薬	アミオダロン	<i>N</i> -脱エチル
	鎮静薬	ミダゾラム トリアゾラム	1'-水酸化 α -水酸化
	抗てんかん薬	カルバマゼピン ゾニサミド	エポキシ化 還元的脱アミノ
	抗菌薬	エリスロマイシン ダブソン	<i>N</i> -脱メチル <i>N</i> -水酸化
	Ca チャネル遮断薬	ジルチアゼム ニフェジピン	<i>N</i> -脱メチル 酸化
	制吐薬	グラニセトロン オンダンセトロン	9-水酸化 水酸化、 <i>N</i> -脱メチル
	免疫抑制薬	シクロスポリン A	<i>N</i> -脱メチル、メチル 基水酸化
	抗がん薬	タクロリムス タモキシフェン	0-脱メチル、 <i>C</i> -酸化 <i>N</i> -脱メチル、 α -水 酸化
		シクロホスファミド パクリタキセル	4-水酸化、 <i>N</i> -脱アル キル 3'-水酸化
	HIV プロテアーゼ阻害 薬	インジナビル	酸化
	HMG-CoA 還元酵素阻害 薬	アトルバスタチン	<i>C</i> -酸化
	その他	テルフェナジン	<i>C</i> -酸化、 <i>N</i> -脱アルキ ル
		デキストロメトルファン コデイン テストステロン 17 α -エチニルエストラ ジオール マイコトキシン類 (アフ ラトキシン B ₁ 、ステリグ マトシスチン)	<i>N</i> -脱メチル <i>N</i> -脱メチル 6 β -水酸化 1- 水酸化 2- エポキシ化

CYPによる薬物代謝反応は、基質特異性の低い事から薬物によっては単一経路を持つものと複数経路を持つものが存在し、同時に異なる薬物が代謝されることにより様々な代謝経路パターンが生まれる。代謝経路のパターンは人種差や性差、年齢差でも異なるために創薬分野ではより多くの薬物代謝試験を行ない薬物代謝経路を把握する必要性がある。

第3節：薬物代謝研究における肝細胞培養の有用性と問題点

薬物代謝研究は、*in vivo* と *in vitro* に大別される。表 1-2 に薬物代謝手法の比較を示す。*in vivo* 試験では薬剤投与から吸収、分布、排出までの全代謝反応の把握、特に前臨床段階では薬効の持続性や強度を調べることができる。しかし種差、すなわち実験動物とヒトとの代謝の違いに起因する薬物代謝の違いが大きな問題になっている。薬物代謝の種差には大きく3つの原因がある。1. 種特異的に異なる酵素が発現している。2. 同じ酵素でも種によって発現量や誘導のされ方が異なる。3. 基質特異性が異なる。例えば、CYP3A4 はヒトにおいてはリファンピシンに強く誘導されるが、マウスの CYP3A はわずかしか誘導されず、ラットでは誘導されない。一方、プレグレノロン-16 α -カルボニトリルにラットの CYP3A 分子種は強く誘導されるが、ヒトの CYP3A4 は誘導されない。これらの原因によって実験動物の結果からヒトの薬物代謝を予測することは困難である。

In vitro 試験では肝細胞を用いることが多い。(6)。肝細胞を用いる長所はヒトの薬物代謝予測が可能な事、代謝試験のハイスループット化が行なえる事で

ある。肝細胞には初代肝細胞と肝細胞株がある。初代肝細胞は、肝臓から単離された肝細胞のことである。ヒト特有の CYP の発現を有しているため薬物代謝試験に良く用いられる。しかし、ドナー間差（個人差）が大きいためデータにばらつきが生じる。初代肝細胞は肝細胞本来の機能を保持したまま長期培養することは難しく、本来の肝機能がすみやかに欠失、減少する(7)。肝細胞株とは無限増殖能をもつ樹立肝細胞である。肝細胞株は培養が容易であり初代肝細胞とほぼ同等のヒト特有の CYP もある程度備えているため簡単な薬物代謝試験には使用可能である。しかし、CYP の発現を含めた肝機能は非常に低い(8-10)。したがって、肝細胞株をそのまま薬物代謝試験に用いることは出来ない。




表 1-2：薬物代謝試験手法の比較

<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
<p>長所 薬効の持続性・強度の把握 薬物代謝の全体像が把握できる</p> <p>短所 動物種とヒトは代謝が異なる</p>	<p>長所 ヒト由来材料が用いられるためヒトの薬物代謝予測ができる 試験のハイスループットが可能</p> <p>短所 ドナー間差が生じやすい 細胞機能が低い</p>

第 4 節：細胞外環境を模倣した肝細胞培養法と新しいコンセプトの培養方法

前節で述べたように、肝細胞の機能を向上させることは薬物代謝試験において非常に重要である。ヒト肝細胞の機能を向上させる試みは以前より多数研究されている。その中でマトリゲル、スフェロイドやサンドイッチ培養などを用いて生体内の細胞外環境を模倣することにより肝細胞機能が向上することが報告されている(11-15)。表 1-3 に主な細胞外環境を模倣した肝細胞培養法を示す。

表 1-3：主な細胞外環境を模倣した肝細胞培養法

 マトリゲル培養	生体ECMに近い組成による肝細胞機能維持ができる
 スフェロイド培養	細胞集合体による生体に近い構造の構築による細胞-細胞相互作用
 サンドイッチ培養	異種細胞との共培養による生体に近い環境の構築

マトリゲルは、Engelbreth-Holm-Swarm(EHS マウス肉腫)より抽出した基底膜成分である(16)。基底膜とは、上皮細胞の足場となり組織を形成するコラーゲン主体の網目構造組織である。コラーゲンタイプ IV、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチンなどの基底膜成分や様々な増殖因子を含むマトリゲルは生体 ECM に近い組成をもつので肝細胞の機能維持が期待出来る。マトリゲル上では、肝細胞の形状は立方体状で E-カドヘリン、コネキシンによ

る細胞間接着もコラーゲン培養に比較して多い(17)。肝特異的転写因子の発現や肝特異的遺伝子発現のレベルも高く維持されている(6,18)。アルブミン産生やCYPの機能が維持されて、薬剤によるCYPの誘導も高いレベルを維持している(14)。コラーゲンやマトリゲルでの重層化培養や構造化することでECMを改良する研究もなされている(17,19)。

スフェロイドは、細胞を凝集させた細胞集合体のことである。細胞同士の相互作用が緻密になることで機能が向上することが報告されている(19-23)。スフェロイド作成方法には、非接着性培養基に細胞を播種し塊化を促す方法や、ローターで回転させて塊を作成する手法、コラーゲンやキトサン、フィブリンなど細胞接着性材料と細胞を混合し、細管から滴下し塊を作成する手法などがある(24)。スフェロイドの大きさは50～数100 μm など様々であり、細胞の生存率と肝細胞機能はスフェロイドの大きさに依存している(25)。中心部位に培地成分等が浸透しづらく壊死しやすい欠点がある。

サンドイッチ共培養は、コラーゲンやキトサンなどの材料で細胞を挟み重層化することで、異種細胞との共培養による生体に近い環境を構築する(26-29)。主に肝細胞と血管内皮細胞の共培養が多数報告されており、細胞形態の立方体化や、CYP発現の向上、アルブミン産生の向上、肝特異的機能の向上が報告されている。欠点は、サンドイッチ構造を構築するのに時間がかかることや煩雑さなどが挙げられる。

肝細胞機能を向上させる代表的な3つの培養法について述べた。いずれの培養法において、生体を模倣した環境の構築をすることで本来の肝細胞がもつ機

能を再現する事を目的としている。しかし、完全に再現することは未だに実現できていない。肝細胞機能を劇的に上昇させるには生体の模倣に変わる新しいコンセプトが必要である。そこで本研究では肝細胞機能を薬物代謝試験レベルまで上げることを目的とした、肝細胞機能を強制的に活性化させることで、薬物代謝試験に適合可能な肝細胞を培養することができる人工的な培養基という新しいコンセプトでの培養基を考えた。図 1-2 に新しいコンセプトの培養基材の開発の図を示す。



図 1-2 : 新しいコンセプトの培養基材の開発

ヒトを含めた多細胞生物の組織は、基底膜上に細胞が固定されその周囲を ECM に覆われた状態で存在している。ECM の主成分はコラーゲンであり長さ 300 nm,幅 1.5 nm のタンパク質がヘテロ 3 量体を形成し、らせん状構造を取る。他の構成要素として、プロテオグリカン、FN、ラミニンなどである。ECM はランダムなタンパク質集合体ではなく、組織、部位によって選択的に組成変化する(30)。ECM 組成は組織特異的であり、生理的条件によって異なる。表 1-4 に ECM の構成要素を示す。

肝細胞の外環境の最適化のためには、忠実に生体 ECM を模倣した人工 ECM

を構築すれば肝機能は向上する。しかし **ECM** は、構成要素が複雑であるため再現は不可能である。肝細胞機能向上に必要な部分のみ焦点をあてた **ECM** の構築が肝細胞の機能向上を促すと期待できる。

表 1-4 ECM 構成要素

細胞外ECM 主な構成要素	Collagens: コラーゲン Fibronectin: ファイブネクチン Proteoglycans: プロテオグリカン Laminin: ラミニン
ECM構成要素	組織
Agrin	Skeletal muscles
Integrin –binding sialoprotein	Bone
Matrilins	Cartilage, connective tissues
Elastin	Arteries, Connective tissue, lungs,
Fibrinogen	skin, bladder
Fibrillin	Blood
Fibulins	Connective tissues, cardiovascular tissues
Netrins	Basement membranes, blood, arteries
SPARC(osteonectin)	Basement membranes
osteonectin	Bone
Reelin	Bone, kidneys
Tenascins	Brain
Vitronectin	Connective tissue
	Blood

細胞と **ECM** の結合が細胞接着分子を介して活性化し、肝細胞の機能に関与する転写因子発現が上昇すると考えられている(30) インテグリンを介したシグナル伝達は、ラットの肝再生の肝細胞増殖に関与している(31,32)。以上のことから肝細胞の機能向上には細胞と **ECM** との相互作用が重要であると考えられる。その中で **ECM** 構成要素の中で **FN** は細胞のインテグリンを介した肝細胞機能に大きく関わると考えられる。

インテグリンは、**ECM** と結合し細胞骨格や細胞内シグナル伝達、細胞増殖、機能の維持、細胞周期の変化と密接に関与している(33,34)。インテグリンと細胞内シグナル伝達を図 1-3 に示す。インテグリンは **FN** やラミニンと結合し、

細胞内のアダプタータンパク質複合体を活性化する。このシグナルが細胞の機能と密接に関連している。インテグリンの構造は、約 1000 アミノ酸と約 700

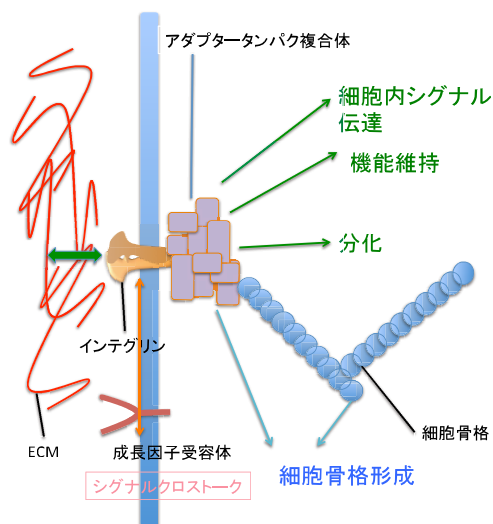


図 1-3 : インテグリンと細胞内シグナル伝達

アミノ酸の α β の二量体の膜タンパク質から構成される。インテグリンは脊椎動物では α サブユニットは 18 種、 β サブユニットは 8 種あり、 α β の組み合わせから 24 種が存在する(35)。表 1-5 にリガンド別に分類したインテグリンを示す。インテグリンは二つの先祖サブグループから進化したとされる。リガンドがラミニンであるものと、FN に結合するものである。そのなかでラミニンに結合するもののなかには、I ドメインを有しコラーゲンへの結合を介している。I ドメインをもつ α サブユニットをもつインテグリンは、白血球や造血細胞に発現し、様々な ICAM や VCAM などの免疫グロブリンスーパーファミリーを含む異種細胞へ接着に関わる。

表 1-5: リガンド別に分類したインテグリン

α	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	V
$\beta 1$	col	col	LN	FN	FN	LN	LN	FN	TN	col	col	FN
α	L	M	X	D	α 6	α V	α 4	E				
$\beta 2$	Leu	Leu	Leu	Leu	$\beta 4$ LN	$\beta 5$ FN	$\beta 7$ FN	Leu				
α	V	IIb				$\beta 6$ FN						
$\beta 3$	FN	FN				$\beta 8$ FN						

col: コラーゲン受容体
 LN: ラミニン受容体
 FN: フィブロネクチン受容体
 Leu: 白血球受容体
 TN: テネイシン受容体

FN は、細胞接着、細胞形態や伸展、細胞骨格構成、発ガン形質転換、食作用、止血、細胞遊走、増殖、分化などにかかわる ECM 構成要素である。図 1-4 に FN の模式図を示す。分子量 250~200KDa、C 末端に一組のジスルフィド結合を持つ巨大糖タンパク質である。繰り返し単位の三つのモジュールに分かれており type I, II, III で構成されている。Type II にはコラーゲン、ゼラチンに結合するモチーフ(36)、type III には、細胞接着に関するモチーフ (RGD,PHSRN 等) が含まれる(37-39)。

近年ラミニンと結合するインテグリンが同定されており(40)、組換えラミニンを用いた幹細胞培養法が確立している(41)。ラミニンと強く結合するインテグリンは $\alpha 6 \beta 1$ に限定されている(35)ために肝細胞機能向上を目的とする上では FN よりも ECM との相互作用は弱いものとする。FN は多くのインテグリンのリガンドとなりうるため、細胞種を選ばず機能を向上させることも期待できる(42, 43)。

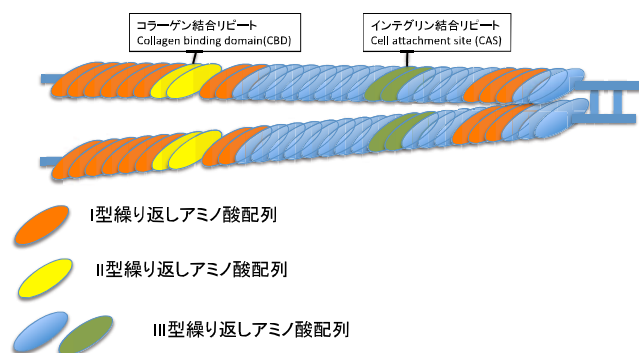


図 1-4 : FN の 2 次構造の模式図

インテグリンの集合体であるインテグリンクラスタは、FN 分子同士の相互作用を促し FN の自己組織化によって FN 繊維化形成を促す(44,45)。図 1-5 に自己組織化による FN の繊維形成を示す。インテグリンリガンドがインテグリンに結合すると細胞表面にインテグリンクラスタが形成される。インテグリンのクラスタリングは、リガンド密度、受容体に対する親和性など ECM の物理的特性に応答する(46)。肝細胞においてインテグリンシグナル伝達経路が機能向上に関わることが知られている (31,32)。従って、インテグリンクラスタ増大が、細胞内シグナル伝達を強化すると考えられる。インテグリンクラスタ化による

ECMでのFN自己繊維形成

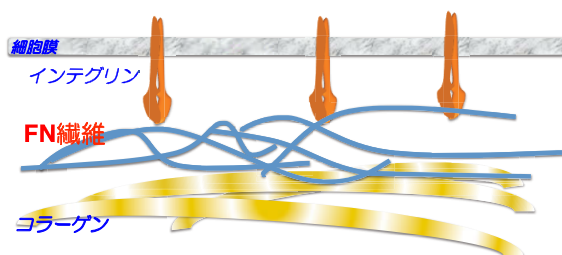


図 1-5: ECM での FN 自己繊維形成

細胞シグナル伝達を図 1-6 に示す。人工 ECM によるインテグリンクラスタの増大をインテグリン・ナノクラスタと名付けた。このインテグリン・ナノクラスタはインテグリンシグナル伝達を増強して肝細胞機能を向上が期待できると考えた。

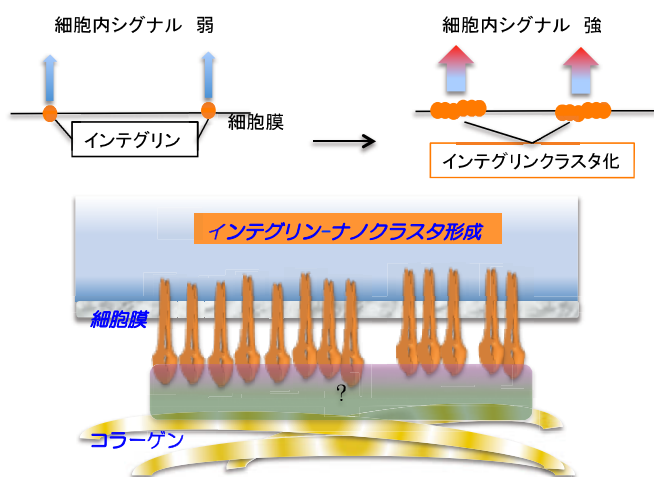


図 1-6: インテグリンクラスタ化による細胞シグナル伝達の強化と

人工 ECM によるインテグリン・ナノクラスタ形成

肝細胞の機能化にはインテグリンを介した細胞内シグナル伝達の強化が有効であると考えられる。そのためにはインテグリン・ナノクラスタを形成させる人工 ECM の構築が重要であると考えられる。インテグリン受容体を多くもつ FN から細胞接着に必要とされる CAS 部位に着目した。CAS 部位は RGD や PHSRN などインテグリンリガンドの集中する箇所である(33,43)。さらに基盤に固相化させるためにコラーゲンに結合する CBD 部位を CAS に融合した。コラーゲンは様々な細胞の足場材料に利用されているので、このタンパク質の CBD を介してコラーゲン足場材料に固定化することができる。FN の CBD 部位と CAS 部位を融

合したキメラタンパク質に CBD-CAS と名付けた。

I 型コラーゲン分子は長さ 300nm、幅 1.5nm 繊維状で平行の束状に配列し、FN は長さ 60~70nm、幅 2nm の 2 量体で繊維化する(29)。CBD-CAS は、タンパク分子量から換算すると約 16 nm となりコラーゲン分子に高密度に結合すると期待できる(47)。CBD 部位のコラーゲン認識部位のペプチド配列は同定されており(48-50)、コラーゲン繊維上で CBD-CAS は効率よく結合することが期待される。CBD-CAS の模式図を図 1-7 に示す。CBD 部分でコラーゲン足場材料に高密度に結合し、CAS を介してインテグリン-ナノクラスタが形成される。より強くインテグリンを介した細胞内シグナル伝達が行なわれ、その結果、肝細胞機能が向上するのではないだろうかとの仮説を立てた。

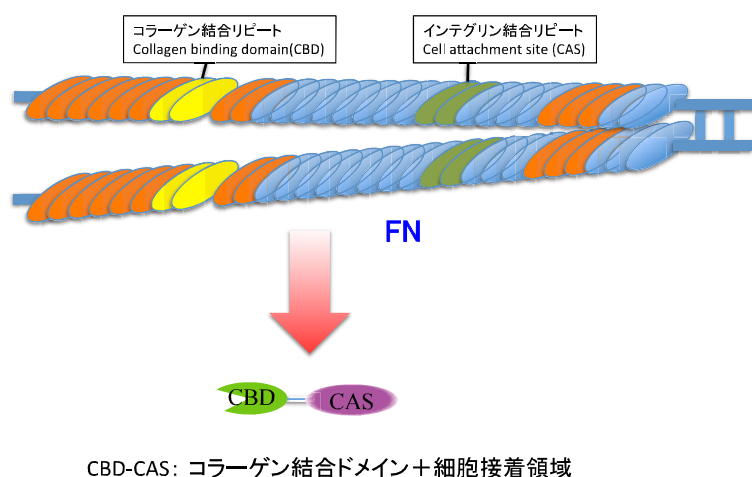


図 1-7 : CBD-CAS の 2 次構造の模式図

2次元培養は通常用いられてきた細胞培養法であるが、生体的環境とは異なる

る条件に細胞をさらすことで肝細胞機能特減少および消失してしまう。その中でも薬物代謝に関与する酵素群の機能減少は顕著である。新薬開発のための薬物スクリーニングで生体肝と異なる薬物代謝試験結果をもたらす恐れがあるために肝細胞機能向上を目的とする研究がなされている事は前節までに述べた。肝細胞を3次元培養することが薬物代謝に関与する酵素群の機能向上を含めた肝細胞機能向上に有効であることは、多く報告されている(51,52)。肝細胞とECMの相互作用が3次元になることで生体環境に近づくことから肝細胞機能調節に有効に影響する。図1-8に3次元構造の細胞培養の利点を示す。3次元構造はCBD-CASによるインテグリン-ナノクラスターの形成をより効率的に肝細胞に与え、肝細胞機能を上げるために最良な方法だと考える。

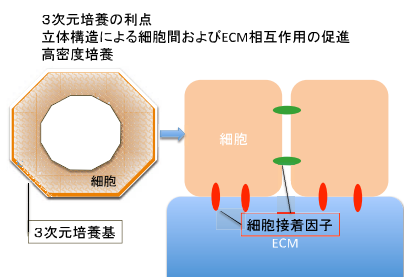


図1-8：3次元構造の細胞培養の利点

以上述べた仮説を立証するために、CBD-CAS 固定化コラーゲンスポンジを用いた培養システムの構築を試みた。キメラタンパク質 CBD-CAS は、FN のインテグリン結合部位(CAS)とコラーゲン結合部位(CBD)を融合したタンパク質である。高密度のインテグリンリガンド配置と CAS の効率的な細胞結合のために CBD-CAS の間にリンカーを挟む形状にした。CBD-CAS 固定化コラーゲンスポ

ンジの利点を3つ挙げる。1、3次元構造による生体環境に近づけたコラーゲン基盤上において肝細胞のインテグリン・ナノクラスタ形成による肝細胞機能向上を目指すことが出来る。2、生理的条件下で固定化でき細胞毒性のリスクが無い。3、手技が簡便である。本論文では、薬物代謝試験への応用を目指して肝細胞の機能を向上させることを目的とした。新規キメラタンパク質 CBD-CAS の有効性を検証し、CBD-CAS 固定化コラーゲンスポンジにおける HepG2 細胞の機能向上について述べる。図 1-9 に CBD-CAS 固定化培養の概要を示す。コラーゲン足場材料に CBD-CAS を固定化し、細胞のインテグリンを介したシグナル伝達を活性化することで肝細胞機能を向上させようとするものである。特に、CBD-CAS によるインテグリン・ナノクラスタ形成によるインテグリンを介したシグナル伝達を増強して肝細胞を活性化しようとするものである。CBD-C

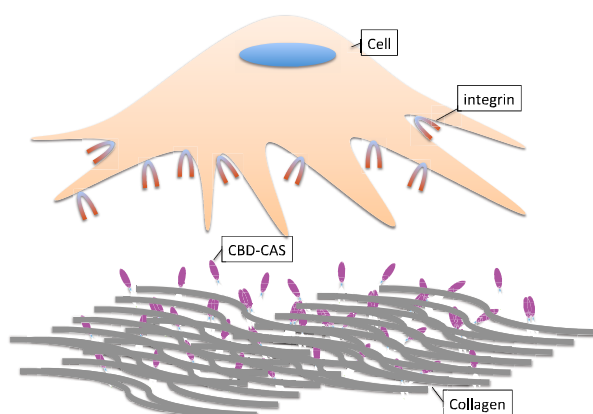


図 1-9 : CBD-CAS 固定化培養

AS でコラーゲン足場材料に固定化することで肝細胞の機能が向上し、薬物代謝試験応用可能かを検証するために、本論文では以下のような構成で論じる。

第2章では CBD-CAS の大腸菌発現システムを用いたキメラタンパク質作製について論じる。第3章では CBD-CAS を2次元コラーゲン足場材料に固定化し肝細胞機能の向上とインテグリンのクラスタ化について論じる。第4章では3次元コラーゲン足場材料を用いて CYP の発現等を検討し、この培養システムが薬物代謝試験に応用しうるかを論じる。また第5章ではこの論文での結論と将来展望について述べる。

参考文献

1. 加藤隆一, 山添康, 横井毅. 薬物代謝学. 第3版, 東京化学同人, 2010, 250p.
2. Omura T. Forty years of cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266(3), 690-698, 1999.
3. Raucy J L., Allen S W. Recent advances in P450 research. *Pharmacogenomics J.* 1(3), 178-186, 2001.
4. Guengerich F P. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 14(6), 611-650, 2001.
5. Nebert D W., Nelson D R., Coon M J., Estabrook R W., Feyereisen R., Fujii-Kuriyama Y., Gonzalez F J., Guengerich F P., Gunsalus I C., Johnson E F., Loper, J C., Sato, R., Waterman, M R., Waxman D J., The

P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, and Recommended Nomenclature. *DNA Cell Biol.* 10(1), 1-14, 1991.

6. Hewitt N J., Bühring K U., Dasenbrock J., Haunschild J., Ladstetter B., Utesch D. Studies comparing in vivo, in vitro metabolism of three pharmaceutical compounds in rat, dog, monkey, and human using cryopreserved hepatocytes, microsomes, and collagen gel immobilized hepatocyte cultures. *Drug Metab. Dispos.* 29(7), 1042-1050, 2001.
7. Rodriguez-Antona C., Donato M T., Boobis A., Edwards R J., Watts P S., Castell J V., Gomez-Lechon M J. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica.* 32, 505-520, 2002.
8. Westerink W M., Schoonen W G. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro.* 21, 1581-1591, 2007.
9. Rodriguez-Antona C., Donato M T., Boobis A., Edwards R J., Watts P S., Castell J V., Gomez-Lechon M J. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica.* 32, 505-520, 2002.

10. Hewitt N J., Hewitt P. Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines. *Xenobiotica*. 34(3), 243-256, 2004.
11. Wu J., Buye' N M., Muino's T F., Borro's S., Favia P., Semino C E. Nanometric self-assembling peptide layers maintain adult hepatocyte phenotype in sandwich cultures. *J. Nanobiotech*. 8(29), 1-15, 2010.
12. Meli L., Jordan E T., Clark D S., Linhardt R J., Dordick J S. Influence of a three-dimensional, microarray environment on human Cell culture in drug screening systems. *Biomaterial*. 33, 9087-9096, 2012.
13. Mooney D., Hansen L., Vacanti J., Langer R., Farmer S., Ingber D. Switching from differentiation to growth in hepatocytes: control by extracellular matrix. *J. Cell Physiol*. 151(3), 497-505, 1992.
14. LeCluyse E., Madan A., Hamilton G., Carroll K., DeHaan R., Parkinson A. Expression and regulation of cytochrome P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes. *J. Biochem. Mol. Toxicol*. 14(4), 177-188, 2000.
15. Cho C S., Seo S J., Park I K., Kim S H., Kim T H., Hoshiba T., Harada I., Akaike T. Galactose-carrying polymers as extracellular matrices for liver tissue engineering. *Biomaterials*. 27(4), 576-585, 2005.
16. Kleinman H K., McGarvey M L., Liotta L A., Robey P G., Tryggvason K. Martin G R. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma, *Biochemistry*. 21(24), 6188-6193, 1982.

17. Hamilton G A., Jolley S L., Gilbert D., Coon D J., Barros S., LeCluyse E L. Regulation of cell morphology and cytochrome P450 expression in human hepatocytes by extracellular matrix and cell-cell interactions. *Cell Tissue Res.* 306(1), 85-99, 2001.
18. Borlak J., Singh P K., Rittelmeyer I. Regulation of Liver Enriched Transcription Factors in Rat Hepatocytes Cultures on Collagen and EHS Sarcoma Matrices. *PLoS One.* 10(4), e0124867, 2015.
19. Landry J., Bernier D., Ouellet R., Goyette R., Marceau N. Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: Histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *J. Cell Biol.* 101, 914-923, 1985.
20. Chang T T., Hughes-Fulford M. Molecular mechanisms underlying the enhanced functions of three-dimensional hepatocyte aggregates. *Biomaterials.* 35(7), 2162-2171, 2014.
21. Gabriel E., Schievenbusch S., Kolossov E., Hengstler J G., Rotshteyn T., Bohlen H., Nierhoff D., Hescheler J., Drobinskaya I. Differentiation and selection of hepatocyte precursors in suspension spheroid culture of transgenic murine embryonic stem cells. *PLoS One.* 7(9), e44912, 2012.
22. Vu L T., Less R R., Rajagopalan P. The promise of organotypic hepatic and gastrointestinal models. *Trends. Biotechnol.* 32(8), 406-413, 2014.

23. 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 micro fabricated scaffold. *J. Toxicol. Sci.* 36(5), 625-633, 2011.
24. Pampaloni F., Reynaud E G., Stelzer E H. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(10), 839-845, 2007.
25. Glicklis R., Merchuk J C., Cohen S. Modeling mass transfer in hepatocyte spheroids via cell viability, spheroid size, and hepatocellular functions. *Biotechnol. Bioeng.* 86(6), 672-680, 2004.
26. Kim Y., Rajagopalan P. 3D hepatic cultures simultaneously maintain primary hepatocyte and liver sinusoidal endothelial cell phenotypes. *PLoS One.* 5(11), e15456, 2010.
27. Takayama G., Taniguchi A., Okano T. Identification of Differentially Expressed Genes in Hepatocyte Endothelial Cell Co-culture System. *Tissue Eng.* 13(1), 159-166, 2007.
28. Kasuya J., Tanishita K. Microporous membrane-based liver tissue engineering for the reconstruction of three-dimensional functional liver tissues in vitro. *Biomatter.* 2(4), 290-295, 2012.

29. Kurosawa Y., Taniguchi A., Okano T. A Novel Method to Examine Hepatocyte Specific Gene Expression in a Functional Co-Culture System, *Tissue Eng.* 11, 1650-1657, 2005.
30. Mouw J K., Ou G., Weaver V. M. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (12), 771-785, 2014.
31. Laurent T., Murase D., Tsukioka S., Matsuura T., Nagamori S., Oda H., A novel human hepatoma cell line, FLC-4, exhibits highly enhanced liver differentiation functions through the three-dimensional cell shape. *J. Cell Physiol.* 227(7), 2898-2906, 2012.
32. Li J W., Wang G P., Fan J Y., Chang C F., Xu C S. Eight path of ERK1/2 signaling pathway regulating hepatocyte proliferation in rat liver regeneration. *J. Genetics.* 90(3), 435-442, 2011.
33. Xu C., Yang Y., Yang J., Chen X., Wang G. Analysis of the role of the integrin pathway in hepatocyte during rat liver regeneration. *Cell & Mol. Biol. Letter.* 17, 274-288, 2011.
34. Harburger D S., Calderwood D A. Integrin signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 159-163, 2009.
35. Legate K R., Wickström S A., Fässler R. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.* 23(4), 397-418, 2009.
36. Hynes R O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110, 673-687, 2002.

37. Ruoslahti E., Hayman E G., Kuusela P., Shively J E., Engvall E. Isolation of a tryptic fragment containing the collagen-binding site of plasma fibronectin. *J. Biol. Chem.* 254(13), 6054-6059, 1979.
38. Pierschbacher M D., Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature.* 309, 30-33, 1984.
39. Pierschbacher M. D., Hayman E G., Ruoslahti E. Location of the cell-attachment site in fibronectin with monoclonal antibodies and proteolytic fragments of the molecule. *Cell.* 26, 259-267, 1981.
40. Aota S., Nomizu M., Yamada K M. The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhance cell-adhesive function. *J. Biol. Chem.* 269, 24756-24761, 1994.
41. Nishiuchi R., Takagi J., Hayashi M., Ido H., Yagi Y., Sanzen N., Tsuji T., Yamada M., Sekiguchi K. Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant alpha3beta1, alpha6beta1, alpha7beta1 and alpha6beta4 integrins. *Matrix Biol.* 25(3), 189-197, 2006.
42. Miyazaki T., Futaki S., Suemori H., Taniguchi Y., Yamada M., Kawasaki M., Hayashi M., Kumagai H., Nakatsuji N., Sekiguchi K., Kawase E. Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 3, 1236, 2012.

43. Pankov R., Yamada K M. Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* 15(115), 3861-3863, 2002.
44. Plow E F., Haas T A., Zhang L., Loftus J., Smith J W. Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* 275(29), 21785-21788, 2000.
45. Wierzbicka-Patynowski I., Schwarzbauer J E. Regulatory role for SRC and phosphatidylinositol 3-kinase in initiation of fibronectin matrix assembly. *J. Biol. Chem.* 277(22), 19703-19708, 2002.
46. Hynes R O. The dynamic dialogue between cells and matrices: implications of fibronectin's elasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96(6), 2588-2590, 1999.
47. Paszek M. J., Boettiger D., Weaver V M., Hammer D A. Integrin clustering is driven by mechanical resistance from the glycocalyx and the substrate. *ProS Comput. Biol.* 5(12), e1000604, 2009.
48. Engel J., Odermatt E., Engel A., Madri J A., Furthmayr H., Rohde H., Timpl R. Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix. *J. Mol. Biol.* 150(1), 97-120, 1981.
49. Erat M C., Slatter D A., Lowe E D., Millard C J., Farndale R W., Campbell I D., Vekonakis I. Identification and structural analysis of type I collagen sites in complex with fibronectin fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 4195-4200, 2009.

50. Erat M C., Linek U S., Pickford A R., Farndale R W., Campbell I D., Vakonakis I. Implication for collagen binding from the crystallographic structure of fibronectin 6FnI1-2FnII7FnI. *J. Biol. Chem.* 285(44), 33764-33770, 2010.
51. Erat M C., Sladek B., Campbell I D., Vakonakis I. Structural analysis of collagen type I interactions with human fibronectin reveals a cooperative binding mode. *J. Biol. Chem.* 288(24), 17441-17450, 2013.
52. Pampaloni F., Stelzer E H., Masotti A. Three-dimensional tissue models for drug discovery and toxicology. *Recent Pat. Biotechnol.* 3(2), 103-117, 2009.
53. Schmeichel K L., Bissell M J. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *J. Cell Sci.* 116 (Pt12): 2377-2388, 2003.

第二章 キメラタンパク質 CBD-CAS の作成

第1節：背景

組織工学の基本的な定義は、細胞と足場構造、そして成長因子の三つの要素によって組織を再生することにある(1)。これは、1993年に Langer と Vacanti によって提唱された概念である。これらの改良するために生体材料研究は非常に重要である。現在 iPS 細胞や ES 細胞を用いた幹細胞からの組織再生が再生医療分野で期待されている (2-5)。様々な組織を人工的に作り上げた生体材料研究の成果が報告されている。細胞培養には成長因子やサイトカインそして ECM が必要である。培地中の成長因子やサイトカインは濃度や細胞内取り込みなどの要因で効果の持続性や有効性が保ちにくい。成長因子やサイトカイン、細胞接着因子の培養基材に固相化することは細胞の機能化に有効的な手法である。固定化させる手法は、化学的、生化学的に行われる。物質と固定化手法を表 2-1 に示す。遺伝子工学的手法によって融合タンパク質はキメラタンパク質と呼ばれ、異なる機能をもたせた複数のタンパク質から構成されている(3-9)。目的タンパク質の遺伝子を遺伝子組換え技術によって原核細胞や真核細胞、無細胞などのタンパク質発現系に導入し作製、精製するために細胞毒性も低く、生理的条件下で固定化などの反応をおこす事が出来るので *in vivo* 条件でも応用できる利点がある。

iPS/ES 細胞など幹細胞の未分化維持培養技術として、関口らはインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ に結合する組換えラミニンを作製した(3)。赤池らは E-カドヘリンと IgG の Fc 領域を融合したメラタンパク質による培養法を確立した(4)。このよう

表：2-1 物質と固定化手法

固定化される物質	固定化手法
VEGF	遺伝子工学的手法 PAA グラフト化ポリエチレンフィルム マイクロパターン
EGF	遺伝子工学的手法 表面修飾：ガラス, PMMA, PDMS ポリエチレン光固定化
BMP	コラーゲン 表面修飾チタン キトサンナノファイバー
FGF	ポリマー・ヘパリン 光固定化
HGF	遺伝子工学的手法
インシュリン	生分解性ポリマー+ コラーゲン, ペプチド表面加水分解 PMMA 表面修飾：ガラス, ポリアクリルアミド
E-カドヘリン	遺伝子工学的手法
ラミニン	遺伝子工学的手法

に、近年ではキメラタンパク質を用いた培養技術が報告されるようになりこの技術は生体材料の機能化に関して優れた技術のひとつとなりつつある。

第2章では、*in vitro* における肝細胞の機能向上を目的とした新規キメラタンパク質 CBD-CAS の構築と発現の検証について述べる。本研究では、肝細胞機能を向上させるためにインテグリンシグナル伝達促進に着目した。インテグリンは、細胞膜上にあり ECM や細胞間接着などの連携を担うと同時に細胞骨格や多くの細胞内シグナル伝達に関わる重要なレセプターである。この中でも RGD

モチーフを認識するインテグリンは、多くの細胞で存在している。インテグリンのリガンドとなる ECM 物質には、コラーゲン、FN、ラミニンがある (10)。FN は多種類のインテグリンを認識し、特に TYPE III の 9 および 10 モジュールは、RGD と PHSRN を含み $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha v \beta 1$, $\alpha 8 \beta 1$, $\alpha \text{IIb} \beta 3$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 6$, $\alpha 3 \beta 1$ を認識する (11)。CBD は FN の TYPE II 領域に存在しコラーゲン、ゼラチンを認識し結合する。CBD によって CAS は、コラーゲン培養基材に固相化できる。つまり、CBD が細胞の足場となり CAS が肝細胞を活性化する。これは上述した 3 つの因子を満たすため CBD-CAS は、肝細胞機能向上に有効であると考ええる。

キメラタンパク質の発現方法には様々な方法が知られている。たとえば、哺乳類の細胞を用いる方法、酵母や大腸菌を用いる方法などである。哺乳類の細胞を用いる方法は比較的複雑で分子量の大きいタンパク質の発現に有効である。また、生理活性に翻訳後の修飾、例えば糖鎖やリン酸化などの修飾が必要な場合に用いられる。大腸菌を用いた発現方法は複雑で分子量の大きいタンパク質の発現や翻訳後の修飾が期待出来ない。しかし、この方法は簡便で大量のタンパク質を短時間に発現させることができる。CBD-CAS は分子量が小さく、翻訳後の修飾は不要なため、大腸菌を用いたタンパク質発現法で発現することとした。

第 2 節：大腸菌による CBD-CAS の発現

ヒト FN の CBD と CAS の発現ベクターを構築した。CBD-CAS では、

FN,TYPE III リピート9および10モジュール部分を用いた。CASのアミノ酸配列は、細胞膜上のインテグリンを認識するRGDとPHSRNを含む(11-16)。CASに可動領域を持たせるためにCBDとCASの間にリンカーを挟んだ。ヒトFNのcDNAからコラーゲン結合ドメイン(CBD)と細胞接着領域(CAS)のcDNA断片をPCR法にて増幅し、pGEX6P-1プラスミドに挿入して、pCBD-CASを構築した。コントロールとしてCBDのみを発現するpCBDを構築した(図2-1)。pGEX6P-1プラスミドはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ

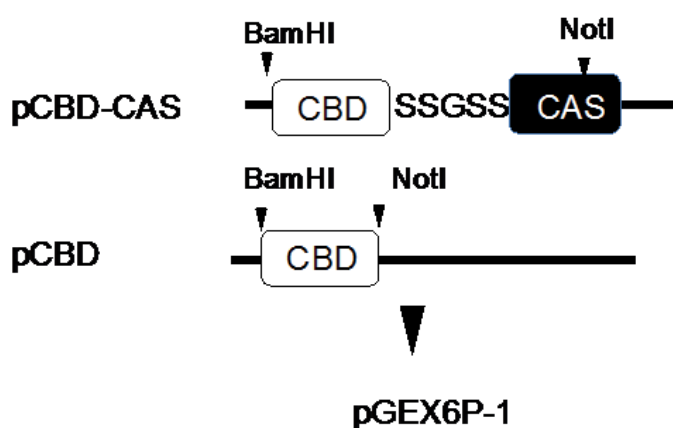


図2-1 : pCBDとpCBD-CASの発現ベクターの構築

(GST)遺伝子の下流に発現タンパク質のcDNAを挿入できるため、発現したりコンビナントタンパク質はN-末端にGSTタグをもことになる。

第3節：CBD-CASの精製とコラーゲン結合活性の評価

CBD-CAS キメラタンパク質を発現させるために、pCBD,pCBD-CASを大腸菌 BL21株に形質転換した。これら構築したタンパク質発現ベクターは、大腸菌を培養後これらリコンビナントタンパク質をグルタチオンセファロース4Bカラムで精製し、PreScission プロテアーゼでGSTタグを切断した（図2-2）。精製し

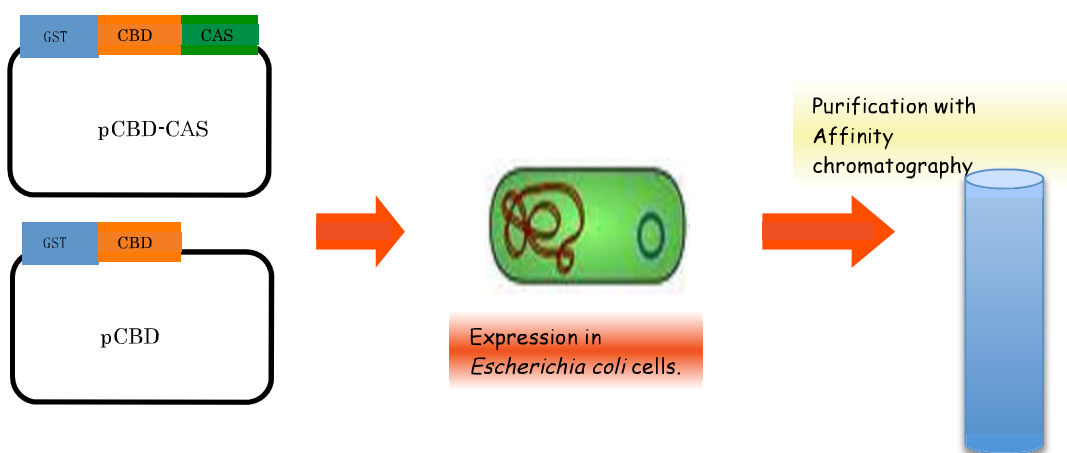


図2-2：リコンビナントタンパク質CBDおよびCBD-CASの発現 pCBDおよびpCBD-CASは、大腸菌 BL21株に形質転換し、アフィニティークロマトグラフィーで精製した。

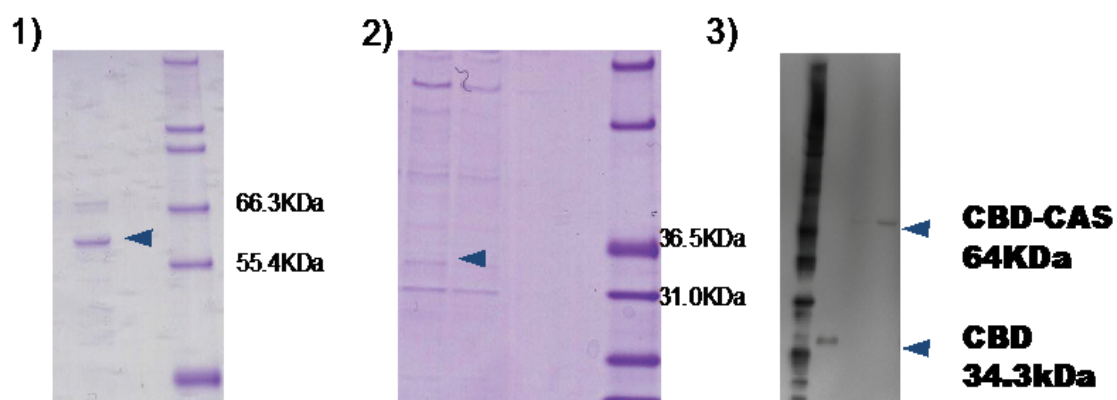


図2-3：リコンビナントタンパク質CBDおよびCBD-CASの精製 pCBDおよびpCBD-CASを大腸菌BL21株に形質転換後、精製したCBDおよびCBD-CASを5-12%アクリルアミドゲルでSDS-PAGEを行い、CBB

染色をした。矢印がそれぞれCBD (B-1))及びCBD-CAS (B-2))を示す。(B-3)は、ウエスタンブロットの結果を示す。精製したCBDおよびCBD-CASは、それぞれ34.3kDa、64kDaであった。

たCBDとCBD-CASのSDS-PAGEとウエスタンブロットの結果を図2-3に示す。これらの結果よりCBDは約34.3kDa、CBD-CASは、約64kDaの分子量であった。これらの分子量は予想される分子量に非常に近いものである。以上の結果から、キメラタンパク質CBDとCBD-CASの発現と精製に成功したと考えられた。

精製したCBD、CBD-CASのI型コラーゲンに対する結合能を評価するために、コラーゲン結合アッセイを行った(図2-4)。I型コラーゲンを固定化した培養基に

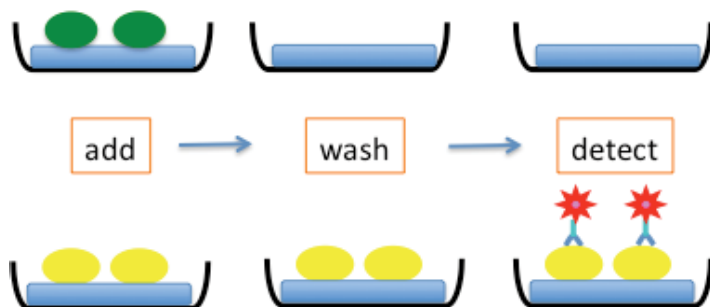


図2-4：コラーゲン結合アッセイの方法 CBDおよびCBD-CAS、FNタンパク質をI型コラーゲンコートしたプレートに固定化した。結合したタンパク質は、1次抗体：抗FN抗体、二次抗体：ヤギ抗マウスHRP標識抗体で標識した後、波長620nmで検出した。

CBD、CBD-CASを添加し、HRP標識抗FN抗体で反応させた後、吸光度620nmで検出した。使用した抗FN抗体はCBDに特異的に結合する単クローン抗体を用いた。I型コラーゲンに対するCBD、CBD-CASの結合能は、コントロールであるBSAよりも約2.5倍と優位に高かった。その結果を図2-5に示す。FN、CBD-CAS、CBDの間では優位な差は無かった。以上の結果より、CBD-CASは、I型コラーゲンに対するFNと同等の結合能を保持することが明らかとなった。

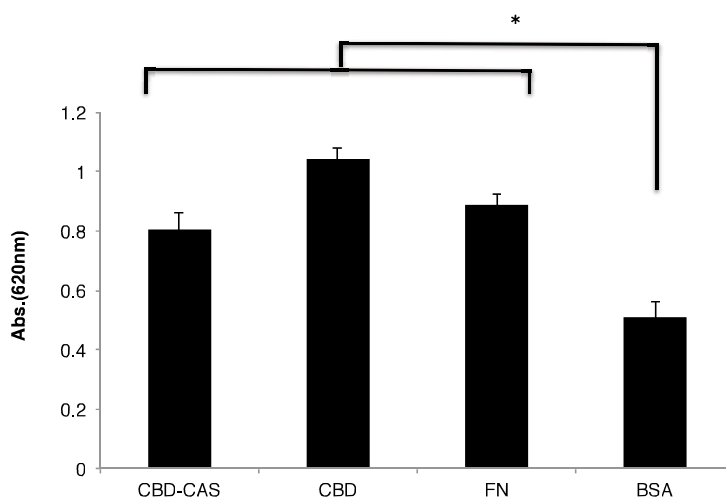


図2-5 : CBDおよびCBD-CAS、FNのコラーゲン結合アッセイ CBDおよびCBD-CASは、コントロールと比較して、2.5倍のコラーゲン結合能があった。そしてFNと同等のコラーゲン結合能であった。

第4節：考察

細胞と生体材料の界面を活性化する様々な遺伝子組換えタンパク質が報告さ

れ再生医療分野や組織工学分野でその有効性が示されている (3・9)。基底膜成分であるラミニンを用いた組換えタンパク質や細胞間接着タンパク質 E-カドヘリンを用いた組換えタンパク質は、異種細胞であるフィーダー細胞を用いなくとも培養できるために幹細胞培養に効果が報告されている (17,18)。ラミニンは特定のインテグリンとしか結合出来ないために、肝細胞の機能を十分向上することが出来ない可能性がある。FN はほとんどすべてのインテグリン分子と結合することが出来ることが知られている(10,19)。

肝細胞培養に用いられているコラーゲン培養皿と細胞のインテグリンを繋ぐ機能を持つCBD-CAS新規キメラタンパク質は、検証実験によりCBD-CASのCBD部分がFN同等のコラーゲン結合能をもつことが示された。CBDとCASは、ヒトFNの構成要素である。CASが、肝細胞のインテグリンのリガンドとなり、CBDがコラーゲンとの結合を介する。FNが長さ60-70 nm、幅 2 nmの2量体であるのに対し、CBD-CASは、タンパク分子量から換算すると約16 nmとなる(20)。CBD-CASは、I型コラーゲン分子のCBD認識部位の特異的ペプチド配列に結合するため、FNのコラーゲンに結合する機能をナノサイズに縮小化し、高密度にコラーゲンに配列ことができると考えられる。

第5節：実験方法

発現ベクターpCBD および pCBD-CAS の構築

ヒト胎生肺繊維芽細胞のtotalRNA(Cell Applications, San Diego, CA)からRT-PCR法を用い、ヒトFNにコードされているコラーゲン結合部位 (CBD) と

細胞結合部位 (CAS) を増幅した。増幅されたCBD断片34.2kDaには、5'側(5'-GGAATTCCATATGTGTGTGCACAGACAGTGGTGT-3')にNdeI、3'側((5'-CCGGAGCTCTCCTCCGGATCCTCCTGAGCTTGGATAGGTCTGT-3')は、SacIを付加した。また、CAS断片は、29.8kDaであり5'側(5'-CCGGAGCTCATGGTTCCTCCTCCCACTGA-3')にSacI、3'側(5'-GCGGCCGCTTATGTTCGGTAATTAATGGAA-3')は、NotIを付加した。これらをpET28sにサブクローニングした。次にCBD-CAS断片をpGEX6P-1に挿入しpCBD-CASを構築した。pCBD-CASからCBD断片をpGEX6P-1に挿入し、pCBDを構築した。

リコンビナントタンパク質の発現と精製

キメラタンパク質 CBD および CBD-CAS は大腸菌で発現した。pCBD および pCBD-CAS を BL21 大腸菌株に形質転換し、50 μ g/mL カルベニシリン含有の LB 培地で培養した。吸光度 660nm にて 0.8 に到達したところで IPTG を 0.1mM になるように添加した。16°C にて 18 時間震盪培養後、回収し 50mL の PBS に懸濁した後、1mM PMSF 添加し、超音波破碎した。破碎した大腸菌サンプルに 0.1%CHAPS を添加し、4°C で 30 分間静置した後、遠心分離し上清を回収した。上清にグルタチオン・セファロース 4B (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を添加し、4°C、20 分緩やかに震盪した。PBS で数回洗浄後、PreScission プロテアーゼ (GE Healthcare) を添加した後、CBD および CBD-CAS を溶出した。溶出した CBD および CBD-CAS は、PBS (pH7.8) 中で透析した。

コラーゲン結合アッセイ

アテロコラーゲンTYPE I (Koken, Tokyo, Japan)でコートした96穴プレートは4°Cで静置した後、PBS洗浄後、CBD-CAS、CBD、FN(Becton, Dickinson and company, Flaklin Lakes, NJ)をそれぞれ50 μ g/wellになるよう添加した。37°Cで2時間静置後、PBS-T (0.05% tween20含有PBS) で洗浄後、抗FN抗体 (1:2000 in PBS with 1% horse serum) (Epitomics, Burlingame, California)を添加し室温で30分静置した。PBS-Tで洗浄後、ヤギ抗マウス IgG-HRP 標識抗体(1:500 1%ウマ血清含PBS) (Cayman, Ann Arbor, Michigan)を添加した。室温で30分静置後、PBS-Tで洗浄し、100 μ L TMB基質(SIGMA, Saint Louis, Missouri)を添加し、5~30分間静置した後、吸光度620nmにてBenchmark Plus microplate spectrometer (BIO-R)を用いて測定した。

第6節 まとめ

*In vitro*における肝細胞の機能向上を目的とした新規キメラタンパク質を構築し、そのキメラタンパク質CBD-CASの発現の検証を行った。ヒトFN由来のCBD(コラーゲン結合ドメイン)とCAS(細胞結合部位)を結合し、新たなキメラタンパク質CBD-CASを作製した。大腸菌の発現システムを用いて作製されたCBD-CASは、十分な純度と量のキメラタンパク質を得ることができた。コラーゲン結合アッセイより、CBD-CASのCBD部分がFN同等のコラーゲン結合能をもつことが示された。以上の結果より、CBD-CASはFN同様コラーゲン結合能

を保持し、分子量が小さいことから、FNよりも高密度にインテグリンを介して細胞を固定化することができると考えられる。

参考文献

1. Ito Y. Covalently immobilized biosignal molecule materials for tissue engineering. *Soft Matter*. 4, 46-56, 2008.
2. Watt F M., Huck W T. Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14(8), 467-473, 2013.
3. Miyazaki T., Futaki S., Suemori H., Taniguchi Y., Yamada M., Kawasaki M., Hayashi M., Kumagai H., Nakatsuji N., Sekiguchi K., Kawase E. Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 3, 1236, 2012.
4. Nagaoka M., Ise H., Harada I., Koshimizu U., Maruyama A., Akaike T. Embryonic undifferentiated cells show scattering activity on a surface coated with immobilized E-cadherin. *J. Cell Biochem.* 103(1), 296-310, 2008.
5. Takayama K., Kawabata K., Nagamoto Y., Kishimoto K., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Kanda K., Hayakawa T., Furue M K., Mizuguchi H. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived

- hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials*. 34(7), 1781-1789, 2013.
6. Nagaoka M., Ise H., Akaike T. Cell attachment and differentiation of primary hepatocytes but not proliferation. *Biotechnol. Lett.* 24, 1857–1862, 2002.
 7. Kitajima T., Terai H., Ito Y. A fusion protein of hepatocyte growth factor for immobilization to collagen. *Biomaterials*. 28, 1989-1997, 2007.
 8. Nishi N., Matsushita O., Yuube K., Miyanaka H., Okabe A., Wada F. Collagen-binding growth factors: Production and characterization of functional fusion proteins having a collagen-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 95(12), 7018–7023, 1998.
 9. Lee K., Silva E A., Mooney D J. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J. R. S . Interface*. 8(55), 153–170, 2011.
 10. Hynes R O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 110, 673-687, 2002.
 11. Pankov R, Yamada K M. Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci*. 115, 3861-3, 2002.

12. Aota S., Nomizu M., Yamada K M. The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J. Biol. Chem.* 269, 24756– 24761, 1994.
13. Bowditch R D., Hariharan M., Tominna E F., Smith J W., Yamada K M., Getzoff E D., Ginsberg M H. Identification of a novel integrin binding site in fibronectin. *J. Biol. Chem.* 269, 10856–10863, 1994.
14. Fong E., Tirrell D A. Collective cell migration on artificial extracellular matrix proteins containing full-length fibronectin domains. *Adv. Mater.* 22(46), 5271-5275, 2010.
15. Pierschbacher M D., Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature.* 309, 30-33, 1984.
16. Ruoslahti E., Pierschbacher M D. New perspectives in cell adhesion: RGD and Integrins. *S* . 238, 491-497, 1987.
17. Miyazaki T., Futaki S., Suemori H., Taniguchi Y., Yamada M., Kawasaki M., Hayashi M., Kumagai H., Nakatsuji N., Sekiguchi K., Kawase E. (2012) Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 3,1236-, 2012.
18. Xu J., Zhu C., Zhang Y., Jiang N., Li S., Su Z., Akaike T., Yang J. hE-cadherin-Fc fusion protein coated surface enhances the adhesion and

proliferation of human mesenchymal stem cells. *Colloids. Surf. B.*

Biointerfaces. 109, 97-102, 2013.

19. Pankov R., Yamada K M. Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* 115, 3861-3863, 2002.

20. Engel J., Odermatt E., Engel A., Madri J A., Furthmayr H., Rohde H., Timpl R. Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix. *J. Mol. Biol.* 150(1), 97-120, 1981.

第三章

二次元培養における CBD-CAS による肝細胞の機能化

第 1 節: 背景

肝細胞は生体から単離され *In vitro* 条件におかれると急速に機能を失う。肝細胞培養には多くの手法が報告されているが、その培養技術は未だ完全なものとは確立されていない。序章でも述べたように生体内環境を模倣する培養方法とは異なる新しいコンセプトとして CBD-CAS によるインテグリン-ナノクラスターを介したシグナル伝達活性化による肝細胞機能を強制的に上げる方法を考案した。本章では 2 次元培養における CBD-CAS による肝細胞機能の向上とインテグリンのクラスター化を検討する。

HepG2 細胞は、ヒト肝癌細胞から樹立した細胞株である。この細胞株は不死化しているため培養が非常に容易であるため薬物代謝試験モデルとしても使用されている。しかし肝細胞としての機能は維持しているものの低レベルである (3)。HepG2 のアルブミン産生は 1/10 に減少し、CYP 遺伝子全 CYP 活性は初代肝細胞の 1/50 になり、mRNA 量も 1/400 にまで下がる。HepG2 は肝がん細胞のため、肝特異的転写因子の発現に変異が起きている事も起因の一部である (2,4-6)。

第 2 章では、キメラタンパク質 CBD-CAS の CBD 部分が FN と同等のコラーゲン結合能があることが示された。本章では、2 次元培養条件において CBD-CAS の CAS 部分が、肝細胞のインテグリンを介した細胞内シグナルの活

性化による肝細胞機能への有効性を HepG2 細胞を用いて検証した。アルブミンは代表的な肝特異的な機能マーカーである。この細胞株の機能を上昇させることができれば、薬物代謝試験に有用であると考えられる。そこで、CBD-CAS 固定化培養皿上で HepG2 細胞を培養し、アルブミン産生を遺伝子及びタンパク質レベルで測定した。本章では CBD-CAS 固定化基質で培養することによって HepG2 細胞の機能が上昇するかを検討した。

第 2 節: CBD-CAS が肝細胞の増殖に与える影響

CBD-CAS の CAS 部分がコラーゲンや FN 培養基に比べて、細胞増殖に変化もたらすかを調べるために、CBD-CAS 上での HepG2 細胞の増殖を検討した。結果を図 3-1 に示す。HepG2 細胞は、それぞれ CBD-CAS、CBD、FN を固定化した培養皿とコラーゲン固定化培養皿をコントロールとして細胞増殖を測定した。細胞を播種してから 3 日後と 6 日後の細胞数を測定した。図 3-1 に示すように CBD-CAS、CBD、FN を固定化した上で培養した細胞はコントロール（これらを固定化していない細胞）では、細胞数に優位な差はみられなかった。以上の結果から、CBD-CAS は、HepG2 細胞の増殖に影響を与えない事が明らかになった。

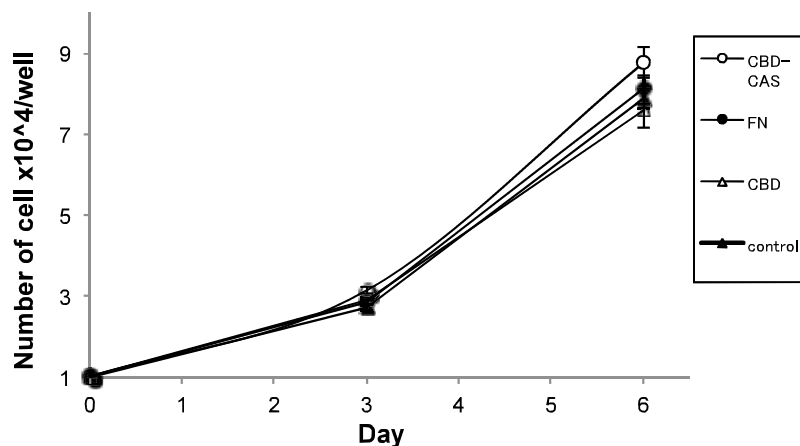


図 3-1 : CBD および CBD-CAS, FN 固定化培養皿における HepG2 細胞の増殖

HepG2 細胞は CBD (黒), CBD-CAS (白丸), FN (黒三角), コラーゲン (コントロール; 白三角) 上に播種した。3 日後, 6 日後に Cell Titer-Glo luminescent kit (Promega) を用いた増殖活性アッセイを行った。

第 3 節 : CBD-CAS が肝細胞の機能に与える影響

CBD-CAS の CAS が HepG2 細胞の肝細胞機能を誘導するか調べるために、肝特異的遺伝子であるアルブミンの mRNA に着目し、その発現を経時的に測定した。肝機能を示す代表的なマーカーを表 3-1 に示す。アルブミンは肝機能マーカーとして多くの機能の指標となる事が示されるマーカーである。コラーゲ

表 3-1 : 肝機能を示す代表的なマーカー

肝細胞機能	マーカー
血清タンパク質産生	アルブミン トランスフェリン α -フェトプロテイン プラスミノゲン プロトロンビン
代謝機能	
・糖代謝	グルコース-6-フォスファターゼ グリコゲン
・窒素代謝	カルバモイルリン酸シターゼ グルタミンシターゼ
・アミノ酸代謝	チロシニアミトランスフェラーゼ トリプトファン2,3-ジオキシゲナーゼ
薬物代謝・解毒	
・チトクロームP450	チトクロームP450薬物代謝酵素群(CYP) アンモニア
・アンモニア代謝	尿素合成
・GST活性	グルタチオン-S-トランスフェラーゼ
胆汁産生・排出	ビリルビン代謝

ンコートした培養皿に CBD-CAS, CBD を固定化し培養した HepG2 細胞のアルブミン遺伝子発現の変化をコラーゲン培養（コントロール）と比較して以下の実験を行った。結果を図 3-2 に示す。それぞれの培養条件で HepG2 細胞を培養し、0 時間、24 時間、72 時間及び 144 時間後のアルブミン mRNA を測定した。

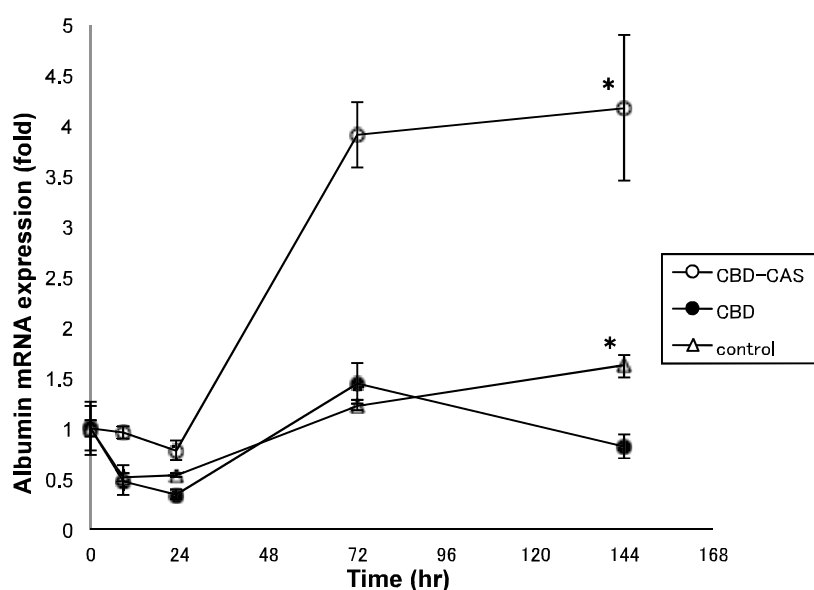


図 3-2: CBD-CAS 固定化培養皿での HepG2 細胞のアルブミン mRNA 発現の経時的变化
 CBD（黒丸）, CBD-CAS（白丸）, FN（黒三角）, コラーゲン（コントロール；白三角）上に播種された HepG2 細胞は、3, 12, 26, 72, 144 時間ごとにアルブミン mRNA をリアルタイム PCR で測定した。測定結果は、固相化なしの培養皿での HepG2 細胞の発現レベルで標準化した。

図 3-2 に示すように、コントロールと比較して 24 時間では発現量に変化は見られなかった。しかし、72 時間後には CBD-CAS 上で培養した細胞は急激なアルブミン mRNA の上昇が認められ、144 時間後において CBD コラーゲン上の培

養に比べ約 3.5 倍高い発現量を示した。以上の結果より CBD-CAS 固定化が HepG2 細胞のアルブミンの発現を促進していると結論づけた。

これらの結果は、細胞がインテグリンからのシグナル伝達が促進され、アルブミン遺伝子発現が誘導されたことを示唆するものである。また、アルブミンの発現誘導には 24 時間以上要していた。さらに、その後もアルブミン遺伝子発現はコントロールに比べて高値で維持できることが明らかになった。

CBD-CAS の固定化密度の違いがアルブミンの発現にどのように影響するのかを調べるために、CBD-CAS の固定化濃度を 3 段階にわけてコラーゲン培養皿に添加し、CBD-CAS の固定化密度を変化させてアルブミン遺伝子発現量を検討した。CBD-CAS 及び FN の固定化濃度による HepG2 のアルブミン mRNA の発現状況を図 3-3 に示す。このように、HepG2 細胞のアルブミン mRNA 発現

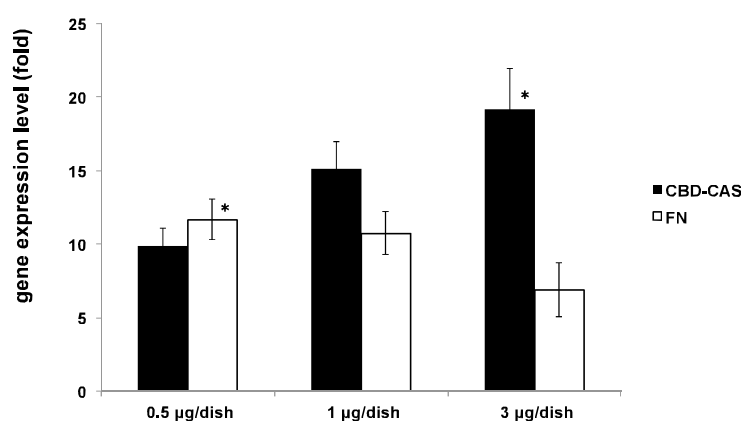


図 3-3: CBD-CAS と FN 培養での HepG2 細胞のアルブミン mRNA 発現の濃度依存的効果 測定結果は、CBD-CAS, FN を固定化していない培養皿上の HepG2 細胞の発現レベルで標準化した。コラーゲン培養皿上に各濃度で CBD-CAS および FN をコートした。HepG2 細胞を播種し、6 時間後リア

リアルタイム PCR でアルブミン mRNA を測定した。

は CBD-CAS 固定化量に比例して上昇し、 $0.5 \mu\text{g/dish}$ に比べ $3 \mu\text{g/dish}$ では約 1.8 倍上昇していた。これに対して、FN は固定化濃度に比例して HepG2 細胞のアルブミン mRNA 発現の上昇は見られなかった。また、 $0.5 \mu\text{g/dish}$ FN 固定化と $3 \mu\text{g/dish}$ CBD-CAS 固定化を比較した場合、約 1.5 倍の上昇を示していた。以上の結果から、固定化濃度による変化はみられず、CBD-CAS 固定化培養では、濃度依存的にアルブミン遺伝子発現は上昇した。これは高密度に CBD-CAS が固定化されたことで HepG2 細胞のアルブミン mRNA 発現が誘導されたことを示唆するものである。

次にタンパク質の発現レベルでの CBD-CAS 固定化による CAS 部分が肝細胞株のアルブミン発現量に与える影響を検討するために、CBD-CAS 固定化による HepG2 細胞が産生されるアルブミンタンパク質を ELISA 法にて測定した。結果を図 3-4 に示す。分泌されたアルブミンはコントロールであるコラーゲン固

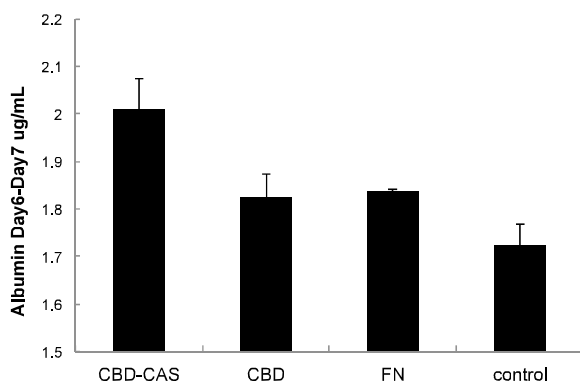


図 3-4: CBD-CAS および FN 培養での HepG2 細胞のアルブミンタンパク質発現の比較 6-7 日に

無血清培地に交換した後、培養 7 日目に培地を回収した。回収した培地のアルブミンタンパク質は ELISA 法で測定した。

定培養皿と比較して優位に高かった。CBD, FN と比較して CBD-CAS が、高い値を示していたが、有意的な差は認められなかった。

第 4 節: CBD-CAS がインテグリン-ナノクラスター形成とシグナル伝達に与える影響

次に、CBD-CASのCASによって細胞接着面のインテグリン発現にどのような変化があるかを明らかにするために、HepG2細胞表面のインテグリンの発現と局在をtotal internal reflection fluorescence microscopy (TIRF)を用いて蛍光観察した。その結果を図3-5に示す。コントロールのコラーゲンコートにおいては、

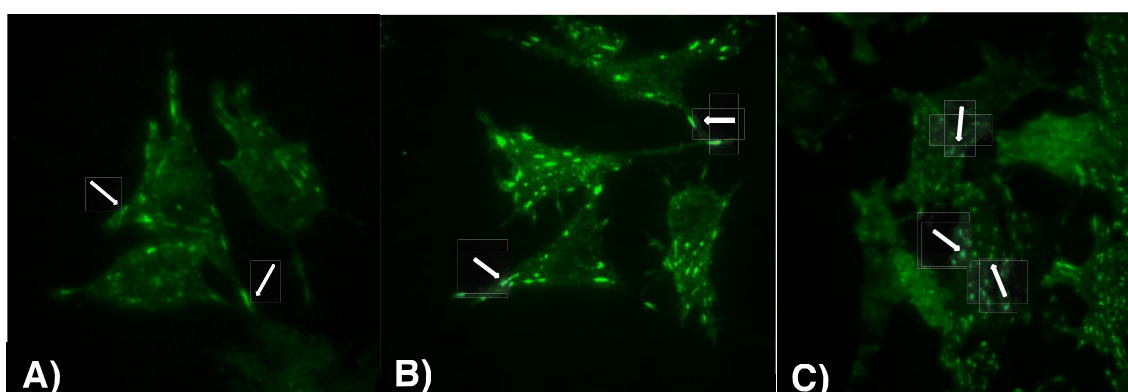


図3-5: CBD-CASおよびFN培養 6 日後のHepG2細胞のインテグリンの発現と局在の免疫蛍光反応

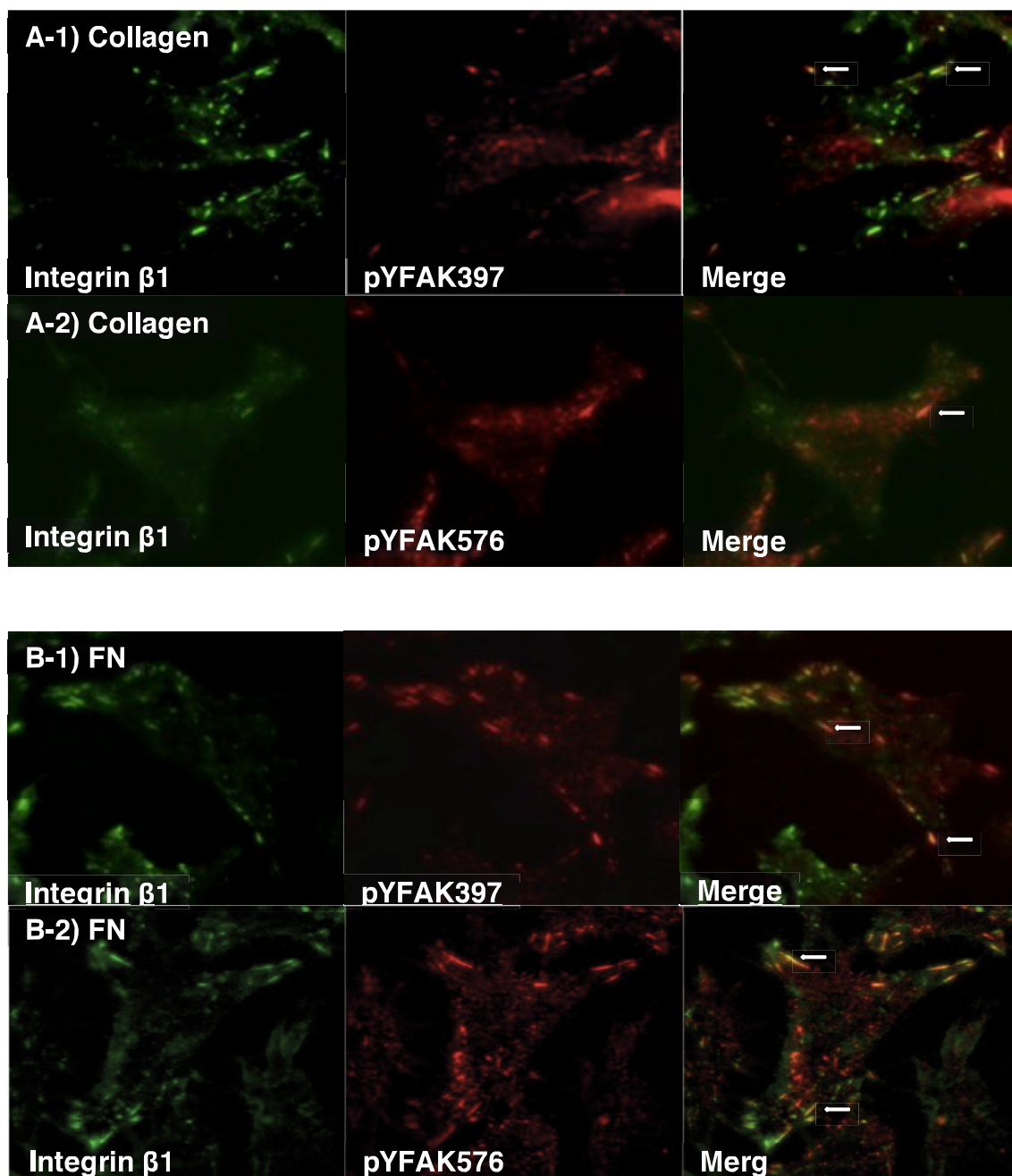
細胞は、A: コラーゲン, B: FN, C: CBD-CAS上で培養した後、固定し抗ヒトインテグリン β

1-Alexa488標識で染色した。矢印はインテグリンクラスタを示す。

非常に細かなインテグリンの接着斑が観察された(A)。インテグリンによる接着斑の数は、FN固定化よりもCBD-CASを固定化した方が定量的に多く観察された(BとCの比較)。さらに、CBD-CAS固定化では細胞全体にインテグリンの接着斑が見られた(C)。肝細胞で発現しているインテグリンは $\alpha 2 \beta 1$ であることから、この接着斑はインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ (7)であるだろうと考えられる。以上の結果より、CBD-CASは高密度にコラーゲンに結合し、CBD-CASのCASが細胞接着面全体のインテグリンと結合しインテグリン-ナノクラスタを形成していると考えられた。

CBD-CASのCASと細胞接着面のインテグリンとの結合によって細胞内シグナル伝達を促進しているかを調べるために、**Focal adhesion kinase (FAK)**の活性化を検討した。125kDaの非レセプター型チロシンキナーゼであるFAKはリン化により、細胞接着の代謝、細胞遊走や成長因子とのクロストーク、細胞周期の促進や生存などを含む様々な細胞内のプロセスに関わることが知られている(8,9)。インテグリンに誘発されたシグナル反応中において活性化FAKのリン酸化反応は397チロシン残基の自己リン酸化と後に続くSrcの結合からはじまる。キナーゼドメインの活性化中におけるチロシン残基Y576 (pY576)/Y577 (pY577)のリン酸化は、触媒的な作用を増長させ、FAKのキナーゼ活性を最大にする(8,9)。CBD-CASとインテグリンの結合に応答して、F

次活性化し、おのこの細胞内シグナル伝達カスケードがおきる (10) そこで、
インテグリンとリン酸化FAK(pFAK)の局在を全反射蛍光顕微鏡で観察した。



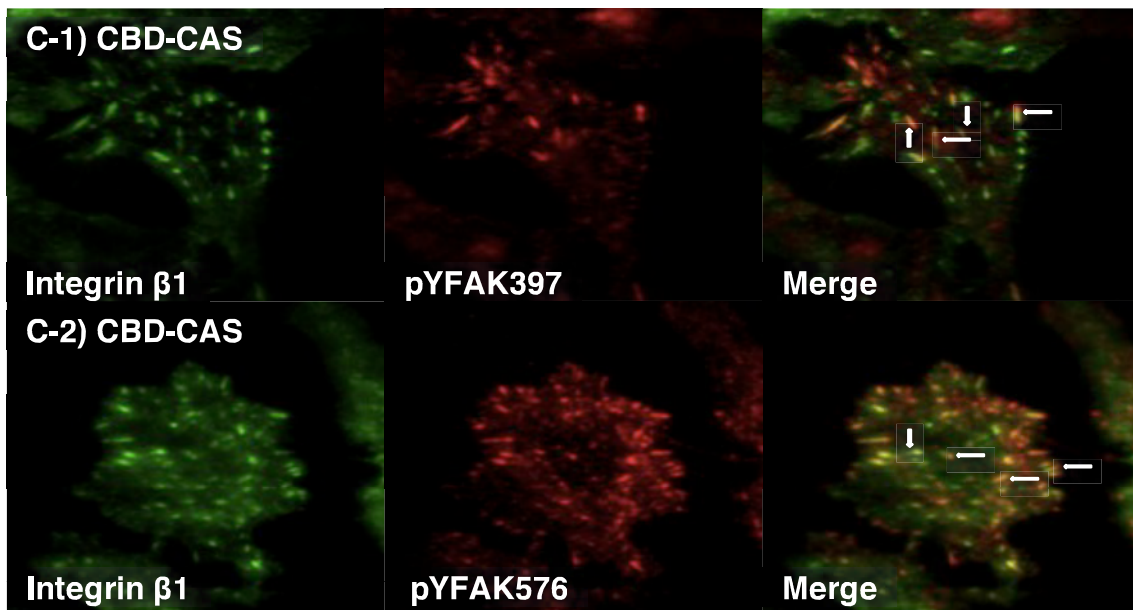


図 3-6: CBD-CASおよびFN培養 20 時間後のHepG2細胞のインテグリンとFAKの発現と局在の免疫蛍光反応 細胞は、A:コラーゲン, B: FN, C: CBD-CAS上で培養した後、固定し抗ヒトインテグリン β 1-Alexa488標識で染色した。次に抗ヒトpYFAK397とAlexa566 (1列) もしくは抗ヒトpYFAK567とAlexa566 (2列) で染色した。矢印はインテグリンクラスタを示す。

CBD-CAS固定化ではFNやコラーゲン上よりも明らかに多くのpFAKとインテグリンが検出された。FNやコラーゲンコート上のHepG2細胞ではpYFAK397, pYFAK576抗体で検出されたFAKのリン酸化は細胞周囲の接着斑に局在している事が観察された (図3-6A,B)。一方、CBD-CAS固定化上のHepG2細胞においては、FAKのリン酸化が細胞接着面の全体に観察された (図3-6C)。これらの結果から、CBD-CAS固定化によるインテグリン-ナノクラスタ形成がFAKのリン酸化を介した細胞内シグナル伝達が強く活性化していると結論づけた。

第5節:考察

細胞がECMに接着することで細胞膜上に存在するインテグリンや他の受容体との情報交換が開始する。インテグリンシグナルを介して肝細胞の分化及び増殖に影響を与える事が報告されている(11,12)。インテグリンを介した細胞内シグナル伝達は、FAKを含む細胞膜上のインテグリンに付随しているアダプタータンパク質による様々な細胞内シグナル伝達に繋がる。インテグリンからのシグナル伝達の模式図を図3-1に示す。細胞表面のインテグリンと結合したFNがその局所濃度を増加させ、インテグリンを活性型に変換することでインテグリンクラスタを誘導する(13)。インテグリンのクラスタリングは、リガンド密度および受容体に対するリガンドの化学的親和性を含むECMの物理的特性に自然応答する(13)。インテグリン-クラスタによる細胞内シグナル伝達活性は、インテグリン-クラスタの密度に依存する(図3-1)。従って、FNよりも小さいCBD-CASは、コラーゲンに高密度に結合するために、インテグリン-ナノクラスタが形成した。FAKの高活性が、細胞内活動を上昇させることが知られている(14)。肝特異的遺伝子であるアルブミン遺伝子発現がCBD-CAS濃度依存的に上昇するということはCBD-CASによるインテグリン-ナノクラスタ形成がFAKを含むインテグリンに付随しているアダプタータンパク質のシグナルカスケードを促進する事を意味していると考ええる。

一般的に細胞培養に使用されているコラーゲンやFN上は細胞周域に局在しているが、CBD-CAS上のインテグリンのクラスタは、接着面全体に広がっている

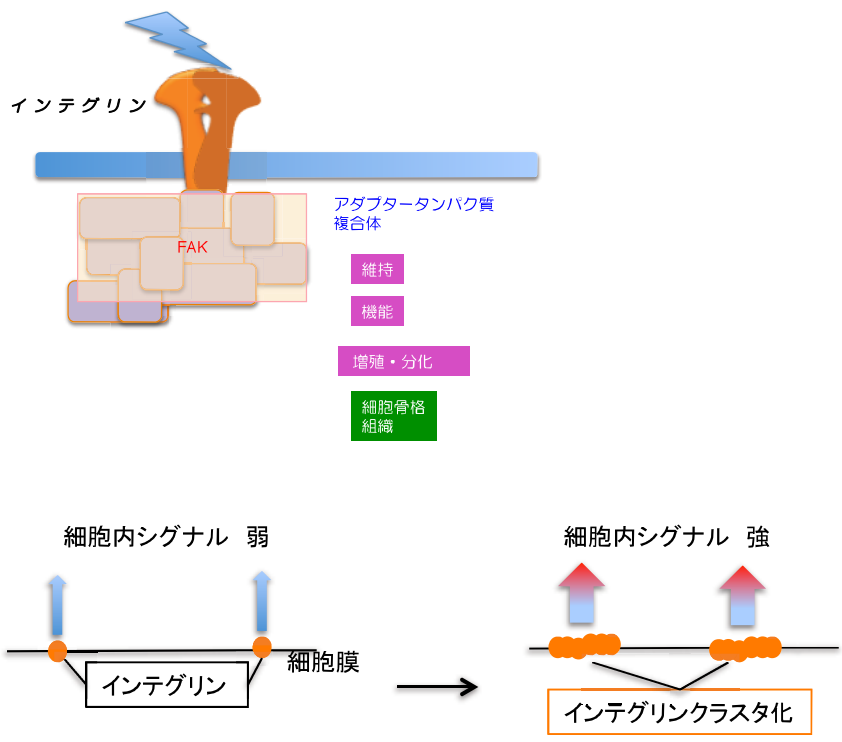


図 3-1 : CBD-CASによるインテグリンシグナルの細胞内伝達と細胞膜上のインテグリン-ナノクラスタによる細胞内シグナル伝達の強度

た。細胞の形態も丸みを帯びた高機能形が観察された。CASの密度が高くなることによってインテグリンの活性を促し、インテグリンを介した細胞内シグナリングが促進されたと考えられる。

本章のpFAKとインテグリンクラスタの観察結果から、CBD-CAS上のHepG2細胞は、FN上のHepG2細胞と比較してpFAKとインテグリンを介したシグナル伝達の促進が観察された。コラーゲン上及びFN上のHepG2細胞では、pYFAK397およびpYFAK576の蛍光シグナルの位置が細胞先端部に顕著に観察された。一方CBD-CAS上のHepG2細胞においては、これらのシグナルは細胞接

着面全体に広がっている事が確認された。これらの事から、CBD-CASは、インテグリン・ナノクラスタを形成し細胞内シグナルの活性化をFNよりも強く誘導することが示唆された。以上の結果から、CBD-CASは、インテグリン及びその下流のFAKを介して肝細胞機能を向上していることが示された(15)。

第6節：実験方法

RNA 抽出と cDNA 合成

HepG2のtotalRNAは、RNeasy kit(QIAGEN, Venlo, Netherlands)を使用しマニュアルに従って抽出した。TotalRNAは、PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis System (Takara, Shiga, Japan)を使用し、マニュアルに従い、cDNA 合成した。

リアルタイム PCR (SYBR Green I 法)

リアルタイム PCR は、LightCycler® Carousel-Based System(Roche Applied Science Indianapolis (Ee et al, 2007)を使用した。スタンダードサンプルは 20ul をキャピラリー(LightCycler® Capillaries; Roche Applied Science)に供した。反応液は、10uL Fast SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, California、 10pmol 両プライマー、10ng HepG2 cDNA、水 終量 20uL とした。検量線は、標準プラスミドを段階希釈にて作成した。温度設定条件は、95°C 20 秒後、95°C 3 秒、60°C 30 秒を 40 サイクルとした。データの補正は、ハウ

スキッピング遺伝子である β アクチンを内在性コントロールとして用いた。

mRNA の発現レベルは、誘導倍率を示した。

Primers Human albumin forward:

5'-GTTGCTATCCTGAAAATTCTGTAGGTT-3'

Human albumin reverse: 5'-A -3'

Human β -actin forward: 5'-CCACGAAACTACCTTCAACTCCAT-3'

Human β -actin reverse: 5'-TGTGTTGGCGTACAGGTCTTTG-3'

分泌アルブミンの定量

アルブミンタンパク質の測定サンプルは、HepG2細胞培養 8 日後の無血清培地を用いた。培養液中のアルブミン濃度は、Human Albumin EIA Kit (Takara, Shiga, Japan)を使用した。

免疫蛍光染色

ガラスボトムディッシュ上に使用説明書に従ってCellmatrix TypeI-Cをコートし、FNもしくはCBD-CASを50ngコートした。インキュベーション6日後、4%PFA-PBSで20分固定化後、0.02%Triton X-100 PBS溶液に5分透過化させた。4%BSA-PBS溶液でブロッキングした後、1次抗体 (anti-human pYFAK397

(Invitrogen, Carlsbad, CA) or anti-human pYFAK576 (Invitrogen, Carlsbad, CA)) を添加し 1 時間静置した。PBS洗浄後、2次抗体(anti-rabbit IgG-conjugated Alexa 566、Alexa 488 anti-human CD29 conjugate (Invitrogen, Carlsbad, CA)を添加し1時間静置した。PBS洗浄後、prolong-gold (Invitrogen, Carlsbad, CA)をマウントし、染色サンプルを作成した。TIRF microscopy (Leica, Wetzlar, Germany)にて観察した。観察データは、Image J によって画像処理を行った。

第 7 節 まとめ

CBD-CASのCASが肝細胞機能に対し有効であるかを検証するために、CBD-CASを固定化した培養皿とCBD、FNおよびコラーゲンの比較をHepG2細胞の2次元培養にて行った。

細胞数測定による細胞増殖には差がみられなかった。肝特異的遺伝子であるアルブミン遺伝子の経時的発現測定では、コントロールと比較して 24 時間では発現量に変化は見られなかったが 72 時間後には、CBD-CAS 上で培養した細胞は急激なアルブミン mRNA の上昇が認められ、144 時間後において、CBD およびコラーゲン培養に比べ約 3.5 倍高い発現量を示した。CBD-CAS と FN 培養での HepG2 細胞のアルブミン mRNA 発現の濃度依存的効果においては、FN では変化はみられず、CBD-CAS では濃度依存的にアルブミン遺伝子発現が上昇した。アルブミンタンパク質の発現レベルではコントロールであるコラーゲン

と比較して優位に高かった。CBD, FN と比較して CBD-CAS が、高い値を示していたが、有意的な差は認められなかった。CBD-CAS は、アルブミン産生を促進していることが明らかになった。以上の結果から高密度の CBD-CAS によって形成されるインテグリン・ナノクラスタは、インテグリンを介した細胞内シグナルをより強めると結論づけた。蛍光顕微鏡観察では、CBD-CAS 培養の細胞形態は高機能形を示した。インテグリンの発現は細胞接着面全体にみられたことから、CBD-CAS はより高密度に配置されているものと考えている。pFAK の発現もインテグリンの発現に重なり接着面全体にみられた。

以上の結果から、CBD-CAS 固相化培養では、インテグリン・ナノクラスタ形成を介した細胞内シグナルの活性化することにより肝細胞の機能が向上したと結論付けた。

参考文献

1. Kleinman H K., McGarvey M L., Liotta L A., Robey P G., Tryggvason K., Martin G R. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry*. 21(24), 6188-6193, 1982.
2. LeCluyse E L. Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *Eur. Pharm. Sci.* 13, 343-368, 2001.
3. Hewitt N J. Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and

- pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metabolism Rev.* 39, 159-234, 2007.
4. Rodriguez-Antona C., Donato M T., Boobis A., Edwards R J., Watts P S., Castell J V., Gomez-Lechon M J. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica.* 32, 505-520, 2002.
 5. Westerink W M., Schoonen W G. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro.* **21**, 1581-1591, 2007.
 6. Wilkening S., Stahl F., Bader A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab. Dispos.* 3(8), 1035-1042, 2003.
 7. Emslay J., Knight C G., Farndale R W., Barnes M J., Liddington R C. Structural Basis of collagen Recognition by Integrin $\alpha 2\beta 1$. *Cell.* 101, 47-56, 2000.
 8. Patynowski I W., Schwarzbauer J E. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J. Cell Sci.* 116, 3269-3276, 2003.
 9. Sánchez A., Alvarez A M., Pagan R., Roncero C., Vilaró S., Benito M., Fabregat I. Fibronectin regulates morphology, cell organization and gene

- expression of rat fetal hepatocytes in primary culture. *J. Hepatol.* 32(2), 242-250, 2000.
10. Harburger D S., Calderwood D A. Integrin signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 159-163, 2009.
11. Li J W., Wang G P., Fan J Y., Chang C F., Xu C S. Eight path of ERK1/2 signaling pathway regulating hepatocyte proliferation in rat liver regeneration. *J. Genetics.* 90(3), 435-442, 2011.
12. Xu C., Yang Y., Yang J., Chen X., Wang G. Analysis of the role of the integrin pathway in hepatocyte during rat liver regeneration. *Cell & Mol. Biol. Letter.* 17, 274-288, 2011.
13. Paszek M J., Boettiger D., Weaver V M., Hammer D A. Integrin clustering is driven by mechanical resistance from the glycocalyx and the substrate. *ProS Comput. Biol.* 5(12), e1000604, 2009.
14. Shroff K., Pearce T R., Kokkoli E. Enhanced integrin mediated Signaling and cell cycle progression on fibronectin mimetic peptide amphiphile monolayers. *Lagmuir.* 28, 1858-186, 2012.
15. Nishida Y., Taniguchi A. Induction of albumin expression in Hepg2 cells using immobilized simplified recombinant fibronectin protein. *In Vitro. Cell Dev. Biol. Anim.* 49(6), 400-407, 2013.

第四章

キメラタンパク質 CBD-CAS の 3 次元培養への応用

第 1 節：背景

創薬において、薬物代謝試験は薬物における臨床的有効や毒性を見極めるのに重要である。肝細胞の CYP は薬物代謝の主要部分を占める。初代肝細胞と HepG2 細胞の CYP の機能を比較してみると全ての CYP のレベルは初代肝細胞に比べ著しく低減していることが知られている。しかし、HepG2 細胞は細胞株の特徴として扱いの簡便さや培養の容易さという強い利点がある。薬物代謝試験に応用するためには、HepG2 細胞の CYP 遺伝子群の発現を向上させることが重要である。

培養環境における立体構造は、細胞に様々な影響をあたえることが多数報告されている(1-3)。従来の 2 次元培養と 3 次元培養された細胞では、形状(4)、細胞表面受容体、細胞-細胞間接触(5)、生理機能(6,7) や遺伝子発現 (8,9) が異なる事が知られている。より生体組織に近い 3 次元環境で培養することで、肝細胞機能の向上が期待できる。肝細胞機能が向上した肝細胞は薬物代謝試験および毒物アッセイなどに適用できるため、実験動物の使用も減らす事が出来る (10) コラーゲンは組織工学分野では足場基材として最もポピュラーなものであり、コラーゲンを主成分とした様々な形の 3 次元足場材料が開発されている(11-13)。

本研究に用いた足場素材は、コラーゲンを口径 200~400 μm のハニカム状の構造に成形した材料である(14)。細胞はこのハニカム内に容易に入り込み、細胞

現しているアルブミン mRNA 量を測定した。その結果を図 4-2 に示す。ハニカ

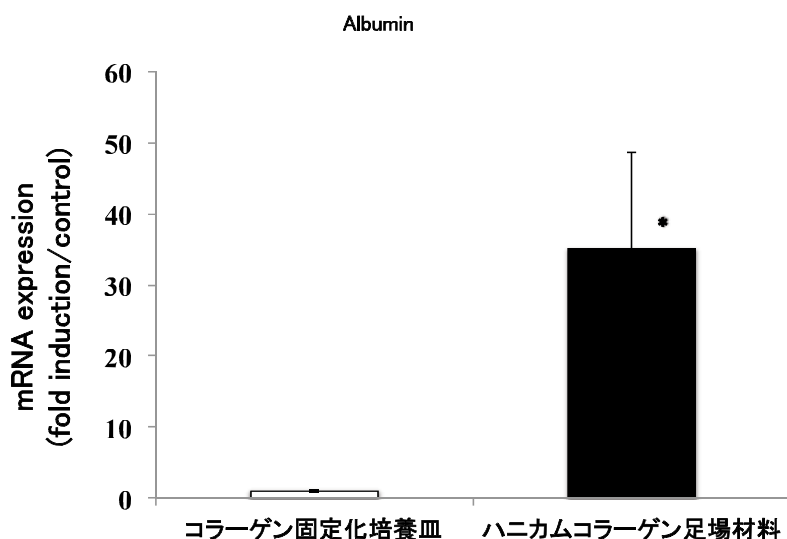


図 4-2 : ハニカムコラーゲン足場材料上の HepG2 細胞のアルブミン mRNA 発現の効果

コラーゲン固定化培養皿とハニカムコラーゲン足場材料上で 3 日間培養した HepG2 細胞のアルブミン mRNA 発現をリアルタイム PCR で測定した。

ムコラーゲン足場材料で培養した HepG2 細胞は、コラーゲン固定化培養と比較してアルブミン mRNA を約 40 倍近く高い発現が見られた。この結果は HepG2 細胞が、3 次元構造の影響を受け、肝細胞機能が向上することを示している。

これは類似の論文が多数報告されているため、結果はそれを裏付ける(15,11,12)。

ハニカムコラーゲン足場材料に播種した細胞の形態を確認するために、電子顕微鏡にて観察した。観察結果を図 4-3 に示す。A, C は、ハニカムコラーゲン足場材料、B, D は CBD-CAS ハニカムコラーゲン足場材料の HepG2 細胞形態を示す。ハニカムコラーゲン足場材料上の細胞は扁平状をしているものが多く、鋭角状に伸展し細胞の厚みが薄い。CBD-CAS ハニカムコラーゲン足場材料

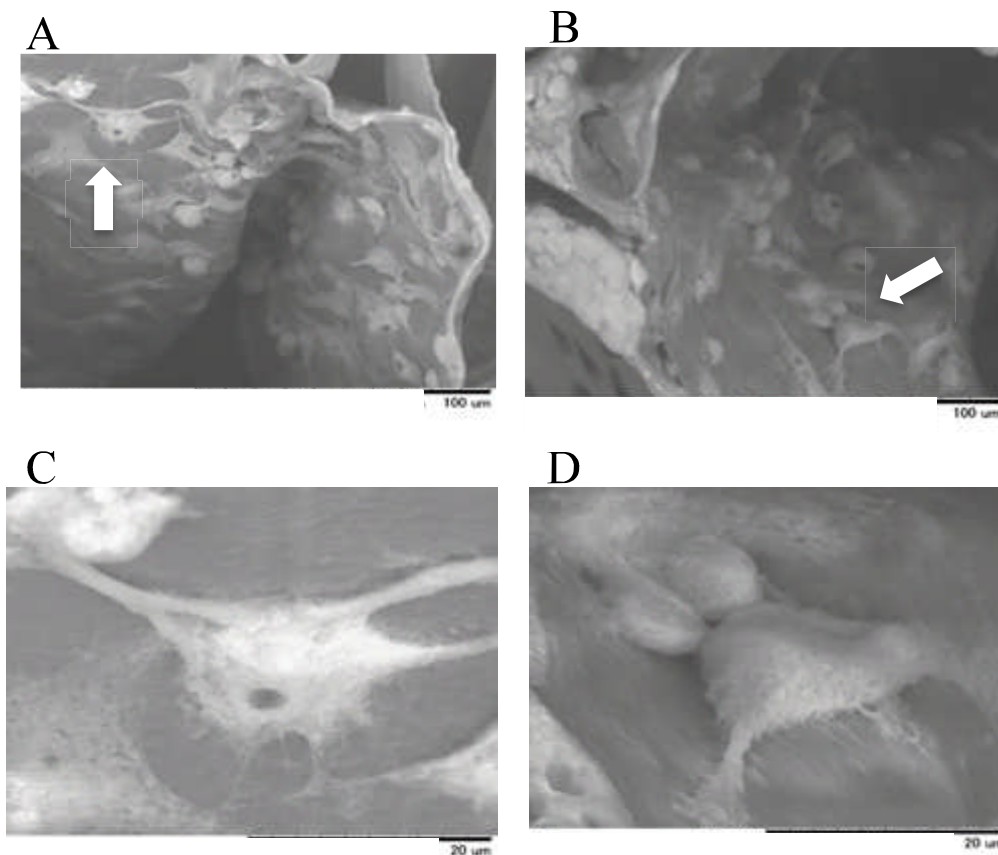


図 4-3: ハニカムコラーゲン足場材料 (A, C) と CBD-CAS 固定化ハニカムコラーゲン足場材料 (B, D) 上での HepG2 細胞の形態。HepG2 細胞は 2 日間培養した後 4%PFA 固定化し、PI ブルーで染色した。倍率は、A および C は 1000 倍、B および D は 4000 倍である。

上の細胞は全体的に球状の形態が観察された。コラーゲンの構造とインテグリンの相互作用が細胞形態と伸展に影響する(3)。丸みを帯びた肝細胞は、肝細胞としての機能が向上している(4)。以上の結果は、CBD-CAS コラーゲン足場材料が肝細胞の形態に影響を与えたことを示す。

CBD-CAS 有無でコラーゲン足場材料上の HepG2 細胞数を比較した。播種 2 日後の細胞数を測定した結果を図 4-4 に示す。細胞数は、CBD-CAS 固定化条件

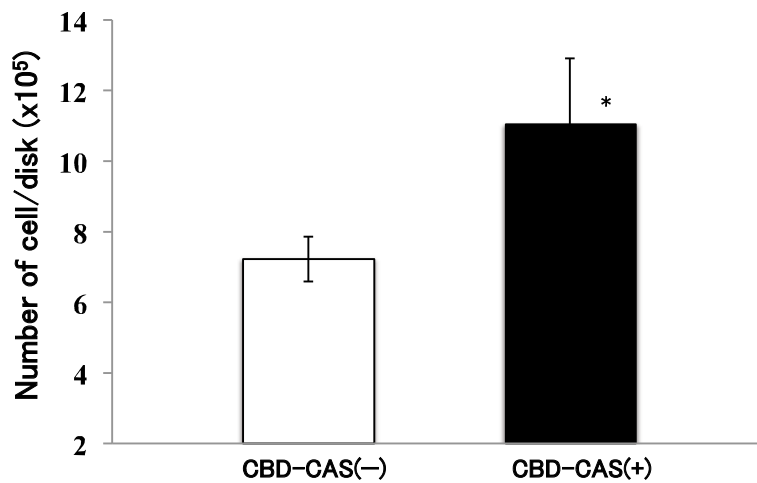


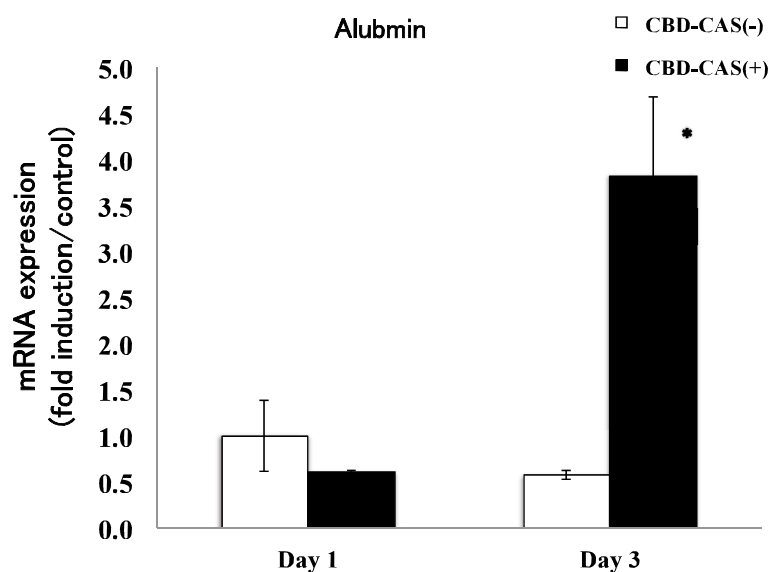
図 4-4 : CBD-CAS 固定化有無によるハニカムコラーゲン足場材料上の HepG2 細胞の細胞数の比較
 黒いバーは CBD-CAS 固定化したハニカムコラーゲン足場材料 (CBD-CAS (+))、白いバーはハニカムコラーゲン足場材料 (CBD-CAS (-)) を示す。HepG2 細胞は、播種後 2 日目に HepG2 細胞をトリパンブルー染色し細胞数を測定した。

において有意的に増加した。細胞播種後の接着細胞数が CBD-CAS 非固定化条件に対して数多く接着したことが明らかになった。この結果は、CBD-CAS により細胞のインテグリン接着部位が増加したため、細胞接着が容易になり細胞数が増加したのではないかと考えられる。

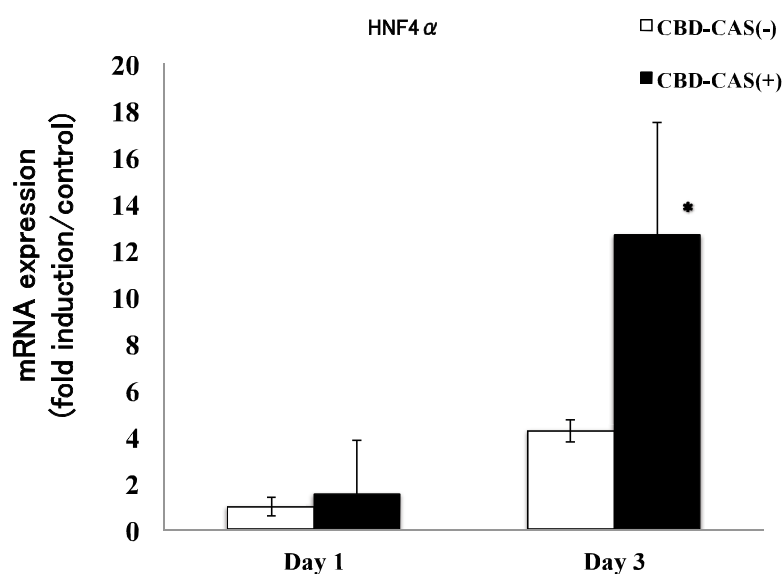
CBD-CAS を固定化したハニカムコラーゲン足場材料上で培養された HepG2 細胞の機能を評価するために、1 日、3 日培養後の、肝細胞特異的遺伝子発現マーカーであるアルブミンと肝細胞に強く発現している転写因子である HNF4 α 、c/EBP α の 3 種類の mRNA 発現量を測定した。その結果を図 4-5 に示す。CBD-CAS 固定化の有無において、アルブミン発現量は 1 日後では有意差はみられなか

ったが、3日後では、CBD-CAS 固定化にて遺伝子レベルの発現は約 6.6 倍増加していた。この結果から、CBD-CAS 固定化ハニカムコラーゲン足場材料での培養で HepG2 の細胞機能の向上されることが示唆された。HNF4 α では、

A



)



C)

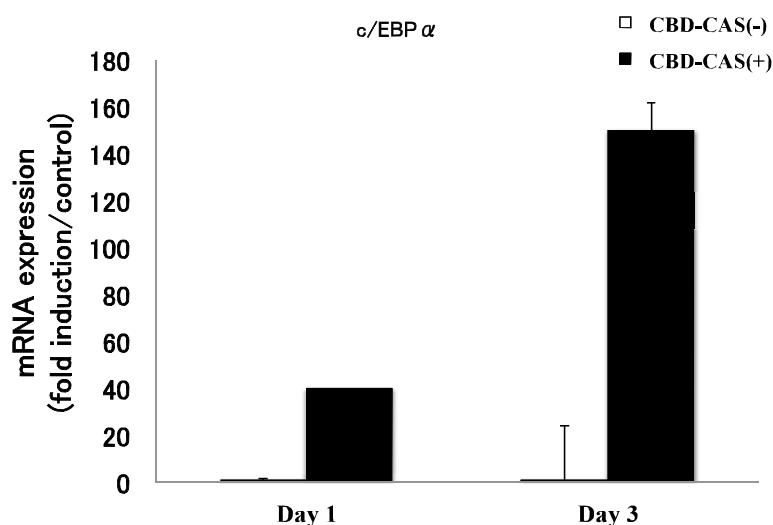


図 4-5 : HepG2 細胞の肝細胞特異的遺伝子発現における CBD-CAS 固定化ハニカムコラーゲン足場材料の効果の比較 HepG2 細胞を播種後 1, 3 日目にリアルタイム PCR でアルブミン (A)、HNF4 α (B)、c/EBP α (C) を測定した。黒いバーは CBD-CAS コートしたハニカムコラーゲン足場材料 (CBD-CAS (+))、白いバーはハニカムコラーゲン足場材料 (CBD-CAS (-)) を示す。ハニカムコラーゲン足場材料での培養 1 日目のサンプルをコントロールとした。データは、GADPH 遺伝子発現を用いて補正した。

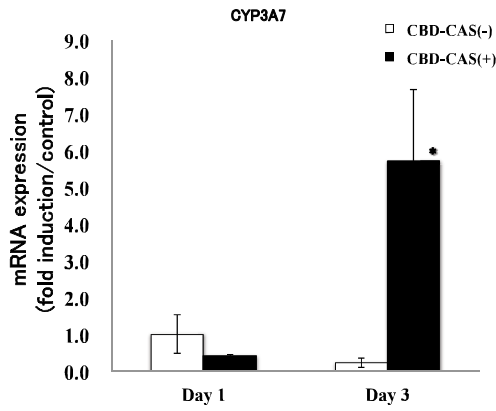
CBD-CAS 固相化で約 3 倍上昇した。HNF4 α は多くの薬物代謝酵素の転写活性に基本的に関わっており、特定の CYP プロモーターを活性化させる(31)。CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) は、1 日後、コントロールと比較して約 40 倍上昇した。3 日後では約 150 倍まで上昇した。アルブミン遺伝子発現は 3 日後から増加していることを考え合わせると、この培養での HepG2 細胞におけるアルブミンの転写活性を c/EBP α が直接促進しているのではないかと考えられる。実際、c/EBP α はアルブミン遺伝子の発現を促進しうることが別の実

験系で報告されている (16)。以上の結果から、CBD-CAS 固定化ハニカムコラーゲン足場材料での培養は、肝細胞の機能性を向上させていることが示された。

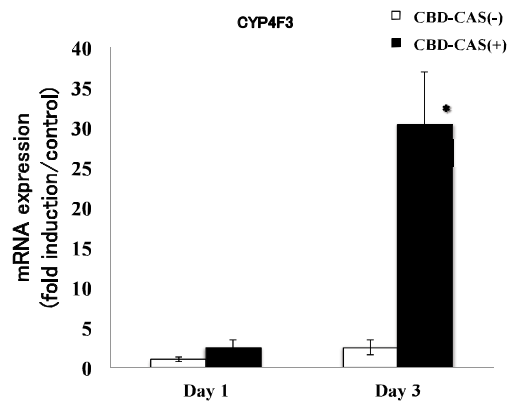
第3節: 3次元培養における CBD-CAS が薬物代謝遺伝子発現に与える影響

CBD-CAS 固定化ハニカムコラーゲン足場材料での培養が薬物代謝試験に適応可能かを検証するために、HepG2細胞のCYP酵素群の活性化をmRNAレベルで測定した。測定したCYP遺伝子は次の4種類である。CYP3A7はステロイド誘導体、グルココルチコイド、マクロライド系抗生物質の代謝に関与する。CYP4A11は高脂血症薬(ペルオキシゾーム誘導剤)、CYP4F3はバルプロ酸エイコサノイド類、脂肪酸の酸化である(17)。CYP27A1はビタミンD誘導体の代謝に関与している。その結果を図4-6に示す。CBD-CAS固定化ハニカムコラーゲン足場材料上のHepG2細胞は、CBD-CAS非固定化に比べCYP3A7では約25倍、CYP4F3では約12.5倍、CYP27A1では約14.7倍、CYP4A11では約2.4倍高い発現が見られた。これらの結果はCBD-CAS固定化ハニカムコラーゲン足場材料での培養によりCYP酵素群の発現が向上したことを示している。したがって、CBD-CAS固定化ハニカムコラーゲン足場材料での培養は薬物代謝試験に適応できる可能性が見いだされたと考える。

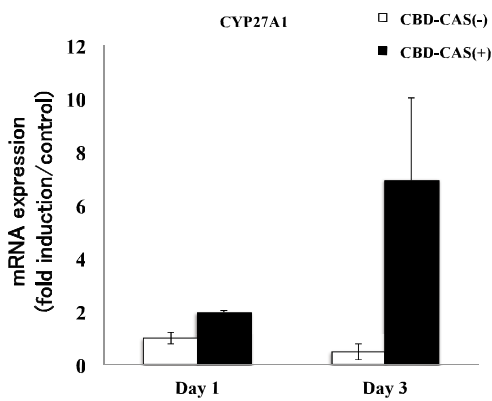
A)



B)



C)



D)

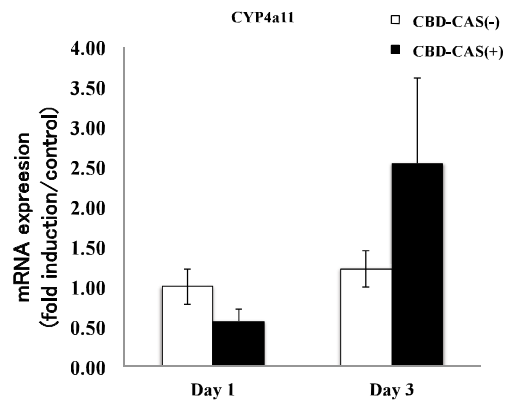


図 4-6 : HepG2 細胞の CYP 遺伝子発現における CBD-CAS 固定化ハニカムコラーゲン足場材料の効果の比較 HepG2 細胞を播種後 1, 3 日目にリアルタイム PCR で CYP3A7 (A), CYP4F3 (B), CYP27A1 (C), CYP4A11 (D) を測定した。黒いバーは CBD-CAS 固定化したハニカムコラーゲン足場材料 (CBD-CAS(+))、白いバーはハニカムコラーゲン足場材料 (CBD-CAS(-)) を示す。ハニカムコラーゲン足場材料での培養 1 日目のサンプルをコントロールとした。データは、GADPH 遺伝子発現を用いて補正した。

第4節：考察

CBD-CAS 固定化ハニカムコラーゲン足場材料での培養法は、コラーゲン培養法よりさらに優れた培養法であると考えられる。細胞外マトリクスには様々な物質で構成されており、その細胞外環境から受け取る情報によって細胞が増殖、分化など制御されている。

アルブミン発現に直接的関与する転写因子として $\text{NHF4}\alpha$ や $\text{c/EBP}\alpha$ が知られているが、実際は細胞機能全体の遺伝子発現に関与するシグナル伝達転写亢進に関係している (18)。CBD-CAS からのインテグリンシグナル伝達も同じように多くの遺伝子のシグナル伝達転写亢進に関係していると予想される。 $\text{c/EBP}\alpha$ の転写活性の上昇でアルブミン遺伝子発現は上昇する (19,20)。

CBD-CAS 固定化ハニカムコラーゲン足場材料での培養では、 C/EBP は1日目でコントロールと比較して約40倍上昇した。3日目ではさらに約150倍まで上昇した。アルブミン遺伝子発現は3日目から発現が増加している。この結果は、CBD-CAS によりアルブミン遺伝子の転写活性を $\text{c/EBP}\alpha$ が直接促進していることを示唆している。肝細胞特異的な転写因子が上昇していることが、 CYP 遺伝子の発現も上昇に関与しているものと思われる。

CBD-CAS 固定化ハニカムコラーゲンでの培養による CYP 酵素群の発現上昇は、CBD-CAS を固定化してない条件に比べ CYP3A7 では約25倍、 CYP27A1 では約14.7倍であった。ある内皮細胞共培養系ではコラーゲン培養皿における肝細胞単層培養との比較では CYP3A7 にて約20倍、 CYP27A1 では約1.3倍発現が見られた (21)。この内皮細胞共培養系とは培養日数と比較条件が異なるが

CYP 発現上昇率は CBD-CAS 固定化ハニカムコラーゲンでの培養が共培養よりも高いことを示している。以上これらの事から CBD-CAS をハニカムコラーゲン足場材料での肝細胞培養法は薬物代謝試験に適応できる可能性があることが示された。

以上、本章の結果から CBD-CAS 固定化ハニカムコラーゲン足場材料は *in vitro* において HepG2 細胞の機能を向上させたことから、薬物代謝試験にも応用できる可能性が見出され CBD-CAS は 3 次元環境での肝細胞培養に有効であることが示唆された。

第 5 節：実験方法

ハニカムコラーゲン足場材料での培養法

ハニカムコラーゲンスポンジ(高研)を、PBS(-)に無菌的に一晚浸漬する。遠心分離機にて 100rpm、10 分間、脱泡する。PBS(-)を抜き取り、96 穴プレートに、ハニカムコラーゲンスポンジをいれ、ピンセットにて残った気泡を抜く。CBD-CAS を、使用濃度にて添加し、CO₂ インキュベータにて 2 時間静置する。PBS(-)で 3 回洗浄し、HepG2 細胞を、培地にて懸濁し、5.0 X10⁵ cells/well の濃度で播種する。CO₂ インキュベータ内で、10rpm にて 3 時間攪拌する。攪拌後、静置培養する。

電子顕微鏡観察

HepG2 細胞を CBD-CAS 固相化ハニカムコラーゲンにて 2 日間培養後、

4%PFA-PBSにて固定し、TI blue solution(nissin EM corporation)にてマニュアルに従って染色した。ハニカムコラーゲン足場材料表面は、Miniscope^B TM7070(HITACHI, Japan)を用いて観察した。

第6節 まとめ

本章では、CBD-CAS 固定化した3次元環境の肝細胞への有効性を検証した。2次元培養に比べ3次元培養のアルブミン mRNA 発現は約40倍近く高い発現が見られた。3次元構造は肝細胞のアルブミン発現に影響することが示唆された。ハニカムコラーゲン足場材料を使い CBD-CAS 固定化ハニカムコラーゲン足場材料を作製し、CBD-CAS 非固定化コラーゲン足場材料との比較検証を行った。アルブミン遺伝子発現は培養3日目約6.6倍増加していた。HNF4 α では約3倍上昇した。c/EBP α では1日目約40倍上昇し、3日目では約150倍まで上昇した。CBD-CAS 固定化コラーゲン足場材料での培養におけるアルブミンの転写活性をc/EBP α が直接促進しているのではないかと考えられる。CYP 遺伝子群の発現においては、CBD-CAS 固定化ハニカムコラーゲン上のHepG2細胞は、CBD-CAS 非固定化に比べCYP3A7では約25倍、CYP4F3では約12.5倍、CYP27A1では約14.7倍、CYP4A11では約2.4倍高い発現が見られた。

本章の結果より、CBD-CAS 固定化ハニカムコラーゲン足場材料での培養は薬物代謝試験にも応用できる可能性が見出された。

参考文献

1. Harunaga J S., Yamada K M. Cell-matrix adheasions in 3D. *Matrix Biol.* 30(7-8), 363-368, 2011.
2. Pampaloni F., Stelzer E H., Masotti A. Three-dimensional tissue models for drug discovery and toxicology. *Recent Pat. Biotechnol.* 3(2), 103-117, 2009.
3. Yamada K M., Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell.* 130, 601-610, 2007.
4. Hamilton G A., Jolley S L., Gilbert D., Coon D J., Barros S., LeCluyse E L. Regulation of cell morphology and cytochrome P450 expression in human hepatocytes by extracellular matrix and cell-cell interactions. *Cell Tissue Res.* 306(1), 85-99, 2001.
5. Bokhari M., Carnachan R J., Cameron N R., Przyborski S A. Culrture of HepG2 liver cells on three dimentional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge. *J. Anat.* 211, 567-576, 2007.
6. Gabriel E., Schievenbusch S., Kolossov E., Hengstler J G., Rotshteyn T., Bohlen H., Nierhoff D., Hescheler J., Drobinskaya I. Differentiation and selection of hepatocyte precursors in suspension spheroid culture of transgenic murine embryonic stem cells. *PLoS One.* 7(9), e44912, 2012.

7. Pereira-Rodrigues N., Poleni P E., Guimard D., Arakawa Y., Sakai Y., Fujii T. Modulation of hepatocarcinoma cell morphology and activity by parylene-c coating on PDMS. *PloS One*, 5(3), e9667, 2010.
8. Chang T T., Hughes-Fulford M. Molecular mechanisms underlying the enhanced functions of three-dimensional hepatocyte aggregates. *Biomaterials*. 35(7), 2162-2171, 2014.
9. Pampaloni F., Reynaud E G., Stelzer E H. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(10), 839-845, 2007.
10. Meli L., Jordan E T., Clark D S., Linhardt R J., Dordick J S. Influence of a three-dimensional, microarray environment on human Cell culture in drug screening systems. *Biomaterial*. 33, 9087-9096, 2012.
11. Berthiaume F., Moghe P V., Toner M., Yarmush M L. Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness : hepatocytes cultured in a sandwich configuration. *FASEB*. 10, 1471-1484, 1996.
12. Dunn J C., Yarmush M L., Koebe H G., Tompkins R G. Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB. J.* 3, 174 -177, 1989.
13. Landry J., Bernier D., Ouellet R., Goyette R., Marceau N. Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: Histotypic reorganization, biomatrix

- deposition, and maintenance of functional activities. *J. Cell Biol.* 101, 914-923, 1985.
14. Itho H., Aso Y., Furuse M., Noishiki Y., Miyata T. A honeycomb collagen carrier for cell culture as a tissue engineering scaffold. *Artificial Organs.* 25(3), 213-217, 2001.
15. Bader A., Rinkes I H., Closs E I., Ryan C M., Toner M., Cunningham J M., Tompkins R G., Yarmush M L. A stable long-term hepatocyte culture system for studies of physiologic processes: cytokine stimulation of the acute phase response in rat and human hepatocytes. *Biotechnol. Prog.* 8, 219-225, 1992.
16. Schrem H., Klempnauer J., Borlak J. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part II: the C/EBPs and D site-binding protein in cell cycle control, carcinogenesis, circadian gene regulation, liver regeneration, apoptosis, and liver-specific gene regulation. *Pharmacol. Rev.* 56(2), 291-330, 2004.
17. 中川 俊人. In vitro 試験からのヒト体内動態予測. *日薬理誌*, 135, 84-86, 2010.
18. Desvergne B., Michalik L., Wahli W. Transcriptional Regulation of Metabolism. *Physiol. Rev.* 86, 465-514, 2006.

19. Friedman A D., Landschulz W H., McKnight S L. CCAAT/enhancer binding protein activates the promoter of the serum albumin gene in cultured hepatoma cells. *Gene Dev.* 3, 1314-1322, 1989.
20. Tan E H., Ma F J., Gopinadhan S., Sakban R B., Wang N D. C/EBP α knock-in hepatocytes exhibit increased albumin secretion and urea production. *Cell Tissue Res.* 330, 427-435, 2007.
- Ohno M, Motojima K, Okano T, Taniguchi A. Up-regulation of drug-metabolizing enzyme genes in layered co-culture of a human liver cell line and endothelial cells. *Tissue Eng. Part A.* 14(11), 1861-1869, 2008.

第五章 総括

第1節：結論

本研究の目的は、薬物代謝試験適合のために肝細胞機能向上を目指すことである。そのために、生体内環境を模倣する培養系とは異なる新しいコンセプトの培養系の構築を試みた。すなわち、細胞外からのシグナルを強制的に活性化することで肝細胞の機能を向上させようとするものである。そこで、以下の仮説を立てた。細胞外からインテグリン-ナノクラスタを形成させ、より強くシグナル伝達を行わせることで肝細胞の機能は向上するという仮説である。この仮説を立証するために以下の方法で検証した。新規キメラタンパク質 **CBD-CAS** をコラーゲン足場材料に固定化し、**HepG2** 細胞の機能向上とそのメカニズムを検討した。その結果、

- 1) **CBD-CAS** を発現、精製した。
- 2) **CBD-CAS** をコラーゲン足場材料に固定化することでアルブミン発現が上昇した。
- 3) **CBD-CAS** をコラーゲン足場材料に固定化することでインテグリンのクラスタ化が確認された。
- 4) **CBD-CAS** をコラーゲン足場材料に固定化することで **FAK** のリン酸化が上昇しシグナル伝達の活性化が見られた。
- 5) **CBD-CAS** をハニカムコラーゲン足場材料に固定化することで **CYP** 遺伝子の発現が上昇した。

以上の結果から、**CBD-CAS** でインテグリン-ナノクラスタ形成を促進することでより強いシグナル伝達が行われ、肝細胞機能が向上し、薬物代謝試験に適合する可能性が見いだされた。

第2節：今後の研究課題、展望

*In vitro*での肝細胞機能減少は、薬物代謝試験にとって大きな問題であり第一に検討すべき事項である。本研究にて**CBD-CAS**固定化ハニカムコラーゲン足場材料による培養法はインテグリン-ナノクラスタを介したシグナル伝達の強制的活性化により肝細胞の機能が向上し薬物代謝試験に適合できる可能性が示された。次に薬物代謝酵素活性は生体と同等である事が重要である。**CBD-CAS**固定化ハニカムコラーゲン足場材料による培養法は、生体の模倣によるものではなく人工的に一部の機能を向上させているために全体的な肝細胞機能について検証する必要がある。そのため**CBD-CAS**固定化ハニカムコラーゲン足場材料による培養法においても薬物によるCYP誘導試験での誘導剤暴露によるCYPmRNA発現量や酵素活性、タンパク質発現量測定やCYP遺伝子発現パターンによるCYPの同定試験など薬物代謝酵素活性について検証すべきであると考えられる。

本論文では、**CBD-CAS**によるインテグリンシグナル伝達活性を強化することにより肝細胞機能が向上した。しかし総合的な肝細胞機能を生体に近い機能レベルまで上げるにはまだ不十分である。細胞膜上では、インテグリンは、成長因子受容体とのクロストークが存在し細胞機能調節を **CBD-GF** は、**CBD** に肝細胞に適した成長因子を融合したキメラタンパク質である。この **CBD-GF** をコ

ラーゲン3次元構造物にアンカリングすることで、成長因子による肝細胞内シグナル伝達に持続性を持たせることとインテグリンとのクロストークが可能となる。

将来的にはCBD-CASコラーゲン足場材料にCBDと成長因子を融合した新規キメラタンパク質を固相化した新規培養基を構築しCBD-CASと固相化した成長因子による共クラスター形成を介したインテグリンと成長因子受容体とのクロストークによる肝機能向上を目指す。図5-1にCBD-CASコラーゲン足場材料を用いた新規培養基の構築を示す。

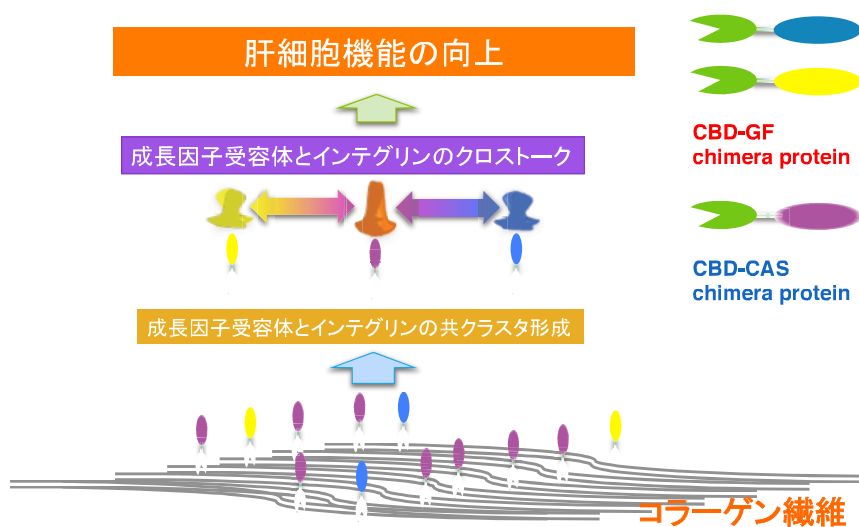


図 5-1 CBD-CAS コラーゲン足場材料を用いた新規培養基の構築

謝辞

本研究は、著者が早稲田大学理工学術院先進理工学研究科後期博士課程在学中に、同大学先進理工学部谷口彰良教授の指導のもとに行ったものである。

本研究をすすめるにあたり、熱心なご指導を頂いた先進理工学研究科ナノ理工学専攻 谷口彰良教授に深く感謝の意を表します。

本論文作成に当たり、審査委員として多くのご助言を頂きました庄子習一教授、谷井孝至教授、国立研究開発法人 物質・材料研究機構 中西淳MANA独立研究者 には深く感謝いたします。また、博士課程への進学にわたる多大なご支援を賜りました国立研究開発法人 物質・材料研究機構 田口哲志 MANA研究者、山崎智彦 MANA研究者、貝塚芳久MANA研究者に深く感謝いたします。また、多くの示唆を頂いた国立研究開発法人 物質・材料研究機構 細胞材料相互作用グループの皆様に感謝します。本研究では、多くのご支援とご指導をいただきました、物質・材料研究機構 ナノテクノロジー融合ステーションの箕輪貴司主幹エンジニアならびに同ステーションでご支援賜りました方々に深く感謝しております。

最後に、博士課程に進むことに対し、温かく見守りそして応援してくれた夫と娘に対しては深い感謝の意を表して謝辞と致します。

研究業績書

学術論文

- 1) ○Induction of albumin expression in HepG2 cells using immobilized amplified recombinant fibronectin protein

In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal 49, 400-407, 2013

Y. Nishida, A. Taniguchi.

- 2) ○A three-dimensional collagen-sponge-based culture system coated with simplified recombinant fibronectin improves the function of a hepatocyte cell line

In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal in press.

Y. Nishida, A. Taniguchi.

- 3) Nuclease-resistant immunostimulatory phosphodiester CpG oligodeoxynucleotides as human Toll-like receptor 9 agonists
BMC Biotechnology. 11,88-96, 2011

W. Meng, T. Yamazaki, Y. Nishida, N. Hanagata

- 4) Preparation and biological evaluation of hydroxyapatite-coated nickel-free high-nitrogen stainless steel
Science and Technology of Advanced Materials (STAM) 13, 64213-64221, 2013
M. Sasaki, M. Inoue, Y. Katada, Y. Nishida, A. Taniguchi, S. Hiromoto, T. Taguchi

学会発表

- 1) キメラタンパク質を用いた細胞固定化基質での肝細胞の機能化

日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム2012

2012年11月26,27日 仙台

西田有紀、谷口彰良

- 2) Activation of Hepatocyte function using immobilized simplified recombinant fibronectin protein

The 4th Asian Biomaterials Congress

29-29 June 2013 Hong Kong

Y. Nishida, A. Taniguchi

2) Activation of Hepatocyte function using immobilized simplified

recombinant fibronectin protein

NANOMED 2014

February 2014 London UK

Y. Nishida, A. Taniguchi

4) ハイドロキシアパタイト結合ペプチドの検索

つくば医工連携フォーラム 2012

2012年1月18日 つくば

山崎智彦, 張慧杰, 西田有紀, 生駒俊之, 花方信孝