

氏 名	(ささき あきら) 佐々木 玲
授 与 学 位	博士 (生物資源科学)
学 位 授 与 年 月 日	平成29年 3月22日
学 位 授 与 の 根 拠 法 規	学位規則第4条第1項
研 究 科 専 攻	秋田県立大学大学院生物資源科学研究科 博士後期課程 生物資源科学専攻
学 位 論 文 題 目	ヒト肝細胞の形成過程における リポタンパク質産生能の獲得機構に関する研究
指 導 教 員	教授 小林 正之
論 文 審 査 委 員	主査 教授 小林 正之 副査 教授 村田 純 准教授 春日 和 特別 理事 小嶋 郁夫

論 文 内 容 要 旨

緒言

肝臓は、糖や脂質、薬物などの代謝に関わる中心的臓器であり、その機能の多くは肝実質細胞（以下、肝細胞）が担っている。新規薬物の探索や薬物の毒性試験などの創薬研究の分野において、肝臓を生体外で再現した肝臓モデルが求められている。従来から肝臓モデルの構築に用いられてきたヒト初代培養肝細胞は、慢性的な供給不足や機能を維持したままの継代培養が困難といった課題が挙げられる。そこで近年、ES細胞やiPS細胞などから肝細胞を分化誘導する試みが行われている。しかしながら、未だ機能的にヒト初代培養肝細胞と同等な分化誘導肝細胞は得られていない。

脂質の代謝は肝細胞が担う重要な機能の一つである。脂質代謝のバランスが崩れ、血液中の脂質が増減した状態を脂質異常症という。脂質異常症は、動脈硬化を引き起こし、心筋梗塞や脳梗塞などの血管系疾患のリスク要因となる。血液中において中性脂肪(TG)およびコレステロールなどの脂質は、親水性のアポリポタンパク質およびリン脂質に包まれたリポタンパク質として存在する(図1)。リポタンパク質は、小腸上皮細胞および肝細胞において合成され、粒子の大きさや密度の違いにより、カイロミクロン(CM)、超低密度リポタンパク質(VLDL)、低密度リポタンパク質(LDL)、高密度リポタンパク質(HDL)の主要4分画に分類される(図2)。肝細胞で合成されるVLDLおよびLDLはそれぞれ、肝臓から末梢組織へのTGおよびコレステロールの輸送に関与し、HDLは末梢組織から肝臓へのコレステロールの逆転送に関与する(図3)。肝細胞はその発生過程においてリポタンパク質産生能を獲得するが、その分子機構について未だ不明な点が多い。そこで本研究では、肝細胞の形成過程におけるリポタンパク質産生能の獲得機構の解明を目的として行った。そこでまず、由来の異なる種々のヒト培養肝細胞株において、既知の肝細胞分化マーカー遺伝子のmRNA発現解析およびそれぞれのヒト培養肝細胞株が産生するリポタンパク質の詳細な解析を行い、肝細胞の分化段階とリポタンパク質産生能の関連性を検証した(実験1)。次に、肝細胞への分化を誘導する転写因子の発現によ

る、幹細胞から肝細胞への分化とリポタンパク質産生に及ぼす影響を検証した(実験2)。

実験1：分化段階の異なるヒト培養肝細胞株におけるリポタンパク質の解析

ヒト肝臓株化細胞である HepG2 細胞において、酪酸ナトリウムによる分化誘導処理は、肝特異的転写因子遺伝子群および脂質代謝関連遺伝子群の発現を亢進させることから、肝細胞の分化とリポタンパク質産生を含む脂質代謝に関連が予測された。そこではじめに、由来の異なる種々のヒト培養肝細胞株を既知の肝細胞分化マーカー遺伝子の mRNA 発現パターンに従って分類し、それぞれの分化段階を評価した。次に、ヒト培養肝細胞株が産生するリポタンパク質を詳細に解析し、肝細胞の分化段階とリポタンパク質産生能の関連を検証した。

【方法】リアルタイム RT-PCR 法により、ヒト培養肝細胞株 (HLE 細胞, HLF 細胞, HepG2 細胞, HuH-7 細胞および HepaRG 細胞) およびヒト初代培養肝細胞 (HC 細胞) における肝細胞分化マーカー遺伝子群の mRNA 発現解析を行った。次に、肝細胞分化マーカー遺伝子の mRNA 発現パターンの類似性に基づいたクラスター解析を行い、それぞれの肝細胞を分類した。さらに、LipoSEARCH 法により、それぞれの肝細胞の培養上清に含まれるリポタンパク質を詳細に解析した。また、リアルタイム RT-PCR 法により、それぞれの培養肝細胞株における脂質代謝関連遺伝子群の mRNA 発現解析を行った。

【結果および考察】HLE 細胞および HLF 細胞における肝特異的転写因子 *HNF4α* および *HNF1α*, 血清タンパク質 *ALB* および *Tf* の mRNA 発現量は、他の培養肝細胞株と比較して著しく低いことが明らかとなった(図4)。また、HepaRG 細胞および HC 細胞における薬物代謝酵素遺伝子 *CYP2C9* および *CYP3A4* の mRNA 発現量は、他の培養肝細胞株と比較して有意に高いことが明らかとなった(図5)。さらに、これらの mRNA 発現パターンの類似性に基づいたクラスター解析によって、それぞれの培養肝細胞株は3つのグループ、低分化型 (HLE, HLF), 中分化型 (HepG2, HuH-7), 高分化型 (HepaRG, HC) に分類された(図6)。

それぞれの培養上清に含まれるリポタンパク質を解析した結果、中分化型 (HepG2, HuH-7) および高分化型 (HepaRG, HC) では、すべてのリポタンパク質画分においてピークが検出されたことにより、リポタンパク質を産生することが判明した(図7)。さらに、それぞれが産生するリポタンパク質画分の割合を検証したところ、高分化型では VLDL 画分が多いのに対し、中分化型では LDL 画分が多いことが明らかとなった(図8)。このことから、中分化型の産生するリポタンパク質の大きさは、高分化型と比較して、小さいことが判明した。一方、低分化型の培養上清からはいずれのリポタンパク質画分においてもピークが検出されなかった(図7)。また、低分化型における脂質代謝関連遺伝子群の mRNA 発現量は、中分化型および高分化型と比較して低く(図9)、特にリポタンパク質の形成に関わる遺伝子群の mRNA 発現量が著しく低かった(図10)。このことから、低分化型 (HLE, HLF) では、リポタンパク質が形成されていないと考えられる。以上の結果から、肝細胞はその分化段階によりリポタンパク質の産生能および性状に違いがあることが明らかとなり、リポタンパク質の解析が肝細胞の分化段階を判断する新たな分化マーカーになることが示唆された。

実験2：肝細胞核因子の強制発現がリポタンパク質産生に与える影響

肝細胞での VLDL の合成には、ApoB100 (アポリポタンパク質 B100) および MTP (ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質) の発現が必須である。これらの発現は、肝細胞への分化に深く関与する HNF (肝細胞核因子) 群の制御下にあることが報告されて

いる。しかしながら、HNF 群が誘導する肝細胞への分化とリポタンパク質産生の関連について着目した研究はこれまで行われていない。そこで、ヒト間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞において HNF 群を強制発現させることにより、HNF 群が肝細胞への分化およびリポタンパク質産生に与える影響について検証した。

【方法】肝細胞核因子である FOXA2, HNF4 α および HNF1 α をそれぞれ単独で強制発現させた UE7T-13 細胞および HNF4 α /HNF1 α を同時に強制発現させた UE7T-13 細胞を樹立し、細胞の形態変化およびリアルタイム RT-PCR 法により、それぞれの細胞における肝細胞分化マーカー遺伝子群 (*AFP*および *ALB*) および薬物代謝酵素遺伝子 (*CYP*) 群の mRNA 発現を検証した。また、細胞内および培養上清に含まれる脂質の定量、加えてウエスタンブロット法およびリアルタイム RT-PCR 法により、脂質代謝関連遺伝子群の発現解析を行った。

【結果および考察】HNF4 α および HNF1 α の発現により、細胞の形態が紡錘状から敷石状に変化し (図 11), *AFP*の mRNA 発現が誘導された (図 12)。さらに、HNF1 α の発現は他の HNF 群の発現よりも *CYP*群の mRNA 発現を強く誘導した (図 13)。これらのことから、HNF1 α の発現が肝細胞への分化に与える影響が大きいことが示唆された。さらに、HNF4 α /HNF1 α の同時発現は、敷石状への細胞形態の変化や *AFP*の mRNA 発現誘導に加え、*ALB*の mRNA 発現を誘導し (図 12), *CYP*群の mRNA 発現をさらに強く誘導した (図 13)。これらのことから、HNF4 α /HNF1 α の同時発現は各 HNF の単独発現よりも、より強く肝細胞への分化を誘導すると考えられた。HNF1 α の単独発現および HNF4 α /HNF1 α の同時発現は、細胞内への脂質蓄積量を増加させた (図 14) が、培養上清における脂質量に影響はみられなかった (図 15)。これらのことから、いずれの HNF を発現させてもリポタンパク質産生能の獲得には至らないものの、HNF4 α /HNF1 α の同時発現によって HepG2 細胞と同等の脂質蓄積能を獲得することが示唆された。

HNF4 α および HNF1 α の単独発現はそれぞれ、*ApoB100*および *MTP*の mRNA 発現量を増加させた (図 16)。しかし、*ApoB100* および *MTP* タンパク質の発現を誘導するに至らなかった (図 17)。一方、HNF4 α /HNF1 α の同時発現は、*ApoB100*および *MTP*の mRNA 発現を共に増加させ (図 16), *ApoB100* タンパク質の発現誘導には至らなかったものの、*MTP* タンパク質の発現を誘導した (図 17)。これらの結果から、リポタンパク質産生能の獲得には、HNF4 α /HNF1 α の同時発現による *MTP* タンパク質の発現誘導に加え、さらなる肝細胞への分化関連遺伝子の導入などによる、*ApoB100* の発現誘導が必要であることが示唆された。

総括 (図 18)

本研究の結果から、分化段階が異なる肝細胞におけるリポタンパク質の産生能、また産生されるリポタンパク質の性状に差異があることを見出し、肝細胞の産生するリポタンパク質の解析が肝細胞の分化段階を判断する新たな分化マーカーになることを提示した。また、ヒト間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞における HNF4 α /HNF1 α の同時発現は、肝細胞への分化を強く誘導し、細胞内への脂質の蓄積を促進することを見出した。さらに、HNF4 α /HNF1 α の同時発現により、*MTP* タンパク質の発現が誘導されることを明らかにした。しかしながら、HNF4 α /HNF1 α の同時発現のみでは、十分な *ApoB100* タンパク質の発現誘導には至らなかったことにより、リポタンパク質産生能の獲得にはさらなる *ApoB100* の発現誘導が必要であると考えられる。以上のように、ヒト肝細胞の形成過程におけるリポタンパク質産生の獲得機構に関する新たな知見が示された。



図 1. リポタンパク質の構造

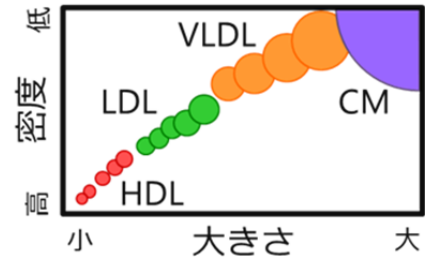


図 2. リポタンパク質の種類

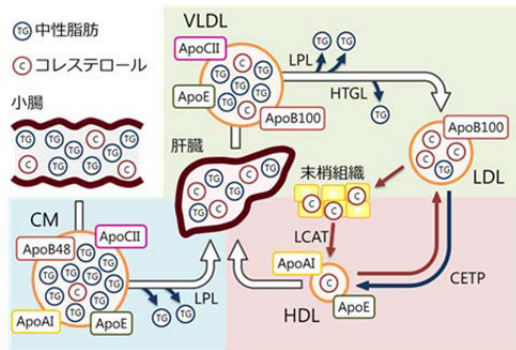


図 3. リポタンパク質の代謝

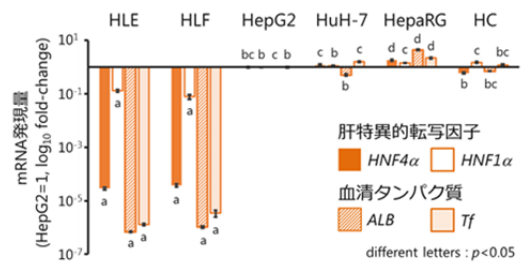


図 4. ヒト培養肝細胞株における肝細胞分化マーカー遺伝子群の mRNA 発現

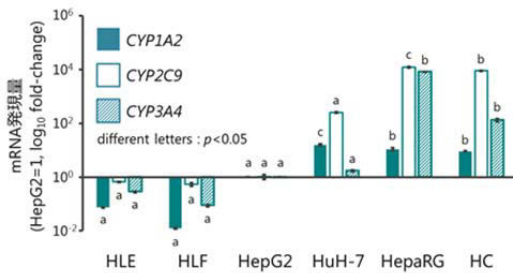


図 5. ヒト培養肝細胞株における薬物代謝酵素遺伝子群の mRNA 発現

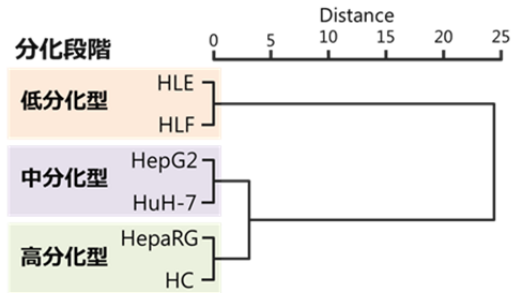


図 6. ヒト培養肝細胞株のクラスター解析

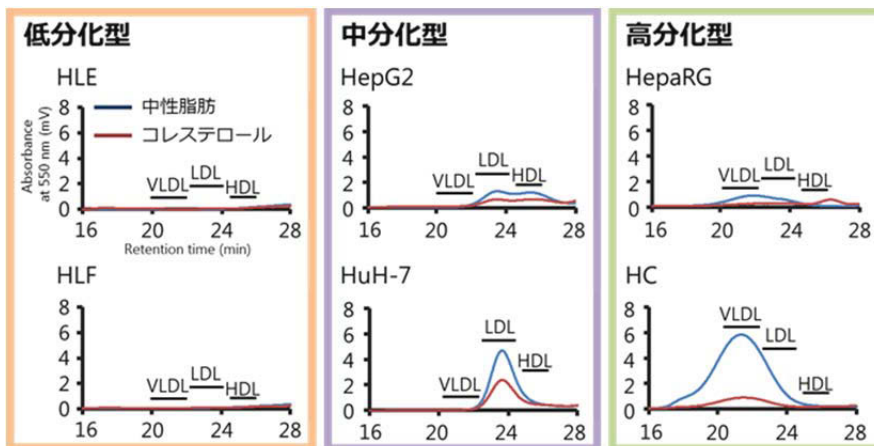


図 7. ヒト培養肝細胞株における培養上清のクロマトグラム (LipoSEARCH 法)

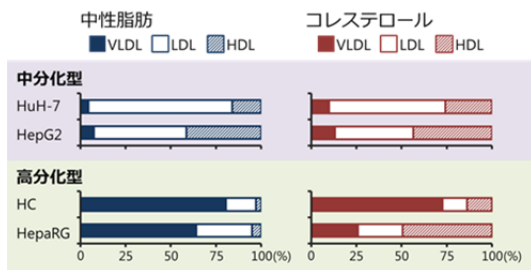


図 8. 各リポタンパク質画分の割合

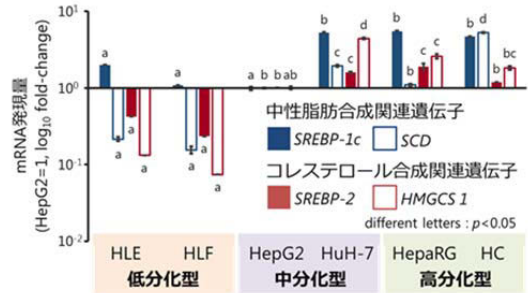


図 9. ヒト培養肝細胞株における脂質合成関連遺伝子群の mRNA 発現

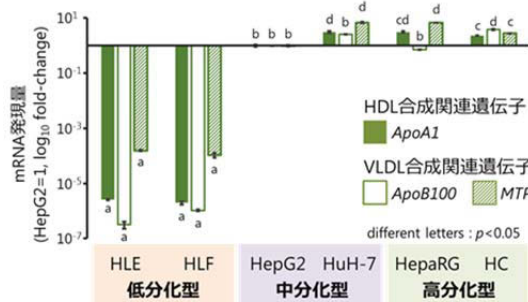


図 10. ヒト培養肝細胞株におけるリポタンパク質合成関連遺伝子群の mRNA 発現

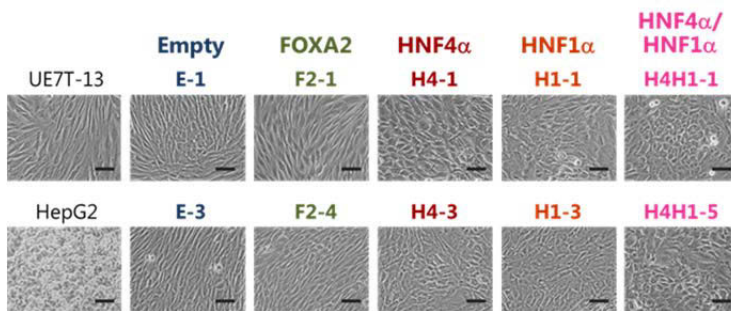


図 11. HNF 発現株の細胞形態

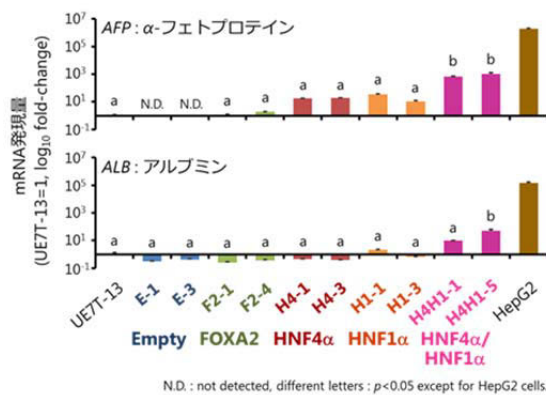


図 12. HNF 発現株における肝細胞分化マーカー遺伝子群の mRNA 発現

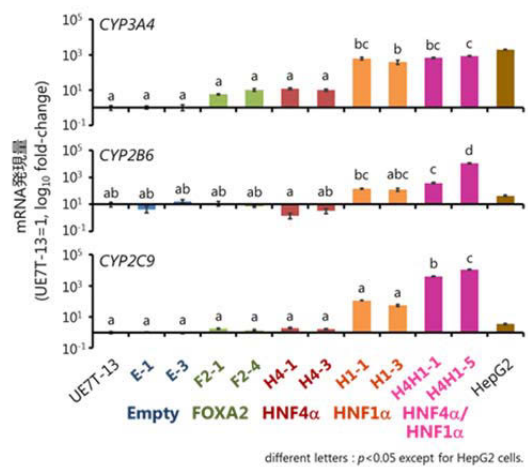


図 13. HNF 発現株における薬物代謝酵素遺伝子群の mRNA 発現

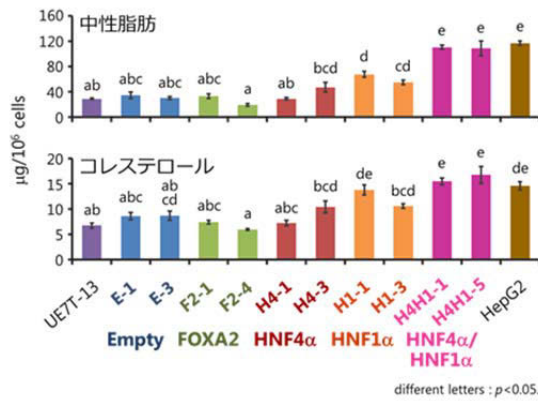


図 14. HNF 発現株における細胞内脂質の蓄積量

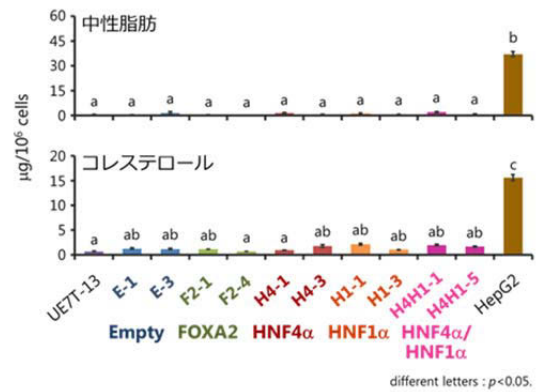


図 15. HNF 発現株における培養上清の脂質量

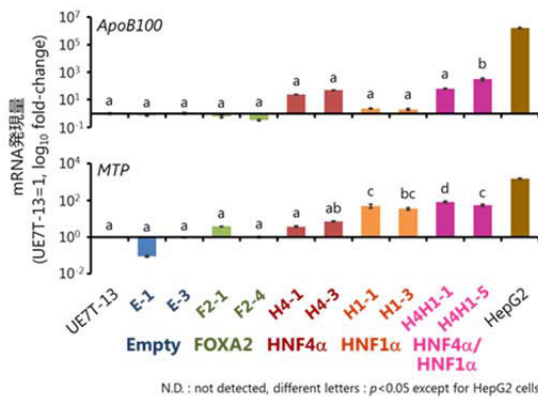


図 16. HNF 発現株における *ApoB100* および *MTP* mRNA 発現量

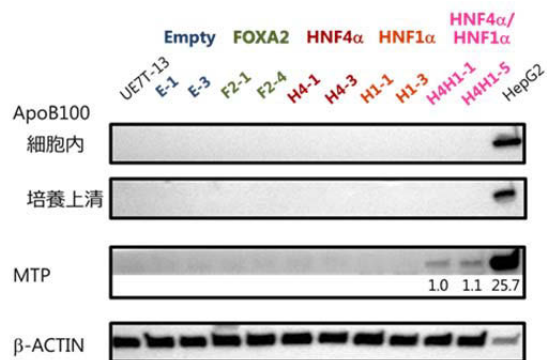


図 17. HNF 発現株における *ApoB100* および *MTP* タンパク質の発現

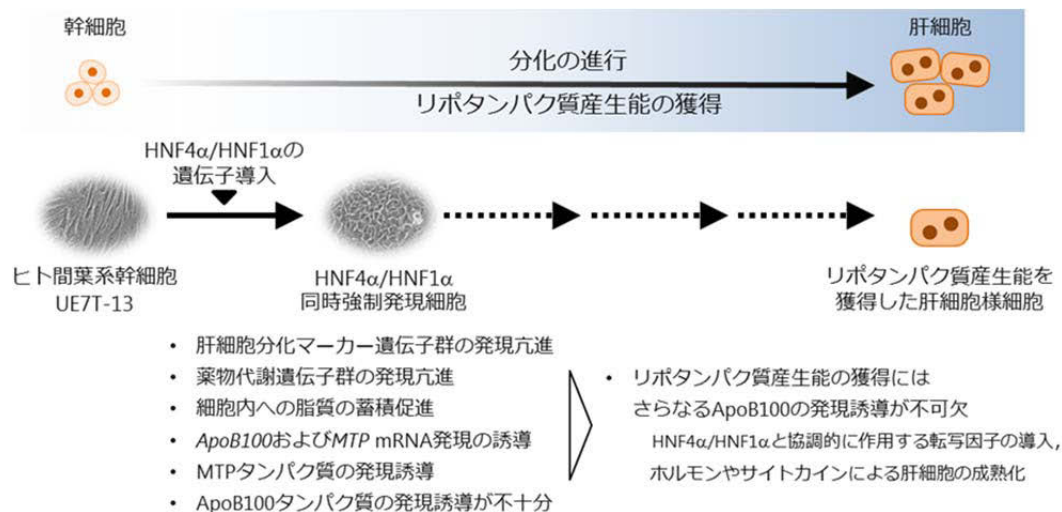


図 18. 考察：HNF4α/HNF1αの同時発現が幹細胞から肝細胞への分化とリポタンパク質産生に与える影響

論文審査結果要旨

研究概要及び審査概要

中性脂肪やコレステロールなどの脂質は、リポタンパク質を形成することにより血中を循環する。脂質代謝の中心的な役割を担う肝細胞は、その形成過程においてリポタンパク質の産生能を獲得するが、詳細は不明である。そこで本研究は、これを明らかにすることを目的として実施した。

実験 1 として、ヒト培養肝細胞株 (6 種) を低分化型、中分化型、高分化型に分類した。この分類に基づき、低分化型はリポタンパク質を産生しないこと、中分化型と高分化型が産生するリポタンパク質の性状に違いがあることを示した。すなわち、分化段階によって、肝細胞によるリポタンパク質産生能に相違があることを明らかにした。

実験 2 として、遺伝子工学的手法を用い、転写因子である HNF (肝細胞核因子) タンパク質群による、肝細胞の形成およびリポタンパク質産生の誘導について検証した。ヒト培養間葉系幹細胞株において、HNF4 α /HNF1 α タンパク質を同時に強制発現させることにより、肝細胞への分化を誘導できることを示した。またこの時、リポタンパク質は産生されなかったものの、細胞内の脂質蓄積量が顕著に増加することを明らかにした。これらの成果より、リポタンパク質産生能の獲得には、HNF4 α /HNF1 α タンパク質に加えて、さらなる要因による ApoB100 遺伝子の活性化が必要であることを提唱するに至った。

本論文の公開審査会は平成 29 年 2 月 20 日に行われ、その後、審査員 4 名による判定を行った。その結果、論文の内容は博士学位論文として十分であり、また、公開審査会における発表、その後の質疑応答についても十分に満足ゆく内容であるものと判断した。

以上により、審査員は申請者が博士の学位を授与される資格があるものと認定した。