

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

Studies on the mechanisms regulating lipoprotein production  
during generation of human hepatocytes.

2017 年 3 月

佐々木 玲

Akira Sasaki

# 目次

目次	2
要約	7
第1章 序論	11
第2章 各実験に共通した材料および方法	24
(1) 大腸菌の培養	25
(2) 組換え DNA 操作	25
(3) 遺伝子導入用プラスミド DNA の調製	25
(4) 実験に用いたヒト細胞とヒト細胞株、およびその培養方法	25
(5) 培養細胞からの RNA 抽出と精製および cDNA 合成	27
(6) PCR 法	27
(7) リアルタイム PCR 法	27
(8) 統計処理	28
第3章 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産生の解析	50
緒言	51
材料および方法	57
結果	58
1) 肝細胞分化マーカー遺伝子群の発現解析	58
2) ヒト培養肝細胞株の培養上清に含まれる リポタンパク質プロファイルの解析	61
3) 脂質代謝関連遺伝子群の発現解析	64
考察	66
第4章 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	67
実験1 肝細胞核因子 FOXA2, HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ の単独強制発現が ヒト骨髓由来間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞の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	68
緒言	68
材料および方法	71
結果	75
1) HNF 単独強制発現ベクター導入細胞の樹立と HNF 群の発現解析	75

2) HNF 単独強制発現ベクター導入細胞の形態変化	78
3) HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における 肝細胞分化マーカー遺伝子群の発現解析	79
4) HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における脂質代謝の検証	83
5) HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における細胞内および培養上清に 含まれる中性脂肪およびコレステロールの定量	84
6) HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における ApoB100 および MTP の 発現解析	88
考察	91
 <b>実験 2 肝細胞核因子 HNF4<math>\alpha</math>および HNF1<math>\alpha</math>の同時発現が ヒト骨髓由来間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞の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</b>	
緒言	93
材料および方法	94
結果	98
1) HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の樹立と HNF 群の発現解析	98
2) HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の形態変化	101
3) HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の肝細胞分化マーカー遺伝子群の 発現解析	102
4) HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の脂質蓄積の検証	105
5) HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の細胞内および 培養上清に含まれる中性脂肪およびコレステロールの定量	106
6) HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の脂質代謝関連遺伝子群の 発現解析	110
考察	114
 <b>第 5 章 総括</b>	<b>116</b>
 <b>引用文献</b>	<b>128</b>
 <b>謝辞</b>	<b>140</b>

図 1.	肝臓を構成する細胞群	12
図 2.	マウスにおける肝発生	13
図 3.	液性因子による幹細胞から肝細胞様細胞の分化誘導法 (例)	14
図 4.	リポタンパク質の構造	15
図 5.	リポタンパク質の分類	15
図 6.	生体におけるリポタンパク質の代謝	17
図 7.	肝細胞における VLDL の産生	18
図 8.	LipoSEARCH 法 測定システム (ゲルろ過 HPLC)	20
図 9.	LipoSEARCH 法によるリポタンパク質のクロマトグラムデータ (例: ヒト血清)	20
図 10.	脂質代謝改善薬が HepG2 細胞のリポタンパク質産生に与える影響	21
図 11.	ジュンサイエタノールエキスが HepG2 細胞のリポタンパク質産生に与える影響	22
図 12.	酪酸ナトリウム処理が HepG2 細胞の産生するリポタンパク質に与える影響	54
図 13.	酪酸ナトリウム処理による HepG2 細胞の肝細胞分化マーカー遺伝子群および 脂質代謝関連遺伝子群の mRNA 発現量の変化	55– 56
図 14.	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 (A) および 薬物代謝酵素遺伝子群 (B) の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析)	59
図 15.	肝細胞分化マーカー遺伝子群および薬物代謝酵素遺伝子群の mRNA 発現パターン に基づいたクラスター解析 (Ward 法)	60
図 16.	ヒト培養肝細胞株の培養上清におけるリポタンパク質プロファイル	62
図 17.	ヒト培養肝細胞株が産生するリポタンパク質画分に含まれる脂質量 (A, B) と 総脂質量に対する各リポタンパク質画分に含まれる脂質量の割合 (C, D)	63
図 18.	ヒト培養肝細胞株における脂質合成関連遺伝子群 (A) および リポタンパク質合成関連遺伝子群 (B) の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析)	65
図 19.	FOXA2 強制発現ベクター (pMN1/FOXA2), HNF4 $\alpha$ 強制発現ベクター (pMN1/HNF4 $\alpha$ ) および HNF1 $\alpha$ 強制発現ベクター (pMN1/HNF1 $\alpha$ ) の構造	71
図 20.	HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における FOXA2 (A), HNF4 $\alpha$ (B) および HNF1 $\alpha$ (C) 遺伝子の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析)	76
図 21.	HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における FOXA2, HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ タンパク質の発現 (ウェスタンブロット解析)	77
図 22.	HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における細胞形態	78
図 23.	HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における肝細胞分化マーカー遺伝子群の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析)	80
図 24.	HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における薬物代謝酵素遺伝子群の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析)	82
図 25.	HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における Oil Red O 染色	83
図 26.	HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における中性脂肪の定量	85
図 27.	HNF 単独強制発現ベクター導入細胞におけるコレステロールの定量	87

図 28.	HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における <i>ApoB100</i> (A) および <i>MTP</i> (B) 遺伝子の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析) .....	89
図 29.	HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における <i>ApoB100</i> および <i>MTP</i> タンパク質の発現 (ウエスタンブロット解析) .....	90
図 30.	HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター (pMN1/HNF4 $\alpha$ -T2A-HNF1 $\alpha$ ) の構造.....	94
図 31.	HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における <i>FOXA2</i> (A), <i>HNF4<math>\alpha</math></i> (B) および <i>HNF1<math>\alpha</math></i> (C) 遺伝子の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析) .....	99
図 32.	HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における <i>FOXA2</i> , HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ タンパク質の発現 (ウエスタンブロット解析) .....	100
図 33.	HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における細胞形態.....	101
図 34.	HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における 肝細胞分化マーカー遺伝子群の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析) .....	102
図 35.	HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における薬物代謝酵素遺伝子群の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析) .....	104
図 36.	HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における Oil Red O 染色.....	105
図 37.	HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における中性脂肪の定量.....	107
図 38.	HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞におけるコレステロールの定量.....	109
図 39.	HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における <i>ApoB100</i> (A) および <i>MTP</i> (B) 遺伝子の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析) .....	110
図 40.	HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における <i>ApoB100</i> および <i>MTP</i> タンパク質の発現 (ウエスタンブロット解析) .....	111
図 41.	HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における脂質合成関連遺伝子群の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析) .....	112-113
図 42.	考察: HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ の同時発現による DGAT2 の発現誘導を介した 細胞内への中性脂肪の蓄積.....	115
図 43.	考察: ヒト肝細胞におけるリポタンパク質産生能を指標にした分化段階の評価...	119
図 44.	考察: HNF 単独強制発現が肝細胞への分化とリポタンパク質産生に与える影響...	121
図 45.	考察: HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ の同時発現が肝細胞への分化と リポタンパク質産生に与える影響.....	123
図 46.	考察: 肝細胞のリポタンパク質産生能獲得機構.....	124
図 47.	HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における C/EBP $\alpha$ 遺伝子の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析).....	126
図 48.	今後の展望: リポタンパク質産生能を獲得した分化誘導肝細胞の創出.....	127

表 1.	脂質異常症の診断基準(空腹時血糖).....	19
表 2.	Miniprep 法によるプラスミド DNA の抽出.....	29
表 3.	KOD -Plus- Neo による PCR 増幅.....	30
表 4.	Wizard® SV Gel and PCR clean-Up system による DNA の精製.....	31
表 5.	In-Fusion クローニングを用いたプラスミド DNA の構築.....	32
表 6.	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, ナカライテスク) の組成.....	33
表 7.	Williams' Medium E (Thermo Fisher Scientific) の組成.....	34
表 8.	哺乳動物細胞の凍結・融解.....	35
表 9.	オレイン酸含有培地による細胞培養.....	36
表 10.	Oil Red O 染色.....	37
表 11.	細胞内および培養液中の中性脂肪およびコレステロールの定量.....	38
表 12.	リポフェクション法による遺伝子導入と遺伝子安定発現株の樹立.....	39
表 13.	QuickGene RNA cultured cell kit S による全 RNA の抽出.....	40
表 14.	PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) による cDNA の合成.....	41
表 15.	リアルタイム PCR による mRNA の発現解析.....	42
表 16.	リアルタイム RT-PCR に用いたプライマー.....	43
表 17.	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動.....	45
表 18.	ウェスタンブロット解析.....	47
表 19.	HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター (pMN1/HNF4 $\alpha$ -T2A-HNF1 $\alpha$ ) の構築に 用いたプライマー.....	94

## 要約

### 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、未だヒト初代培養肝細胞と同等な機能を有する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。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。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。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。まず始めに、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（第3章）。次に、肝細胞への分化を誘導する転写因子の強制発現が、幹細胞から肝細胞への分化とリポタンパク質産生に及ぼす影響について検証した（第4章）。

### 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

ヒト肝臓株化細胞株である 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。ここではじめに、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、各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、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。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。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、これらの培養肝細胞株は 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。

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、すなわち VLDL, LDL および HDL 画分においてピークが検出されたことにより、これらのリポタンパク質を産生することが判明した。さらに、これら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 画分の割合が多かったことから、VLDL サイズのリポタンパク質を主に産生することが明らかとなった。一方、中分化型では、LDL 画分の割合が多く、LDL サイズのリポタンパク質を主に産生することが明らかとなった。このことから、高分化型 (HepaRG, HC) と中分化型 (HepG2, HuH-7) では産生するリポタンパク質の粒子サイズに違いがあることが判明した。また、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。さらに、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、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。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眼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 $\alpha$  および HNF1 $\alpha$  をそれぞれ単独で強制発現させた UE7T-13 細胞および HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  を同時に強制発現させた UE7T-13 細胞を樹立し、細胞の形態変化について検証した。またリアルタイム 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。さらに、細胞内および培養上清に含まれる脂質の定量、加えてウェ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 $\alpha$  および HNF1 $\alpha$  の発現により、細胞の形態が紡錘状から敷石状に変化し、AFP の mRNA 発現が誘導された。HNF1 $\alpha$  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。これらのことから、HNF1 $\alpha$  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 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  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、CYP 群の mRNA 発現をさらに強く誘導した。これらのことから、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  の同時発現は 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 $\alpha$  の単独発現および HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  の同時発現は、細胞内への脂質蓄積量を増加させたが、培養上清における脂質量に影響はみられなかった。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 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  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 $\alpha$  および HNF1 $\alpha$  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。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。一方、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  の同時発現は、ApoB100 および MTP の mRNA 発現を共に増加させ、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。これらの結果から、リポタンパク質産生能の獲得には、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  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 タンパク質の発現誘導が必要であることが示唆された。

## 総括

本研究の結果から，分化段階が異なる肝細胞において，リポタンパク質（VLDL，LDL ないしは HDL）の産生能，および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，肝細胞が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 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 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 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 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 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 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 タンパク質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。

## 第 1 章

### 序論

## 第1章 序論

### 1. 肝臓を構成する細胞群

肝臓は、右上腹部に位置する人体内で最大の臓器であり、エネルギーの代謝や貯蔵、有害物質の解毒、胆汁の生成・分泌など多岐にわたる生理的機能を有し、生体内代謝の中心的な役割を担っている。肝臓は、肝実質細胞（以下、肝細胞）および胆管上皮細胞に加え、クッパー細胞、肝星細胞、類洞内皮細胞などの多くの細胞から構成される（図1）。このうち肝臓全細胞中の60–70%を占める肝細胞は、単核もしくは2核細胞として存在し、糖や脂質、薬物の代謝や胆汁の生成など、主要な肝機能の多くを担っている。そのため、肝細胞は肝機能の研究において極めて重要な細胞といえる。

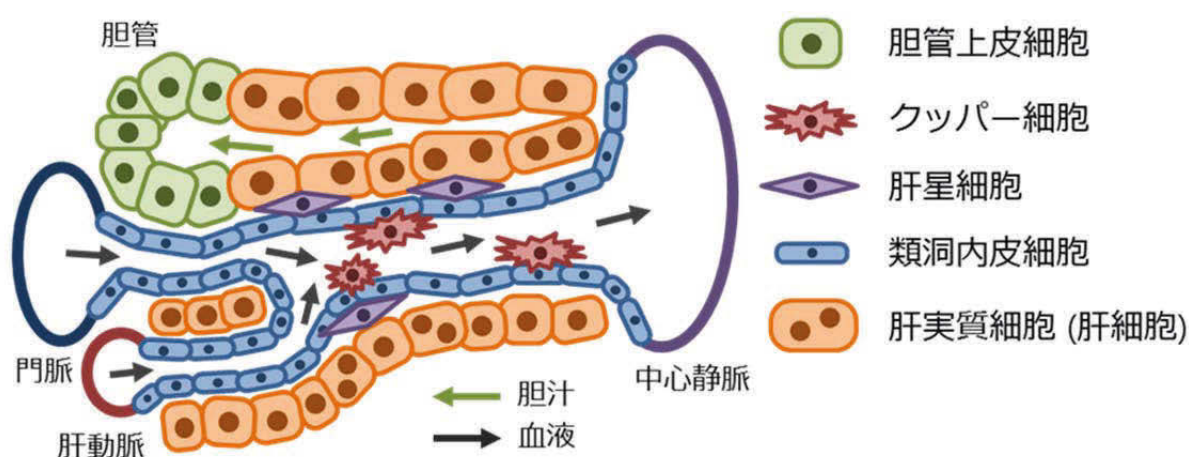


図1. 肝臓を構成する細胞群

### 2. 肝臓の発生過程

マウスにおける肝臓の発生（図2）は、胎生8日頃に前腸内胚葉が心臓中胚葉から分泌される線維芽細胞増殖因子 (FGF: fibroblast growth factor), 横中隔間充織から分泌される骨形成タンパク質 (BMP: bone morphogenetic protein) などの増殖因子の刺激を受け、胎生8.5–9.5日頃に肝芽細胞が形成されることで開始する [1, 2]。その後、肝芽細胞は、横中隔間充織や周りの内皮細胞から分泌される肝細胞増殖因子 (HGF: hepatocyte growth factor, [3, 4]) や肝芽細胞自身から分泌されるオンコスタチン M (OSM: oncostatin M, [5, 6]) などのシグナルを受け、胎生13.5–17.5日頃にかけて肝細胞への分化が進行する [7, 8]。

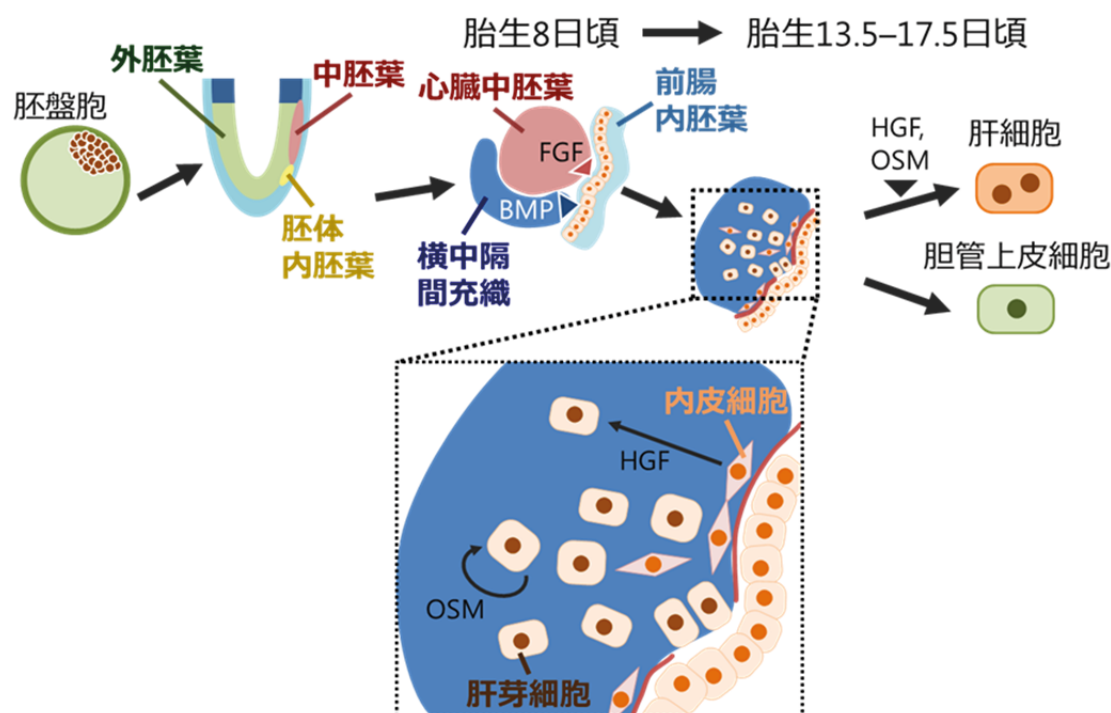


図 2. マウスにおける肝発生

### 3. 多能性幹細胞からの肝細胞様細胞の分化誘導

新規薬物の探索や薬物の毒性試験といった創薬研究の分野において、肝臓を *in vitro* で再現した肝臓モデルが求められている [9]。肝臓モデルの構築には正常かつ成熟した肝細胞が必要である。従来から肝臓モデルの構築に用いられているヒト初代培養肝細胞は、慢性的な供給不足に加え、長期培養による機能低下が課題として挙げられる。また、癌細胞などの株化肝細胞やラットなどの実験動物由来の肝細胞は、癌化や種差などに起因する正常肝細胞との機能の違いが問題となる [10]。そのため、肝臓モデルの構築には、正常な肝機能を有する細胞の安定的な供給が望まれている。

近年、ES 細胞（胚性幹細胞, [11, 12]）や iPS 細胞（人工多能性幹細胞, [13, 14]）といった多能性を有する幹細胞から分化誘導により肝細胞様細胞を作出する研究が数多く行われている [8, 15, 16]。幹細胞からの肝細胞様細胞の分化誘導（図 3）は、発生過程における肝臓形成を模した形で幹細胞を段階的に肝細胞へと分化誘導することにより行われている [17, 18]。すなわち、未分化細胞である幹細胞を Activin A など添加することで内胚葉系細胞に分化させた後、FGF, BMP, HGF など添加し、肝芽細胞へ分化させる [19–21]。さらに、OSM やデキサメタゾン (Dex: dexamethasone) など添加することによって肝細胞の成熟化を促す [8, 16]。

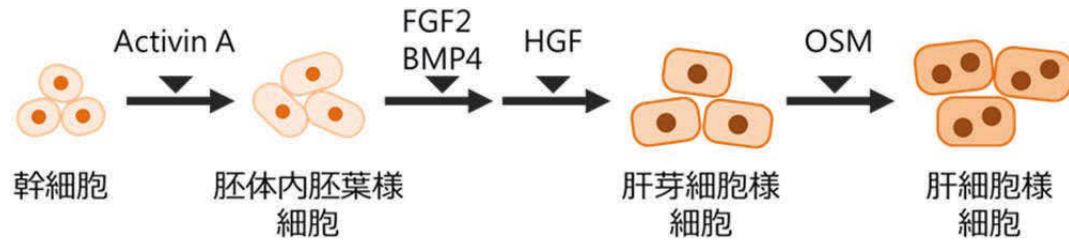


図 3. 液性因子による幹細胞からの肝細胞様細胞の分化誘導法（例） [15]

このような段階的な液性因子の添加による分化誘導法のほかに、肝細胞への分化に寄与する転写因子をコードする遺伝子を導入する、遺伝子導入法による分化誘導も報告されている [22–24]。肝細胞核因子 (HNF: hepatocyte nuclear factor) 群は、前腸内胚葉からの肝臓形成や肝機能の獲得・維持に広く関与する転写因子として知られている [25]。さらに、ジンクフィンガー型転写因子 GATA4, GATA6 [26, 27], ホメオボックス型転写因子 HEX [28, 29] および塩基性ロイシンジッパー型転写因子 C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  [30, 31] などが肝臓の発生に関与する転写因子群として報告されている。

#### 4. 分化誘導肝細胞における肝機能の評価

幹細胞由来の分化誘導肝細胞は、肝特異的転写因子である HNF 群や血清タンパク質である $\alpha$ -フェトプロテイン、トランスフェリンなど肝細胞において特異的に発現している遺伝子またはタンパク質の発現解析、さらにアルブミンの分泌能やグリコーゲン蓄積能、薬物代謝能など肝細胞が有する生理的機能を調べることで評価される [25, 32]。しかしながら、これらは肝細胞が有する特徴的な機能の一部に重点を置いて評価しているに過ぎず、未だすべての機能において正常肝細胞と同等な分化誘導肝細胞の取得には至っていない。そのため、正常肝細胞と同等な分化誘導肝細胞を作製するためには、脂質代謝能や胆汁酸合成能など、他の肝機能の評価することも求められる。

## 5. 肝臓におけるリポタンパク質の代謝と脂質異常症

食事から摂取または肝細胞で合成される中性脂肪 (TG: triglyceride) やコレステロールなどの脂質は、生体内でエネルギーや細胞の構成成分、ステロイドホルモンなどの原料として利用される。しかし、これらの脂質は、そのままの状態では水に溶けることができないため、血液を介して脂質を吸収部位や合成部位から使用部位へ運搬するために特別な輸送体が必要となる。そこで脂質は、肝細胞内で界面活性を持つアポリポタンパク質やリン脂質と結合し、複合体粒子であるリポタンパク質を形成する

(図4, [33])。リポタンパク質の表面には、親水性のアポリポタンパク質やリン脂質、遊離コレステロールが並び、内側に存在する疎水性のTG やコレステロールエステルを包んでいる。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: chylomicron), 超低密度リポタンパク質 (VLDL: very low density lipoprotein), 低密度リポタンパク質 (LDL: low density lipoprotein), 高密度リポタンパク質 (HDL: high density lipoprotein) の主要4分画に分類される (図5, [33])。



図4. リポタンパク質の構造

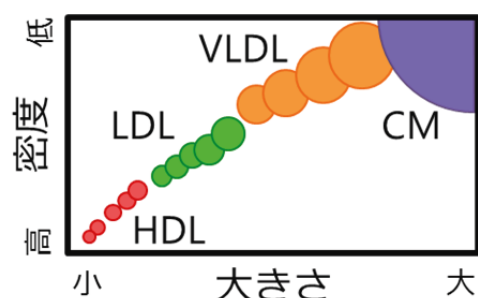


図5. リポタンパク質の分類

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 [34, 35], HDL は末梢組織から肝臓へのコレステロールの逆転送系に関与する (図 6, [36])。

VLDL の合成は、肝細胞の小胞体内においてミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質 (MTP: microsomal triglyceride transfer protein) により、TG やコレステロールエステルなどを含んだ粒子とアポリポタンパク質 B100 (ApoB100: apolipoprotein B100) との会合が触媒されることにより、pre-VLDL が合成されることで始まる (図 7, [37-40])。その後 pre-VLDL は、Sar1/COPII 小胞を介してゴルジ体へ輸送され、ゴルジ体内でさらに脂質が付加され VLDL となり肝細胞外へ分泌される (図 7)。血中に分泌された VLDL は、血管内皮細胞表面に存在するリポタンパク質リパーゼ (LPL: lipoprotein lipase, [41]) によって含有する TG の分解を受けながら末梢組織へ TG を輸送する

(図 6)。TG を放出し、小型化した VLDL は、肝性トリグリセリドリパーゼ (HTGL: hepatic triglyceride lipase, [42]) によって、さらに含有する TG の分解を受けることで LDL へと変換される [43]。そして LDL は、末梢組織細胞の LDL 受容体に結合し、代謝されることで末梢組織へコレステロールを輸送する (図 6, [44])。

また、肝細胞ではアポリポタンパク質 AI (ApoAI: apolipoprotein AI) を主要な構成因子として HDL が合成される [45]。HDL はレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT: lecithin cholesterol acyl transferase, [46]) によって、末梢組織の細胞表面に存在する遊離コレステロールをエステル化することで、末梢組織から余分なコレステロールを回収する。HDL に含まれるコレステロールエステルは、コレステロールエステル転送タンパク質 (CETP: cholesterol ester transfer protein, [47]) によって VLDL や LDL に含まれる TG と相互の受け渡しが行われる。その後、HDL は肝臓に取り込まれ、代謝される (図 6)。



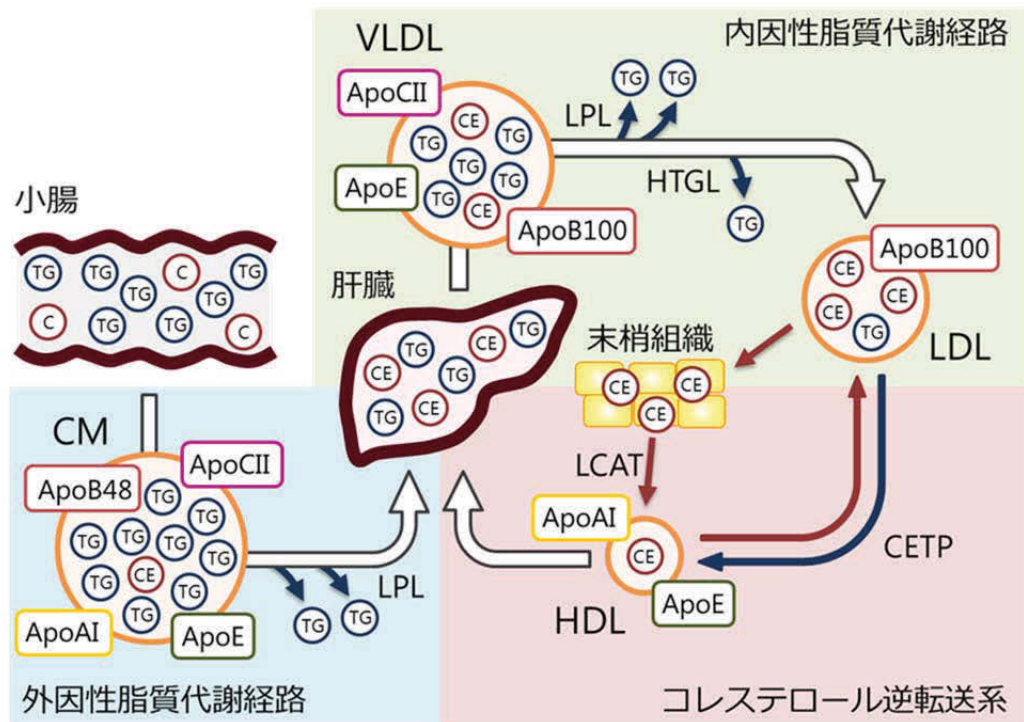
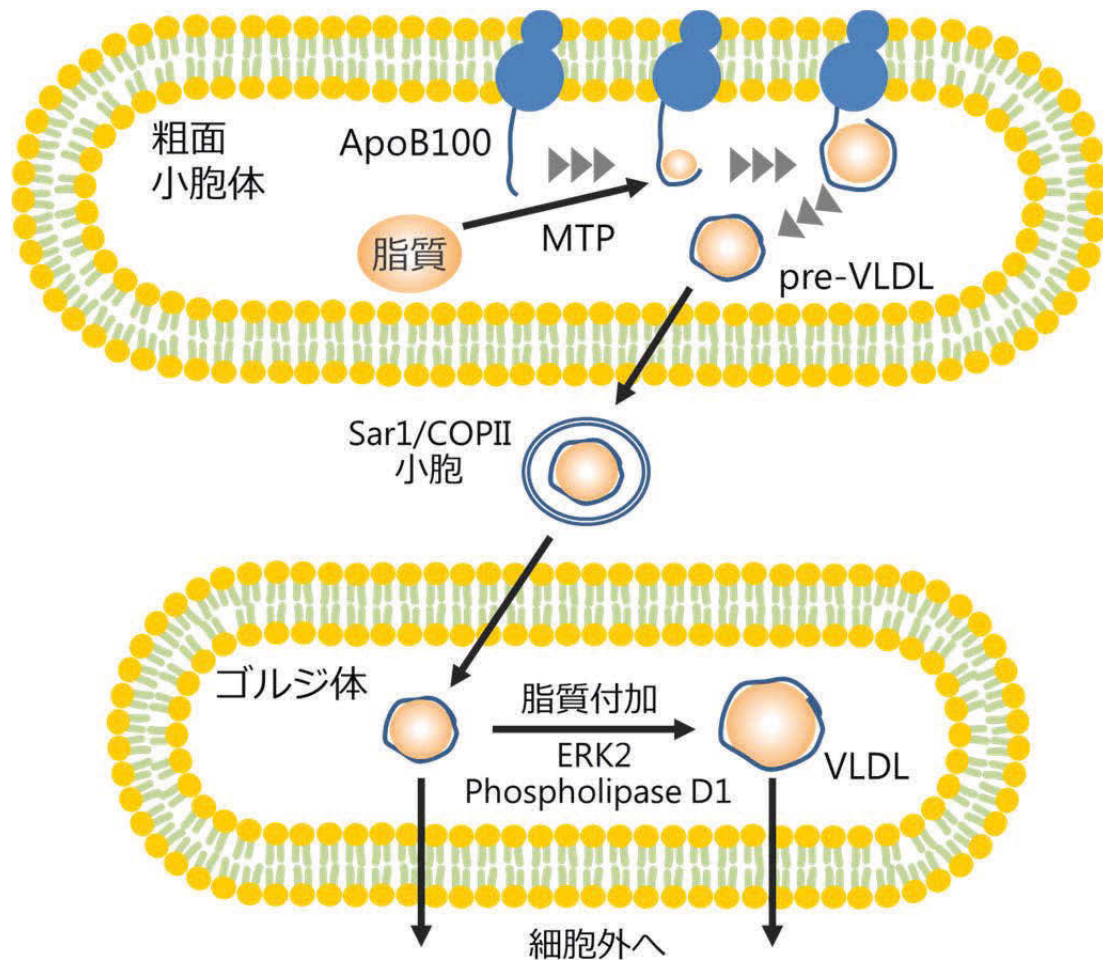


図 6. 生体におけるリポタンパク質の代謝

TG: 中性脂肪, C: コレステロール, CE: コレステロールエステル,  
 CM: カイロミクロン, VLDL: 超低密度リポタンパク質,  
 LDL: 低密度リポタンパク質, HDL: 高密度リポタンパク質,  
 ApoAI: アポリポタンパク質 AI, ApoB48: アポリポタンパク質 B48,  
 ApoB100: アポリポタンパク質 B100, ApoCII: アポリポタンパク質 CII,  
 ApoE: アポリポタンパク質 E, LPL: リポタンパク質リパーゼ,  
 HTGL: 肝性トリグリセリドリパーゼ,  
 CETP: コレステリルエステル転送タンパク質,  
 LCAT: レシチンコレステロールアシル基転移酵素



**図 7. 肝細胞における VLDL の産生**

VLDL: 超低密度リポタンパク質, ApoB100: アポリポタンパク質 B100,  
MTP: ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質,  
Sar1: secretion-associated and Ras-related protein 1,  
COPII: コートタンパク質複合体 II,  
ERK2: extracellular signal-regulated kinase 2

カロリーや動物性脂肪の過剰摂取、過労や運動不足といった生活習慣の乱れにより、血液中に存在するリポタンパク質のバランスが崩れ、血液中の脂質量が大きく増減した状態のことを脂質異常症という（表1）。脂質異常の態様の違いから3種類に分けられる脂質異常症は、動脈硬化を引き起こし、脳梗塞や心筋梗塞などの血管系疾患につながるリスク要因となる。

表 1. 脂質異常症の診断基準（血清脂質値：空腹時採血）

高 LDL コレステロール血症	LDL コレステロール	140 mg/dL 以上
低 HDL コレステロール血症	HDL コレステロール	40 mg/dL 未満
高 TG 血症	TG	150 mg/dL 以上

日本動脈硬化学会「動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2007 年版」

これまで脂質異常症の診断には、リポタンパク質に含まれる TG やコレステロール量が指標として使われてきた。近年、LDL よりも粒子サイズが小さい、small, dense LDL が動脈硬化を特に強く引き起こすことが報告されており [48]、従来から行われてきた脂質の定量法に加え、リポタンパク質粒子サイズの測定も重要性を増している。つまり、脂質異常症の診断や予防には、TG やコレステロールなどの脂質の定量に加え、リポタンパク質の粒子サイズおよび分布のバランスなど、血液中に存在するリポタンパク質を包括的に解析することが求められる。

## 6. LipoSEARCH 法によるリポタンパク質の解析

リポタンパク質に含まれる脂質の定量は、まずリポタンパク質を密度や粒子サイズに従って分画し、分画したそれぞれのリポタンパク質に含まれる TG およびコレステロール量を測定することで行われる。リポタンパク質を分画する標準的な方法として、リポタンパク質の密度の違いにより分離する超遠心分離法 [49] が挙げられるが、測定に使用する検体量の多さや測定時間の長さなどから日常的な解析には適さない。また簡便な方法として、リポタンパク質の電荷の違いにより分離する電気泳動法、酵素反応による酵素法などがあるが、いずれも分離精度が十分ではない。

岡崎らが開発した LipoSEARCH 法（図 8、株式会社スカイライト・バイオテック、[50–53]）は、検体中に含まれるリポタンパク質をゲル濾過 HPLC により粒子サイズに従って迅速かつ高精度に分画し、分画したリポタンパク質に含まれる TG およびコレステロール量を定量する技術である。すなわち、ゲル濾過 HPLC により粒子サイズの大きい順に溶出したリポタンパク質は、TG 検出経路とコレステロール検出経路に分歧し、それぞれの経路上で測定試薬の酵素反応を受け、オンラインでクロマトグラムとして検出される（図 9）。さらに、取得したクロマトグラムデータを解析することにより、検体中に含まれるリポタンパク質の脂質含量、粒子数および粒子サイズを分析することができる。そのため LipoSEARCH 法では、検体中に含まれるリポタンパク質

を包括的に捉えたデータである，リポタンパク質プロファイルの取得が可能である。

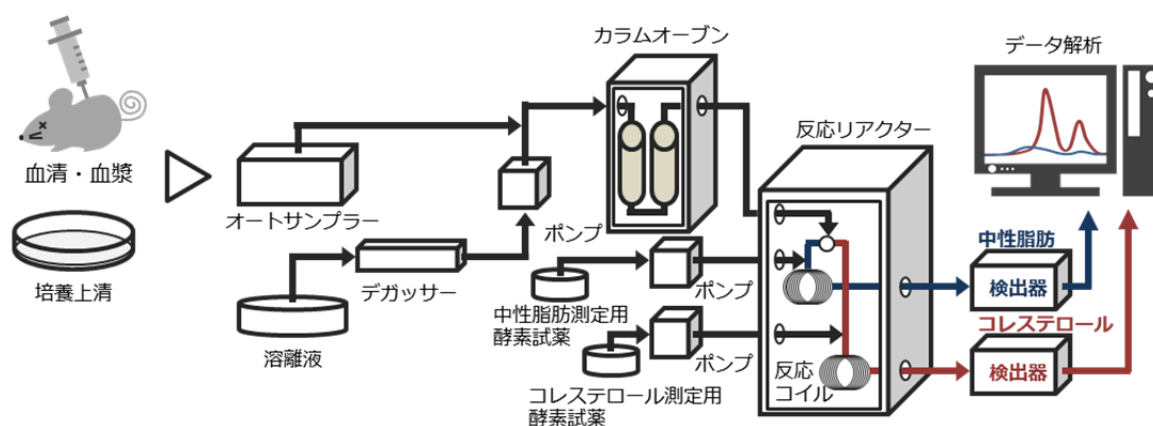


図 8. LipoSEARCH 法 測定システム (ゲルろ過 HPLC 法)

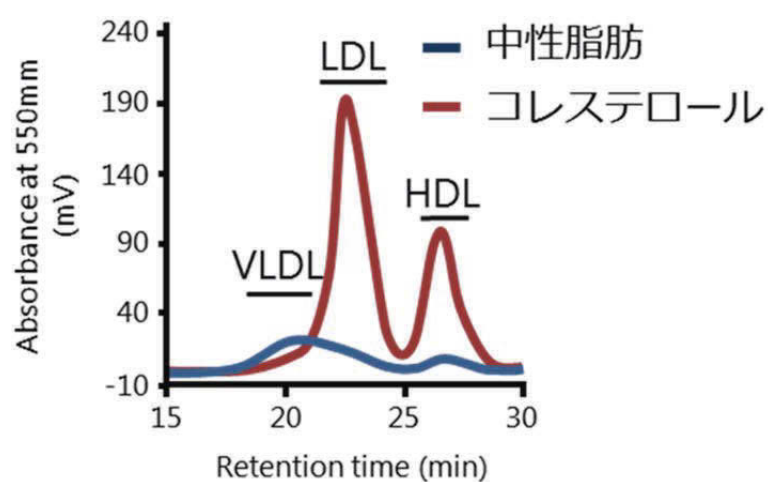


図 9. LipoSEARCH 法によるリポタンパク質のクロマトグラムデータ (例: ヒト血清)

これまでに畠ら（秋田県総合食品研究センター）は、および独自のリポタンパク質解析法である LipoSEARCH 法およびリポタンパク質を産生することが知られているヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞 [54, 55] を用いて、脂質異常改善効果を有する生理活性物質の探索・評価を行う新規のシステムを構築した [56]。本システムでは、コレステロールの合成を阻害するスタチンを添加した HepG2 細胞の培養上清において、リポタンパク質中のコレステロール量が減少し、TG およびコレステロールの合成を阻害するフェノフィブラートを添加した HepG2 細胞の培養上清において、リポタンパク質中の TG およびコレステロール量が共に減少するという各薬剤の特長を捉えた結果が得られた（図 10, [56]）。また、畠らは本システムを用いて、ジュンサイに脂質代謝改善効果が認められることを見出した（図 11, [57]）。これらのことから、LipoSEARCH 法はリポタンパク質の詳細な解析に適していることが示された。

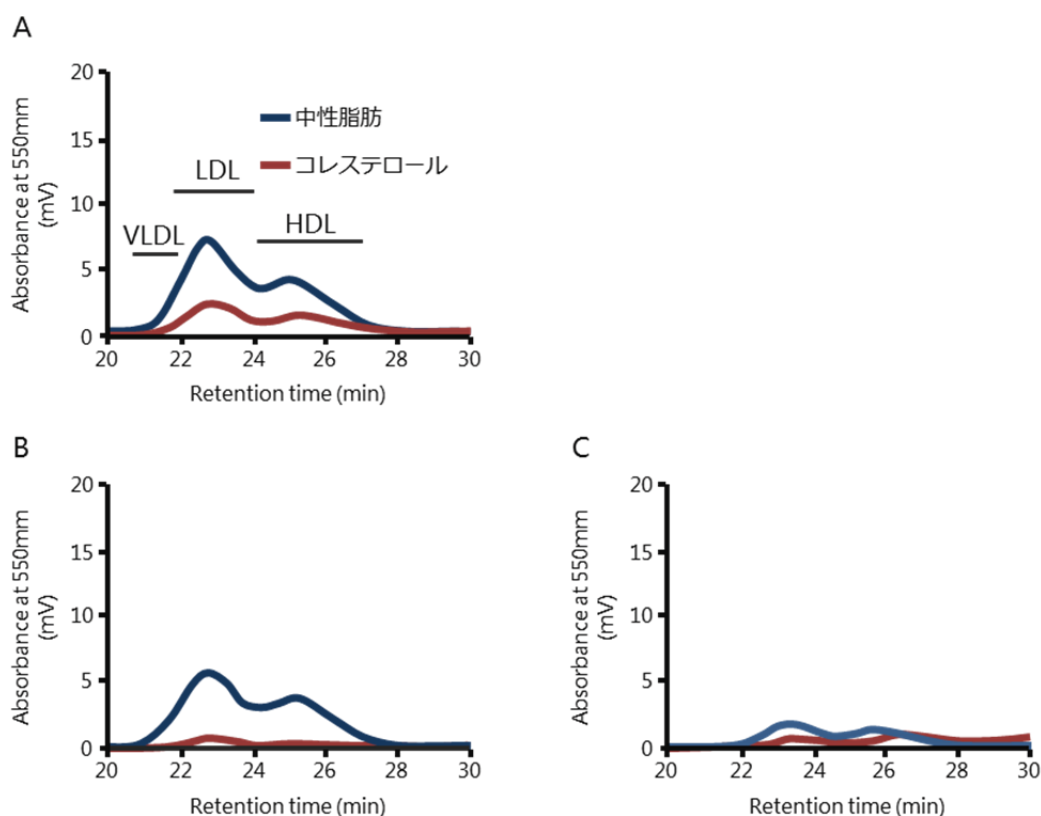


図 10. 脂質代謝改善薬が HepG2 細胞のリポタンパク質産生に与える影響 [56]

- A. コントロール, B. シンバスタチン (5  $\mu$ M) 添加培養,  
 C. フェノフィブラート (200  $\mu$ M) 添加培養

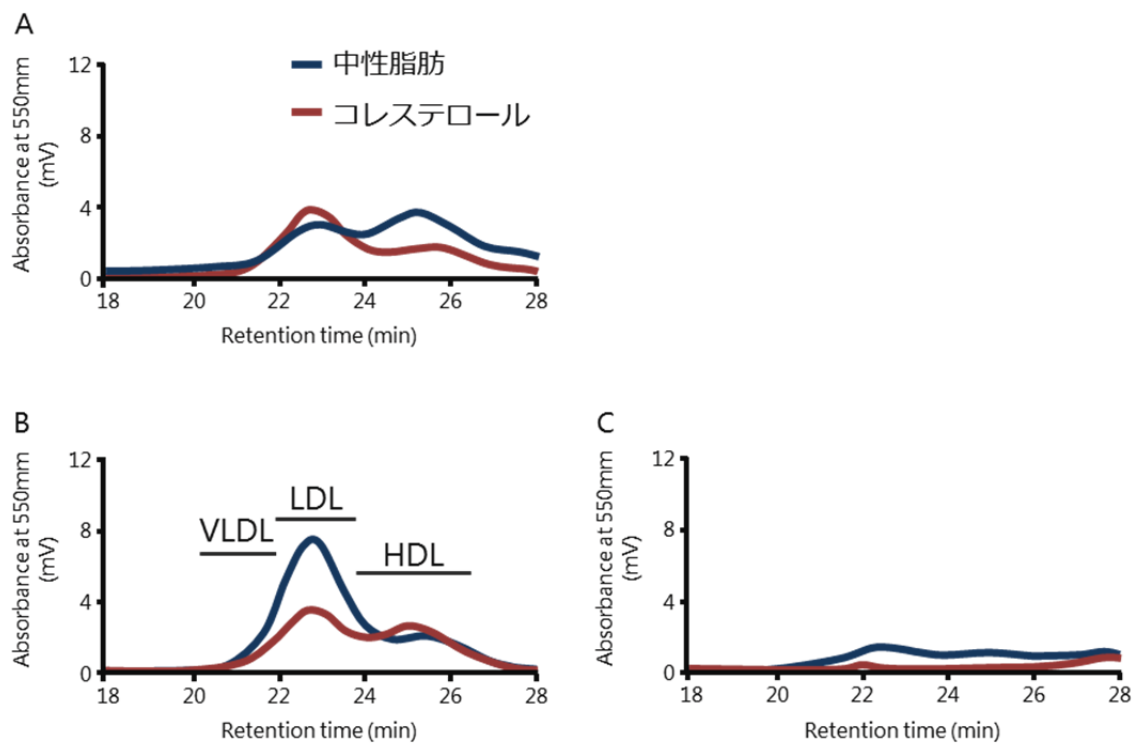


図 11. ジュンサイエタノールエキ스가 HepG2 細胞のリポタンパク質産生に与える影響 [57]

- A. コントロール, B. オレイン酸ナトリウム (0.75 mM) 添加培養,  
C. オレイン酸ナトリウム (0.75 mM) + ジュンサイエタノールエキス (100  $\mu$ g/ml) 添加培養

## 7. 本研究の概要

リポタンパク質産生能は、成熟した肝細胞が有する代表的な生理的機能の一つであり、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。しかしながら、その分子機構について未だ不明な点が多く、また肝細胞の分化とリポタンパク質産生に着目した報告は少ない。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を明らかにすることを目的として行った。

第3章では、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 発現解析を行った。そして、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により、それぞれの肝細胞株を分類し、分化段階を判断した。さらに、LipoSEARCH 法により、それぞれのヒト肝細胞株の培養上清に含まれ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性を検証した。

次に第4章 実験1では、ヒト間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞において肝細胞核因子 (HNF) 群である FOXA2, HNF4 $\alpha$  および HNF1 $\alpha$  をそれぞれ強制発現させた細胞株を樹立し、肝細胞分化マーカー遺伝子および脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現解析、さらに細胞内および培養上清に含まれる脂質量を定量した。第4章 実験2では、実験1でリポタンパク質産生への関与が示唆された HNF4 $\alpha$  および HNF1 $\alpha$  を同時に強制発現させた UE7T-13 細胞を樹立し、実験1と同様に、肝細胞分化マーカー遺伝子および脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現解析、さらに細胞内および培養上清に含まれる脂質量を定量し、肝細胞への分化を誘導する HNF 群の発現による、幹細胞から肝細胞への分化とリポタンパク質産生に与える影響について検証した。

## 第 2 章

### 各実験に共通した材料および方法



## 第2章 各実験に共通した材料および方法

### (1) 大腸菌の培養

本研究では JM109 (タカラバイオ), Stellar™ Competent Cells (タカラバイオ) および NEB Stable Competent *E. coli* (High Efficiency, New England Biolabs Japan Inc.) の3種の大腸菌株を適宜実験に応じて用いた。各大腸菌株は LB 寒天培地上でコロニーを生育させ、液体培養は LB 培養液で行った。JM109 および Stellar™ Competent Cells は 37°C, NEB Stable Competent *E. coli* は 30°C で培養した。また必要に応じて、アンピシリンナトリウム (Amp, 終濃度 100 µg/ml) を添加した。

### (2) 組換え DNA 操作

遺伝子組換えプラスミド DNA の構築に用いる挿入 DNA 断片の増幅には KOD -Plus-Neo (東洋紡) を用いた。制限酵素の反応条件は添付の説明書に従い行った。制限酵素処理後のプラスミド DNA はアガロース電気泳動に供し、DNA 断片の分離・精製を行った。アガロースゲルは目的 DNA 断片の大きさに応じて Agarose S (ニッポンジー) を 1 x TAE buffer に溶解して作製した。プラスミド DNA は、T4 DNA ligase (Promega) によるライゲーション反応または In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ) による In-Fusion 反応 (表 5) により調製した。目的に応じた大腸菌株を形質転換し、Mini Prep 法 (表 2) により遺伝子組換えプラスミド DNA を保持した形質転換大腸菌のスクリーニングを行った。

### (3) 遺伝子導入用プラスミド DNA の調製

ヒト細胞への遺伝子導入プラスミド DNA は、Wizard® SV Gel and PCR clean-Up system (Promega, 表 4) を使用して精製した。

### (4) 実験に用いたヒト細胞とヒト細胞株、およびその培養方法

#### 1) ヒト細胞およびヒト細胞株

本研究には次の初代培養細胞 (1 種) および細胞株 (6 種) を使用した。

##### 1. ヒト肝癌由来細胞株 HLE 細胞

HLE 細胞はヒト肝癌由来の樹立細胞株であり [58], JBRC 細胞バンクより入手したものをを用いた。

##### 2. ヒト肝癌由来細胞株 HLF 細胞

HLF 細胞はヒト肝癌由来の樹立細胞株であり [58], JBRC 細胞バンクより入手したものをを用いた。

### 3. ヒト肝芽腫由来細胞株 HepG2 細胞

HepG2 細胞はヒト肝芽腫由来の樹立細胞株 [54] であり、ヒト肝臓の代替モデルとして用いられている [59–63]。理研バイオリソースセンターから入手したものをを用いた。

### 4. ヒト肝癌由来細胞株 HuH-7 細胞

HuH-7 細胞はヒト肝癌由来の樹立細胞株であり [64]、理研バイオリソースセンターから入手したものをを用いた。

### 5. ヒト肝腫瘍由来細胞株 HepaRG 細胞

HepaRG 細胞はヒト肝腫瘍由来の樹立細胞株であり [65]、分化誘導によりヒト肝細胞様の形態を呈するため、薬物動態研究や毒性研究などに用いられる [66–68]。Thermo Fisher Scientific から購入したものをを用いた。

### 6. ヒト初代培養肝細胞 (Lot. HU4175)

ヒト初代培養肝細胞は *in vivo* の肝臓と同等な機能を有しており、薬物動態研究や毒性試験によく用いられる。Thermo Fisher Scientific から購入したものをを用いた。Lot. HU4175 は、3 歳白人男性由来の細胞である。

### 7. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞

UE7T-13 細胞はヒト骨髄由来の間葉系幹細胞にヒトテロメア逆転写酵素 (hTERT: human telomerase reverse transcriptase) 遺伝子およびヒトパピローマウイルス (HPV: human papillomavirus) E7 遺伝子を導入して樹立された不死化細胞株であるが、間葉系幹細胞が有する多分化能を保持している [69]。間葉系幹細胞は、間葉系に属する骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞および軟骨細胞などへの分化能に加え、神経細胞や肝細胞への分化能を有することが報告されている [70–74]。理研バイオリソースセンターから入手したものをを用いた。

## 2) ヒト細胞の凍結融解と培養方法

ヒト細胞の凍結融解は表 8 に示す通りに行った。解凍した細胞は、1 週間、継代培養した後に実験に用いた。

## 3) 細胞の培養方法

### 1. HLE 細胞, HLF 細胞, HepG2 細胞, HuH-7 細胞および UE7T-13 細胞の培養方法

HLE 細胞, HLF 細胞, HepG2 細胞, HuH-7 細胞および UE7T-13 細胞の培養には、Dulbecco's modified Eagle's medium (以下 DMEM, ナカライテスク) に、ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, 以下 FBS, 非働化处理済, 終濃度 10 %, BioWest), ペニシリンーストレプトマイシン混合溶液 (ペニシリン G 終濃度

100 U/ml, ストレプトマイシン終濃度 100 µg/ml) を無菌的に添加した培地を用い、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

## 2. HepaRG 細胞

HepaRG 細胞の培養には、Williams' Medium E (以下 WM, Thermo Fisher Scientific) に、HepaRG Maintenance/Metabolism Medium supplement (Thermo Fisher Scientific), ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (ペニシリン G 終濃度 100 U/ml, ストレプトマイシン終濃度 100 µg/ml) を無菌的に添加した培地を用い、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

## 3. ヒト初代培養肝細胞

ヒト初代培養肝細胞には、WM (Thermo Fisher Scientific) に、Hepatocyte Maintenance Supplement (Thermo Fisher Scientific), FBS (非働化処理済, 終濃度 10%, BioWest), ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (ペニシリン G 終濃度 100 U/ml, ストレプトマイシン終濃度 100 µg/ml) を無菌的に添加した培地を用い、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

## (5) 培養細胞からの RNA 抽出と精製および cDNA 合成

RNA の抽出および精製には、QuickGene RNA cultured cell kit S (倉敷紡績) および DNase I (Promega) を用いた (表 13)。逆転写反応による cDNA の合成には、PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time, タカラバイオ) を用いた (表 14)。

## (6) PCR 法

RT-PCR の際には、Ex Taq polymerase (タカラバイオ) を用いて増幅反応を行った。遺伝子組換えプラスミド DNA の構築の際の挿入 DNA 断片の増幅には KOD-Plus-Neo (東洋紡) を用いて行った。

本研究で使用した PCR 用プライマーおよび RT-PCR 用プライマーは表 16, 表 19 に示した。また、PCR 反応の条件は表 3 および表 15 に示した。

## (7) リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR 反応は SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ) および Chromo 4 (Bio-Rad) を用いて行った。反応条件はリアルタイム PCR 実験ガイド 実践編: SYBR Green I による RT-PCR (タカラバイオ) に従った。得られたデータの解析には、リアルタイム PCR 解析用ソフト Opticon Monitor 3 (Bio-Rad) を用いた。

## (8) 統計処理

それぞれの実験は独立した実験として、3 回以上の試行を実施した。実験結果は平均値±標準誤差で示した。統計処理は SPSS PASW Statistics 18.0 (日本 IBM) を使用し、Scheffe 法にて多重比較検定を行い、すべての検定において有意水準は 5%とした。またクラスター解析には、Ward 法を用いた。

**表 2. Miniprep 法によるプラスミド DNA の抽出**

○ 使用する機器・試薬類

- ・ Solution I  
(50 mM glucose, 1 M Tris-HCl (pH 8.0, 10 mM EDTA))
- ・ Solution II  
(0.2 N NaOH, 1% SDS)
- ・ Solution III  
(3 M potassium acetate, 2 M acetic acid)
- ・ TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)
- ・ 2-propanol
- ・ 70% ethanol
- ・ RNase A (10 mg/ml)
- ・ プラスミド DNA の確認に適した制限酵素

○ 操作手順

- ↓ *E. coli* を適当な抗生物質を含む LB 培地 (1 ml) にて培養 (18 hr) する
- ↓ 培養液を 1.5 ml tube に移す
- ↓ 遠心分離 (15,000 rpm, 1 min) する
- ↓ 上清を除去する
- ↓ 菌体のペレットに Solution I (100 µl) を添加し, vortex を用いて菌体を懸濁する
- ↓ Solution II (200 µl) を添加し, tube を上下反転させ, 溶菌させる
- ↓ r/t で 5 min 放置する
- ↓ Solution III (150 µl) を添加し, vortex を用いて懸濁する
- ↓ 遠心分離 (15,000 rpm, 5 min) する
- ↓ 上清を新しい 1.5 ml tube に移す
- ↓ 2-Propanol (400 µl) を添加し, vortex を用いて懸濁する
- ↓ 遠心分離 (15,000 rpm, 10 min) する
- ↓ 上清を除去し, 70% ethanol (400 µl) を添加する
- ↓ 15,000 rpm, 5 min
- ↓ 上清を除去し, ペレットを乾燥させる
- ↓ ペレットを TE (containing 10 µg/ml RNase A, 100 µl) に溶解させる

○ 制限酵素による切断パターンの検証

・ プラスミド DNA	2.0 µl
・ 10 x buffer	1.0 µl
・ Distilled water	X µl
・ 制限酵素	Y µl (up to 1 µl)
Total	10 µl

- ↓ 37°C, 1 hr
- ↓ 全量電気泳動に供し, 切断パターンを確認する

**表 3. KOD -Plus- Neo による PCR 増幅**

○ 使用する機器・試薬類

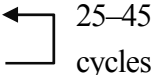
- ・ KOD -Plus- Neo (東洋紡)
- ・ サーマルサイクラー (TaKaRa PCR Thermal cycler Dice, タカラバイオ)

○ 操作手順

↓ 反応液を調製する

・ 10 x PCR Buffer for KOD -Plus- Neo	5 $\mu$ l	1 x
・ 2 mM dNTPs	5 $\mu$ l	0.2 mM each (終濃度)
・ 25 mM MgSO <sub>4</sub>	3 $\mu$ l	1.5 mM (終濃度)
・ Primer F (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l	0.3 $\mu$ M (終濃度)
・ Primer R (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l	0.3 $\mu$ M (終濃度)
・ Template DNA	X $\mu$ l	Plasmid DNA (–50 ng/50 $\mu$ l)
・ KOD -Plus- Neo (1 U / $\mu$ l)	1 $\mu$ l	1 U / 50 $\mu$ l (終濃度)
・ Autoclaved, distilled water	up to 50 $\mu$ l	
Total	50 $\mu$ l	

↓ 反応液を 0.2 ml tube または 8 連 tube に分注し, サーマルサイクラーで反応させる  
2 ステップ\*

・ Predenature	94°C, 2 min	
・ Denature	98°C, 10 sec	
・ Extension	68°C, 30 sec/kb	

※反応条件は適宜調整する

↓ 反応終了後, 反応液 (2  $\mu$ l) を用いてアガロース電気泳動を行い, 目的 DNA の増幅を確認する

**表 4. Wizard® SV Gel and PCR clean-Up system による DNA の精製**

Wizard® SV Gel and PCR clean-Up system (Promega)

○ 使用する機器・試薬類

- ・ Wizard® SV Minicolumns
- ・ Membrane Binding Solution (4.5 M guanidine isothiocyanate, 0.5 M potassium acetate)
- ・ Membrane Wash Solution (10 mM potassium acetate, 80% ethanol, 16.7  $\mu$ M EDTA pH 8.0)
- ・ Nuclease-Free Water
- ・ 分光光度計 (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific)
- ・ ヒートブロック (FG-01N, 日本ジェネティクス) ※ゲルからの精製時のみ

○ 操作手順

ゲルスライスの溶解

- ↓ アガロースゲルから目的 DNA 断片を切り出し、重量を測定する
- ↓ Membrane Binding Solution をアガロースゲル 10 mg につき 10  $\mu$ l 添加し、vortex する
- ↓ 50–65°C で 10 min インキュベートし、ゲルスライスを完全に溶解する

プラスミド DNA および PCR 産物の処理

- ↓ プラスミド DNA または PCR 反応液に等量の Membrane Binding Solution を加える

遠心分離による精製

- ↓ Collection tube に SV Minicolumn を挿入し、調製したゲル溶解液、プラスミド DNA または PCR 産物を添加後、1 min, r/t で静置する
- ↓ 遠心分離 (16,000 x g, 1 min) し、Collection tube 内の液体を除去する
- ↓ Membrane Wash Solution (700  $\mu$ l) を添加する
- ↓ 遠心分離 (16,000 x g, 1 min) し、Collection tube 内の液体を除去する
- ↓ Membrane Wash Solution (500  $\mu$ l) を添加する
- ↓ 遠心分離 (16,000 x g, 5 min) し、Collection tube 内の液体を除去する
- ↓ SV Minicolumn を新しい 1.5 ml tube に移し、Nuclease-Free Water (20–50  $\mu$ l) を添加する
- ↓ r/t で 1 min 静置する
- ↓ 遠心分離 (16,000 x g, 1 min) し、DNA 溶液を回収する

DNA の定量

- ↓ 2  $\mu$ l のサンプルを用いて NanoDrop により DNA の濃度を定量する
- ↓ 以降の実験に合わせて、適宜終濃度を調整する

表 5. In-Fusion クローニングを用いたプラスミド DNA の構築

○ 使用する機器・試薬類

- ・ In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech)
- ・ Stellar™ Competent Cells (Clontech)
- ・ サーマルサイクラー (TaKaRa PCR Thermal cycler Dice, タカラバイオ)
- ・ 分光光度計 (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific)
- ・ ヒートブロック (FG-01N, 日本ジェネティクス)

○ 操作手順

線状化ベクターの調製

↓使用するベクターとクローニング部位を決定し, 制限酵素処理によりベクターを線状化する

インサート DNA の調製

↓インサート DNA の PCR 増幅のための In-Fusion Primer を設計する

※In-Fusion Primer は使用する線状化ベクターの末端配列に相同な 15 塩基を, 配列特異的プライマーの 5' 末端に付与する形で作製する

参考 URL : [https://www.takara-bio.co.jp/infusion\\_primer/infusion\\_primer\\_form.php](https://www.takara-bio.co.jp/infusion_primer/infusion_primer_form.php)

↓インサート DNA を PCR 増幅する

↓PCR 産物を全量電気泳動し, Wizard® SV Gel and PCR clean-Up system によりインサート DNA を精製する

In-Fusion Cloning 反応

↓線状化ベクターおよびインサート DNA の DNA 濃度を測定する

↓0.2 ml tube に In-Fusion Cloning 反応液を調製する

・ 5 x In-Fusion HD Enzyme Premix	1 µl
・ 線状化ベクター	x µl
・ 精製済インサート DNA	y µl
・ Distilled water	up to 5 µl
Total	5 µl

※線状化ベクター：精製済インサート DNA=1：2-8（モル比）

↓サーマルサイクラーにて 50°C, 15 min の In-Fusion 反応を行う

↓In-Fusion 反応液全量を用いて, 大腸菌を形質転換し, 目的プラスミド DNA を増幅させる



表 6. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, ナカライテスク) の組成

	mg/L		mg/L
<b>Inorganic Salts</b>		<b>Vitamines</b>	
• $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	265.00	• Choline chloride	4.00
• $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.10	• Folic acid	4.00
• $\text{MgSO}_4$	97.67	• <i>myo</i> -inositol	7.20
• KCl	400.00	• Nicotinamide	4.00
• NaCl	6400.00	• D-Pantothenic acid calcium salt	4.00
• $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	109.00	• Pyridoxine·HCl	4.00
• $\text{NaHCO}_3$	109.00	• Vitamin B <sub>1</sub> ·HCl	4.00
<b>Amino Acids</b>		• Vitamin B <sub>2</sub>	0.40
• L-Arginine·HCl	84.00	<b>Others</b>	
• L-Cystine·2HCl	62.60	• D-Glucose	1000.00
• L-Glutamine	584.00	• Phenol red	14.93
• Glycine	30.00	• Sodium pyruvate	110.00
• L-Histidine·HCl·H <sub>2</sub> O	42.00		
• L-Isoleucine	105.00		
• L-Lysine·HCl	146.00		
• L-Methionine	30.00		
• L-Phenylalanine	66.00		
• L-Serine	42.00		
• L-Threonine	95.00		
• L-Tryptophan	16.00		
• L-Tyrosine·2Na·2H <sub>2</sub> O	104.00		
• L-Valine	94.00		

\*用時, 必要に応じて FBS (非働化処理済, 終濃度 10%), ペニシリンーストレプトマイシン混合溶液 (ペニシリン G 終濃度 100 U/ml, ストレプトマイシン終濃度 100 µg/ml) を添加する

\*オレイン酸添加培養時には, ウシ血清由来アルブミン (脂肪酸不含), ペニシリンーストレプトマイシン混合溶液 (ペニシリン G 終濃度 100 U/ml, ストレプトマイシン終濃度 100 µg/ml) を添加 (終濃度 1%) し, ろ過滅菌する

表 7. Williams' Medium E (WM, Thermo Fisher Scientific) の組成

	mg/L		mg/L
<b>Amino Acids</b>		• Pyridoxal hydrochloride	1.0
• Glycine	50.0	• Riboflavin	0.1
• L-Alanine	90.0	• Thiamine hydrochloride	1.0
• L-Arginine	50.0	• Vitamin A (acetate)	0.1
• L-Asparagine•H <sub>2</sub> O	20.0	• Vitamin B <sub>12</sub>	0.2
• L-Asparagine Acid	30.0	• α-Tocopherol phos. Na salt	0.01
• L-Cysteine	40.0	• <i>myo</i> -Inositol	2.0
• L-Cysteine•2H <sub>2</sub> O	26.07	<b>Inorganic Salts</b>	
• L-Glutamic Acid	50.0	• CaCl <sub>2</sub>	200.0
• L-Histidine	15.0	• CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	1.0 x 10 <sup>-4</sup>
• L-Isoleucine	50.0	• Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> •9H <sub>2</sub> O	1.0 x 10 <sup>-4</sup>
• L-Lysine•HCl	87.46	• MgSO <sub>4</sub>	97.67
• L-Methionine	15.0	• MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	1.0 x 10 <sup>-4</sup>
• L-Phenylalanine	25.0	• KCl	400.0
• L-Proline	30.0	• NaHCO <sub>3</sub>	2200.0
• L-Serine	10.0	• NaCl	6800.0
• L-Threonine	40.0	• NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	140.0
• L-Tryptophan	10.0	• ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	2.0 x 10 <sup>-4</sup>
• L-Tyrosine•2Na•2H <sub>2</sub> O	50.65	<b>Others</b>	
• L-Valine	50.0	• D-Glucose	2000.0
<b>Vitamines</b>		• Glutathione	0.05
• Ascorbic Acid	2.0	• Methyl linoleate	0.03
• Biotine	0.5	• Phenol red	10.0
• Choline chloride	1.5	• Sodium pyruvate	25.0
• D-Calcium pantothenate	1.0		
• Ergocalciferol	0.1		
• Folic Acid	1.0		
• Menadione sodium bisulfate	0.01		
• Niaciamide	1.0		

\* HepaRG 細胞の培養時には, HepaRG maintenance/metabolism Medium supplement (Thermo Fisher Scientific), ペニシリンーストレプトマイシン混合溶液 (ペニシリン G 終濃度 100 U/ml, ストレプトマイシン終濃度 100 µg/ml) を添加する

\* ヒト初代培養肝細胞の培養時には, Hepatocyte Maintenance Supplement (Thermo Fisher Scientific), FBS (非働化处理済, 終濃度 10%), ペニシリンーストレプトマイシン混合溶液 (ペニシリン G 終濃度 100 U/ml, ストレプトマイシン終濃度 100 µg/ml) を添加する

表 8. 哺乳動物細胞の凍結・融解

○ 使用する機器・試薬類

- ・ CELLBANKER 1plus (日本全薬工業)
- ・ セラムチューブ (住友ベークライト)
- ・ -80°C ディープフリーザー

○ 凍結手順

- ↓細胞の培養液を除去し、PBS (-) で細胞を洗浄する
- ↓0.05% Trypsin/0.02% EDTA 溶液で処理し、細胞を剥離させる
- ↓10% FBS 含有 DMEM で細胞を 15 ml tube に収集する
- ↓遠心分離 (1,000 rpm, 5 min) し、上清を除去する
- ↓収集した細胞に終濃度  $1.0 \times 10^6$ – $2.0 \times 10^6$  cells/ml となるように適量のセルバンカーを加え、穏やかにピペッティングする
- ↓充分混合させた細胞懸濁液をセラムチューブに 1 ml ずつ分注し、細胞名、細胞数、継代数および日付を記入する
- ↓セラムチューブを-80°Cディープフリーザーで凍結保存する

○ 解凍手順

- ↓-80 °Cディープフリーザーから取り出し、37°C恒温槽で融解する
- ↓培養細胞を完全融解の手前で、10% FBS 含有 DMEM 9 ml を入れた 15 ml tube に加える
- ↓遠心分離 (1,000 rpm, 5 min) し、上清を除去する
- ↓10% FBS 含有 DMEM で細胞を穏やかに懸濁し、懸濁液を培養シャーレに移す
- ↓シャーレを上下、左右に揺らし、細胞が均一になるようにする
- ↓5–10 min 程度静置した後、37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養を開始する

## 表 9. オレイン酸含有培地での細胞培養

### ○ 0.75 mM オレイン酸ナトリウム含有 DMEM (Phenol red-free) の培養液組成

- ・ DMEM with sodium pyruvate,  
without L-Gln and phenol red, liquid (ナカライテスク) 500 ml
- ・ 200 mM L-Glutamine 溶液 (ナカライテスク) 10 ml 4 mM (終濃度)
- ・ Albumin, from bovine serum, fatty acid-free (Wako) 5 g 1% (終濃度)  
BSA 溶解後, 0.45  $\mu$ m フィルターでろ過滅菌
- ・ 75 mM Sodium oleate 5 ml 0.75 mM (終濃度)  
Sodium oleate (Wako) 1.14 g を超純水 5 ml に溶解後,  
0.45  $\mu$ m フィルターでろ過滅菌する

### ○ 操作手順

- ↓ 10 cm dish など継代培養した細胞の培養液を除去し, PBS (-)で細胞を洗浄する
- ↓ 0.05% Trypsin/0.02% EDTA 溶液で処理し, 細胞を剥離させる
- ↓ 10% FBS 含有 DMEM で細胞を 15 ml tube に収集する
- ↓ 遠心分離 (1,000 rpm, 5 min) し, 上清を除去する
- ↓ 10% FBS 含有 DMEM で細胞を再懸濁し, 細胞数をカウントする
- ↓  $0.5 \times 10^5$  cells/ml の濃度密度で細胞懸濁液を調製し, 24-well cell culture plate に 1ml ずつ添加する
- ↓ 5–10 min 静置した後, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 2 日間培養する
- ↓ 細胞の培養液を除去し, PBS (-)で洗浄する
- ↓ 0.75 mM Sodium oleate 含有 DMEM (phenol red-free) を 500  $\mu$ l 添加する
- ↓ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 2 日間培養する

## 表 10. Oil Red O 染色

### ○ 使用する機器・試薬類

- ・ 10% Formalin 溶液
- ・ 60% Isopropanol
- ・ Oil Red O 溶液  
Oil Red O (Wako) 150 mg を isopropanol 100 ml に溶解する
- ・ 60% Oil Red O 溶液  
Oil Red O 溶液を蒸留水で 60%に希釈する  
※沈殿が生じるため、使用時に調製し、濾紙でろ過して使用する

### ○ 操作手順 24 well plate

- ↓細胞の培養液を除去し、PBS (-) で細胞を洗浄する
- ↓10% Formalin 溶液を 300  $\mu$ l 添加する
- ↓10 min 静置し、細胞を固定する
- ↓超純水で洗浄する
- ↓60% Isopropanol を 300  $\mu$ l 添加し、1 min 静置する
- ↓60% Oil Red O 溶液を 300  $\mu$ l 添加し、15 min 静置する
- ↓60% Isopropanol を 300  $\mu$ l 添加し、洗浄する
- ↓超純水を 300  $\mu$ l 添加し、鏡検する

表 11. 細胞内および培養液中の中性脂肪およびコレステロールの定量

○ 使用する機器・試薬類

- ・ 10% FBS 含有 DMEM
- ・ 0.75 mM オレイン酸ナトリウム含有 DMEM (phenol red-free)
- ・ 24-well および 96-well cell culture plate
- ・ コレステスト®TG (積和メディカル)
- ・ コレステスト®CHO (積和メディカル)
- ・ 凍結乾燥機 FDU-1110 (東京理化工機)
- ・ 角型ドライチャンバー DRC-1000 (東京理化工機)
- ・ マイクロプレートリーダー SpectraMax® M5 (モレキュラーデバイス)

○ 操作手順

細胞内中性脂肪およびコレステロールの定量

- ↓細胞の培養液を除去し, PBS (-)で細胞を洗浄する
- ↓PBS (-)をできるだけ取り除き, 細胞を凍結する (-20°C, 4 hr)
- ↓TG 酵素液①または CHO 酵素液①を 120 µl 添加し, 細胞を溶解する
- ↓細胞溶解液を 1.5 ml チューブに回収し, インキュベートする (37°C, 1 hr)
- ↓遠心分離 (15,000 rpm, 10 min) し, 上清を回収する
- ↓回収した細胞溶解液と等量の超純水を加え, 96-well plate に 120 µl 分注する
- ↓TG 酵素液②または CHO 酵素液②を 40 µl 添加し, 5 min 静置する
- ↓マイクロプレートリーダーで, 550 nm の吸光度を測定する

培養液中の中性脂肪およびコレステロールの定量

- ↓細胞培養液 (0.75 mM sodium oleate 含有 DMEM (phenol red-free)) を 1.5 ml tube に収集する
- ↓遠心分離 (15,000 rpm, 10 min) し, 上清を回収, 凍結する
- ↓20°Cに設定した角型ドライチャンバー内に凍結した細胞培養液を入れ, 凍結乾燥機にて細胞培養液を 6 hr 凍結乾燥する
- ↓TG 酵素液①または CHO 酵素液①を 120 µl 添加し, 凍結乾燥物を完全に溶解する
- ↓インキュベート (37°C, 1 hr) 後, 96-well plate に 120 µl 分注する
- ↓TG 酵素液②または CHO 酵素液②を 40 µl 添加し, 5 min 静置する
- ↓マイクロプレートリーダーで, 550 nm の吸光度を測定する

検量線の作成と中性脂肪およびコレステロール量の算出

- ↓中性脂肪およびコレステロール濃度が既知の血清を適宜希釈する
- ↓TG 酵素液①および②, CHO 酵素液①および②を用いて各濃度での 550 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し, 検量線を作成する
- ↓得られた検量線から, 細胞内および培養液中の中性脂肪およびコレステロール量を算出し, 事前に計数した細胞数を用いて, "µg/10<sup>6</sup> cells" で表記する

表 12. リポフェクション法による遺伝子導入と遺伝子安定発現株の樹立

○ 使用する機器・試薬類

- ・ 遺伝子導入用 Opti-MEM® (Thermo Fisher Scientific)
- ・ Viafect™ transfection Reagent (Promega)
- ・ 6-well cell culture plate
- ・ 6 cm dish
- ・ Antibiotics

○ 操作手順

前培養

- ↓ 10 cm dish などで継代培養した細胞の培養液を除去し、PBS (-)で細胞を洗浄する
- ↓ 0.05% Trypsin/0.02% EDTA 溶液で処理し、細胞を剥離させる
- ↓ 10% FBS 含有 DMEM で細胞を 15 ml tube などに収集する
- ↓ 遠心分離 (1,000 rpm, 5 min) し、上清を除去する
- ↓ 10% FBS 含有 DMEM で細胞を再懸濁し、細胞数をカウントする
- ↓ 適当な濃度 ( $3.0 \times 10^5$  cells/well)となるように細胞懸濁液を調製し、6-well dish には播種する
- ↓ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> で 16–20 hr 培養する

リポフェクション法による遺伝子導入

- ↓ Opti-MEM (無血清, 120 µl) にプラスミド DNA 溶液 (3.0 µg) を加える
- ↓ Viafect™ (12 µl) を加え、vortex する
- ↓ r/t で 5 min 静置する
- ↓ DNA/Viafect™ 混合液を細胞へ添加する
- ↓ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> で培養する (16–20 hr)  
(必要に応じて培養開始後 4–6 hr 程度で培養液を交換する)

遺伝子安定発現株の樹立

- ↓ 遺伝子導入した細胞の培養液を除去し、PBS (-)で細胞を洗浄する
- ↓ 0.05% Trypsin/0.02% EDTA 溶液で処理し、細胞を剥離させる
- ↓ 10% FBS 含有 DMEM で細胞を 15 ml tube などに収集する
- ↓ 遠心分離 (1,000 rpm, 5 min) し、上清を除去する
- ↓ 10% FBS 含有 DMEM で細胞を再懸濁し、細胞数をカウントする
- ↓ 適当な濃度となるように細胞懸濁液を調製し、6-well dish には播種する
- ↓ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> で 16–20 hr 培養後、適当な抗生物質を含んだ培養液に交換する
- ↓ 培地交換をしながら 2 週間ほど培養を継続し、抗生物質耐性のコロニーを取得する

**表 13. QuickGene RNA cultured cell kit S による全 RNA の抽出**

○ 使用する機器・試薬類

- ・ QuickGene RNA cultured cell kit S (倉敷紡績)
- ・ QuickGene-Mini80 (倉敷紡績)
- ・ RQ1 RNase-Free DNase (Promega)
- ・ 2- Mercaptoethanol
- ・ Ethanol
- ・ 分光光度計 (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific)

○ 操作手順

ライセートの作製

- ↓ 遺伝子導入した細胞の培養液を除去し, PBS (-)で細胞を洗浄する
- ↓ 1% 2-ME を加えた LRC (lysis buffer) を細胞に添加し, 細胞を溶解する  
(細胞数上限  $1 \times 10^6$  cells, 1 サンプルあたり LRC 520  $\mu$ l 使用する)
- ↓ 細胞溶解液を 1.5 ml tube に回収する
- ↓ Vortex (1min) し, spin down する
- ↓ Ethanol (100  $\mu$ l) 添加する
- ↓ Vortex (5–15 sec) し, spin down する
- ↓ Ethanol (180  $\mu$ l) 添加する
- ↓ Vortex し, spin down する

QuickGene-Mini80 による全 RNA の抽出

- ↓ 調製したライセートをカートリッジに全量添加し, 加圧する
- ↓ WRC (wash buffer, 500  $\mu$ l) を添加し, 加圧する  
(WRC は初期使用時に ethanol (90 ml) を添加し, 調製する)
- ↓ カートリッジ内のフィルターに DNase 溶液を 40  $\mu$ l 添加する

DNase 溶液/sample		
・ 1 U/ $\mu$ l DNase I	20 $\mu$ l	20 U (終濃度)
・ 10 x Reaction Buffer	4 $\mu$ l	
・ Nuclease-free water	16 $\mu$ l	
Total	40 $\mu$ l	

- ↓ r/t で 5 min 静置する
- ↓ WRC (wash buffer, 500  $\mu$ l) 添加し, 加圧する
- ↓ 上記を繰り返す
- ↓ カートリッジホルダを回収位置へ移動する
- ↓ CRC (elution buffer, 30–50  $\mu$ l) を添加し, 加圧する
- ↓ 分光光度計 (NanoDrop 1000) で全 RNA の濃度を測定する



**表 14. PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) による cDNA の合成**

○ 使用する機器・試薬類

- ・ PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time, タカラバイオ)
- ・ サーマルサイクラー (TaKaRa PCR Thermal cycler Dice)

○ 操作手順

↓ 逆転写反応液を調製する

・ 5 x PrimeScript Buffer (for RT-PCR)	2 $\mu$ l	
・ PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 $\mu$ l	
・ Oligo dT Primer (50 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	25 pmol (終濃度)
・ Random 6 mers (100 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	50 pmol (終濃度)
・ 全 RNA (0.5 $\mu$ g)	X $\mu$ l	
・ RNase free dH <sub>2</sub> O	up to 10 $\mu$ l	
Total	10 $\mu$ l	

(必要に応じて反応液をスケールアップする)

↓ サーマルサイクラーにて逆転写反応を行う

37°C, 15 min

85°C, 5 sec

4°C, hold

表 15. リアルタイム PCR による mRNA の発現解析

○ 使用する機器・試薬類

- ・ SYBR<sup>®</sup> *Premix Ex Taq*<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ)
- ・ Chromo 4 (Bio-Rad)

○ 操作手順

↓ 反応液を調製する

・ SYBR <sup>®</sup> <i>Premix Ex Taq</i> <sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus) (2 x)	12.5 µl	1x
・ Primer F (10 µM)	1 µl	0.4 µM (終濃度)
・ Primer R (10 µM)	1 µl	0.4 µM (終濃度)
・ Template cDNA (RT 反応液)	2.0 µl	
・ dH <sub>2</sub> O	8.5 µl	
Total	25 µl	

↓ サーマルサイクラーにて反応を行う

- ・ Step 1            95°C, 30 sec
- ・ Step 2            95°C, 5 sec      ← 40 cycles
- 60°C, 30 sec
- ・ Step 3            Melt Curve

↓ データ解析ソフト Opticon Monitor 3 (Bio-Rad) を用いて、データ解析を行う

表 16. リアルタイム RT-PCR に用いたプライマー

増幅遺伝子	プライマー配列
<i>FOXA2</i>	5'- CACCACTACGCCTTCAACC -3' 5'- GGTAGTAGGAGGTATCTGCGG -3'
<i>HNF4<math>\alpha</math></i>	5'- GCCTACCTCAAAGCCATCAT -3' 5'- GACCCTCCCAGCAGCATCTC -3'
<i>HNF1<math>\alpha</math></i>	5'- GTGTCTACAACCTGGTTTGCC -3' 5'- TGTAGACACTGTCACTAAGG -3'
<i>AFP</i>	5'- ACATCCTCAGCTTGCTGTCTCAGTA -3' 5'- CTTTGCCAATGCTTGGCTCTC -3'
<i>ALB</i>	5'- ACTGCATTGCCGAAGTGGA -3' 5'- GCAGCACGACAGAGTAATCAGGA -3'
<i>Tf</i>	5'- ATGTGGCCTTTGTCAAGCACTC -3' 5'- AGCAGCTCATACTGGTCCCTGTC -3'
<i>CYP3A4</i>	5'- CCAAGCTATGCTCTTCACCG -3' 5'- TCAGGCTCCACTTACGGTGC -3'
<i>CYP2B6</i>	5'- ATGGGGCACTGAAAAAGACTGA -3' 5'- AGAGGCGGGGACACTGAATGAC -3'
<i>CYP2C9</i>	5'- CCTCTGGGGCATTATCCATC -3' 5'- ATATTTGCACAGTGAAACATAGGA -3'
<i>SREBP-1c</i>	5'- GGCTCCTGCCTACAGCTTCT -3' 5'- CAGCCAGTGGATCACCACA -3'
<i>SCD</i>	5'- TGAACAGTGCTGCCCACCTC -3' 5'- CGGCCATGCAATCAATGAAG -3'
<i>FAS</i>	5'- CAGCAGTTCACGGACATGGAG -3' 5'- CGGCACGCAGCTTGTAGTAGA -3'
<i>DGAT1</i>	5'- GGCCTTCTTCCACGAGTACC -3' 5'- GGCCTCATAGTTGAGCACG -3'
<i>DGAT2</i>	5'- AGTGGCAATGCTATCATCAT -3' 5'- GAGGCCTCGACCATGGAAGAT -3'
<i>SREBP-2</i>	5'- CTATGGAGCAGCCTCAACGTCA -3' 5'- CCGTAGCGACAGTAGCAGGTCA -3'
<i>HMGCS-1</i>	5'- GTATGCCCTGGTAGTTGCAGGAG -3' 5'- TGTTCATATGTGTCCCACGAA -3'
<i>ApoA1</i>	5'- TGTGTACGTGGATGTGCTCAAAGA -3' 5'- GTCACGCTGTCCCAGTTGTCA -3'
<i>ApoB100</i>	5'- TCGCCTGCCAAACTGCTTC -3' 5'- CATTGGTGCCTGTGTTCCATTC -3'

<i>MTP</i>	5'- TCTCTACTCGGGTTCTGGCATTCTA -3'
	5'- GCTGCGATTAAGGCTTCCAGTC -3'
<i>GAPDH</i>	5'- GCACCGTCAAGGCTGAGAAC -3'
	5'- TGGTGAAGACGCCAGTGGA -3'

---

表 17. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

○ 使用する機器・試薬類

- ・ ミニプロテイン Tetra レディーゲルセル (Bio-Rad)
- ・ ミニプロテイン TGX ゲル (Bio-Rad)
- ・ パワーサプライ (パワーステーション 1000VC, ATTO)
- ・ M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific)
- ・ プロテアーゼ阻害剤カクテル (ナカライテスク)
- ・ Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad)
- ・ Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard Pre-Diluted Set (Thermo Fisher Scientific)
- ・ マイクロプレートリーダー SpectraMax® M5 (モレキュラーデバイス)
- ・ NuPAGE® LDS Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific)
- ・ Running Buffer
- ・ 分子量マーカー

○ 操作手順

サンプルの作製

↓細胞の培養液を取り除き, PBS (-)で細胞を洗浄する

↓プロテアーゼ阻害剤を加えた M-PER Reagent (Thermo Fisher Scientific) を細胞に添加する

Plate Size/Surface Area	M-PER Reagent Volume
100 mm	500–1000 µl
60 mm	250–500 µl
6-well plate	200–400 µl/well
24-well plate	100–200 µl/well
96-well plate	50–100 µl/well

↓ 5 分間穏やかに振盪する

↓細胞溶解液を 1.5 ml tube に回収する

↓遠心分離 (14,000 x g, 10 min) する

↓上清を新しい 1.5 ml tube に移す

タンパク質の定量

↓スタンダード (1.25–10 µg/ml) およびサンプル (200 倍希釈) を調製する

↓スタンダードまたはサンプルを 96-well plate に 150 µl ずつ添加する

↓1 x dye reagent 150 µl を添加し, 混合する

↓r/t で 5 min 静置する

↓マイクロプレートリーダーで, 595 nm の吸光度を測定する

↓検量線を作成し, サンプルのタンパク質濃度を算出する

↓Sample buffer を用いて 15 µg/well となるようにサンプルを調整する

## SDS-PAGE

↓ミニプロテイン Tetra レディーゲルセルにミニプロテイン TGX ゲルをセットする

↓泳動槽に running buffer を入れる

### 10 x running buffer

• Tris(hydroxymethyl)aminomethane	30.3 g	0.25 M (終濃度)
• Glycine	144 g	1.92 M (終濃度)
• SDS	10 g	1% (w/v) (終濃度)
• Distilled water	up to 1 L	
Total	1 L	

※使用時に 10 倍希釈して用いる

↓サンプルを熱処理 (70°C, 10 min) する

↓サンプルおよび分子量マーカーを注意深くウェルに入れる

↓電極をつなぎ、電気泳動 (200 V, 30 min) を行う

表 18. ウェスタンブロット解析

○ 使用する機器・試薬類

- ・ セミドライブロッティング装置 (ホライズブロット, ATTO)
- ・ パワーサプライ (パワーステーション 1000VC, ATTO)
- ・ ブロッティング用 PVDF 膜 (Clear Blot Membrane-P, ATTO)
- ・ ブロッティング用ろ紙 (Absorbent Paper, ATTO)
- ・ 卓上小型振とう機 (TAITEC)
- ・ ライトキャプチャ (ATTO)
- ・ Transfer buffer A
- ・ Transfer buffer B
- ・ Transfer buffer C
- ・ TBS-T
- ・ Blocking buffer (Block One, ナカライテスク)
- ・ Primary antibody
  - ヤギ抗 FOXA2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, 5% Block One にて 3,000 倍に希釈)
  - ヤギ抗 HNF4 $\alpha$  抗体 (Santa Cruz Biotechnology, 5% Block One にて 5,000 倍に希釈)
  - ヤギ抗 HNF1 $\alpha$  抗体 (Santa Cruz Biotechnology, 5% Block One にて 8,000 倍に希釈)
  - ヤギ抗 ApoB100 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, 5% Block One にて 3,000 倍に希釈)
  - ヤギ抗 MTP 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, 5% Block One にて 3,000 倍に希釈)
  - ウサギ抗 $\beta$ -actin 抗体 (IMGENEX, 5% Block One にて 3,000 倍に希釈)
- ・ Secondary antibody
  - HRP (horseradish peroxidase) 標識 anti-goat-IgG 抗体  
(Santa Cruz Biotechnology, 5% Block One にて 30,000 倍に希釈)
  - HRP (horseradish peroxidase) 標識 anti-rabbit-IgG 抗体  
(Santa Cruz Biotechnology, 5% Block One にて 30,000 倍に希釈)
- ・ ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Bio-Sciences)

○ 操作手順

Buffer 類の調製

Transfer buffer A

• Tris(hydroxymethyl)aminomethane	36.3 g	300 mM (終濃度)
• Methanol	50 ml	5% (v/v) (終濃度)
• Distilled water	up to 1 L	
Total	1L	

Transfer buffer B

• Tris(hydroxymethyl)aminomethane	3 g	25 mM (終濃度)
• Methanol	50 ml	5% (v/v) (終濃度)
• Distilled water	up to 1 L	
Total	1 L	

Transfer buffer C

• Tris(hydroxymethyl)aminomethane	3 g	25 mM (終濃度)
• 6-Aminohexanoic acid	5.2 g	40 mM (終濃度)
• Methanol	50 ml	5% (v/v) (終濃度)
• Distilled water	up to 1 L	
Total		

10 x TBS

• Tris(hydroxymethyl)aminomethane	30.3 g	250 mM (終濃度)
• NaCl	87.7 g	1.5 M (終濃度)
• HCl	適量	pH 7.4 に調整
• Distilled water	up to 1L	
Total	1 L	

1 x TBS-T

• 10 x TBS	100 ml	25 mM Tris-HCl (終濃度), 0.15 M NaCl (終濃度), pH 7.4
• Tween-20	1 ml	0.1% (v/v) (終濃度)
• Distilled water	up to 1 L	
Total	1 L	



### PVDF 膜の湿潤化

- ↓ PVDF 膜をメタノールに浸漬後, transfer buffer B に移す
- ↓ 15 min 以上振盪し, なじませる

### ろ紙の湿潤化

- ↓ ろ紙を transfer buffer A: 2 枚, transfer buffer B: 1 枚, transfer buffer C: 3 枚ずつ転写バッファに浸す

### ゲルの取り出し

- ↓ 泳動終了したゲルをプレートから外し, 不要部分を切り取った後, transfer buffer B に浸漬する
- ※ゲルの大きさが変わることがあるので, 15 min 未満にする

### Electrotransfer

- ↓ ブロッキング装置の陽極板の上に, transfer buffer A に浸したろ紙 2 枚, 次に transfer buffer B 液に浸したろ紙 1 枚を重ねる
- ↓ PVDF メンブレンを重ねる
- ↓ ゲルをメンブレンに気泡が入らないように重ねる
- ↓ Transfer buffer C に浸したろ紙 3 枚を重ね, ローラーで気泡を抜く
- ↓ ブロッキング装置の陰極側で蓋をし, トランスファー ( $2 \text{ mA/cm}^2$ , 30 min) を行う
- ↓ ブロッキング終了後, PVDF メンブレンを取り出し, TBS-T で浸透しながら洗浄 (5 min) する

### Immunodetection

- ↓ メンブレンを blocking buffer に浸し (30 min), ブロッキングを行う
- ↓ TBS-T で洗浄 (5 min) する
- ↓ 一次抗体反応 (r/t, 1 hr または  $4^\circ\text{C}$ , O/N) を行う
- ↓ 一次抗体溶液を捨て, TBS-T ですすぐ ※3 回繰り返す
- ↓ TBS-T で振盪・洗浄 (5 min) する ※3 回繰り返す
- ↓ 二次抗体反応 (r/t, 1 hr) を行う
- ↓ 二次抗体溶液を捨て, TBS-T ですすぐ ※3 回繰り返す
- ↓ TBS-T で振盪・洗浄 (5 min) する ※3 回繰り返す
- ↓ ECL prime 処理 (r/t, 5 min) を行う
- ↓ ライトキャプチャを用いて化学発光を検出する
- ↓ データ解析ソフト CS Analyzer 3.0 (ATTO) を用いて, データ解析を行う

## 第3章

### 分化段階の異なるヒト培養肝細胞株における リポタンパク質産生の解析

### 第3章 分化段階の異なるヒト培養肝細胞株における リポタンパク質産生の解析

#### 緒言

#### 1) 多能性幹細胞からの肝細胞様細胞の分化誘導

新規薬物の探索や薬物の毒性試験といった創薬研究において、生体内組織である肝臓を *in vitro* で再現した肝臓モデルが求められている [9]。肝臓モデルの構築には正常かつ成熟した肝細胞が必要である。従来から肝臓モデルの構築に用いられるヒト初代培養肝細胞は、慢性的な供給不足に加え、長期培養による機能低下が課題である。また、癌細胞などの株化肝細胞やラットなどの実験動物由来の肝細胞は、癌化や種差などに起因する正常肝細胞との機能の違いが問題となる [10]。そのため、肝臓モデルの構築には、正常な機能を有する細胞の安定的な供給が望まれている。

近年、ES 細胞（胚性幹細胞）や iPS 細胞（人工多能性幹細胞）といった多能性を有する幹細胞から分化誘導により肝細胞様細胞を作出する研究が数多く行われている [8, 15, 16]。幹細胞からの肝細胞様細胞の分化誘導は、発生過程における肝臓形成を模した形で行われ、液性因子 [17–21] や遺伝子導入 [22–24] により幹細胞を段階的に肝細胞へと分化誘導する。幹細胞由来の分化誘導肝細胞は、肝特異的転写因子である HNF 群や血清タンパク質である $\alpha$ -フェトプロテイン (AFP:  $\alpha$ -fetoprotein), トランスフェリン (Tf: transferrin) など肝細胞において特異的に発現している遺伝子またはタンパク質の発現解析, さらにアルブミン (ALB: albumin) の分泌能やグリコーゲン蓄積能, 薬物代謝能など肝細胞が有する生理的機能を調べることで評価される [25, 32]。また, 中性脂肪 (TG) やコレステロールの合成およびリポタンパク質の産生なども肝細胞が有する代表的な機能の一つであるが, これらの脂質代謝能を指標に, 分化誘導肝細胞の評価を行っている報告は少ない。

#### 2) 肝臓における脂質代謝とリポタンパク質

肝臓は脂質の代謝において中心的な役割を担う臓器である。肝細胞では、血液を介して TG やコレステロールなどの脂質を末梢組織に届けるため、リポタンパク質を合成・分泌する [33]。リポタンパク質の表面には、親水性のアポリポタンパク質やリン脂質、遊離コレステロールが並び、内側に存在する疎水性の TG やコレステロールエステルを包んでいる。リポタンパク質は粒子の大きさ、比重の違いにより、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 5)。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への輸送に関与し [34, 35], HDL は末梢組織から肝臓へのコレステロールの逆転送系に関与する (図 6, [36])。

血液中のリポタンパク質のバランスが崩れた状態のことを脂質異常症といい、脂質異常の状態の違いから、3種類に分類される(表1)。これまで脂質異常症の診断には、血液中のリポタンパク質に含まれるTGやコレステロールの含量が指標として使われてきたが、LDLよりも粒子サイズが小さい、small, dense LDLが動脈硬化を特に強く引き起こす[48]ことが報告されており、従来からの脂質の定量法に加え、リポタンパク質粒子サイズの測定も重要性を増している。つまり、脂質異常症の予防や診断には、リポタンパク質に含まれるTGやコレステロールなどの脂質量、リポタンパク質の粒子サイズおよび分布のバランスなど、リポタンパク質を包括的に解析することが求められる。

### 3) 肝細胞の分化と脂質代謝

肝細胞におけるVLDLの合成は、ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質(MTP: microsomal triglyceride transfer protein)が、脂質とアポリポタンパク質B100(ApoB100: apolipoprotein B100)の会合を触媒することによって始まる(図7, [37-40])。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は未だ不明な点が多く、肝細胞の分化とリポタンパク質産生能の獲得における関連性について詳細な解析は行われていない。

酪酸ナトリウムはヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤の一つとして知られ、高濃度では細胞増殖の停止やアポトーシスを誘導するが、低濃度では様々な細胞の分化を誘導する働きを有することが知られている[75-77]。酪酸ナトリウム(1 mM)で処理したHepG2細胞は、ALBや尿素の産生量が向上するなど、肝機能が賦活化されることが報告されている[78]。そのため酪酸ナトリウムは、HepG2細胞において分化を進行させ、成熟を促すと考えられる。また畠らは、酪酸ナトリウム(1-2 mM)による分化誘導処理が、HepG2細胞の脂質代謝に与える影響を検討したところ、酪酸ナトリウムの濃度依存的にHepG2細胞が産生するリポタンパク質量、特にVLDLおよびLDL量が増加することが判明した(図12, [79])。同様に、既知の肝細胞分化マーカーおよび脂質合成やリポタンパク質産生に関与する遺伝子群のmRNA発現量も酪酸ナトリウムの濃度依存的に増加した(図13, [79])。以上の結果から、HepG2細胞において、肝細胞分化マーカー遺伝子のmRNA発現量とリポタンパク質の産生量に関係性が認められたことにより、肝細胞の分化とリポタンパク質産生に関連があると考えられた。

そこで第3章では、肝細胞の分化とリポタンパク質産生の関連を明らかにするため以下の実験を行った。はじめに、由来の異なる種々のヒト培養肝細胞株において、リアルタイム RT-PCR 法により既知の肝細胞分化マーカー遺伝子の mRNA 発現量を定量した。そして、mRNA の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、各肝細胞を分類した。次に、LipoSEARCH 法により、各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。さらに、リアルタイム RT-PCR 法により、各肝細胞における脂質代謝関連遺伝子群の mRNA 発現解析を行った。

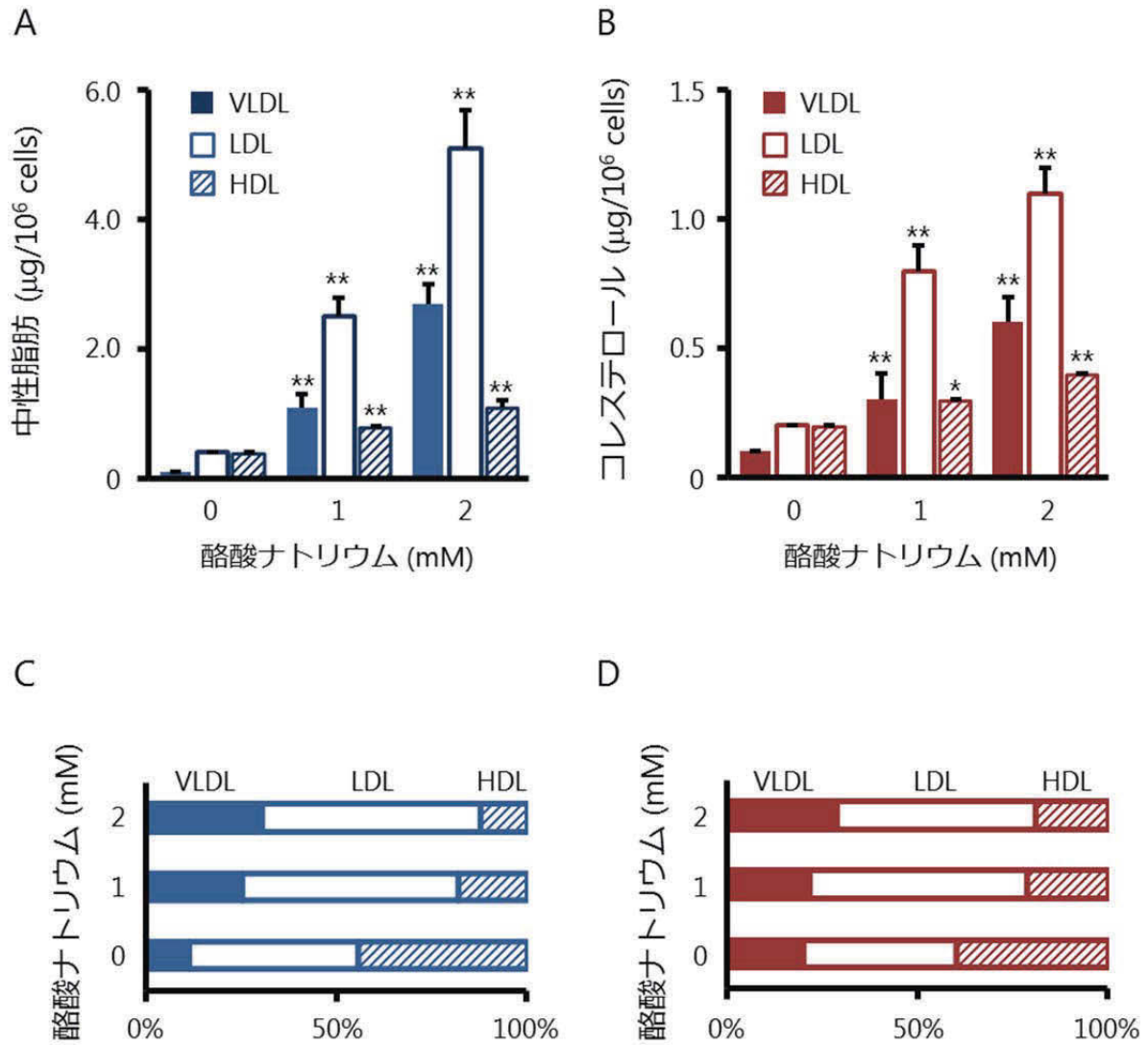


図 12. 酪酸ナトリウム処理が HepG2 細胞の産生するリポタンパク質に与える影響 [79]

A. 中性脂肪量, B. コレステロール量,  
 C. 総中性脂肪量に対する各リポタンパク質画分に含まれる中性脂肪の割合  
 D. 総コレステロール量に対する各リポタンパク質画分に含まれる  
 コレステロールの割合  
 n=3, \* $p < 0.05$  vs. 0 mM.

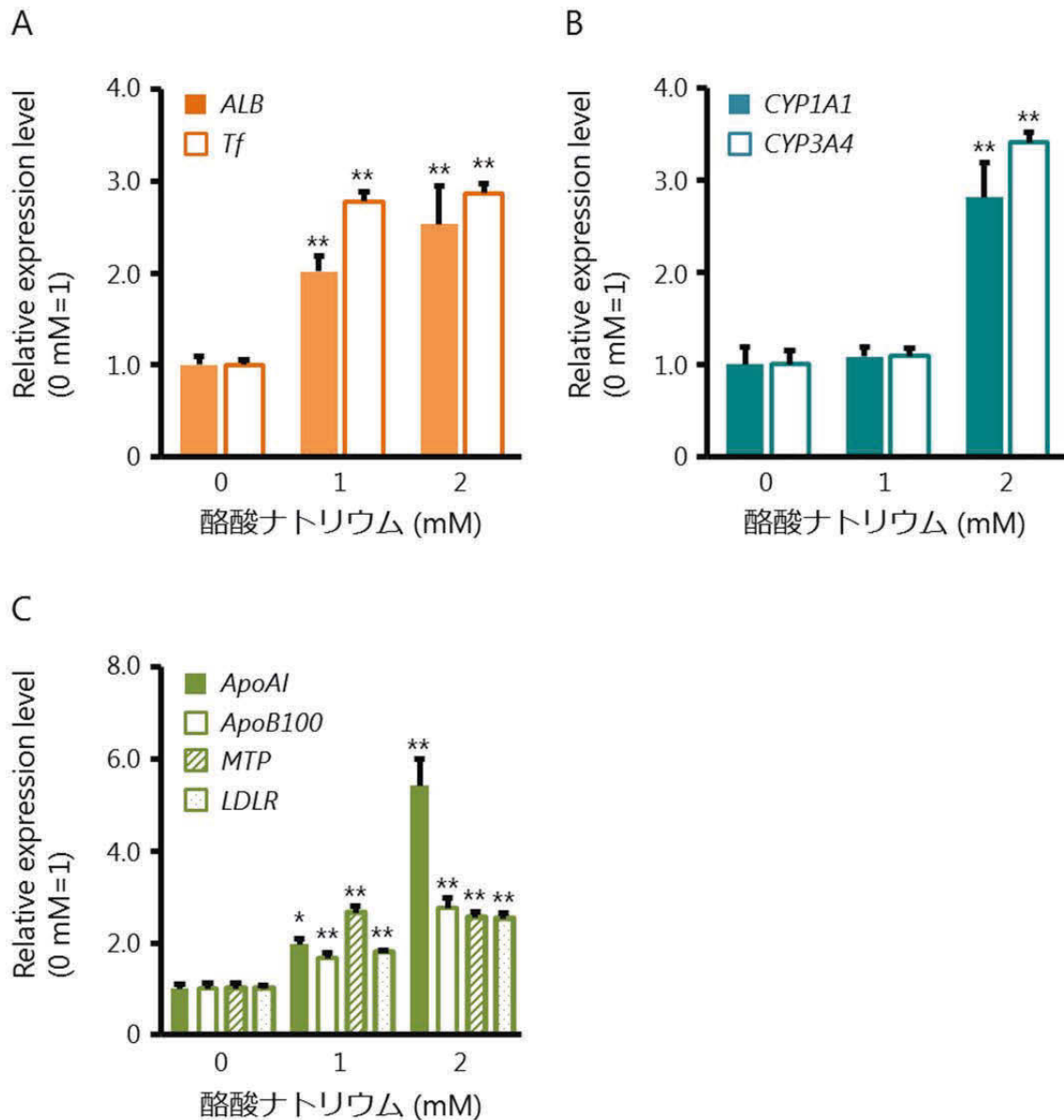


図 13. 酪酸ナトリウム処理による HepG2 細胞の肝細胞分化マーカー遺伝子群および脂質代謝関連遺伝子群の mRNA 発現量の変化 [79]

A. 血清タンパク質遺伝子群 ALB: アルブミン, Tf: トランスフェリン

B. 薬物代謝酵素遺伝子群 CYP1A1, CYP3A4

C. リポタンパク質代謝関連遺伝子群

ApoA1: アポリポタンパク質 AI,

ApoB100: アポリポタンパク質 B100,

MTP: ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質,

LDLR: 低密度リポタンパク質受容体

n=4, \* $p < 0.05$  vs 0 mM, \*\* $p < 0.01$  vs 0 mM.

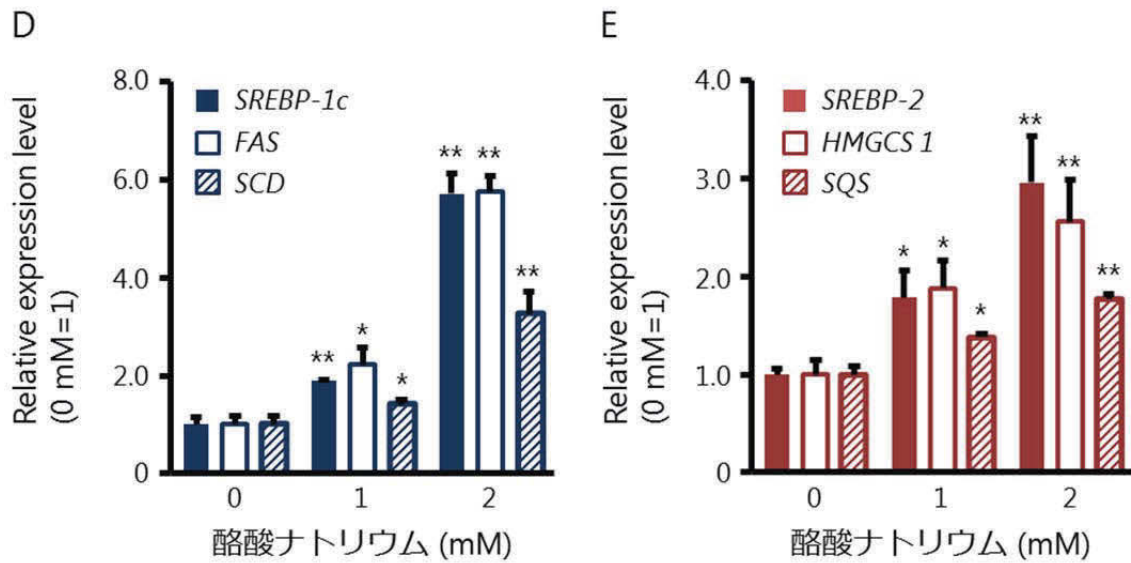


図 13. つづき

D. 中性脂肪合成関連遺伝子群

*SREBP-1c*: ステロール調節エレメント結合タンパク質 1c,

*FAS*: 脂肪酸合成酵素,

*SCD*: ステアロイル CoA 不飽和化酵素

E. コレステロール合成関連遺伝子群

*SREBP-2*: ステロール調節エレメント結合タンパク質 2,

*HMGCS 1*: ヒドロキシメチルグルタリル CoA 合成酵素 1,

*SQS*: スクアレン合成酵素

n=4, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$



## 材料および方法

### 1) ヒト由来肝細胞の培養

本実験には、ヒト培養肝細胞株 5 種 (HLE 細胞, HLF 細胞, HepG2 細胞, HuH-7 細胞および HepaRG 細胞), ヒト初代培養肝細胞 1 種 (HC 細胞: Primary Hepatocyte) の計 6 種を用いた。HLE 細胞, HLF 細胞, HepG2 細胞および HuH-7 細胞の培養には 10% FBS 含有 DMEM (表 6), HepaRG 細胞の培養には HepaRG Maintenance/Metabolism Medium supplement 含有 WE (表 7), HC 細胞の培養には 10% FBS および Hepatocyte Maintenance Supplements 含有 WE (表 7) を用い, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

### 2) 肝細胞分化マーカーおよび脂質代謝関連遺伝子群の発現解析

HLE 細胞, HLF 細胞, HepG2 細胞, HuH-7 細胞, HepaRG 細胞および HC 細胞の各細胞を, 所定の培地を用いて 24-well plate に播種 ( $1.0 \times 10^5$  cells/well・1 ml) し, 培養した (2 日間, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>)。

次に各細胞を PBS (-) で 2 回洗浄した後, LRC (520  $\mu$ l, lysis buffer) に溶解し, 全 RNA を抽出した (表 13)。各細胞の全 RNA を用いて cDNA を合成し (表 14), リアルタイム RT-PCR 解析を行った (表 15)。なお, 各遺伝子の mRNA 発現量は, ハウスキーピング遺伝子である *GAPDH* の mRNA 発現量で補正し, HepG2 細胞の mRNA 発現量を基準として示した。クラスター解析 (Ward 法) は, PASW Statistics 18 (日本 IBM) を用いて行った。

### 3) 肝細胞培養上清のリポタンパク質プロファイルに関する解析

2) と同様に, HLE 細胞, HLF 細胞, HepG2 細胞, HuH-7 細胞, HepaRG 細胞および HC 細胞について, 所定の培地を用いて 24 well plate に 1ml ずつ播種 ( $1.0 \times 10^5$  cells/well・1 ml) し, 培養した (2 日間, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>)。

次に, 細胞を PBS (-) で 2 回洗浄した後, 1% ウシ血清アルブミン (脂肪酸不含) 含有 DMEM (0.5 ml, フェノールレッド不含, 表 9) に交換し, さらに培養 (2 日間, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) した。培養終了後, 細胞培養液を遠心分離 (10,000 rpm/min, 5 min) し, 上清を回収した。同時に, トリパングルー色素排除法により生細胞数を計数した。

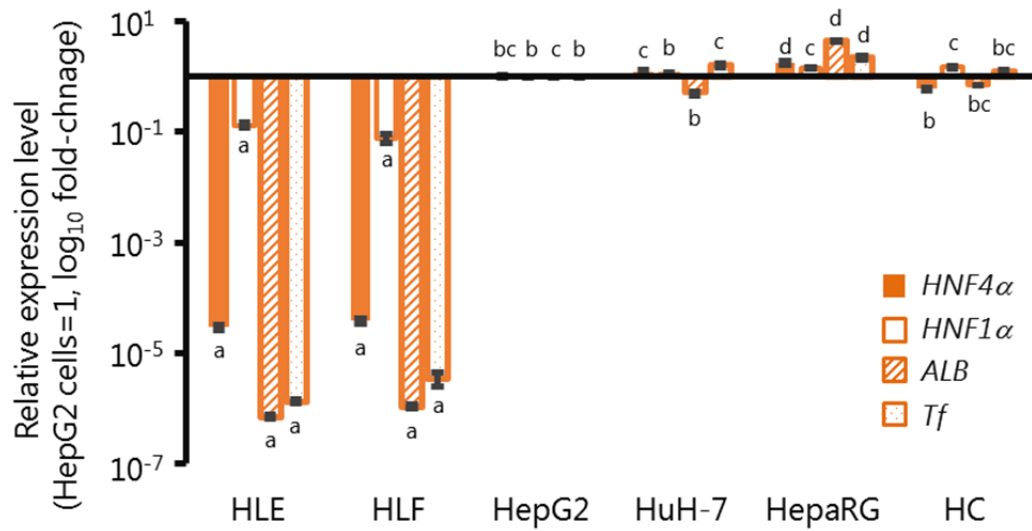
培養上清中に含まれるリポタンパク質プロファイルの解析には, LipoSEARCH 法 (図 8) を用いた。すなわち, 培養上清 (80  $\mu$ l) に含まれるリポタンパク質をゲル濾過 HPLC により粒子サイズに従って分離し, 酵素反応後, 吸光度 (550 nm) を測定することにより, 各リポタンパク質画分に含まれる TG およびコレステロールを定量した。

## 結果

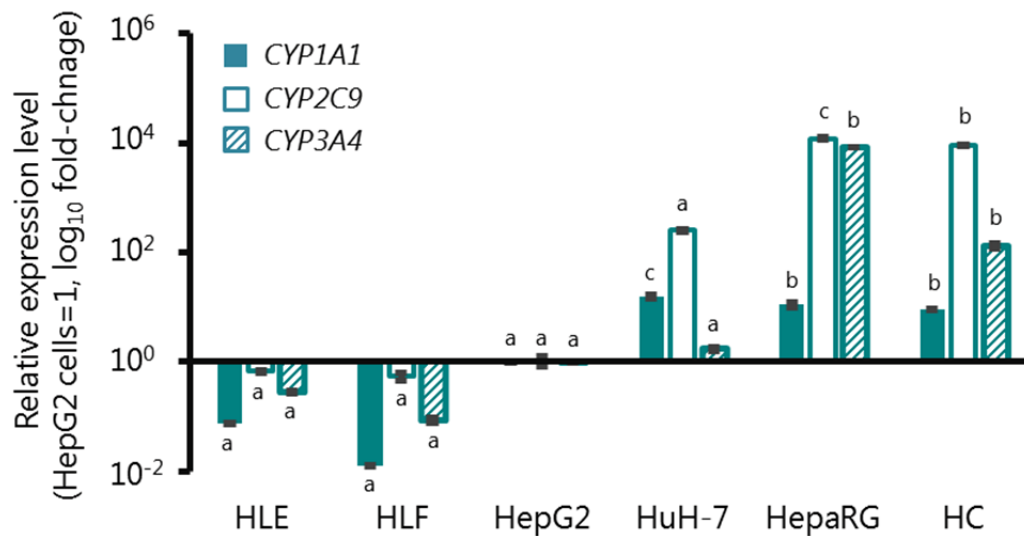
### 1) 肝細胞分化マーカー遺伝子群の発現解析

ヒト培養肝細胞株から調製した全 RNA を試料として、リアルタイム RT-PCR 解析を行い、肝細胞分化マーカー遺伝子群の発現解析を行った。その結果、HLE 細胞および HLF 細胞において肝細胞分化マーカー遺伝子の mRNA 発現量が他の肝細胞と比較して顕著に低かった (図 14A)。特に初期肝細胞マーカー遺伝子である *ALB* および *Tf*, 肝芽細胞マーカー遺伝子である *HNF4α* の mRNA 発現量は HepG2 細胞と比較して、 $1/10^4$  から  $1/10^6$  倍以下と極めて低いことが判明した (図 14A)。また HepaRG 細胞および HC 細胞において、成熟肝細胞で発現し主要な薬物代謝酵素遺伝子である *CYP2C9* および *CYP3A4* の mRNA 発現量は、HepG2 細胞と比較して、有意に高かった (図 14B)。これらの肝細胞特異的な遺伝子群の mRNA 発現量を用いてクラスター解析 (Ward 法) を行い、肝細胞マーカー遺伝子の mRNA 発現パターンの類似性に基づいたグループ形成を行った。その結果、低分化型 (HLE 細胞, HLF 細胞), 中分化型 (HepG2 細胞, HuH-7 細胞), 高分化型 (HepaRG 細胞, HC 細胞) からなるグループに分類された (図 15)。

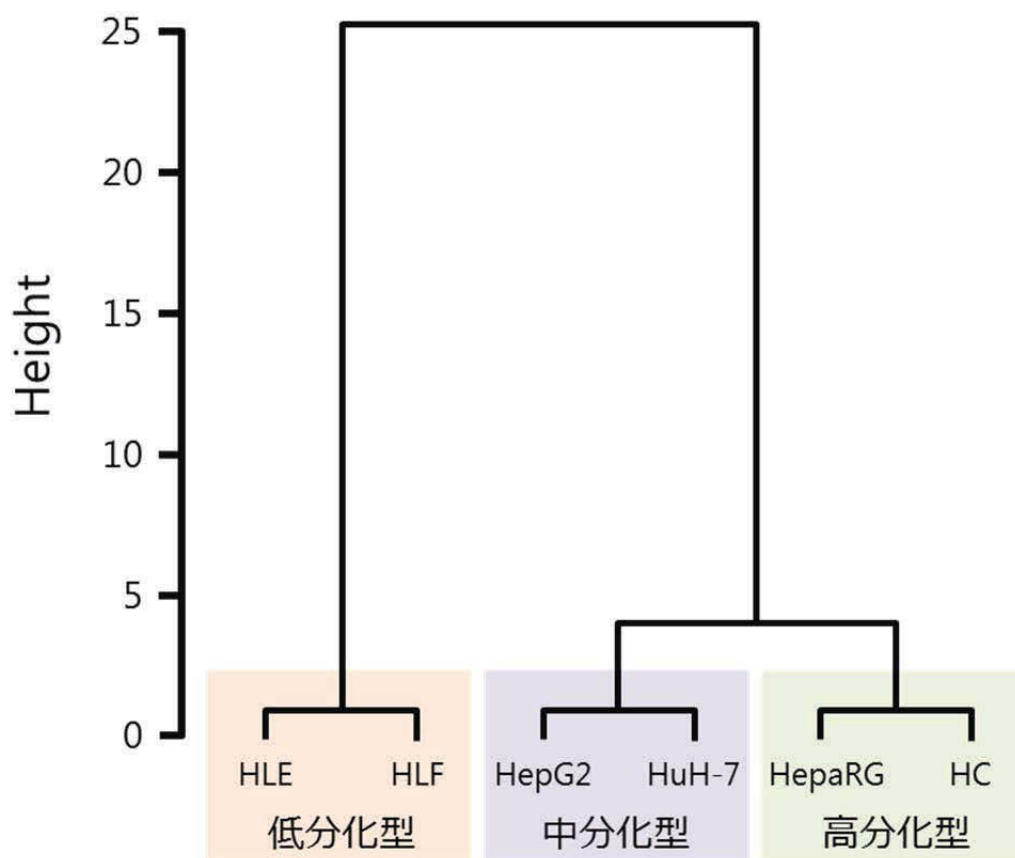
A



B



**図 14. 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 (A) および薬物代謝酵素遺伝子群 (B) の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析)**  
 各 mRNA 発現量は、ハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* の mRNA 発現量で補正した。  
 HLE: HLE 細胞, HLF: HLF 細胞, HepG2: HepG2 細胞, HuH-7: HuH-7 細胞, HepaRG: HepaRG 細胞, HC: ヒト初代培養肝細胞  
 n=3, 異なる文字間 (a, b, c) で有意差あり ( $p < 0.05$ )



**図 15. 肝細胞分化マーカー遺伝子群および薬物代謝酵素遺伝子群の mRNA 発現パターンに基づいたクラスター解析 (Ward 法)**

HLE: HLE 細胞, HLF: HLF 細胞, HepG2: HepG2 細胞, HuH-7: HuH-7 細胞, HepaRG: HepaRG 細胞, HC: ヒト初代培養肝細胞

## 2) ヒト培養肝細胞株の培養上清に含まれるリポタンパク質プロファイルの解析

LipoSEARCH 法により、ヒト培養肝細胞株の培養上清に含まれるリポタンパク質のプロファイルを解析した。その結果、中分化型（HepG2 細胞および HuH-7 細胞）および高分化型（HepaRG および HC 細胞）の培養上清では、肝細胞が産生するすべてのリポタンパク質画分（VLDL, LDL および HDL）においてピークが検出された

（図 16）。そのため、これらの肝細胞はリポタンパク質を産生することが明らかとなった。さらに、各リポタンパク質画分における脂質量を定量および比較した結果、高分化型では、VLDL 画分において多くの脂質が検出されたことから、高分化型の産生するリポタンパク質の粒子径は VLDL サイズのものが多くことが明らかとなった。一方、中分化型では、LDL 画分において多くの脂質が検出されたことから、中分化型の産生するリポタンパク質の粒子径は LDL サイズのものが多くことが明らかとなった

（図 16, 17）。これに対し、低分化型（HLE 細胞および HLF 細胞）は、いずれのリポタンパク質画分においてもピークは検出されなかった（図 16）ことから、低分化型はリポタンパク質を産生しないことが判明した。

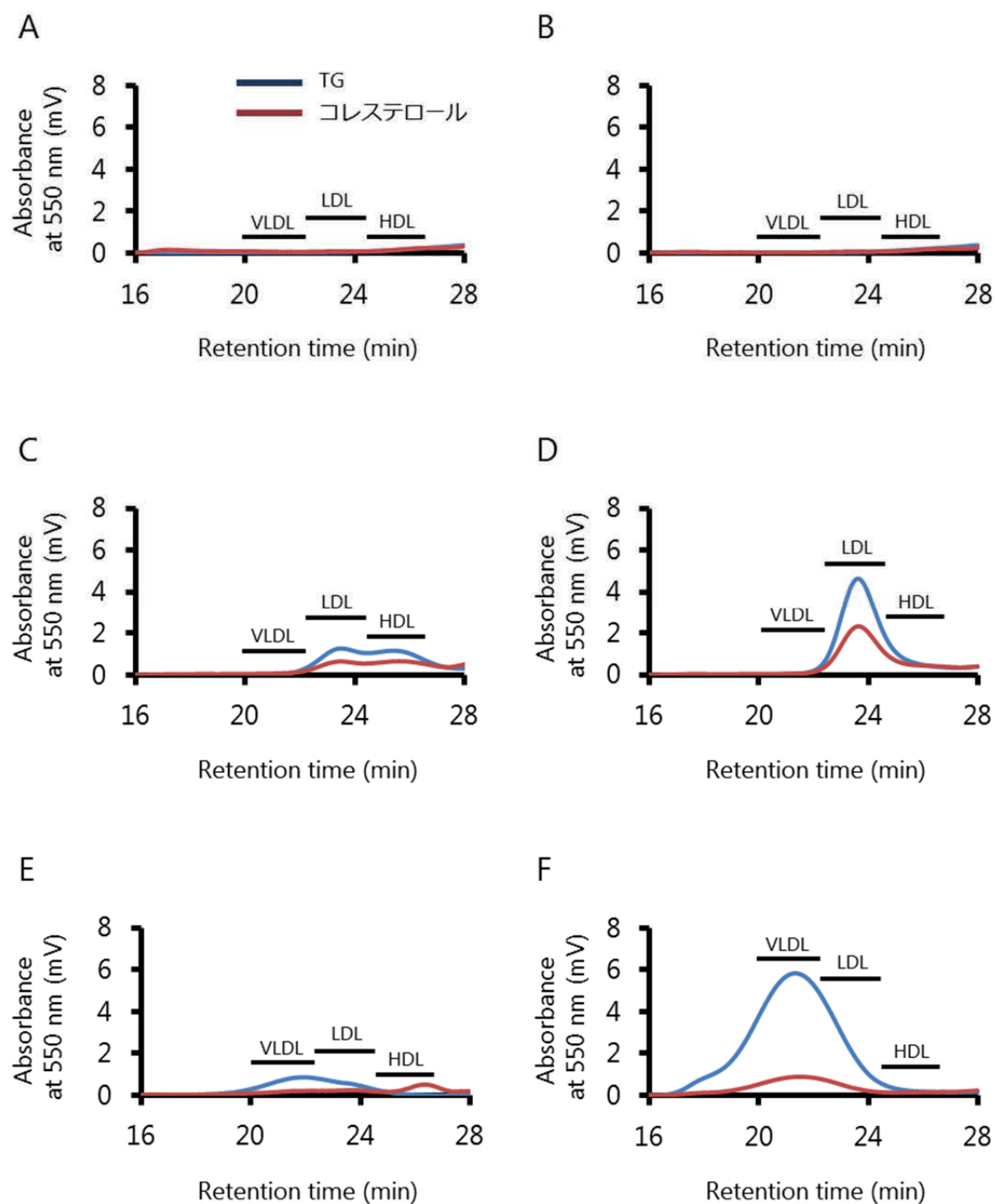


図 16. ヒト培養肝細胞株の培養上清におけるリポタンパク質プロファイル

A. HLE 細胞, B. HLF 細胞, C. HepG2 細胞, D. HuH-7 細胞,  
E. HepaRG 細胞, F. HC 細胞 (ヒト初代培養肝細胞)

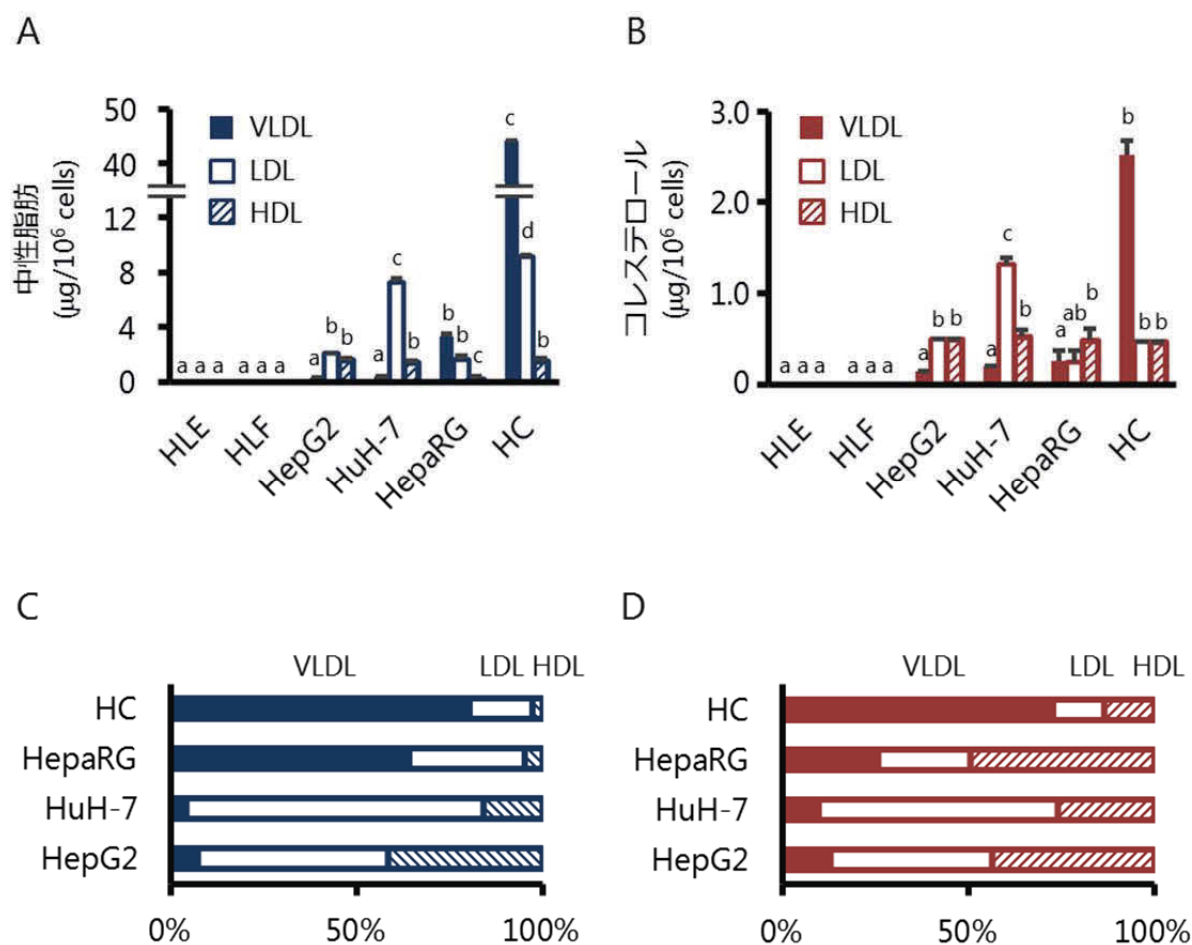


図 17. ヒト培養肝細胞株が産生するリポタンパク質画分に含まれる脂質量 (A, B) と総脂質量に対する各リポタンパク質画分に含まれる脂質量の割合 (C, D)

A. 中性脂肪量, B. コレステロール量,

C. 各リポタンパク質画分に含まれる中性脂肪量の割合,

D. 各リポタンパク質画分に含まれるコレステロールの割合

HLE: HLE 細胞, HLF: HLF 細胞, HepG2: HepG2 細胞, HuH-7: HuH-7 細胞,

HepaRG: HepaRG 細胞, HC: ヒト初代培養肝細胞

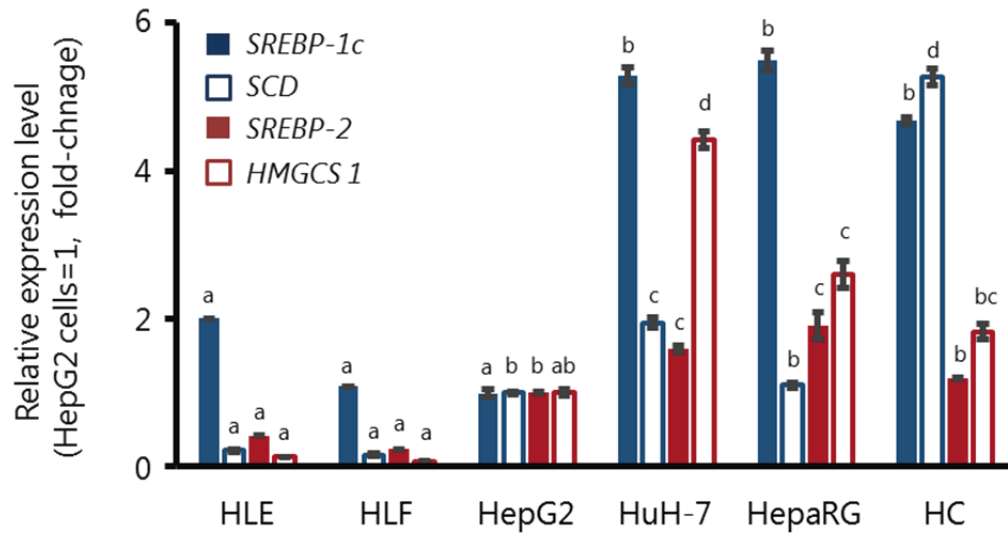
n=3, 異なる文字間 (a, b, c) で有意差あり ( $p < 0.05$ )

### 3) 脂質合成およびリポタンパク質合成関連遺伝子群の発現解析

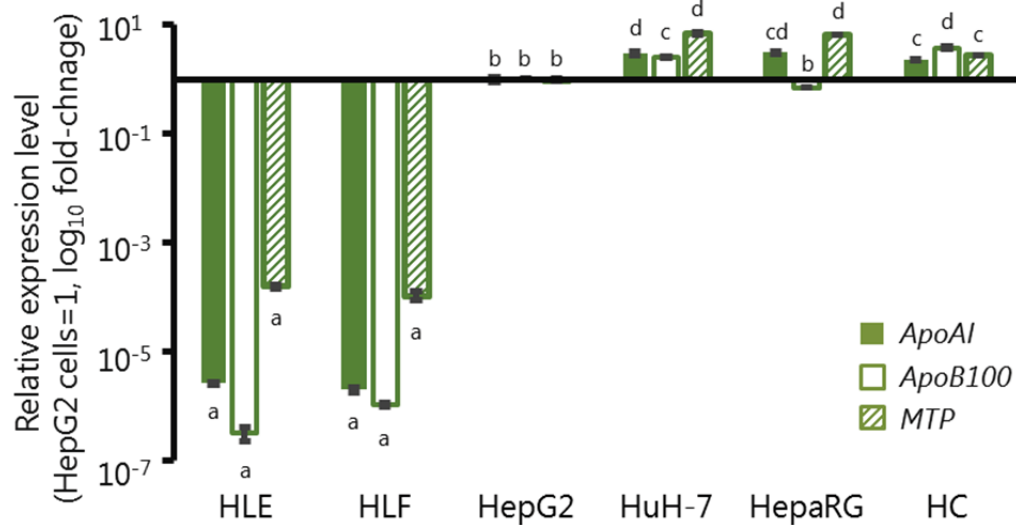
ヒト培養肝細胞株から調製した全 RNA を試料に、リアルタイム RT-PCR 解析を行い、脂質代謝関連遺伝子群の発現解析を行った。その結果、低分化型において、TG の合成に関与する *SCD* 遺伝子およびその転写を正に制御する *SREBP-1c* 遺伝子、並びにコレステロールの合成に関与する *HMGCS 1* およびその転写を正に制御する *SERBP-2* 遺伝子の mRNA 発現量は、中分化型および高分化型と比較して、同程度もしくは 1/10 倍以下と低かった (図 18A)。さらに、低分化型において、HDL の主要な構成因子である *ApoA1*、VLDL の主要な構成因子である *ApoB100* および VLDL の合成に関与する *MTP* の mRNA 発現量は、中分化型、高分化型と比較して、 $1/10^4$ – $1/10^6$  倍以下と極めて低く、ほとんど発現していないことが判明した (図 18B)。



A



B



**図 18. ヒト培養肝細胞株における脂質合成関連遺伝子群 (A) および  
リポタンパク質合成関連遺伝子群 (B) の mRNA 発現(リアルタイム RT-PCR)**  
各 mRNA 発現量は, ハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* の mRNA 発現量で  
補正した。  
HLE: HLE 細胞, HLF: HLF 細胞, HepG2: HepG2 細胞, HuH-7: HuH-7 細胞,  
HepaRG: HepaRG 細胞, HC: HC 細胞 (ヒト初代培養肝細胞)  
n=3, 異なる文字間 (a, b, c, d) で有意差あり ( $p < 0.05$ )

## 考察

肝細胞マーカー遺伝子群の mRNA 発現パターンに基づくクラスター解析により、低分化型グループに分類された HLE 細胞および HLF 細胞は、VLDL, LDL および HDL のリポタンパク質を産生しなかった (図 16, 17)。HLE 細胞および HLF 細胞がリポタンパク質を産生しなかったのは、中分化型に分類された HepG2 細胞および HuH-7 細胞や高分化型に分類された HepaRG 細胞および HC 細胞と比較して、脂質代謝遺伝子群、特にリポタンパク質合成に関与する遺伝子群 (*ApoA1*, *ApoB100* および *MTP*) の mRNA 発現量が極めて低いためと考えられる (図 18)。

中分化型に分類された HepG2 細胞および HuH-7 細胞は、高分化型に分類された HepaRG 細胞および HC 細胞と比較して、薬物代謝酵素遺伝子群である *CYP2C9* および *CYP3A4* の mRNA 発現量が低かった (図 14)。これは、HepG2 細胞や HuH-7 細胞などのヒト肝癌由来肝細胞株は、継代培養が可能であるものの、癌化により *CYP* 遺伝子の発現が著しく低いこと [80, 81] に起因すると考えられる。

高分化型に分類された HepaRG 細胞および HC 細胞は VLDL 画分のリポタンパク質を多く産生した (図 16E, F) が、中分化型に分類された HepG2 細胞および HuH-7 細胞は LDL 画分に分画されるリポタンパク質を多く産生した (図 16C, D)。このことから、HepG2 細胞および HuH-7 細胞が産生するリポタンパク質は、HepaRG 細胞および HC 細胞が産生するリポタンパク質と比較して、粒子サイズの小さいものが多いことが明らかとなった。

肝細胞において VLDL は、2 段階の反応を経て形成される [82]。すなわち、MTP が ApoB100 と脂質の会合を触媒し、pre-VLDL が形成された後、pre-VLDL がゴルジ体へ輸送され、phospholipase D1 や ERK2 (extracellular signal-regulated kinase 2) の作用によって、さらに TG を取り込み、大型化することで成熟型 VLDL となる。中分化型に分類された HepG2 細胞および HuH-7 細胞と高分化型に分類された HepaRG 細胞および HC 細胞の間で *ApoB100* および *MTP* の mRNA 発現量に大きな差はなかった (図 18B)。したがって、HepG2 細胞と HuH-7 細胞では、pre-VLDL の形成ではなく、pre-VLDL への TG の取り込みによる VLDL の成熟化 (リポタンパク質の大型化) が進行せず、粒子サイズの小さいリポタンパク質が多く産生されたと考えられる。

以上に示した第 3 章の結果から、肝細胞は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示され、肝細胞の分化とリポタンパク質産生に関連性が認められた。そのため、肝細胞が産生するリポタンパク質の詳細な解析は、肝細胞の分化段階を判断する新たな分化マーカーになり得ることが示された。

## 第 4 章

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

## 第4章 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

### 実験1 肝細胞核因子 FOXA2, HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ の単独強制発現がヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞の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

#### 緒言

##### 1) 肝臓の発生過程

マウスにおける肝臓の発生（図2）は、前腸内胚葉が心臓中胚葉から分泌される線維芽細胞増殖因子（FGF）や横中隔間充織から分泌される骨形成タンパク質（BMP）などの増殖因子の刺激を受け、胎生 8.5–9.5 日頃に肝芽細胞が形成されることで開始する [1, 2]。その後、肝芽細胞は、横中隔間充織や周りの内皮細胞から分泌される肝細胞増殖因子（HGF, [3, 4]）や肝芽細胞自身から分泌されるオンコスタチン M（OSM, [5, 6]）などのシグナルを受け、胎生 13.5–17.5 日頃にかけて肝細胞への分化が進行する [7, 8]。肝臓は、肝細胞（肝実質細胞）と胆管上皮細胞に加え、類洞内皮細胞、肝星細胞、クッパー細胞などの多くの細胞から構成される（図1）が、このうち各種代謝や解毒、胆汁の生成などの主要な肝機能の多くは肝細胞が担っている。したがって、肝細胞は肝機能の研究において極めて重要な細胞といえる。

##### 2) 肝臓の発生を制御する転写因子群

肝細胞核因子（HNF）群は、前腸内胚葉からの肝臓形成や肝機能の獲得・維持に関与する転写因子として知られている [25]。HNF3 $\beta$ としても知られ、フォークヘッドドメインを有する FOXA2 (forkhead box protein A2) は、内胚葉系譜への分化を制御しており、肝臓の発生段階において最も初期に発現し、肝臓の初期形態形成に深く関与する [83]。核内受容体である HNF4 $\alpha$ は、肝芽細胞から肝細胞への分化に加え、肝細胞が有する多くの機能の獲得・維持に関与する [84, 85]。ホメオボックスドメインを有する HNF1 $\alpha$ は成熟肝細胞で発現し、肝細胞が担う種々の代謝に広く関与する [86]。これらの転写因子に加え、ジンクフィンガー型転写因子 GATA4, GATA6 [26, 27]、ホメオボックス型転写因子 HEX [28, 29] および塩基性ロイシンジッパー型転写因子 C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  [30, 31] などの転写因子群が肝臓の発生過程で発現することにより肝臓が形成される。

##### 3) 液性因子および遺伝子導入を用いた幹細胞から肝細胞への分化誘導法

液性因子による幹細胞から肝細胞への分化誘導法（図3）は、発生過程における肝

臓形成を模した形で幹細胞を段階的に肝細胞へと分化・成熟させる [17, 18]。すなわち、未分化細胞である幹細胞に Activin A などを添加することで内胚葉系細胞へ分化させた後、FGF, BMP, HGF などを添加し、肝芽細胞へ分化を促す [19-21]。さらに、OSM やデキサメタゾン (Dex) などを添加することによって肝細胞の成熟を促す [8, 16]。このような液性因子を用いた分化誘導法によって得られた分化誘導肝細胞は、グリコーゲンの蓄積能やアルブミン (ALB) の分泌能、薬物代謝酵素 (CYP) 活性などの機能を有する [8, 16] が、機能レベルでヒト初代培養肝細胞と同一までには至らず、また分化誘導効率も低いことが課題であった。そこで近年、液性因子に加え、肝細胞への分化に関与する転写因子をコードする遺伝子を導入することにより、高効率で分化誘導肝細胞を作製する分化誘導法が報告された [22-24]。遺伝子導入法によって得られた分化誘導肝細胞は、ヒト初代培養肝細胞と同等の ALB 分泌能や薬物代謝酵素活性など有する [22-24]。しかしながら、従来から行われている分化誘導肝細胞の評価は、肝細胞が有する特徴的な機能の一部に重点を置いているに過ぎず、分化誘導肝細胞において肝細胞が有する脂質代謝能や胆汁酸合成能などの評価は未だなされていない。そのため、すべての機能レベルで正常肝細胞と同等な分化誘導肝細胞の作製には至っていない。

肝細胞への分化誘導の材料となる幹細胞には、多能性を有する ES 細胞 [11, 12] や iPS 細胞 [13, 14] に加え、多分化能を有する体性幹細胞 [87] が用いられている。体性幹細胞の一種である間葉系幹細胞 (MSCs : Mesenchymal Stem Cells) は、中胚葉性組織 (間葉) に由来する体性幹細胞であり、自己複製能と骨芽細胞や筋肉細胞、脂肪細胞などの間葉系組織への多分化能を有する [70-72, 88]。さらに MSCs は、外胚葉由来の神経細胞 [73] や内胚葉由来の肝臓 [74] への分化能も保持していることが報告され、ES・iPS 細胞と共に、再生医療への応用が大きく期待されている細胞種である。ヒト骨髓由来間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞は、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) 遺伝子およびヒトパピローマウイルス (HPV) E7 を導入した不死化細胞株でありながら、間葉系幹細胞としての多分化能を保持した株化細胞である [69]。UE7T-13 細胞は、肝臓の初期形態形成に関与する FOXA2 を発現させることで、初期の肝細胞様細胞を分化誘導できる [89] こと、また肝臓の発生に深く関与する HNF4 $\alpha$ を発現させることで、アルブミンおよび尿素分泌能を有する肝細胞様細胞を分化誘導できる [90] ことが報告されている。

#### 4) 肝細胞における VLDL の産生

肝細胞では、血中のグルコースや遊離脂肪酸、各種代謝の中間体であるアセチル CoA から中性脂肪 (TG) やコレステロールが合成される。TG はエネルギー源として、コレステロールはホルモンや胆汁酸の原料、細胞膜の構成成分として利用される。これらの脂質を末梢組織に運ぶため、肝細胞では超低密度リポタンパク質 (VLDL) が合成される (図 6, 7)。すなわち VLDL は、小胞体内腔に存在するミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質 (MTP) が VLDL の構成成分であるアポリポタンパク質 B100 (ApoB100) と TG やコレステロールを含んだ粒子との会合を触媒することによって産

生される [37–40]。VLDL の産生に重要な役割を担う ApoB100 および MTP は、それぞれ肝細胞への分化に関与する HNF 群の制御下にあることが報告されている [85, 91, 92]。しかしながら、同じく HNF 群が制御する肝細胞への分化とリポタンパク質産生の関係について着眼した研究はこれまで行われていない。

そこで第 4 章 実験 1 では、肝細胞への分化に深く関与し、それぞれ発現時期が異なる 3 種の HNF 群、すなわち FOXA2, HNF4 $\alpha$  および HNF1 $\alpha$  を強制的に発現させた UE7T-13 細胞をそれぞれ樹立し、これらの HNF 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。

## 材料および方法

### 1) HNF 強制発現ベクターの構築

3 種の HNF 強制発現ベクター, pMN1/FOXA2, pMN1/HNF4 $\alpha$  および pMN1/HNF1 $\alpha$  (図 19) の構築を行った。まず, FOXA2 (NM\_153675) のコード DNA 配列の 5'末端側に *Xba*I 認識配列および Kozak 配列 [93] を, 3'末端側に *Bam*HI 認識配列を付与した DNA 配列を化学合成により作製した (ジェンスクリプトジャパン)。作製した DNA 断片を哺乳動物用発現ベクター pMN1Pur [94] のマルチクローニングサイト (*Xba*I-*Bam*HI) に組み込み, FOXA2 強制発現ベクター (pMN1/FOXA2) を構築した。なお, pMN1Pur は, 哺乳動物において強力な活性を示す CAG プロモーター [95], IRES (internal ribosomal entry site) およびピューロマイシン耐性遺伝子を有するジシストロニック mRNA 発現ベクターである。HNF4 $\alpha$  (NM\_000457) および HNF1 $\alpha$  (NM\_00545) についても同様に操作を行い, HNF4 $\alpha$  強制発現ベクター (pMN1/HNF4 $\alpha$ ), および HNF1 $\alpha$  強制発現ベクター (pMN1/HNF1 $\alpha$ ) を構築した (図 19)。

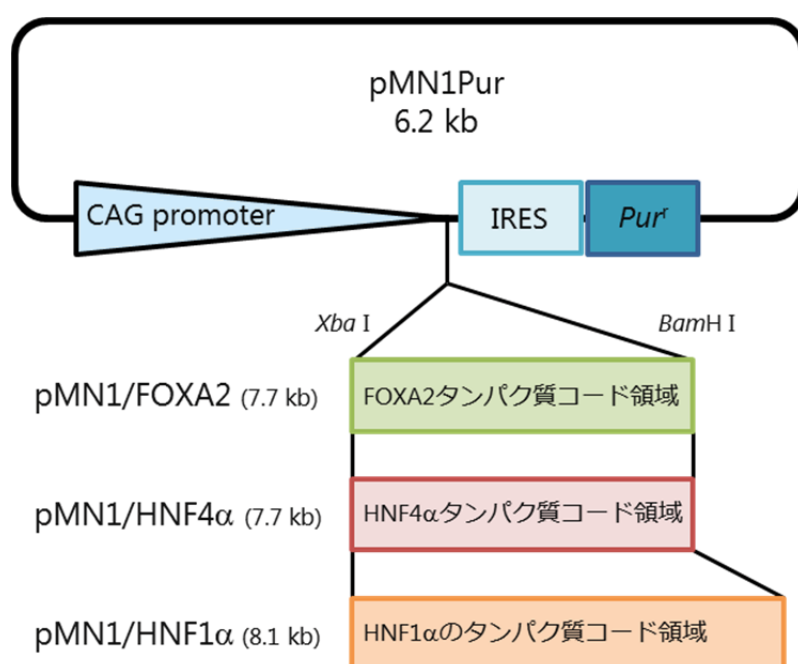


図 19. FOXA2 強制発現ベクター (pMN1/FOXA2), HNF4 $\alpha$  強制発現ベクター (pMN1/HNF4 $\alpha$ ) および HNF1 $\alpha$  強制発現ベクター (pMN1/HNF1 $\alpha$ ) の構造  
それぞれの HNF タンパク質コード領域の 5'末端側には, Kozak 配列 (GCCGCCACC) を付与した。

## 2) HNF 強制発現ベクター導入細胞の樹立

3 種の HNF 強制発現ベクター (pMN1/FOXA2, pMN1/HNF4 $\alpha$ , pMN1/HNF1 $\alpha$ , 図 19) およびコントロールベクター (pMN1Pur) をヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞にそれぞれリポフェクション法により遺伝子導入した (表 12)。まず, UE7T-13 細胞を 6-well dish に播種 ( $3 \times 10^5$  cells/well) し, 培養 (16 hr, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) した。次に, それぞれの HNF 群強制発現ベクター, またはコントロールベクター (3  $\mu$ g) および遺伝子導入試薬 Viafect (12  $\mu$ l) を添加した血清非添加培養液 Opti-MEM (120  $\mu$ l) を UE7T-13 細胞へそれぞれ添加した。培養 (24 hr, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) を継続した後, 6 cm dish に細胞を再播種し ( $2 \times 10^5$  cells/dish), ピューロマイシン (終濃度 0.3  $\mu$ g/ml) を添加した 10% FBS 含有 DMEM で培養 (2 週間) することにより, ベクターが安定的に導入された細胞を選択した。

## 3) HNF 群の発現解析

それぞれの HNF の発現をリアルタイム RT-PCR 解析 (表 15) およびウエスタンブロット解析 (表 18) を用いて検証した。24-well cell culture plate において 90% コンフルエントまで培養したそれぞれの HNF 強制発現ベクター導入細胞を 1% 2-ME を添加した LRC (520  $\mu$ l, 表 13) に溶解し, リアルタイム RT-PCR 解析の試料とした。同様に, 24-well cell culture plate において 90% コンフルエントまで培養したそれぞれの HNF 強制発現ベクター導入細胞を冷 PBS (-) (500  $\mu$ l) で 2 回洗浄した後, プロテアーゼ阻害剤を添加した M-PER Reagent (150  $\mu$ l, 表 17) に溶解し, ウエスタンブロット解析の試料とした (15  $\mu$ g protein/lane)。なお, HepG2 細胞についても同様の操作を行い実験のポジティブコントロールとした。

## 4) HNF 強制発現ベクター導入細胞の形態変化

それぞれの HNF 強制発現ベクター導入細胞の細胞形態を高密度培養条件下および低密度培養条件下で鏡検した。

## 5) 肝細胞分化マーカー遺伝子の mRNA 発現解析

それぞれの肝細胞分化マーカーの発現をリアルタイム RT-PCR 解析 (表 15) を用いて検証した。24-well culture plate において 90% コンフルエントまで培養した HNF 強制発現ベクター導入細胞を 1% 2-ME を添加した LRC (520  $\mu$ l, 表 13) に溶解し, リアルタイム RT-PCR 解析の試料とした。肝細胞分化マーカー遺伝子として,  $\alpha$ -フェトプロテイン (AFP), アルブミン (ALB) および薬物代謝酵素 (CYP) 遺伝子群 (CYP3A4, CYP2B6 および CYP2C9) を用いた。これら遺伝子の発現は, HNF 群の制御下にあることが報告されている [25, 96–99]。なお, HepG2 細胞についても同様の操作を行い実験のポジティブコントロールとした。



## 6) HNF 強制発現ベクター導入細胞の脂質蓄積の検証

オレイン酸を添加した培養液（表 9）でそれぞれの HNF 強制発現ベクター導入細胞を培養し、細胞内への脂質の蓄積を Oil Red O 染色（表 10）を用いて検証した。24-well cell culture plate に HNF 強制発現ベクター導入細胞を播種 ( $0.5 \times 10^5$  cells/well) し、培養した（2 日間, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>）。PBS (-) で 2 回洗浄し、オレイン酸ナトリウム (0.75 mM) を添加した DMEM (Phenol red-free, 500  $\mu$ l) により培養（2 日間, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>）した。培養終了後、PBS (-) で細胞を洗浄し、Oil Red O 染色を行った。なお、HepG2 細胞についても同様の操作を行い実験のポジティブコントロールとした。

## 7) HNF 強制発現ベクター導入細胞の細胞内および培養上清に含まれる中性脂肪およびコレステロールの定量

オレイン酸を添加した培養液（表 9）でそれぞれの HNF 強制発現ベクター導入細胞を培養し、細胞内に蓄積した TG およびコレステロール（表 11）、培養上清に含まれる TG およびコレステロール（表 11）を定量した。24-well cell culture plate に HNF 強制発現ベクター導入細胞を播種 ( $0.5 \times 10^5$  cells/well) し、培養（2 日間, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>）した。PBS (-) で 2 回洗浄し、オレイン酸ナトリウム (0.75 mM) を添加した DMEM (Phenol red-free, 500  $\mu$ l) により培養（2 日間, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>）した。

### ・ 細胞内の中性脂肪およびコレステロールの定量

培養終了後、PBS (-) で細胞を洗浄し、細胞を凍結した (-20°C, 4 hr)。TG 酵素液①または CHO 酵素液② (120  $\mu$ l) を添加し、細胞を溶解した。細胞溶解液をインキュベート (37°C, 1 hr) し、等量の超純水を加えた後、96-well plate に分注 (120  $\mu$ l) した。TG 酵素液②または CHO 酵素液② (40  $\mu$ l) を添加し、吸光度 (550 nm) を測定した。

### ・ 培養上清に含まれる中性脂肪およびコレステロールの定量

培養終了後、細胞培養液を遠心分離 (15,000 rpm, 5 min) し、上清を回収した。上清を凍結乾燥したのち、TG 酵素液①または CHO 酵素液② (120  $\mu$ l) を添加し、凍結乾燥物を溶解した。溶解液をインキュベート (37°C, 1 hr) し、96-well plate に分注 (120  $\mu$ l) した。TG 酵素液②または CHO 酵素液② (40  $\mu$ l) を添加し、吸光度 (550 nm) を測定した。

中性脂肪およびコレステロール濃度が既知の血清を用いて検量線を作成し、あらかじめ計数した細胞数を用いて中性脂肪量およびコレステロール量を補正した。なお、HepG2 細胞についても同様の操作を行い実験のポジティブコントロールとした。

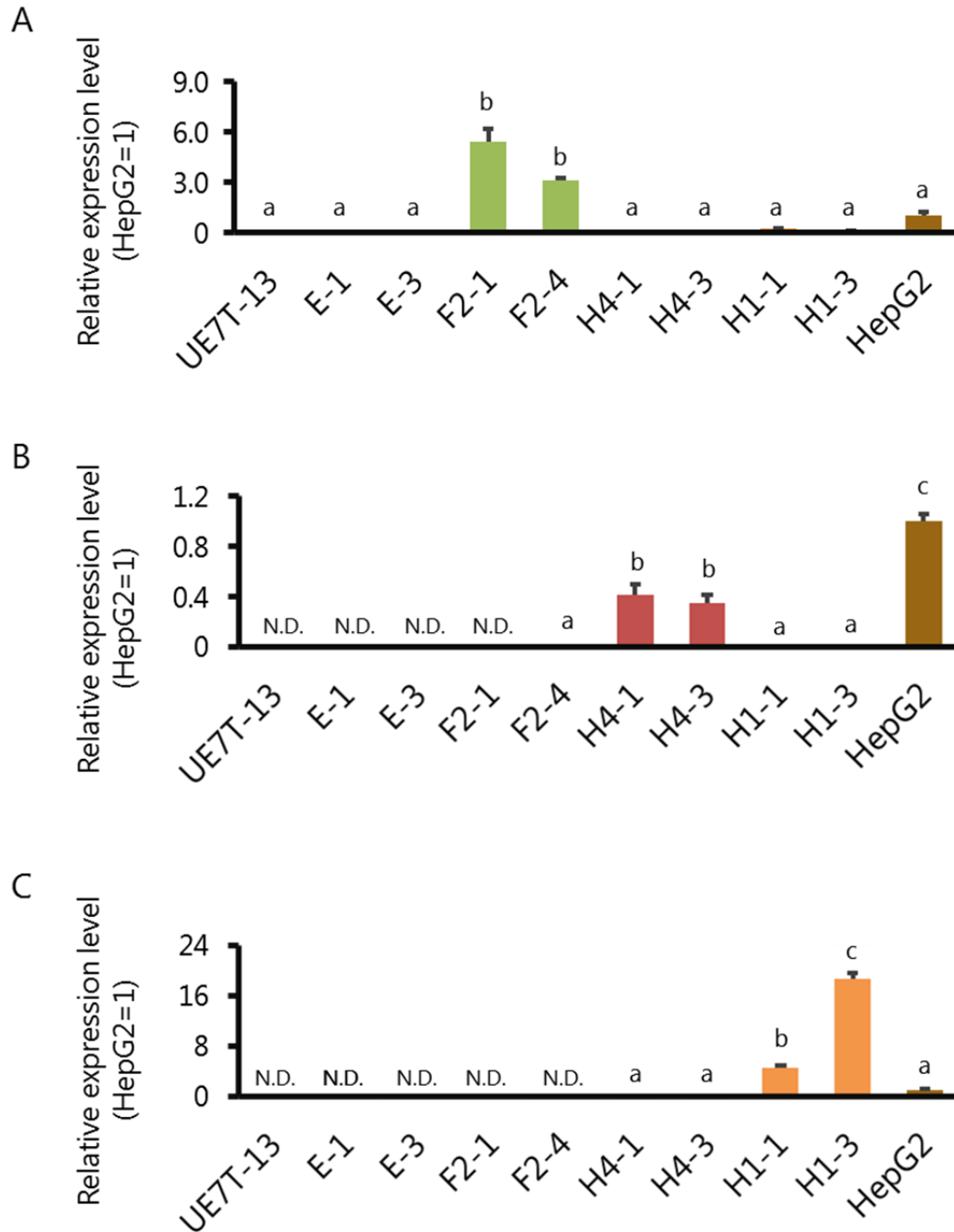
## 8) HNF 強制発現ベクター導入細胞の ApoB100 および MTP の発現解析

VLDL の産生に関与する ApoB100 および MTP の発現をリアルタイム RT-PCR 解析 (表 15) およびウェスタンブロット解析 (表 18) を用いて検証した。24-well cell culture plate でオレイン酸添加培養液を用いて培養したそれぞれの HNF 強制発現ベクター導入細胞を 1% 2-ME を添加した LRC (520  $\mu$ l, 表 13) に溶解し, リアルタイム RT-PCR 解析の試料とした。同様に, 24-well cell culture plate でオレイン酸添加培養液を用いて培養したそれぞれの HNF 強制発現ベクター導入細胞を冷 PBS (-) (500  $\mu$ l) で 2 回洗浄した後, プロテアーゼ阻害剤を添加した M-PER Reagent (150  $\mu$ l, 表 17) に溶解し, ウェスタンブロット解析の試料とした (15  $\mu$ g protein/lane)。なお, HepG2 細胞についても同様の操作を行い実験のポジティブコントロールとした。

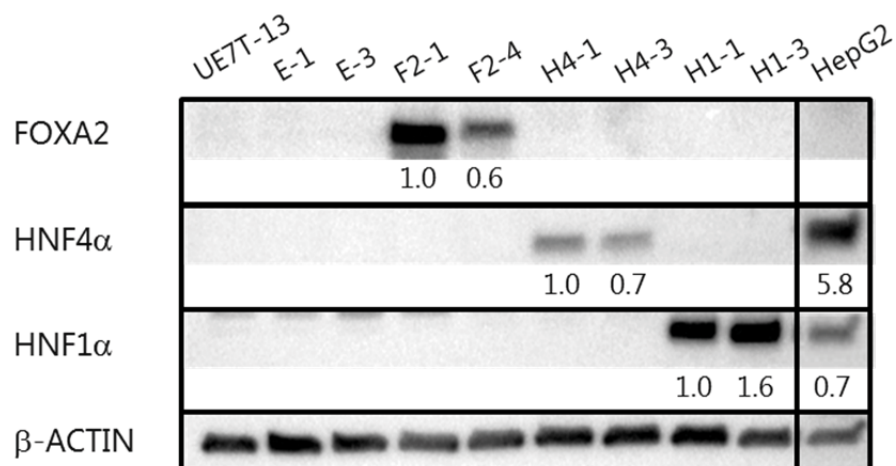
## 結果

### 1) HNF 単独強制発現ベクター導入細胞の樹立と HNF 群の発現解析

リアルタイム RT-PCR 解析およびウエスタンブロット解析により、HNF 遺伝子を導入した UE7T-13 細胞において、FOXA2、HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ がそれぞれ強制発現されていることを確認した (図 20, 21)。次に、単独強制発現させた HNF が他の内在性 HNF 群の発現を誘導するか検討したところ、FOXA2 の単独強制発現では、内在性 HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ の発現を顕著に誘導することはなかった (図 20, 21)。同様に、HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ の単独強制発現についても他の内在性 HNF 群の発現を顕著に誘導することはなかった (図 20, 21)。



**図 20. HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における *FOXA2* (A), *HNF4α* (B) および *HNF1α* (C) 遺伝子の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析)**  
 各 mRNA 発現量は、ハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* の mRNA 発現量で補正した。  
 UE7T-13: UE7T-13 細胞, E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞,  
 F2-1, F2-4: pMN1/*FOXA2* 導入細胞, H4-1, H4-3: pMN1/*HNF4α* 導入細胞,  
 H1-1, H1-3: pMN1/*HNF1α* 導入細胞, HepG2: HepG2 細胞  
 n=3, 異符号間 (a, b, c) で有意差あり ( $p < 0.05$ ), N.D.: not detected.



**図 21. HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における FOXA2, HNF4αおよび HNF1αタンパク質の発現 (ウエスタンブロット解析)**

下の数字は,  $\beta$ -ACTIN により補正した強度比を示す。

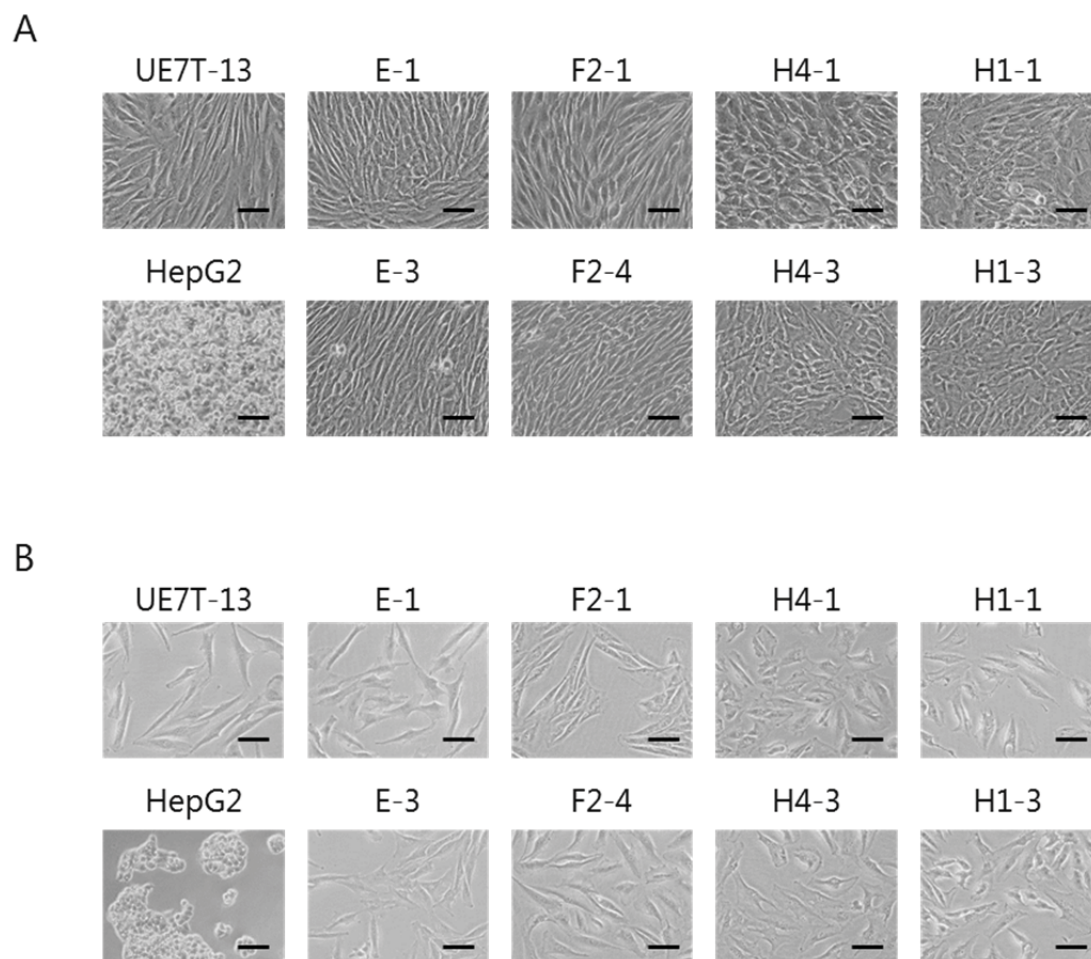
UE7T-13: UE7T-13 細胞, E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞,

F2-1, F2-4: pMN1/FOXA2 導入細胞, H4-1, H4-3: pMN1/HNF4α導入細胞,

H1-1, H1-3: pMN1/HNF1α導入細胞, HepG2: HepG2 細胞

## 2) HNF 強制発現ベクター導入細胞の形態変化

間葉系由来の細胞である UE7T-13 細胞の細胞形態は紡錘状を示す。コントロールベクター導入細胞および FOXA2 強制発現ベクター導入細胞の細胞形態は、UE7T-13 細胞と同様に紡錘状を示した (図 22)。一方、HNF4 $\alpha$ 強制発現ベクター導入細胞 (H4-1, H4-3) および HNF1 $\alpha$ 強制発現ベクター導入細胞 (H1-1, H1-3) の細胞形態は紡錘状から、上皮細胞の特徴である敷石状に変化した。



**図 22. HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における細胞形態**

A. 高密度培養, B. 低密度培養

UE7T-13: UE7T-13 細胞, HepG2: HepG2 細胞

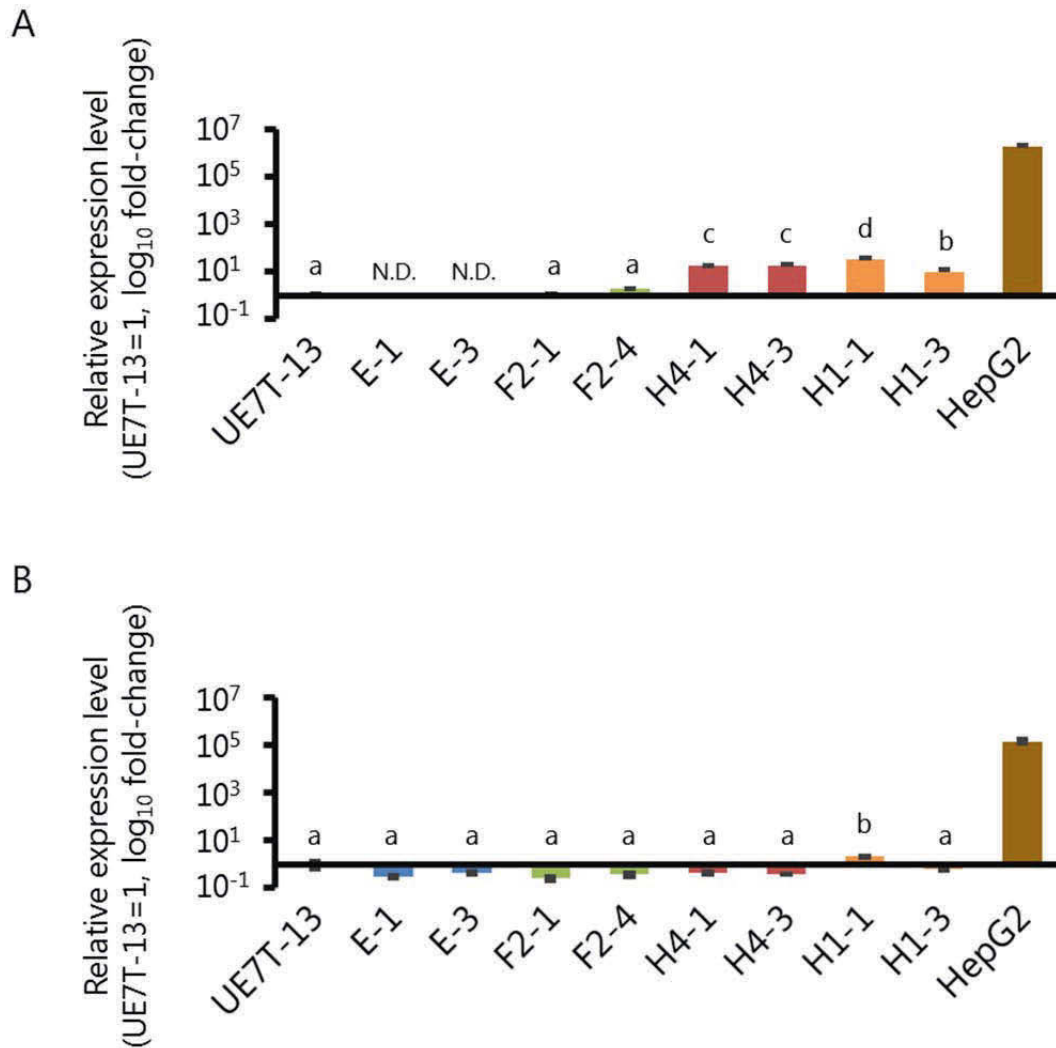
E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞, F2-1, F2-4: pMN1/FOXA2 導入細胞,

H4-1, H4-3: pMN1/HNF4 $\alpha$ 導入細胞, H1-1, H1-3: pMN1/HNF1 $\alpha$ 導入細胞,

Scale bar : 100  $\mu$ m

### 3) HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における肝細胞マーカー遺伝子群の発現解析

HNF 単独強制発現ベクター導入細胞から調製した全 RNA を試料に、リアルタイム RT-PCR 解析を行い、肝細胞分化マーカー遺伝子群の発現解析を行った。代表的な初期肝細胞マーカー遺伝子である *AFP* の mRNA 発現量は、UE7T-13 細胞に対して、FOXA2 強制発現ベクター導入細胞では 1.2–1.9 倍、HNF4 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞では 18–19 倍、HNF1 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞では 10–35 倍にそれぞれ増加することが判明した (図 23A)。しかしながら、HepG2 細胞に対しては、いずれの HNF 強制発現ベクター導入細胞においても  $1.0 \times 10^{-5}$  倍以下であった。同様に *ALB* の mRNA 発現量は、UE7T-13 細胞に対して、*AFP* の発現量が 35 倍に増加した HNF1 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞 (H1-1) において 2.1 倍に増加したが、他の HNF 強制発現ベクター導入細胞においては顕著な発現量の増加は見られなかった (図 23B)。また HepG2 細胞に対しては、いずれの HNF 強制発現ベクター導入細胞も  $1.0 \times 10^{-5}$  倍以下であった (図 23)。



**図 23. HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における  
肝細胞分化マーカー遺伝子群の mRNA 発現（リアルタイム RT-PCR 解析）**

A. AFP:  $\alpha$ -fetoprotein, B. ALB: Albumin

各 mRNA 発現量は、ハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* の mRNA 発現量で補正した。

UE7T-13: UE7T-13 細胞, E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞,

F2-1, F2-4: pMN1/FOXA2 導入細胞, H4-1, H4-3: pMN1/HNF4 $\alpha$ 導入細胞,

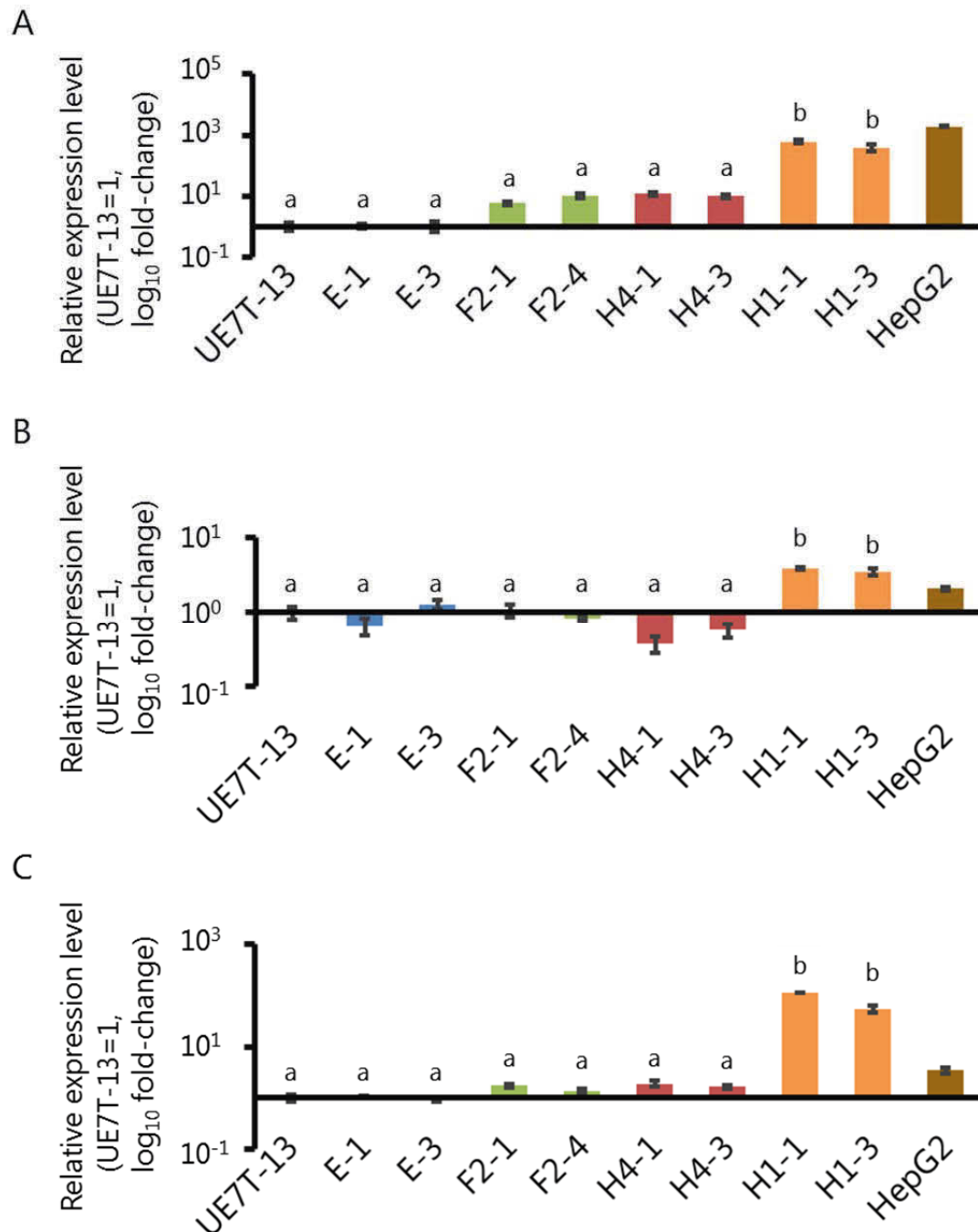
H1-1, H1-3: pMN1/HNF1 $\alpha$ 導入細胞, HepG2: HepG2 細胞

n=3, 異符号間 (a, b, c) で有意差あり ( $p < 0.05$ , HepG2 細胞を除く),

N.D.: not detected.



次に、*CYP* 遺伝子群の mRNA 発現量を比較した。*CYP3A4* の mRNA 発現量は、UE7T-13 細胞に対して、FOX A2 強制発現ベクター導入細胞では 5.7–10 倍、HNF4 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞では 10–12 倍、HNF1 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞では  $3.9 \times 10^2$ – $6.2 \times 10^2$  倍にそれぞれ増加した (図 24A)。*CYP2B6* の mRNA 発現量は、HNF1 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞のみ 3.4–3.8 倍に増加した (図 24B)。*CYP2C9* の mRNA 発現量は、FOX A2 強制発現ベクター導入細胞では 1.4–1.7 倍、HNF4 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞では 1.7–1.9 倍、HNF1 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞では  $56$ – $1.1 \times 10^2$  倍にそれぞれ増加した (図 24C)。それぞれの HNF 強制発現ベクター導入細胞の *CYP* 遺伝子群の mRNA 発現量を HepG2 細胞と比較したところ、*CYP3A4* の mRNA 発現量はいずれの HNF 強制発現ベクター導入細胞においても 1/3 倍以下であったが、HNF1 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞において *CYP2B6* の mRNA 発現量は 1.7–1.9 倍、*CYP2C9* の mRNA 発現量は 16–36 倍、それぞれ HepG2 細胞よりも高いことが判明した (図 24)。



**図 24. HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における  
薬物代謝酵素遺伝子群の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析)**

A. *CYP3A4*, B. *CYP2B6*, C. *CYP2C9*

各 mRNA 発現量は、ハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* の mRNA 発現量で補正した。

UE7T-13: UE7T-13 細胞, E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞,

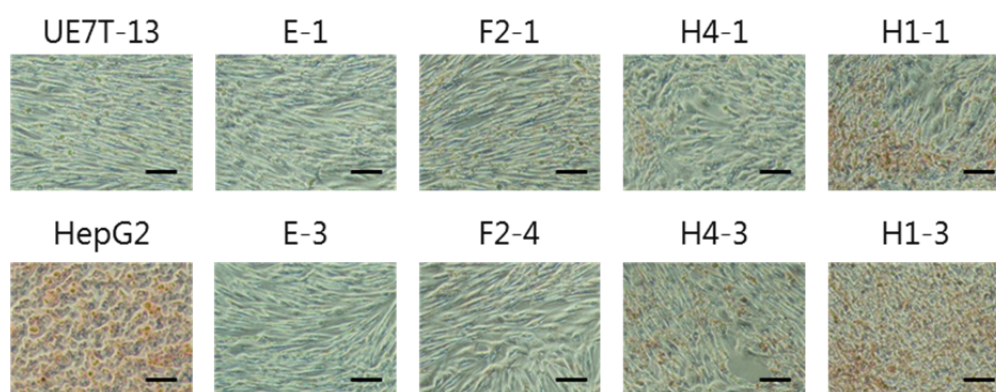
F2-1, F2-4: pMN1/FOXA2 導入細胞, H4-1, H4-3: pMN1/HNF4 $\alpha$ 導入細胞,

H1-1, H1-3: pMN1/HNF1 $\alpha$ 導入細胞, HepG2: HepG2 細胞

n=3, 異なる異符号間 (a, b) で有意差あり ( $p < 0.05$ , HepG2 細胞を除く)

#### 4) HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における脂質蓄積の検証

Oil Red O は細胞内の脂肪滴を赤く染色する。そこで、オレイン酸添加培養後、それぞれの HNF 強制発現ベクター導入細胞に存在する脂肪滴を Oil Red O 染色により可視化し、鏡検した (図 25)。その結果、UE7T-13 細胞では脂肪滴は検出されなかったが、HNF1 $\alpha$ 強制発現ベクター導入細胞 (H1-1, H1-3) では HepG2 細胞と同様に、明確な脂肪滴が細胞内に多く検出された。



**図 25. HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における Oil Red O 染色**

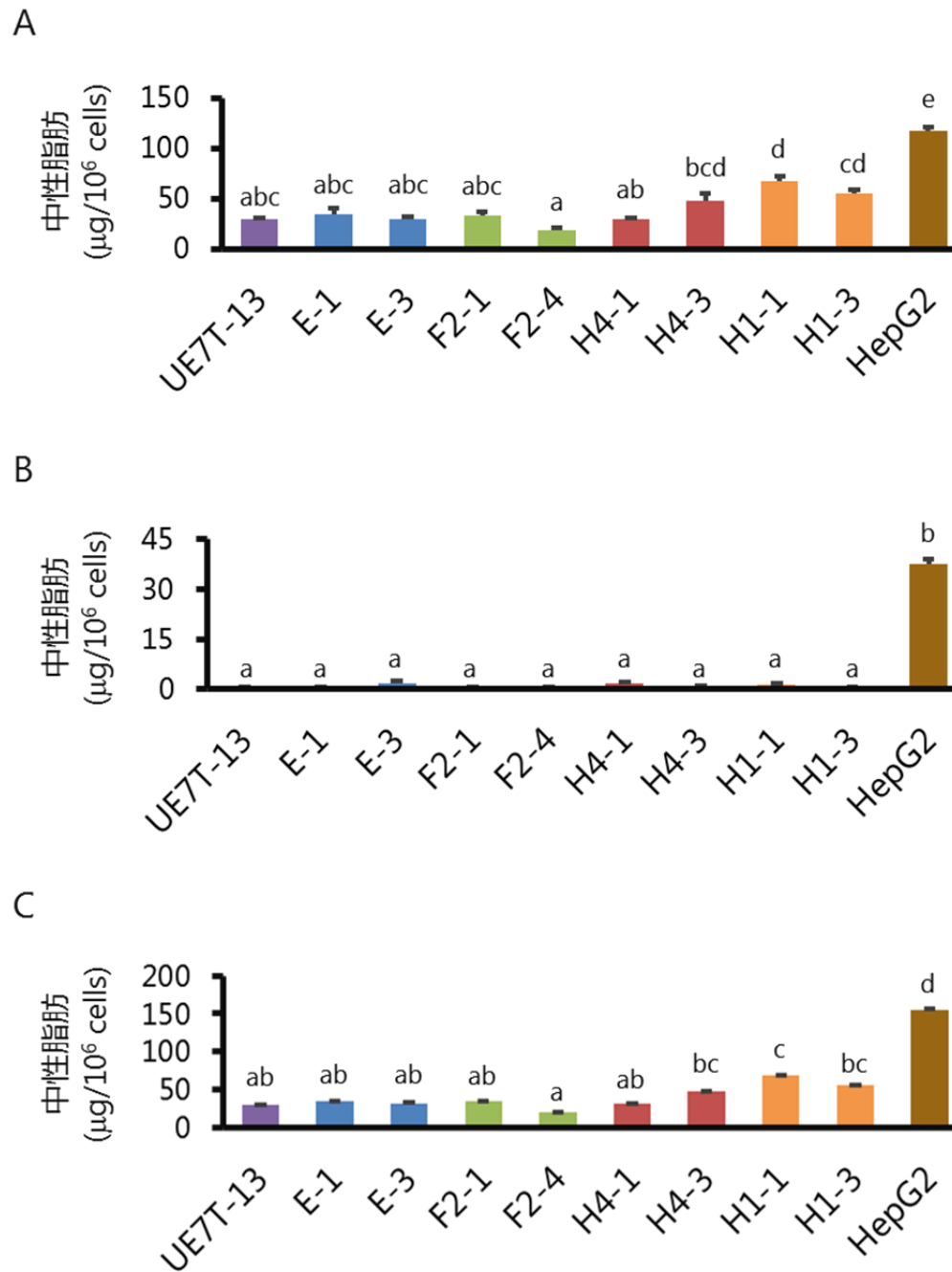
UE7T-13: UE7T-13 細胞, HepG2: HepG2 細胞,  
E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞, F2-1, F2-4: pMN1/FOXA2 導入細胞,  
H4-1, H4-3: pMN1/HNF4 $\alpha$ 導入細胞, H1-1, H1-3: pMN1/HNF1 $\alpha$ 導入細胞,  
Scale bar: 100  $\mu$ m.

## 5) HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における細胞内および培養上清に含まれる中性脂肪およびコレステロールの定量

オレイン酸添加培養後、HNF 単独強制発現ベクター導入細胞の細胞内および培養上清に含まれる TG およびコレステロールを定量した。

### ・ TG 量

細胞内の TG 量は、UE7T-13 細胞に対して、FOXA2 強制発現ベクター導入細胞では 0.65–1.1 倍であったのに対し、HNF4 $\alpha$ 強制発現ベクター導入細胞では 1.0–1.6 倍、HNF1 $\alpha$ 強制発現ベクター導入細胞では 1.9–2.3 倍にそれぞれ増加した (図 26A)。しかしながら、HepG2 細胞との比較では、FOXA2 強制発現ベクター導入細胞では 16–29%、HNF4 $\alpha$ 強制発現ベクター導入細胞では 25–40%、HNF1 $\alpha$ 強制発現ベクター導入細胞では 47–58%であり、いずれも HepG2 細胞の細胞内 TG 蓄積量に及ばなかった (図 26A)。また培養上清に含まれる TG 量は、UE7T-13 細胞に対して、FOXA2 強制発現ベクター導入細胞では 0.51–0.87 倍、HNF4 $\alpha$ 強制発現ベクター導入細胞では 0.51–2.5 倍、HNF1 $\alpha$ 強制発現ベクター導入細胞では 1.2–2.1 倍であったが、いずれも HepG2 細胞の培養上清に含まれる TG 量の 1.4–5.5%程度であった (図 26B)。そのため、細胞内および培養上清に含まれる TG の総量は、HepG2 細胞に対して、FOXA2 強制発現ベクター導入細胞では 13–22%、HNF4 $\alpha$ 強制発現ベクター導入細胞では 20–31%、HNF1 $\alpha$ 強制発現ベクター導入細胞では 36–45%であった (図 26C)。



**図 26. HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における中性脂肪の定量**

A. 細胞内, B. 培養上清, C. 総量 (細胞内+培養上清)

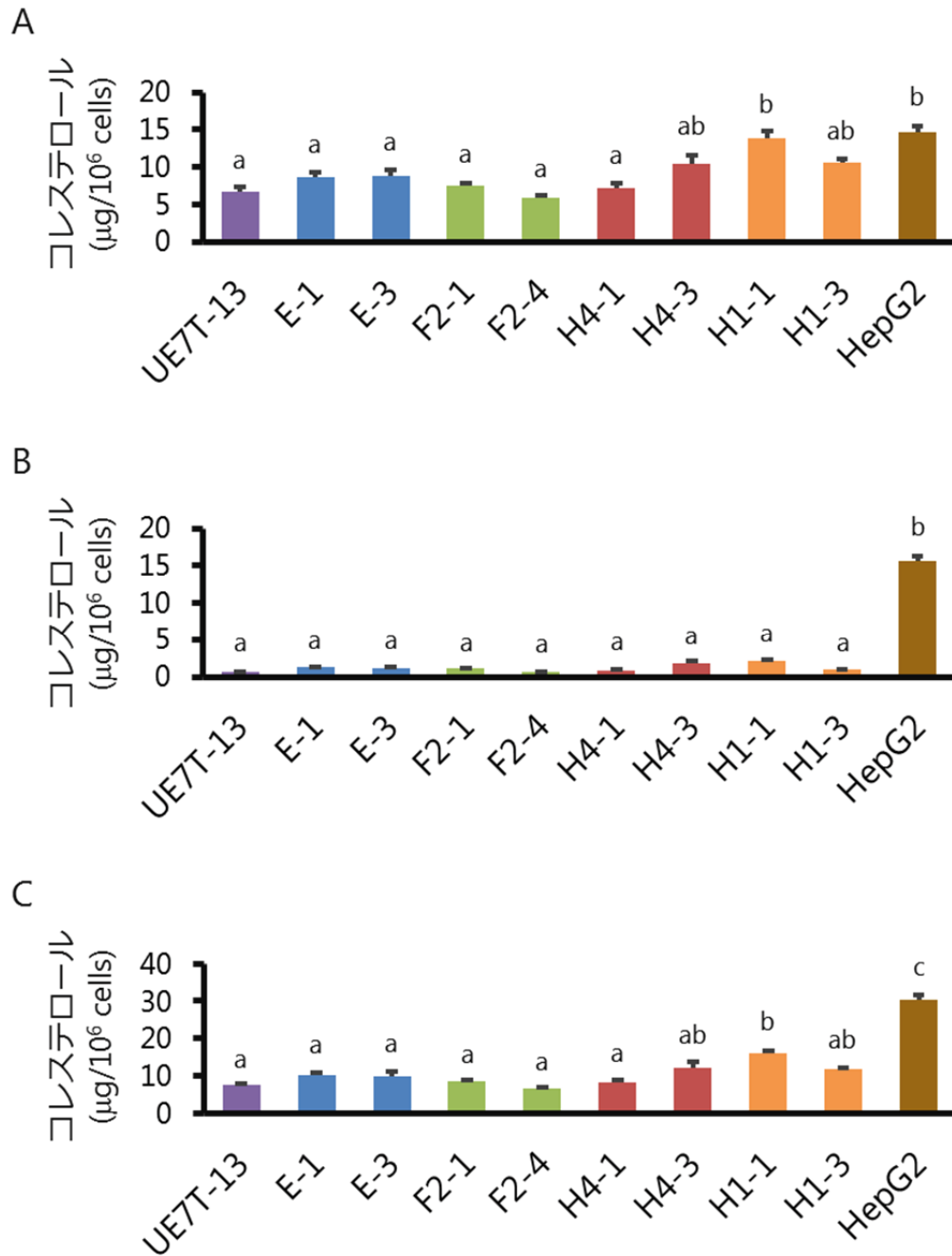
E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞, F2-1, F2-4: pMN1/FOXA2 導入細胞,

H4-1, H4-3: pMN1/HNF4 $\alpha$ 導入細胞, H1-1, H1-3: pMN1/HNF1 $\alpha$ 導入細胞

n=3, 異なる異符号間 (a, b, c, d) で有意差あり ( $p<0.05$ )

・ コレステロール量

細胞内のコレステロール量は、UE7T-13細胞に対して、FOXA2 強制発現ベクター導入細胞では 0.88–1.1 倍であったのに対し、HNF4 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞では 1.1–1.5 倍、HNF1 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞では 1.6–2.0 倍にそれぞれ増加した (図 27A)。しかしながら、HepG2 細胞との比較では、FOXA2 強制発現ベクター導入細胞では 41–51%、HNF4 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞では 41–50%、HNF1 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞では 71–95%であり、いずれも HepG2 細胞の細胞内コレステロール蓄積量に及ばなかった (図 27A)。培養上清に含まれるコレステロール量は、野生型株 UE7T-13 細胞に対して、FOXA2 強制発現ベクター導入細胞では 1.0–1.6 倍、HNF4 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞では 1.0–1.3 倍、HNF1 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞では 2.5–3.0 倍であったが、いずれも HepG2 細胞の培養上清に含まれるコレステロール量の 4.5–14%程度であった (図 27B)。そのため、細胞内および培養上清に含まれるコレステロール量の合計は、HepG2 細胞に対して、FOXA2 強制発現ベクター導入細胞では 22–29%、HNF4 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞では 27–41%、HNF1 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞では 39–53%であった (図 27C)。



**図 27. HNF 単独強制発現ベクター導入細胞におけるコレステロールの定量**

A. 細胞内, B. 培養上清, C. 総量 (細胞内+培養上清)

E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞, F2-1, F2-4: pMN1/FOXA2 導入細胞,

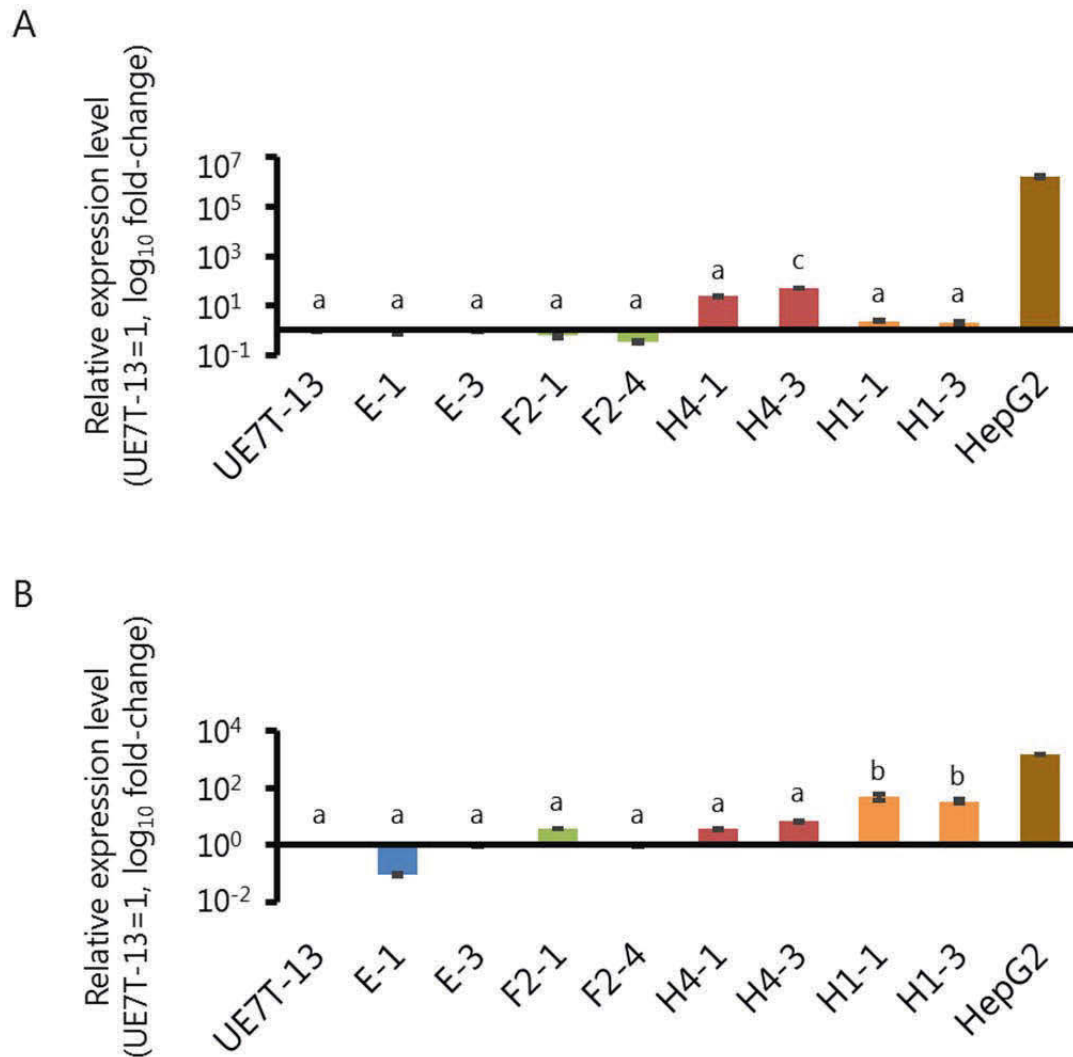
H4-1, H4-3: pMN1/HNF4 $\alpha$ 導入細胞, H1-1, H1-3: pMN1/HNF1 $\alpha$ 導入細胞

n=3, 異なる異符号間 (a, b, c) で有意差あり ( $p<0.05$ )

## 6) HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における ApoB100 および MTP の発現解析

HNF 単独強制発現ベクター導入細胞から調製した全 RNA を試料に、リアルタイム RT-PCR 解析を行い、*ApoB100* および *MTP* 遺伝子の発現解析を行った。その結果、*ApoB100* の mRNA 発現量は、UE7T-13 細胞に対して、FOXA2 強制発現ベクター導入細胞では明確な変化はなかったが、HNF4 $\alpha$ 強制発現ベクター導入細胞では 24–50 倍、HNF1 $\alpha$ 強制発現ベクター導入細胞で 2.0–2.3 倍にそれぞれ増加した (図 28A)。また *MTP* の mRNA 発現量は、UE7T-13 細胞に対して、FOXA2 強制発現ベクター導入細胞では 1.0–3.7 倍、HNF4 $\alpha$ 強制発現ベクター導入細胞では 3.7–7.0 倍、HNF1 $\alpha$ 強制発現ベクター導入細胞で 35–48 倍にそれぞれ増加した (図 28B)。しかしながら、HepG2 細胞と比較では、いずれの HNF 強制発現ベクター導入細胞においても、*ApoB100* の mRNA 発現量は  $1.0 \times 10^{-5}$  倍以下、*MTP* の mRNA 発現量は  $1.0 \times 10^{-2}$  倍以下だった (図 28)。





**図 28. HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における *ApoB100* (A)**

**および *MTP* (B) 遺伝子の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析)**

各 mRNA 発現量は、ハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* の mRNA 発現量で補正した。

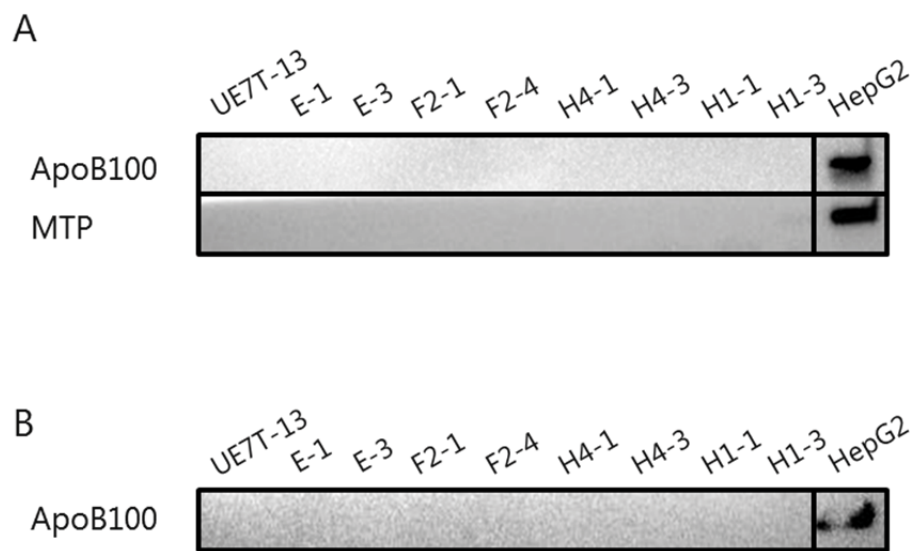
UE7T-13: UE7T-13 細胞, E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞,

F2-1, F2-4: pMN1/FOXA2 導入細胞, H4-1, H4-3: pMN1/HNF4 $\alpha$ 導入細胞,

H1-1, H1-3: pMN1/HNF1 $\alpha$ 導入細胞, HepG2: HepG2 細胞

n=3, 異なる異符号間(a, b, c) で有意差あり ( $p < 0.05$ , HepG2 細胞を除く)

続いて、HNF 単独強制発現ベクター導入細胞から調製した細胞溶解液および細胞上清を試料に、ウエスタンブロット解析を行い、ApoB100 および MTP タンパク質の発現解析を行った。その結果、ApoB100 はいずれの HNF 強制発現ベクター導入細胞の溶解液および培養上清からも ApoB100 タンパク質は検出されず (図 29A, B), 同様にいずれの HNF 強制発現ベクター導入細胞の溶解液からも MTP タンパク質は検出されなかった (図 29A)。



**図 29. HNF 単独強制発現ベクター導入細胞における ApoB100 および MTP タンパク質の発現 (ウエスタンブロット解析)**

A. 細胞溶解液, B. 培養上清

E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞, F2-1, F2-4: pMN1/FOXA2 導入細胞,  
H4-1, H4-3: pMN1/HNF4 $\alpha$ 導入細胞, H1-1, H1-3: pMN1/HNF1 $\alpha$ 導入細胞,  
HepG2: HepG2 細胞

$\beta$ -ACTIN は図 13 に示した。

## 考察

間葉系幹細胞は、種々の液性因子を添加し、培養を行うことで、肝細胞様の細胞に分化する [100, 101]。ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞は、IV 型コラーゲンをコートした culture dish を用い、aFGF (acidic fibroblast growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) および HGF の添加条件下で、21 日間培養することにより、アルブミン分泌能や尿素合成能などの肝機能を有する細胞に分化すること [102]、また、UE7T-13 細胞における FOXA2 の強制発現は、AFP や ALB などの肝細胞分化マーカー遺伝子の mRNA 発現量を増加させ、さらに bFGF を添加することで、これらの mRNA 発現量をより大きく増加させる [89] ことが報告されている。本研究において、UE7T-13 細胞における FOXA2 の強制発現は、AFP の mRNA 発現量を増加させたが、その程度は HNF4 $\alpha$  や HNF1 $\alpha$  の強制発現と比較し、低かった (図 23)。そのため、FOXA2 による肝細胞への分化誘導には、bFGF などの液性因子による刺激も必要であると考えられる。

また、肝細胞への分化には HNF 群を含めた複数の転写因子が関与する。これらの転写因子は、互いの発現を制御し、複雑な発現調節のネットワークを形成していることが知られている [25, 103]。本実験で樹立した FOXA2, HNF4 $\alpha$  および HNF1 $\alpha$  をそれぞれ強制発現させた UE7T-13 細胞において、HNF の単独強制発現だけでは、他の内在性 HNF 群の発現が誘導されることはなかった (図 20, 21)。このことから、FOXA2, HNF4 $\alpha$  および HNF1 $\alpha$ 、それぞれの単独強制発現のみでは、肝細胞の分化に関与する転写因子の調節ネットワークを駆動させるには不十分であることが示された。

UE7T-13 細胞において、FOXA2, HNF4 $\alpha$  および HNF1 $\alpha$ 、それぞれの単独強制発現により、AFP および CYP 群の mRNA 発現量が増加した (図 23, 24) ことから、それぞれの HNF は、UE7T-13 細胞の肝細胞への分化に寄与することが明らかとなった。樹立した HNF 強制発現ベクター導入細胞の中で、HNF1 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞が最も種々の肝細胞分化マーカー遺伝子の発現量が高かった (図 23, 24)。また HepG2 細胞との比較では、HNF1 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞の AFP, ALB および CYP3A4 の mRNA 発現量は低かったものの、CYP2B6 および CYP2C9 の mRNA 発現量は高かった (図 24)。さらに、HNF1 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞の細胞形態は、UE7T-13 細胞が示す紡錘状から上皮細胞の特徴である敷石状へと変化した (図 22)。以上の結果から、HepG2 細胞と比較し未熟ではあるが、HNF1 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞が最も肝細胞様の特徴を有していると考えられた。

オレイン酸は HepG2 細胞において細胞内への TG の蓄積およびリポタンパク質の分泌を促進する [104, 105]。Oil Red O 染色の結果から、HNF1 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞は、オレイン酸添加培養により細胞内において明確な脂肪滴の存在が認められた

(図 25)。また、HNF1 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞は、UE7T-13 細胞やコントロールベクター導入細胞、および他の HNF 強制発現ベクター導入細胞と比較して、細胞内の TG およびコレステロールの蓄積量が増加していることが判明した (図 26, 27)。しかしながら、HNF1 $\alpha$  強制発現ベクター導入細胞における細胞内の TG およびコレステロールの蓄積量は、HepG2 細胞内の TG およびコレステロールの蓄積量に及ばなかった

(図 26, 27)。また HepG2 細胞の培養上清と比較して、いずれの HNF 強制発現ベクター導入細胞の培養上清からもわずかな量の TG およびコレステロール量しか検出されないことが明らかとなった (図 26, 27)。以上の結果から、細胞内の TG およびコレステロール蓄積量が増加した HNF1 $\alpha$ 強制発現ベクター導入細胞においても、リポタンパク質はほとんど産生されていないと考えられる。

VLDL の合成には ApoB100 および MTP の発現が必須であり [34, 38], それらの発現はそれぞれ HNF4 $\alpha$ , HNF1 $\alpha$ によって正の制御を受けることが報告されている [85, 92, 106, 107]。UE7T-13 細胞と比較し, HNF4 $\alpha$ 強制発現ベクター導入細胞では *ApoB100* の mRNA 発現量が増加し, HNF1 $\alpha$ 強制発現ベクター導入細胞では *MTP* の mRNA 発現量が顕著に増加した (図 28)。しかしながら, それらの発現量はいずれも HepG2 細胞と比較して低かった (図 28)。また, いずれの HNF 強制発現ベクター導入細胞の溶解液においても, ApoB100 および MTP タンパク質は検出されず, また ApoB100 タンパク質はいずれの培養上清においても検出されなかった (図 29)。これらのことから, UE7T-13 細胞において, HNF1 $\alpha$ の強制発現は細胞内へ TG の蓄積を促進するが, HNF4 $\alpha$  または HNF1 $\alpha$ の単独発現だけでは, リポタンパク質の産生を促すために必要な ApoB100 および MTP の発現を誘導するには不十分であると考えられる。

## 実験2 肝細胞核因子 HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ の同時発現が ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞の肝細胞への分化 およびリポタンパク質産生に与える影響

### 緒言

第4章 実験1より、肝細胞核因子 FOXA2, HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ , それぞれの単独強制発現がヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞に与える影響について以下のことが明らかとなった。

1. FOXA2, HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ , 各因子の単独強制発現は, UE7T-13 細胞において, 肝細胞分化マーカーである *APF* 遺伝子や *CYP* 遺伝子群の発現量を増加させる
2. HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ の強制発現は, UE7T-13 細胞の形態を紡錘状から敷石状へと変化させる
3. HNF1 $\alpha$ の強制発現は, TG およびコレステロールの細胞内蓄積を促進させる
4. HNF4 $\alpha$ の強制発現は *ApoB100* の mRNA 発現量を増加させ, HNF1 $\alpha$ の強制発現は *MTP* の mRNA 発現量を増加させる
5. FOXA2, HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ のいずれを単独で強制発現させても, リポタンパク質の産生に必要な十分量の *ApoB100* および *MTP* タンパク質を発現させるまでには至らない

肝細胞における VLDL の産生には, VLDL の構成アポリポタンパク質である *ApoB100*, および *ApoB100* と脂質との会合を触媒する *MTP* の発現が必須である [108]。また, *ApoB* および *MTP* を発現していない細胞において, 遺伝子導入により *ApoB* および *MTP* を同時に発現させることで, *ApoB* を含んだ粒子の分泌を引き起こすことが報告されている [109, 110]。さらに *ApoB* は, *MTP* の非存在下では速やかに分解される [111, 112] ことから, *MTP* は *ApoB100* への脂質の輸送のみならず, *ApoB100* の安定化に寄与すると考えられる。以上のことから, 肝細胞におけるリポタンパク質の産生には, 十分量の *ApoB100* および *MTP* の発現が必要であると考えられる。

そこで第4章 実験2では, *ApoB100* の mRNA 発現を誘導した HNF4 $\alpha$ および *MTP* の mRNA 発現を誘導した HNF1 $\alpha$ を同時に発現する UE7T-13 細胞を樹立し, HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ の同時発現がリポタンパク質産生に与える影響について検証するとともに, 肝細胞への分化に与える影響についても合わせて検証した。

## 材料および方法

### 1) HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクターの構築

HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター (pMN1/HNF4 $\alpha$ -T2A-HNF1 $\alpha$ , 図 30) の構築を行った。まず, pMN1/HNF4 $\alpha$ およびpMN1/HNF1 $\alpha$ より, HNF4 $\alpha$ およびHNF1 $\alpha$ のコード DNA 配列を PCR によりそれぞれ増幅した。増幅した 2 つのコード DNA を自己開裂 2A ペプチド配列コード DNA [113] で連結することにより, HNF4 $\alpha$ -T2A-HNF1 $\alpha$ 配列コード DNA を作製した。作製したコード DNA を哺乳動物用発現ベクターpMN1Pur [94] のマルチクローニングサイト (*Xba*I-*Bam*HI) に組み込み, pMN1/HNF4 $\alpha$ -T2A-HNF1 $\alpha$ を構築した。

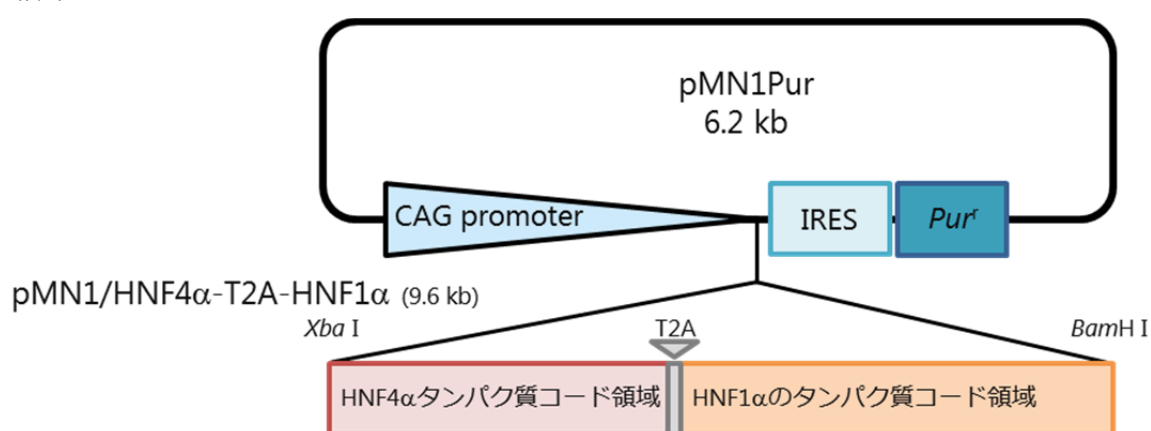


図 30. HNF4 $\alpha$ およびHNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター (pMN1/HNF4 $\alpha$ -T2A-HNF1 $\alpha$ ) の構造

HNF4 $\alpha$ タンパク質コード領域の 5'末端側には, Kozak 配列 (GCCGCCACC) を付与した。

T2A : 自己開裂型 2A ペプチド配列コード DNA

表 19. HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター (pMN1/HNF4 $\alpha$ -T2A-HNF1 $\alpha$ ) の構築に用いたプライマー

増幅断片	プライマー配列
	5'- ATAGGGCGAATCTAGAG <u>GCCGCCACC</u> ATGCGACT -3'
HNF4 $\alpha$ -T2A	5'- ACCGCATGTTAGCAGACTTCCTCTGCCCTCTCC GCTTCCGATAACTTCCTGCTTGGTGATGG -3'
	5'- CTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAAT
T2A-HNF1 $\alpha$	CCTGGACCTATGGTTTCTAAACTGAGCCAGCT -3'
	5'- ATTCGATGGGGGATCCGATGCGGCCGCTTACTG -3'

下線部に Kozak 配列を示す

## 2) HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の樹立

HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター (pMN1/HNF4 $\alpha$ -T2A-HNF1 $\alpha$ , 図 30) をヒト骨髓由来間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞にリポフェクション法により遺伝子導入した (表 12)。まず, UE7T-13 細胞を 6-well dish に播種 ( $3 \times 10^5$  cells/well) し, 培養 (16 hr, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) した。次に, HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター (3.0  $\mu$ g) および遺伝子導入試薬 Viafect (12  $\mu$ l) を添加した血清非添加培養液 Opti-MEM (50  $\mu$ l) を UE7T-13 細胞へそれぞれ添加した。培養 (24 hr, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) を継続した後, 6 cm dish に細胞を播種し直し ( $2 \times 10^5$  cells/dish), ピューロマイシン (終濃度 0.3  $\mu$ g/ml) を添加した 10% FBS 含有 DMEM で培養 (2 週間) することによりベクターが安定的に導入された細胞を選択した。

## 3) HNF 群の発現検証

HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ の発現をリアルタイム RT-PCR 解析 (表 15) およびウエスタンブロット解析 (表 18) を用いて検証した。24-well cell culture plate において 90% コンフルエントまで培養した HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞を 1% 2-ME を添加した LRC (520  $\mu$ l, 表 13) に溶解し, リアルタイム RT-PCR 解析の試料とした。同様に, 24-well cell culture plate において 90% コンフルエントまで培養した HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞を冷 PBS (-) (500  $\mu$ l) で 2 回洗浄した後, プロテアーゼ阻害剤を添加した M-PER Reagent (150  $\mu$ l, 表 17) に溶解し, ウエスタンブロット解析の試料とした (15  $\mu$ g protein/lane)。なお, HepG2 細胞についても同様の操作を行い実験のポジティブコントロールとした。

## 4) HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の形態変化

HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の細胞形態を高密度培養条件下および低密度培養条件下で鏡検した。

## 5) 肝細胞分化マーカー遺伝子群の mRNA 発現検証

肝細胞分化マーカーの発現をリアルタイム RT-PCR 解析 (表 15) を用いて検証した。24-well culture plate において 90% コンフルエントまで培養した HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞を 1% 2-ME を添加 LRC (520  $\mu$ l, 表 13) に溶解し, リアルタイム RT-PCR 解析の試料とした。肝細胞分化マーカー遺伝子として, *AFP*, *ALB* および *CYP* 遺伝子群 (*CYP3A4*, *CYP2B6* および *CYP2C9*) を用いた。なお, HepG2 細胞についても同様の操作を行い実験のポジティブコントロールとした。

## 6) HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の脂質蓄積の検証

オレイン酸を添加した培養液 (表 9) で HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞を培養し、細胞内への脂質の蓄積を Oil Red O 染色 (表 10) を用いて検証した。24-well culture plate に HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞を播種 ( $0.5 \times 10^5$  cells/well) し、培養 (2 日間, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) した。PBS (-) で 2 回洗浄し、オレイン酸ナトリウム (0.75 mM) を添加した DMEM (Phenol red-free, 500  $\mu$ l) により培養 (2 日間, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) した。培養終了後、PBS (-) で細胞を洗浄し、Oil Red O 染色を行った。なお、HepG2 細胞についても同様の操作を行い実験のポジティブコントロールとした。

## 7) HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の細胞内および培養上清に含まれる中性脂肪およびコレステロールの定量

オレイン酸を添加した培養液 (表 9) で HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞を培養し、細胞内に蓄積した TG およびコレステロール (表 11)、培養上清の TG およびコレステロール (表 11) を定量した。24-well culture plate に HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞を播種 ( $0.5 \times 10^5$  cells/well) し、培養 (2 日間, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) した。PBS (-) で 2 回洗浄し、オレイン酸ナトリウム (0.75 mM) を添加した DMEM (Phenol red-free, 500  $\mu$ l) により培養 (2 日間, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) した。

### ・ 細胞内の中性脂肪およびコレステロールの定量

培養終了後、PBS (-) で細胞を洗浄し、細胞を凍結した (-20°C, 4 hr)。TG 酵素液①または CHO 酵素液② (120  $\mu$ l) を添加し、細胞を溶解した。細胞溶解液をインキュベート (37°C, 1 hr) し、等量の超純水を加えた後、96-well plate に分注 (120  $\mu$ l) した。TG 酵素液②または CHO 酵素液② (40  $\mu$ l) を添加し、吸光度 (550 nm) を測定した。

### ・ 培養上清の中性脂肪およびコレステロールの定量

培養終了後、細胞培養液を遠心分離 (15,000 rpm, 5 min) し、上清を回収した。上清を凍結乾燥したのち、TG 酵素液①または CHO 酵素液② (120  $\mu$ l) を添加し、凍結乾燥物を溶解した。溶解液をインキュベート (1 hr, 37°C) し、96-well plate に分注 (120  $\mu$ l) した。TG 酵素液②または CHO 酵素液② (40  $\mu$ l) を添加し、吸光度 (550 nm) を測定した。

中性脂肪およびコレステロール濃度が既知の血清を用いて検量線を作成し、あらかじめ計数した細胞数を用いて中性脂肪量およびコレステロール量を補正した。なお、HepG2 細胞についても同様の操作を行い実験のポジティブコントロールとした。



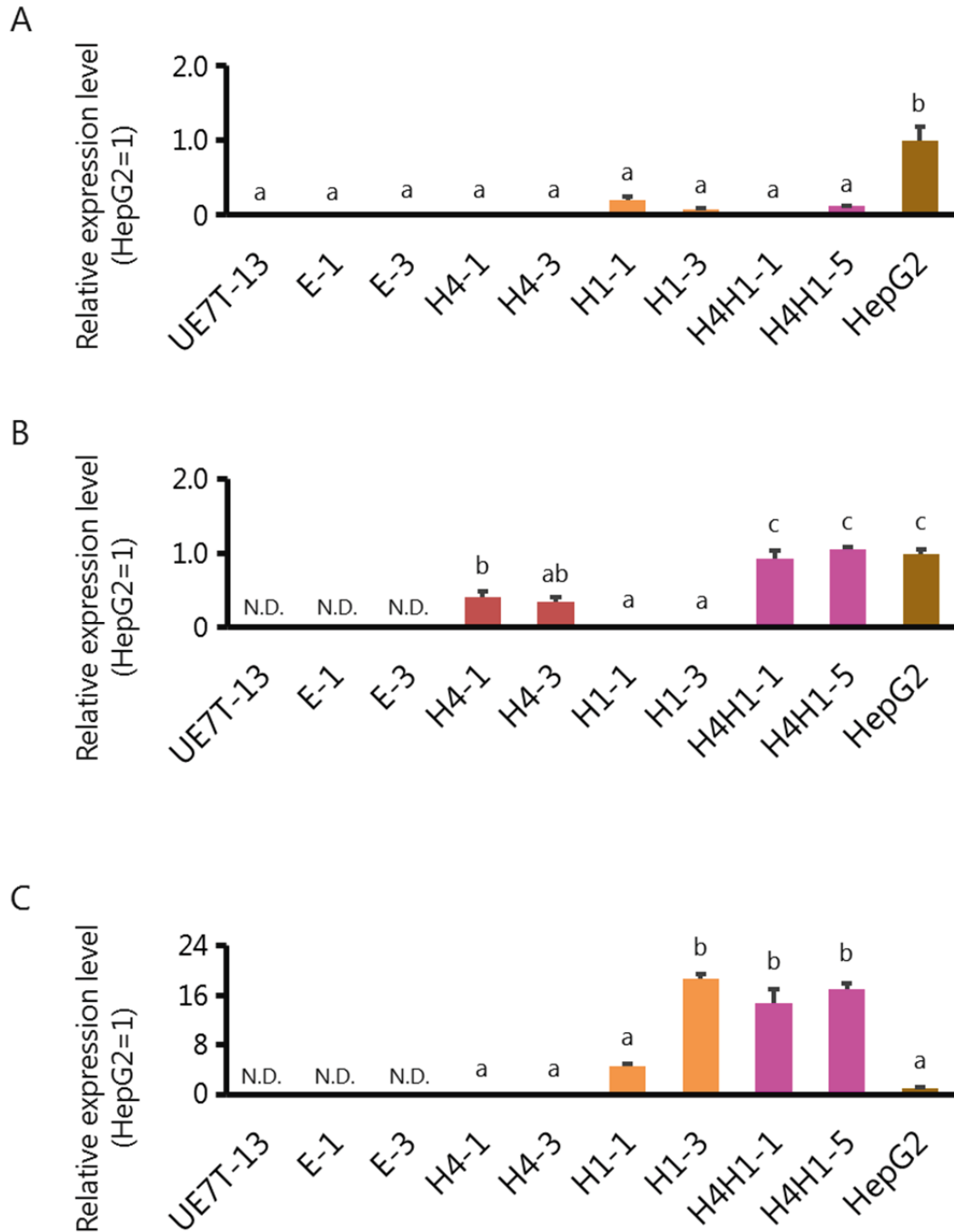
## 8) HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の脂質代謝関連遺伝子群の発現解析

VLDL の産生に關与する ApoB100 および MTP の発現をリアルタイム RT-PCR 解析 (表 15) およびウエスタンブロット解析 (表 18) を用いて検証した。24-well cell culture plate においてオレイン酸添加培養液を用いて培養した HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞を 1% 2-ME を添加 LRC (520  $\mu$ l, 表 13) に溶解し, リアルタイム RT-PCR 解析の試料とした。また, 脂質合成関連遺伝子群として, TG 合成に關与する *FAS* (fatty acid synthase) 遺伝子, *DGAT1* (diglyceride acyltransferase 1) および *DGAT2* 遺伝子, コレステロール合成に關与する *HMGCS 1* (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1) 遺伝子についても合わせてリアルタイム RT-PCR 解析を行った。同様に, 24-well cell culture plate においてオレイン酸添加培養液を用いて培養した HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞を冷 PBS (-) (500  $\mu$ l) で 2 回洗淨した後, プロテアーゼ阻害剤を添加した M-PER Reagent (150  $\mu$ l, 表 17) に溶解し, ウエスタンブロット解析の試料とした (15  $\mu$ g protein/lane)。なお, HepG2 細胞についても同様の操作を行い実験のポジティブコントロールとした。

## 結果

### 1) HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の樹立と HNF 群の発現解析

リアルタイム RT-PCR 解析およびウエスタンブロット解析により、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$  同時発現ベクターを導入した UE7T-13 細胞において、HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ が共に強制発現されていることを確認した (図 31,32)。次に、同時に強制発現させた HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ が内在性 FOXA2 の発現を誘導するか検討したところ、HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ の同時発現により、内在性 FOXA2 の発現が誘導されることはなかった (図 31A, 32)。



**図 31. HNF4α/HNF1α同時発現ベクター導入細胞における FOXA2 (A), HNF4α (B) および HNF1α (C) 遺伝子の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析)**

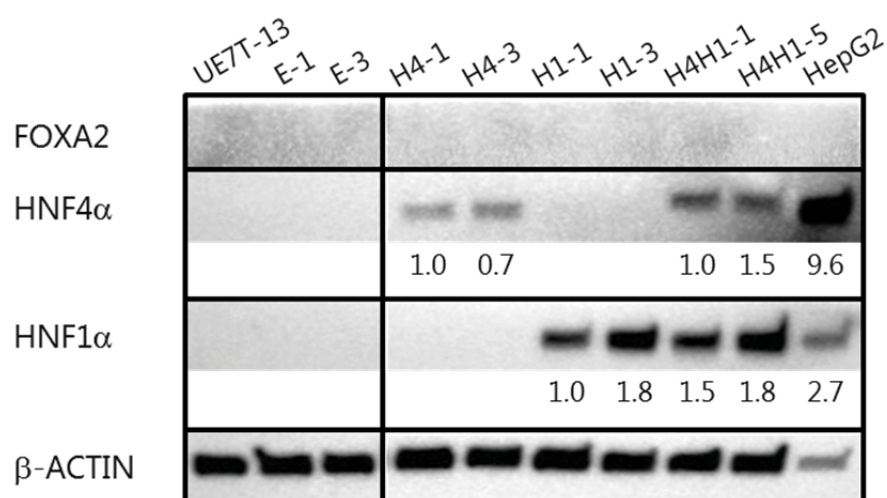
各 mRNA 発現量は、ハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* の mRNA 発現量で補正した。

UE7T-13: UE7T-13 細胞, E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞,

H4-1, H4-3: pMN1/HNF4α導入細胞, H1-1, H1-3: pMN1/HNF1α導入細胞,

H4H1-1, H4H1-5: pMN1/HNF4α-T2A-HNF1α導入細胞, HepG2: HepG2 細胞

n=3, 異なる異符号間 (a, b, c) で有意差あり ( $p < 0.05$ ), N.D.: not detected.



**図 32. HNF4α/HNF1α同時発現ベクター導入細胞における FOXA2, HNF4α および HNF1αタンパク質の発現（ウエスタンブロット解析）**

下の数字は、β-ACTIN により補正した強度比を示す。

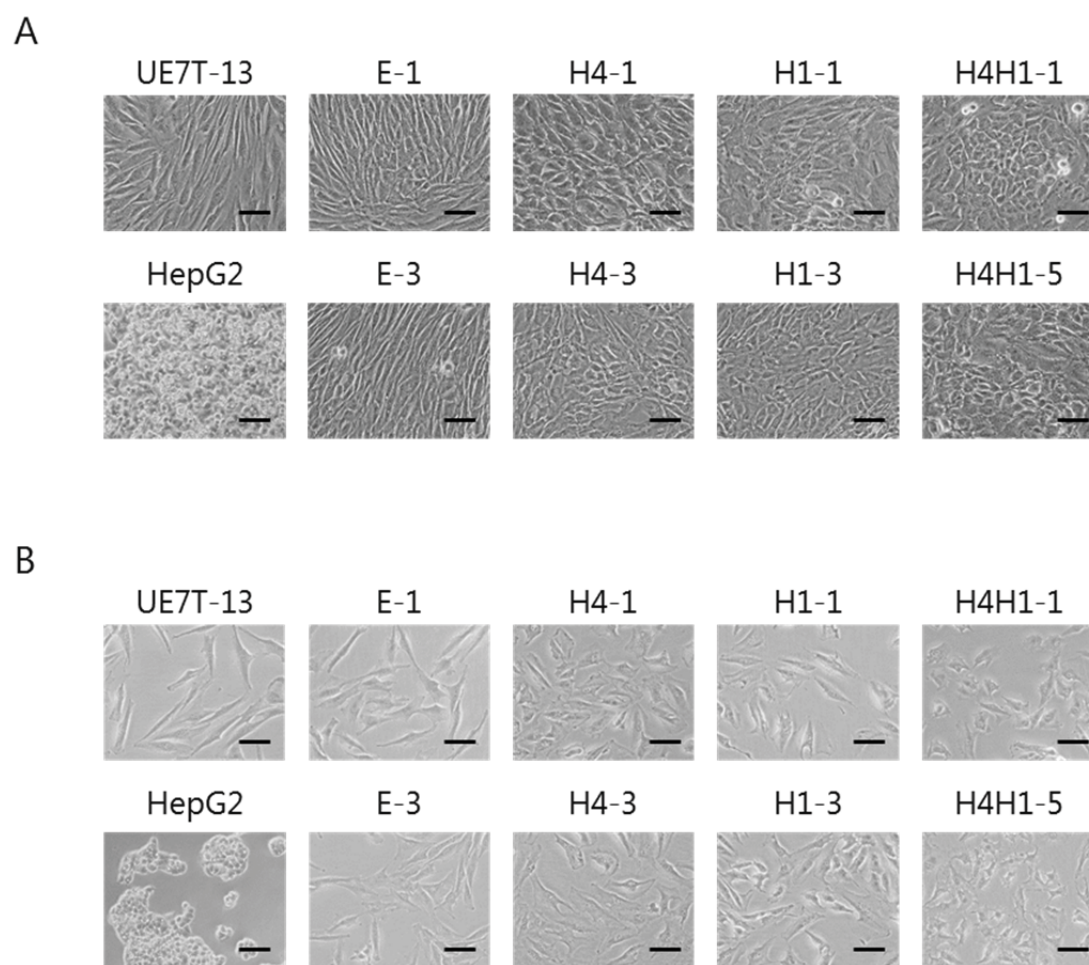
UE7T-13: UE7T-13 細胞, E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞,

H4-1, H4-3: pMN1/HNF4α導入細胞, H1-1, H1-3: pMN1/HNF1α導入細胞,

H4H1-1, H4H1-5: pMN1/HNF4α-T2A-HNF1α導入細胞, HepG2: HepG2 細胞

## 2) HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の形態変化

HNF4 $\alpha$ およびHNF1 $\alpha$ の同時強制発現ベクター導入細胞 (H4H1-1, H4H1-5) の形態は, HNF4 $\alpha$ 単独強制発現ベクター導入細胞 (H4-1, H4-3) および HNF1 $\alpha$ 単独強制発現ベクター導入細胞 (H1-1, H1-3) と同様, 紡錘状から上皮細胞の特徴である敷石状に変化した (図 33)。



**図 33. HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における細胞形態**

A. 高密度培養, B. 低密度培養

UE7T-13: UE7T-13 細胞, HepG2: HepG2 細胞, E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞, H4-1, H4-3: pMN1/HNF4 $\alpha$ 導入細胞, H1-1, H1-3: pMN1/HNF1 $\alpha$ 導入細胞, H4H1-1, H4H1-5: pMN1/HNF4 $\alpha$ -T2A-HNF1 $\alpha$ 導入細胞

Scale bar: 100  $\mu$ m.

### 3) HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の肝細胞マーカー遺伝子群の発現解析

HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞において、肝細胞マーカー遺伝子である *AFP* の mRNA 発現量は、野生型株 UE7T-13 細胞に対して  $6.9 \times 10^2$ – $1.0 \times 10^3$  倍に大きく増加した。さらに、*ALB* の mRNA 発現量も 9.8–52 倍に増加し、いずれもそれぞれの単独発現よりも顕著に増加することが判明した (図 34)。しかしながら、HepG2 細胞における *AFP* および *ALB* の mRNA 発現量には及ばず、*AFP* では  $1.0 \times 10^{-3}$  倍以下、*ALB* では  $1.0 \times 10^{-4}$  倍以下であった。

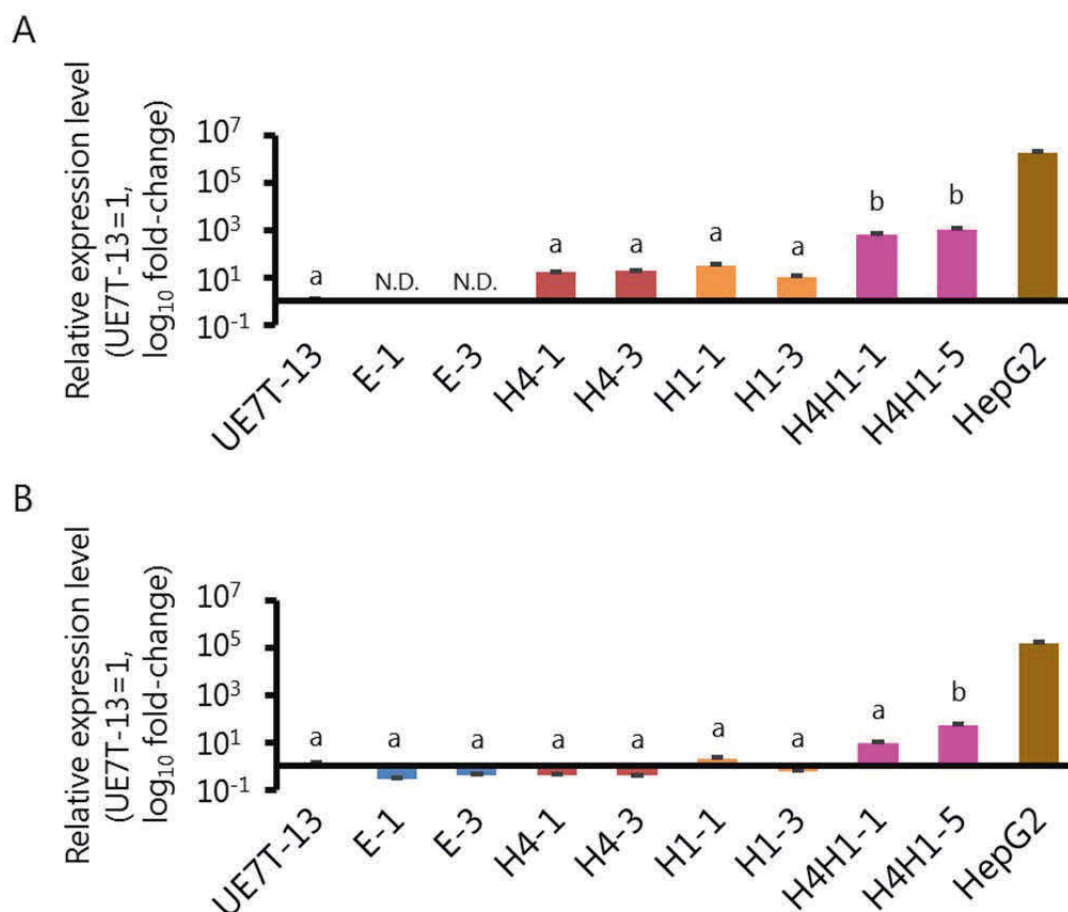


図 34. HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における肝細胞分化マーカー遺伝子群の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析)

A. AFP:  $\alpha$ -fetoprotein, B. ALB: Albumin

各 mRNA 発現量は、ハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* の mRNA 発現量で補正した。

UE7T-13: UE7T-13 細胞, E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞,

H4-1, H4-3: pMN1/HNF4 $\alpha$ 導入細胞, H1-1, H1-3: pMN1/HNF1 $\alpha$ 導入細胞,

H4H1-1, H4H1-5: pMN1/HNF4 $\alpha$ -T2A-HNF1 $\alpha$ 導入細胞, HepG2: HepG2 細胞,

n=3, 異なる異符号間 (a, b) で有意差あり ( $p < 0.05$ , HepG2 細胞を除く),

N.D.: not detected.

次に、*CYP* 群の mRNA 発現量を比較した。HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における *CYP3A4* の mRNA 発現量は、UE7T-13 細胞に対して、 $6.7 \times 10^2$ – $8.7 \times 10^2$  倍に、*CYP2B6* の mRNA 発現量は 6.2–34 倍に、*CYP2C9* の mRNA 発現量は  $4.0 \times 10^3$ – $1.1 \times 10^5$  倍にそれぞれ大きく増加した (図 35)。また、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の *CYP* 遺伝子群の mRNA 発現量は、HepG2 細胞に対して、*CYP3A4* の mRNA 発現量は 1/2–1/3 倍程度であったが、*CYP2B6* の mRNA 発現量は 3.0–16 倍、*CYP2C9* の mRNA 発現量は  $1.1 \times 10^3$ – $3.4 \times 10^3$  倍、それぞれ顕著に高いことが判明した。

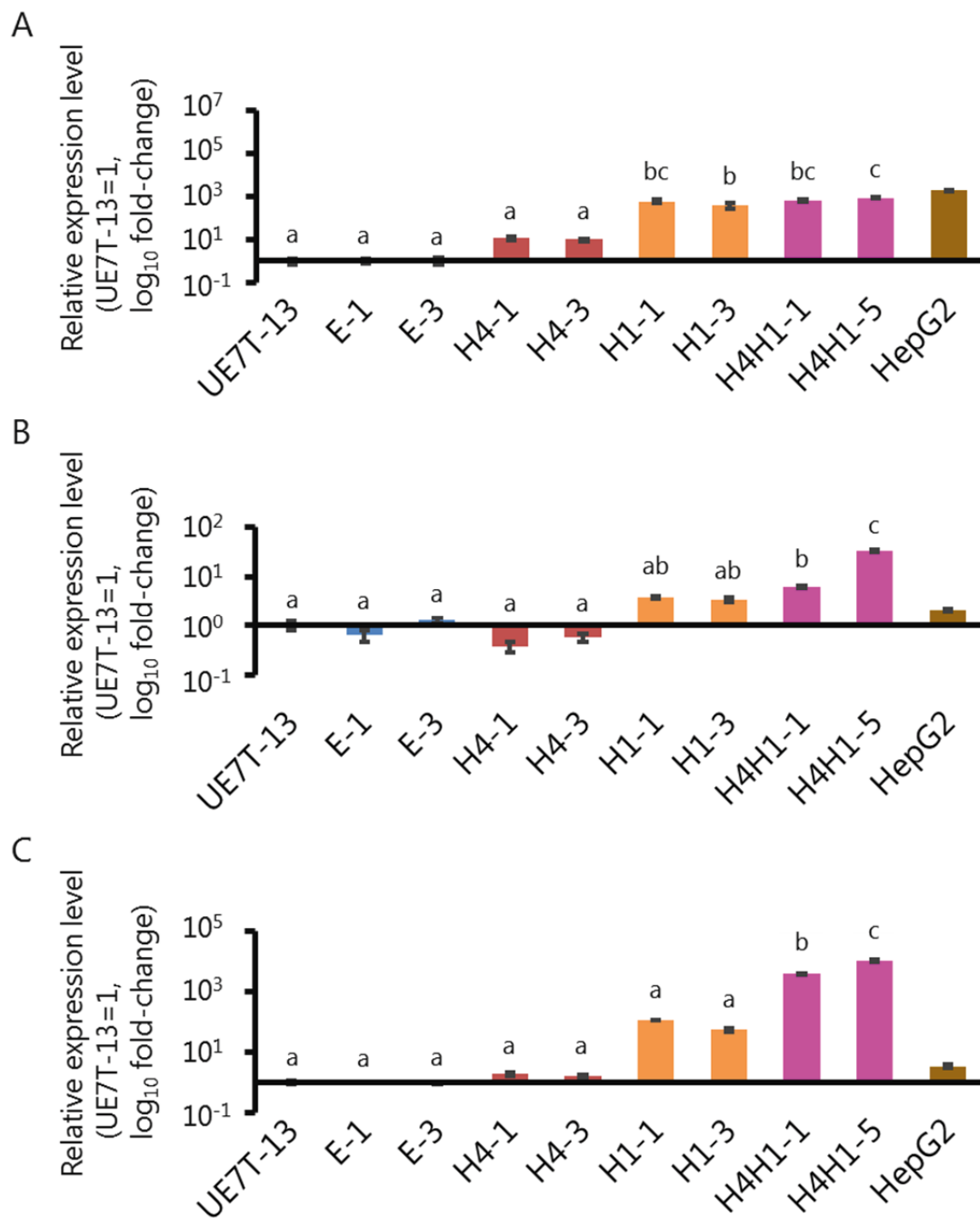


図 35. HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における

薬物代謝酵素遺伝子群の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析)

A. CYP3A4, B. CYP2B6, C. CYP2C9

各 mRNA 発現量は, ハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* の mRNA 発現量で補正した。

UE7T-13: UE7T-13 細胞, E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞,

H4-1, H4-3: pMN1/HNF4 $\alpha$ 導入細胞, H1-1, H1-3: pMN1/HNF1 $\alpha$ 導入細胞,

H4H1-1, H4H1-5: pMN1/HNF4 $\alpha$ -T2A-HNF1 $\alpha$ 導入細胞, HepG2: HepG2 細胞,

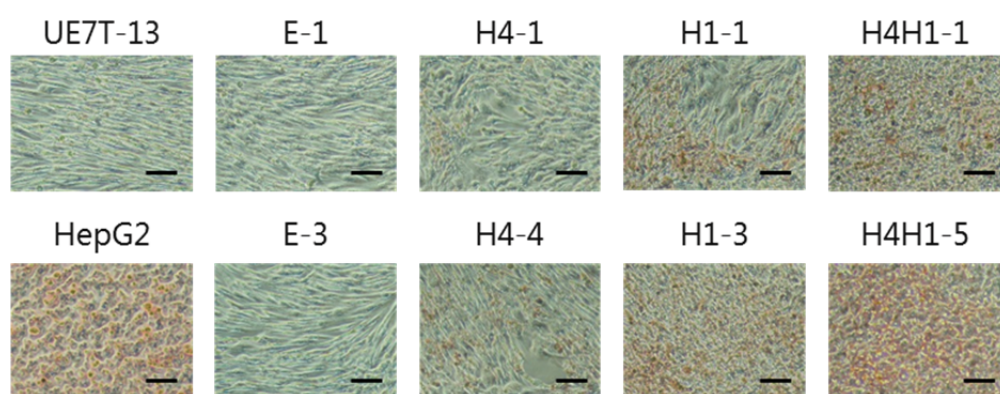
n=3, 異なる異符号間 (a, b, c) で有意差あり ( $p < 0.05$ , HepG2 細胞を除く),

N.D.: not detected.



#### 4) HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の脂質蓄積の検証

オレイン酸添加培養後、それぞれの HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞に存在する脂肪滴を Oil Red O 染色により可視化し、鏡検した。その結果、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞 (H4H1-1, H4H1-5) において、それぞれの単独発現ベクター導入細胞 (H4-1, H4-3 および H1-1, H1-3) よりも多くの脂肪滴が細胞内で検出された (図 36)。



**図 36. HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における Oil Red O 染色**

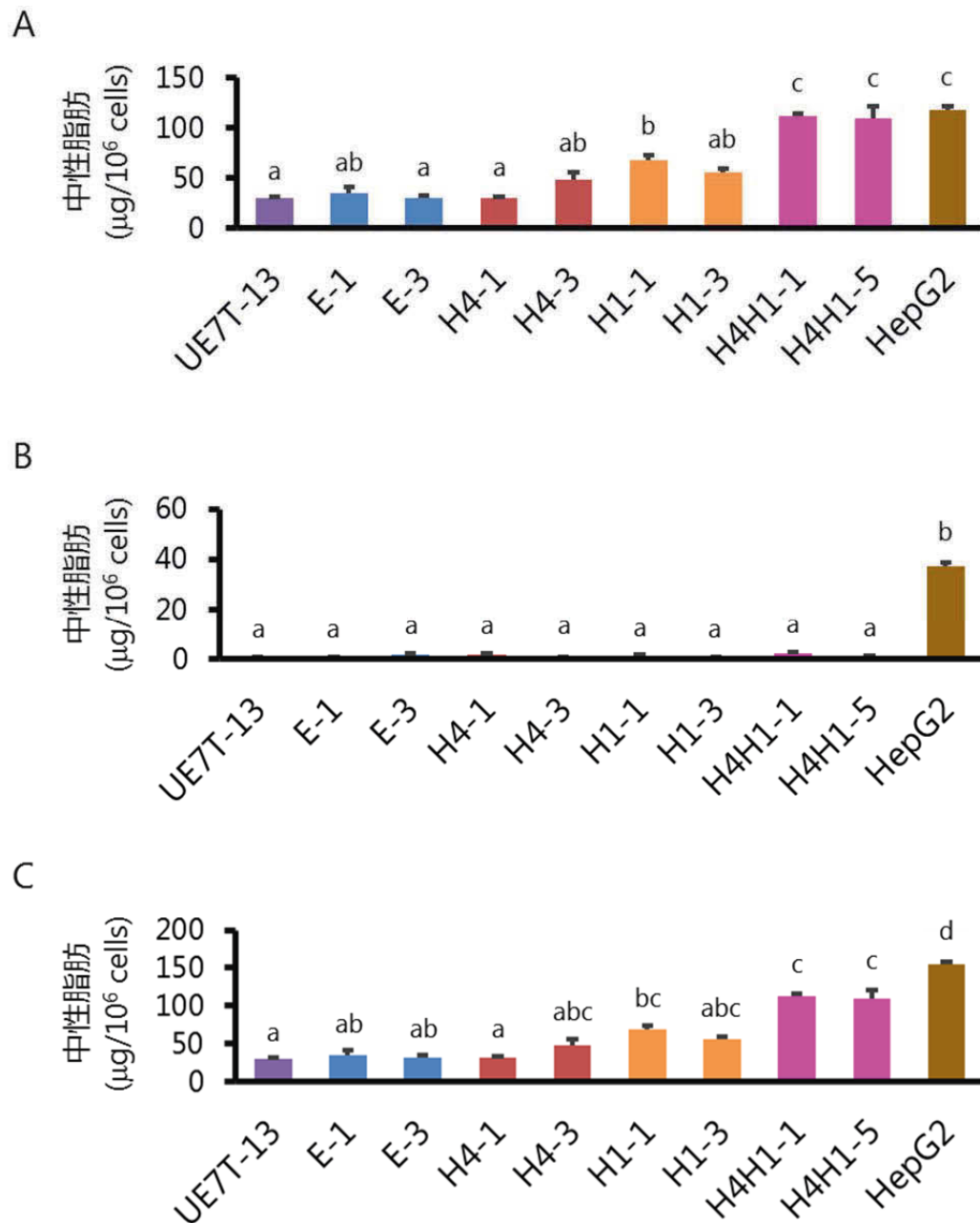
UE7T-13: UE7T-13 細胞, HepG2: HepG2 細胞, E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞,  
H4-1, H4-3: pMN1/ HNF4 $\alpha$ 導入細胞, H1-1, H1-3: pMN1/HNF1 $\alpha$ 導入細胞,  
H4H1-1, H4H1-5: pMN1/HNF4 $\alpha$ -T2A-HNF1 $\alpha$ 導入細胞,  
Scale bar: 100  $\mu$ m.

## 5) HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の細胞内および培養上清に含まれる中性脂肪およびコレステロールの定量

オレイン酸添加培養後, HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の細胞内および培養上清に含まれる TG およびコレステロールを定量した。

### ・ TG 量

HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の細胞内の TG 量は, 野生型株 UE7T-13 細胞に対して 3.7–3.8 倍, 有意に増加し, HepG2 細胞との比較でも, 93–94% とほぼ同等量であった (図 37A)。しかしながら, 培養上清に含まれる TG 量は, 野生型株 UE7T-13 細胞に対して, 1.4–3.3 倍に増加していたが, HepG2 細胞との比較では 2.3–5.5% であった (図 37B)。そのため, 細胞内および培養上清に含まれる TG 量の合計は, HepG2 細胞に対して 71–73 % であった (図 37C)。



**図 37. HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における中性脂肪の定量**

A. 細胞内, B. 培養上清, C. 総量 (細胞内+培養上清)

UE7T-13: UE7T-13 細胞, E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞,

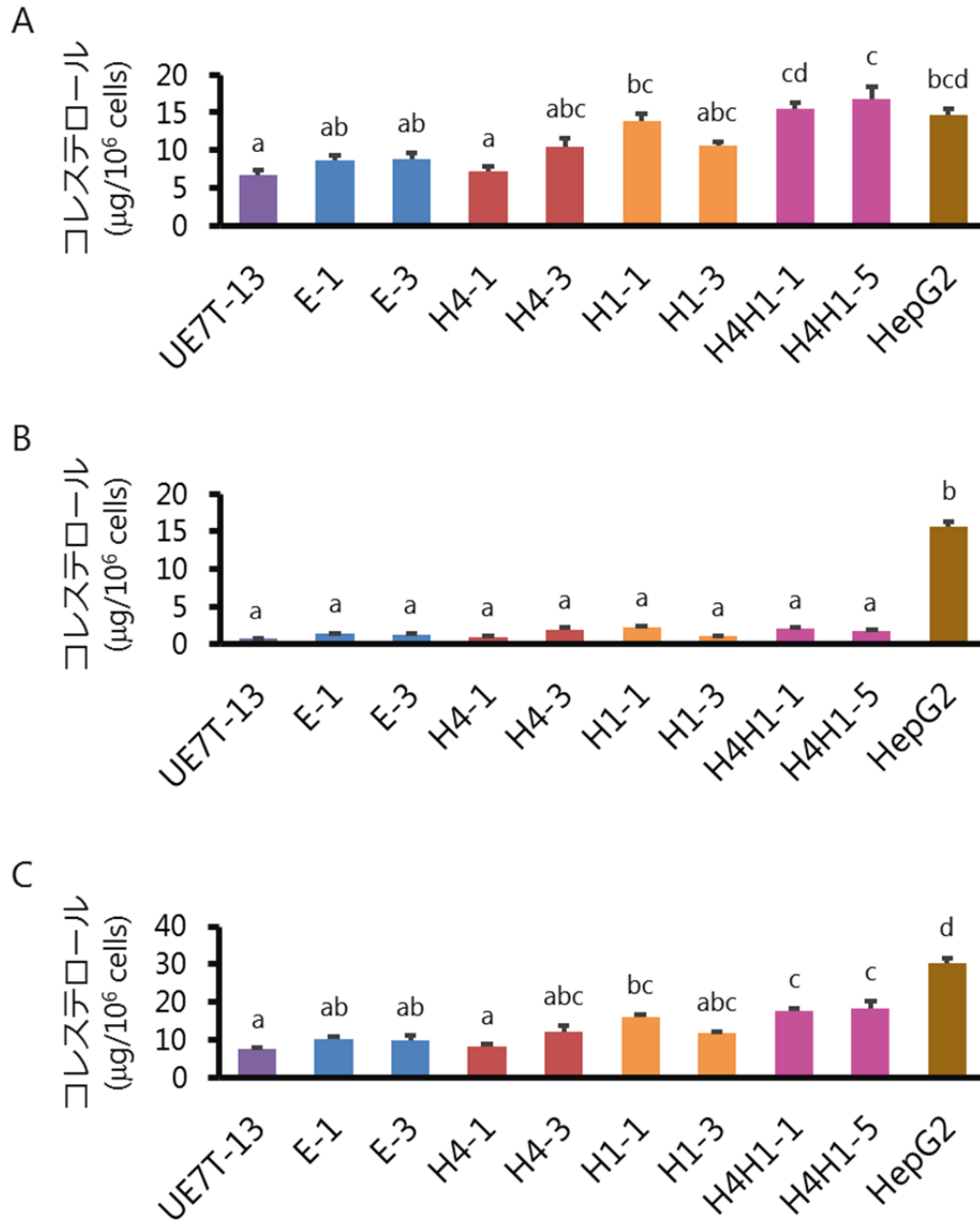
H4-1, H4-3: pMN1/HNF4 $\alpha$ 導入細胞, H1-1, H1-3: pMN1/HNF1 $\alpha$ 導入細胞,

H4H1-1, H4H1-5: pMN1/HNF4 $\alpha$ -T2A-HNF1 $\alpha$ 導入細胞, HepG2: HepG2 細胞,

n=3, 異なる文字間 (a, b, c, d) で有意差あり ( $p < 0.05$ , HepG2 細胞を除く)

- ・ コレステロール量

HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の細胞内のコレステロール量は、UE7T-13 細胞に対して、2.3–2.5 倍に増加し、HepG2 細胞との比較でも 1.1–1.2 倍に増加した (図 38A)。また、培養上清に含まれるコレステロール量は、UE7T-13 細胞に対して、2.3–2.8 倍に増加していたが、HepG2 細胞との比較では 11–13 %であった (図 38B)。そのため、細胞内および培養上清に含まれるコレステロール量の合計は、HepG2 細胞に対して 58–61 %であった (図 38C)。



**図 38. HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞におけるコレステロールの定量**

A. 細胞内, B. 培養上清, C. 総量 (細胞内+培養上清)

UE7T-13: UE7T-13 細胞, E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞,

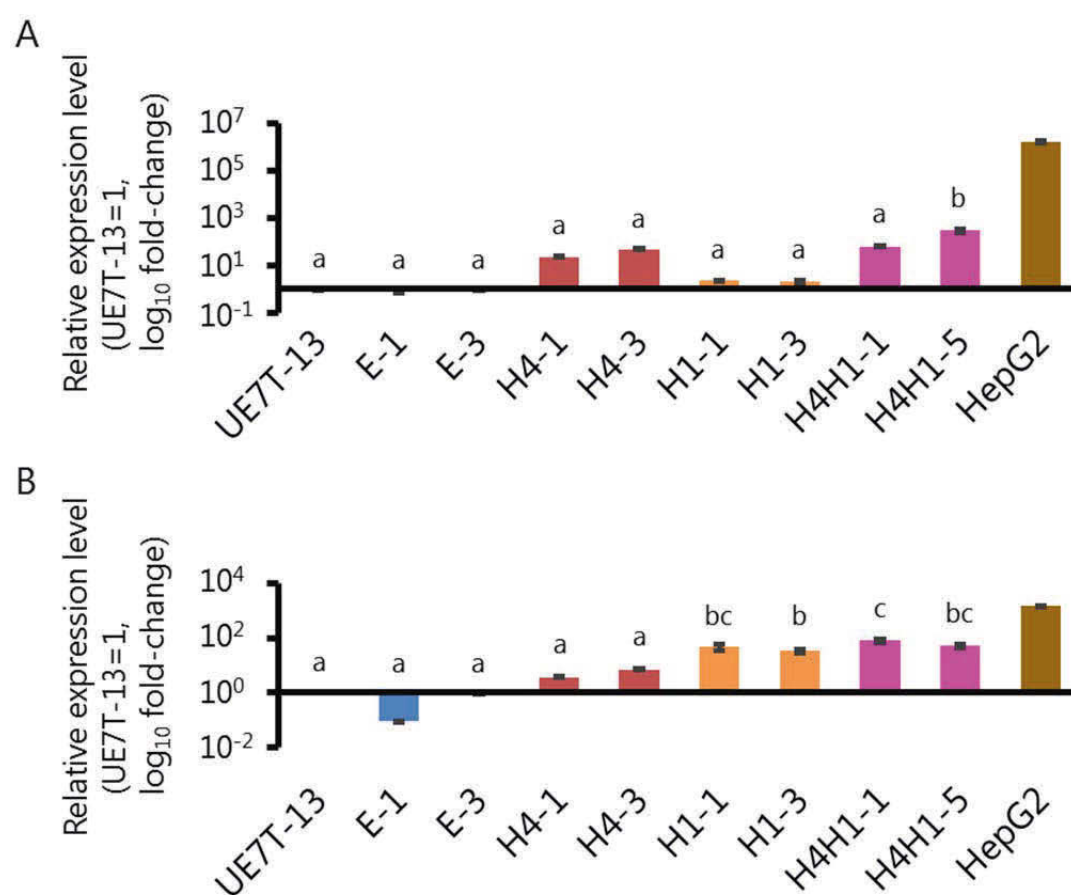
H4-1, H4-3: pMN1/HNF4 $\alpha$ 導入細胞, H1-1, H1-3: pMN1/HNF1 $\alpha$ 導入細胞,

H4H1-1, H4H1-5: pMN1/HNF4 $\alpha$ -T2A-HNF1 $\alpha$ 導入細胞, HepG2: HepG2 細胞,

n=3, 異なる異符号間 (a, b, c, d) で有意差あり ( $p<0.05$ )

## 6) HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の脂質代謝関連遺伝子群の発現解析

HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞から調製した全 RNA を試料に、リアルタイム RT-PCR 解析を行い、*ApoB100* および *MTP* 遺伝子の発現解析を行った。その結果、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞は UE7T-13 細胞に対して、*ApoB100* の mRNA 発現量が  $64\text{--}3.1 \times 10^2$  倍に、*MTP* の mRNA 発現量が 53–81 倍にそれぞれ増加した (図 39)。しかしながら、HepG2 細胞との比較では、*ApoB100* の mRNA 発現量は  $1.0 \times 10^{-3}$  倍以下、*MTP* の mRNA 発現量は  $1.0 \times 10^{-2}$  倍以下であった (図 39)。



**図 39. HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における *ApoB100* (A) および *MTP* (B) 遺伝子の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析)**

各 mRNA 発現量は、ハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* の mRNA 発現量で補正した。

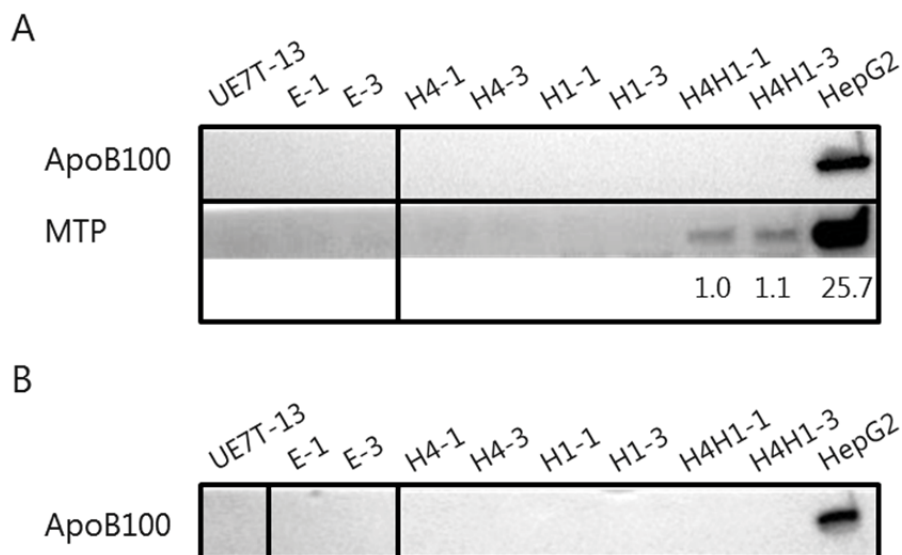
UE7T-13: UE7T-13 細胞, E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞,

H4-1, H4-3: pMN1/HNF4 $\alpha$ 導入細胞, H1-1, H1-3: pMN1/HNF1 $\alpha$ 導入細胞,

H4H1-1, H4H1-5: pMN1/HNF4 $\alpha$ -T2A-HNF1 $\alpha$ 導入細胞, HepG2: HepG2 細胞

n=3, 異なる異符号間 (a, b, c) で有意差あり ( $p < 0.05$ )

次に, HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞から調製した細胞溶解液および細胞上清を試料に, ウェスタンブロット解析を行い, ApoB100 および MTP タンパク質の発現解析を行った。その結果, HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の細胞内および培養液中から ApoB100 タンパク質は検出されなかった(図 40A, B)。しかしながら, HepG2 細胞と比較するとわずかではあるが, 細胞内から MTP タンパク質が検出された(図 40A)。



**図 40. HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における ApoB100 および MTP タンパク質の発現 (ウェスタンブロット解析)**

A. 細胞溶解液, B. 培養上清

下の数字は,  $\beta$ -ACTIN により補正した強度比を示す。

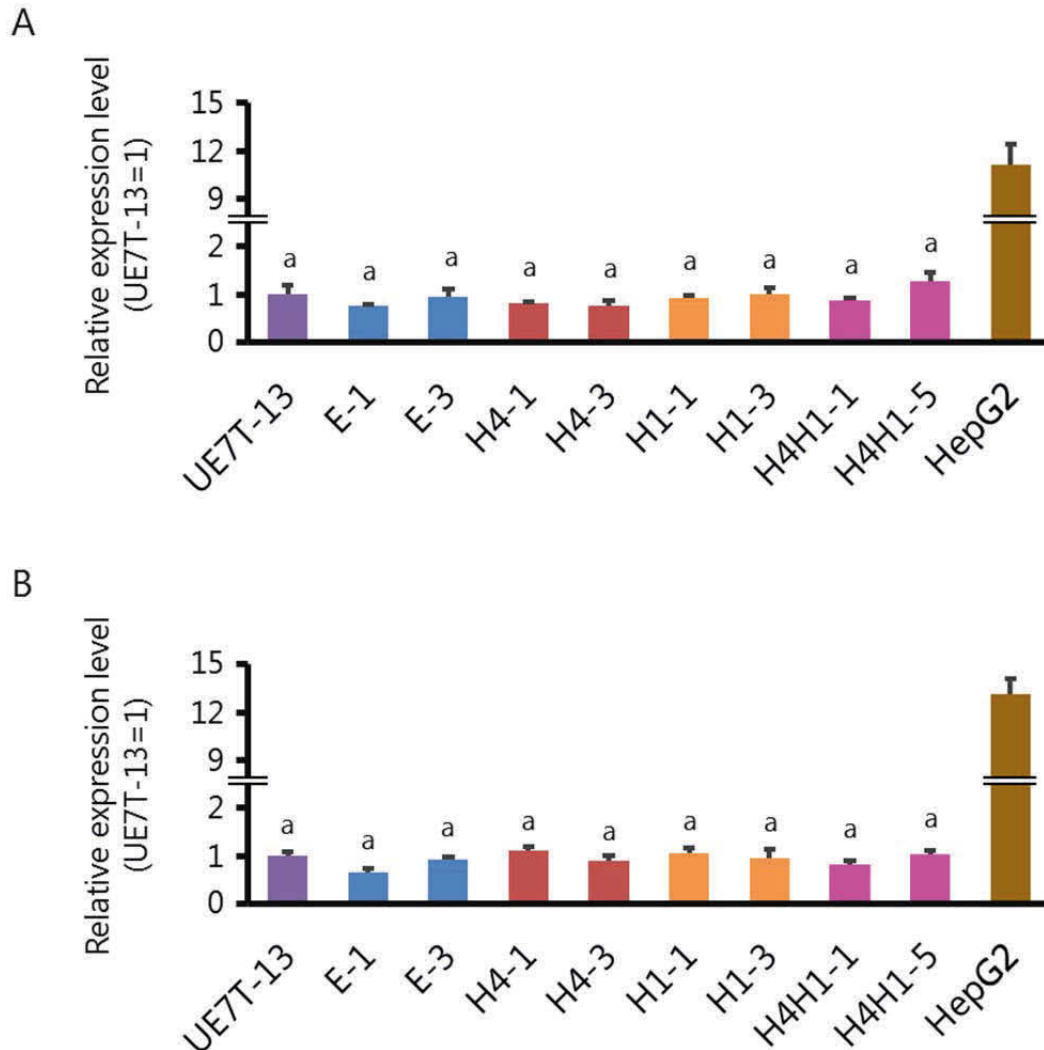
UE7T-13: UE7T-13 細胞, E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞,

H4-1, H4-3: pMN1/HNF4 $\alpha$ 導入細胞, H1-1, H1-3: pMN1/HNF1 $\alpha$ 導入細胞,

H4H1-1, H4H1-5: pMN1/HNF4 $\alpha$ -T2A-HNF1 $\alpha$ 導入細胞, HepG2: HepG2 細胞

$\beta$ -ACTIN は図 32 に示した。

さらに、脂質代謝関連遺伝子群の mRNA 発現解析を行った結果、それぞれの細胞間で *FAS*, *HMGCS 1* および *DGAT1* の mRNA 発現量に大きな変化は見られなかった (図 41A, B, C)。しかしながら、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における *DGAT2* の mRNA 発現量は、UE7T-13 細胞や HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ 単独強制発現ベクター導入細胞に対して、2.2–2.9 倍有意に増加した (図 41D)。



**図 41. HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における脂質合成関連遺伝子群の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析)**

A. *FAS*, B. *HMGCS 1*

各 mRNA 発現量は、ハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* の mRNA 発現量で補正した。

UE7T-13: UE7T-13 細胞, E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞,

H4-1, H4-3: pMN1/HNF4 $\alpha$ 導入細胞, H1-1, H1-3: pMN1/HNF1 $\alpha$ 導入細胞

H4H1-1, H4H1-5: pMN1/HNF4 $\alpha$ -T2A-HNF1 $\alpha$ 導入細胞, HepG2: HepG2 細胞

n=3, 異なる異符号間 (a, b) で有意差あり ( $p < 0.05$ )



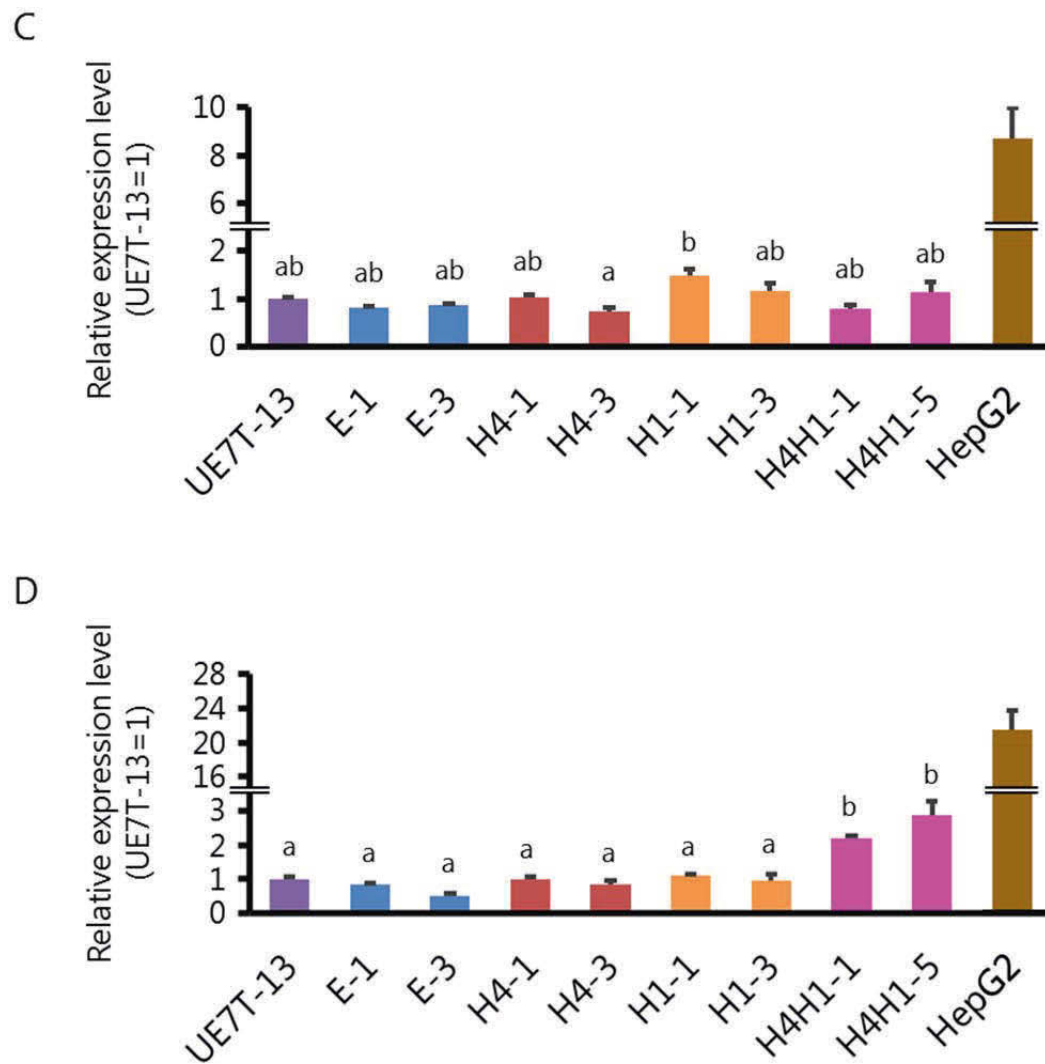


図 41. つづき

C. *DGAT1*, D. *DGAT2*

各 mRNA 発現量は、ハウスキーピング遺伝子 GAPDH の mRNA 発現量で補正した。

UE7T-13: UE7T-13 細胞, E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞,

H4-1, H4-3: pMN1/HNF4 $\alpha$ 導入細胞, H1-1, H1-3: pMN1/HNF1 $\alpha$ 導入細胞,

H4H1-1, H4H1-5: pMN1/HNF4 $\alpha$ -T2A-HNF1 $\alpha$ 導入細胞, HepG2: HepG2 細胞

n=3, 異なる異符号間 (a, b) で有意差あり ( $p<0.05$ )

## 考察

UE7T-13 細胞において、実験 1 で明らかとなった HNF4 $\alpha$ または HNF1 $\alpha$ の強制発現によっても内在性 FOXA2 の発現は誘導されないことに加え、HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ の同時発現によっても内在性 FOXA2 の発現が誘導されないことが明らかとなった。肝臓の発生過程において、FOXA2 は内胚葉への分化に関与しており、肝細胞への分化および肝機能の獲得・維持に関与する HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ よりも発現の時期が早い [114]。また、FOXA2 の発現は、FOXA2 自身または HNF6 によって制御されていること [115, 116]、HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ は互いの発現を調節し合うことが報告されている [117, 118]。そのため UE7T-13 細胞における HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ の同時発現により、FOXA2 の発現誘導が見られなかったのは、FOXA2 が HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ による発現調節のネットワークとは異なる発現調節を受けているためと考えられる。

HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ を同時に強制発現させた UE7T-13 細胞の細胞形態は、HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ 単独強制発現ベクター導入細胞と同様に、上皮細胞の特徴である敷石状に変化した (図 33)。また HepG2 細胞と比較して低いながらも、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における肝細胞分化マーカー遺伝子 *AFP*, *ALB* の mRNA 発現量は、それぞれの単独強制発現ベクター導入細胞に比べ、明確に増加した (図 34)。さらに *CYP* 群の mRNA 発現量も明確に増加し、*CYP2B6* および *CYP2C9* の mRNA 発現量は HepG2 細胞よりも高かった (図 35)。以上の結果は、HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ の同時発現は、HNF4 $\alpha$ または HNF1 $\alpha$ の単独強制発現よりも肝細胞への分化を強く誘導することを示している。

オレイン酸の添加培養後に細胞内の TG およびコレステロール量を測定した結果、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞は HepG2 細胞と同程度の TG およびコレステロールを細胞内に蓄積することが判明した (図 37A, 38A)。しかしながら、HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ の単独強制発現ベクター導入細胞と同様に、HepG2 細胞と比較して、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞の培養上清から検出される TG およびコレステロール量は僅かであった (図 37B, 38B)。また、*ApoB100* の mRNA 発現量の増加は見られた (図 39A) もの、細胞内および培養上清から ApoB100 タンパク質は検出されなかった (図 40) ことから、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞においてもリポタンパク質はほとんど産生されなかったと考えられる。しかしながら、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞において *MTP* の mRNA 発現量が増加し

(図 39B)、HepG2 細胞と比較するとわずかではあるが、MTP タンパク質の発現が検出された (図 40A)。以上の結果から、リポタンパク質の産生にはさらなる ApoB100 の発現誘導が必要であると考えられる。

HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞において、脂質合成に関与する *FAS*, *HMGCS1* の mRNA 発現量は、UE7T-13 細胞と比較して大きな変化は見られなかった (図 41)。そのため、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞において細胞内に蓄積した脂質 (特に TG) は、*de novo* 合成によるものではなく、培養液に添加したオレイン酸由来であると考えられる。オレイン酸などの遊離脂肪酸は、肝細胞に取り込まれた後、グルコース代謝で生成されるグリセロール 3-リン酸とエステル結合し、TG が

合成される。DGAT は TG 合成の最終反応であるジアシルグリセロール (DAG : diacylglycerol) から TG の合成を触媒する酵素であり, 2 種類のアイソフォーム DGAT1 および DGAT2 が存在する [119, 120]。DGAT1 は小胞体内での TG 合成に関与し, VLDL の分泌を促進するが, DGAT2 は細胞内での TG 合成に関与し, 細胞内への TG の蓄積を促進する [121]。HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞において, *DGAT1* の mRNA 発現量に大きな変化は見られなかったが, *DGAT2* の mRNA 発現量は UE7T-13 細胞や各 HNF 単独強制発現ベクター導入細胞に比べ, 2.2–2.9 倍, 有意に増加していた (図 41C, D)。以上の結果から, UE7T-13 細胞における HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ の同時発現は, DGAT2 の発現誘導を介して, 細胞内への TG の蓄積を促進したと考えられる (図 42)。

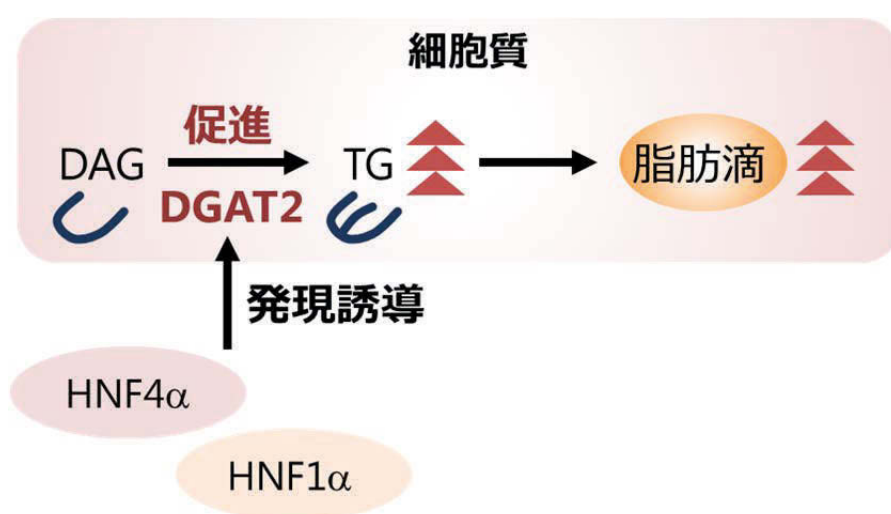


図 42. 考察 : HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ の同時発現による DGAT2 の発現誘導を介した細胞内への中性脂肪蓄積量の増加

## 第 5 章

### 総括

## 第5章 総括

### 1. 分化誘導肝細胞の創出と肝機能の評価

肝臓は、エネルギーの代謝や貯蔵、有害物質の解毒、胆汁の生成・分泌など多岐にわたる機能を有し、生体内代謝の中心的な役割を担っている。これら肝機能の大部分は、肝臓全細胞の60–70%を占める肝実質細胞（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といった創薬研究において、肝臓を *in vitro* で再現した肝臓モデルの構築が求められている。この肝臓モデルに用いる細胞は、ヒト初代培養肝細胞が最適ではあるが、慢性的な供給不足や継代培養が困難といった課題がある。近年、この課題を解決するため、成熟した肝細胞を、ES細胞（胚性幹細胞）やiPS細胞（人工多能性幹細胞）といった多能性を有する幹細胞から分化誘導によって作出する研究が数多く行われている [8, 15, 16]。幹細胞からの肝細胞への分化誘導は、発生過程における肝臓形成を模した形で行われる。すなわち、肝細胞への分化に参与する液性因子、さらには肝臓発生過程に重要な役割を果たしている遺伝子を順次各分化段階で発現させることによって行われる。このような分化誘導法により創出された肝細胞様細胞の評価は、肝細胞で特異的に発現している遺伝子またはタンパク質の発現や肝細胞が有する生理的な機能を調べることで行われる。しかしながら、既存の分化マーカーは肝細胞が有する特徴の一部を評価しているに過ぎず、未だヒト正常肝細胞とすべての機能において同等な分化誘導肝細胞は得られていない。

### 2. 肝臓におけるリポタンパク質代謝

肝細胞では、中性脂肪 (TG) やコレステロールなどの脂質を末梢組織の細胞に届けるために、超低密度リポタンパク質 (VLDL) が合成される。VLDLは、ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質 (MTP) の作用により、脂質とアポリポタンパク質 B100 (ApoB100) が会合することによって形成される (図7)。肝細胞が有する代表的な機能の一つであるリポタンパク質産生能は、肝細胞の形成過程で獲得される。しかし、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ついて詳細な解析は行われておらず、未だ不明な点が多い。これまでに、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞において、酪酸ナトリウム (1–2 mM) による分化誘導処理が、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、さらに HepG2 細胞の産生するリポタンパク質量に影響を与えることが報告されている (図13, [79])。そのため、肝細胞の分化とリポタンパク質産生を含む脂質代謝には関連が予測された。

### 3. 分化段階の異なる種々のヒト培養肝細胞株におけるリポタンパク質の解析 (第3章)

第3章では、肝細胞の分化段階とリポタンパク質産生の関連を明らかにすることを目的とした。はじめに、既知の肝細胞分化マーカー遺伝子の mRNA 発現解析 (図 14) および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により、由来の異なる 6 種のヒト培養肝細胞株を、低分化型 (HLE 細胞, HLF 細胞), 中分化型 (HepG2 細胞, HuH-7 細胞) および高分化型 (HepaRG 細胞, HC 細胞) にそれぞれ分類した (図 15)。

次に、LipoSEARCH 法により、それぞれの培養上清に含まれるリポタンパク質の解析を行った。その結果、1. 中分化型および高分化型はリポタンパク質を産生する (図 16), 2. 中分化型は低密度リポタンパク質 (LDL) サイズ, 高分化型は VLDL サイズのリポタンパク質をそれぞれ主に産生する (図 16, 17) ことが明らかとなった。LDL は、VLDL よりも粒子サイズが小さい。そのため、この結果は、中分化型の産生するリポタンパク質の粒子サイズが、高分化型と比較して小さいことを示している。肝細胞において VLDL は、MTP が触媒する脂質と ApoB100 との会合による pre-VLDL の形成、および pre-VLDL への TG の取り込みによる VLDL の成熟化 (粒子サイズ的大型化) という 2 段階の反応を経て形成される [82]。脂質代謝関連遺伝子群の mRNA 発現解析により、中分化型および高分化型において、脂質合成およびリポタンパク質の形成に関わる遺伝子群の mRNA 発現量に大きな差は見られなかった (図 18)。そのため、中分化型では pre-VLDL への TG の取り込みによる VLDL の成熟化が進行せず、粒子サイズの小さいリポタンパク質が多く産生されたと考えられる。

また、3. 低分化型はリポタンパク質を産生しないことが明らかとなった。さらに、脂質代謝関連遺伝子群の mRNA 発現解析により、低分化型ではリポタンパク質の形成に関与するアポリポタンパク質 AI (*ApoAI*), *ApoB100* およびミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質 (*MTP*) 遺伝子の mRNA 発現量が著しく低いことが明らかとなった (図 18B)。これらのことから、低分化型では、リポタンパク質の形成に関与する遺伝子群の発現低下によって、リポタンパク質が産生されないと考えられる。

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った。そのため、リポタンパク質の詳細な解析は、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と考えられる (図 43)。

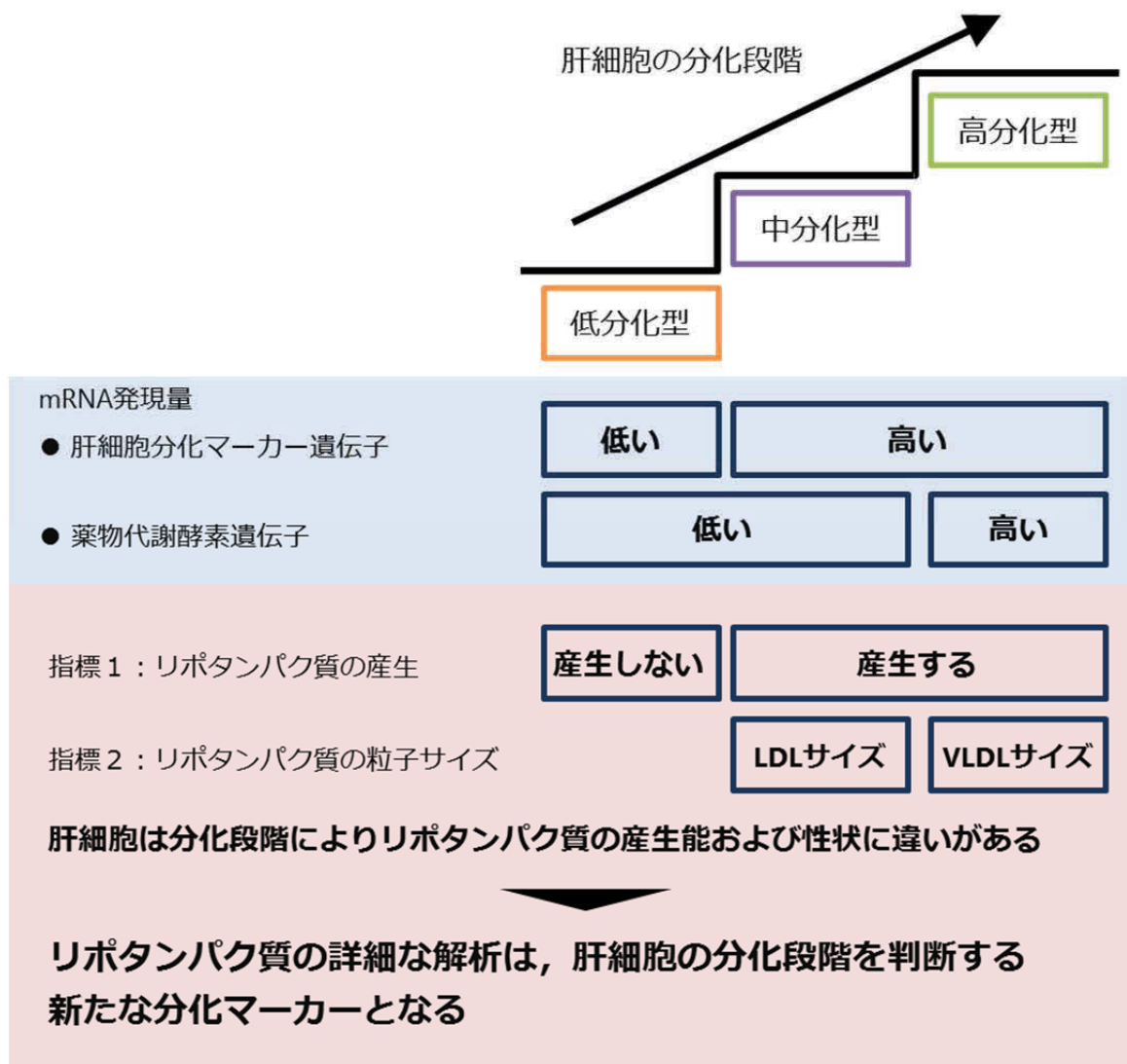


図 43. 考察 : ヒト肝細胞におけるリポタンパク質産生能を指標にした分化段階の評価

#### 4. 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 (第4章)

第3章において、肝細胞は、その分化段階によって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った。しかしながら、肝細胞がその形成過程においてどのようにリポタンパク質産生能を獲得するのかは依然として不明である。

肝細胞核因子 (HNF) 群は、肝臓形成や肝機能の獲得・維持に関与する転写因子として知られている [25]。HNF3 $\beta$ としても知られる FOXA2 は、内胚葉系譜への分化を制御しており、肝臓の発生段階において最も初期に発現し、肝臓の初期形態形成に深く関与する [83]。HNF4 $\alpha$ は、肝芽細胞から肝細胞への分化に加え、肝細胞が有する多くの機能の獲得・維持に関与する [84, 85]。HNF1 $\alpha$ は成熟肝細胞で発現し、肝細胞が担う種々の代謝に広く関与する。またこれらの HNF は VLDL の形成に必須な ApoB100 および MTP の発現を制御することも知られている [84, 91, 92]。そこで第4章では、HNF の発現がヒト間葉系幹細胞において、肝細胞への分化およびリポタンパク質産生能の獲得に与える影響について検証した。

第4章 実験1では、はじめに、肝臓の発生段階において発現時期が異なる3つの HNF である、FOXA2、HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ がヒト間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞における肝細胞への分化に与える影響を詳細に検証した。肝細胞分化マーカー遺伝子群および薬物代謝酵素 (CYP) 遺伝子群の mRNA 発現解析の結果、HNF1 $\alpha$ の強制発現は FOXA2 および HNF4 $\alpha$ の強制発現と比較して、 $\alpha$ -フェトプロテイン (AFP) や CYP3A4, CYP2C9 の mRNA 発現量を増加させた (図 23, 24)。このことから、HNF1 $\alpha$ の強制発現が、最も肝細胞への分化に影響を与えと考えられる。次に、それぞれの HNF の発現がリポタンパク質の産生に与える影響について検証した。HNF1 $\alpha$ の強制発現によって、細胞内への TG およびコレステロールの蓄積量が亢進した (図 26A, 27A)。しかしながら、いずれの HNF を強制発現させても、培養上清から検出される TG およびコレステロール量はわずかであった (図 26B, 27B)。また、ApoB100 および MTP の発現解析の結果、ApoB100 および MTP mRNA 発現は、それぞれ HNF4 $\alpha$ および HNF1 $\alpha$ の発現により誘導された (図 28) 一方、ApoB100 および MTP タンパク質の発現を誘導するまでには達しないことが明らかとなった (図 29)。これらのことから、いずれの HNF を単独で強制発現させても、VLDL の形成に不可欠である ApoB100 および MTP 両方の発現を十分に誘導できず、その結果、リポタンパク質産生能の獲得には至らなかったと考えられる (図 44)。



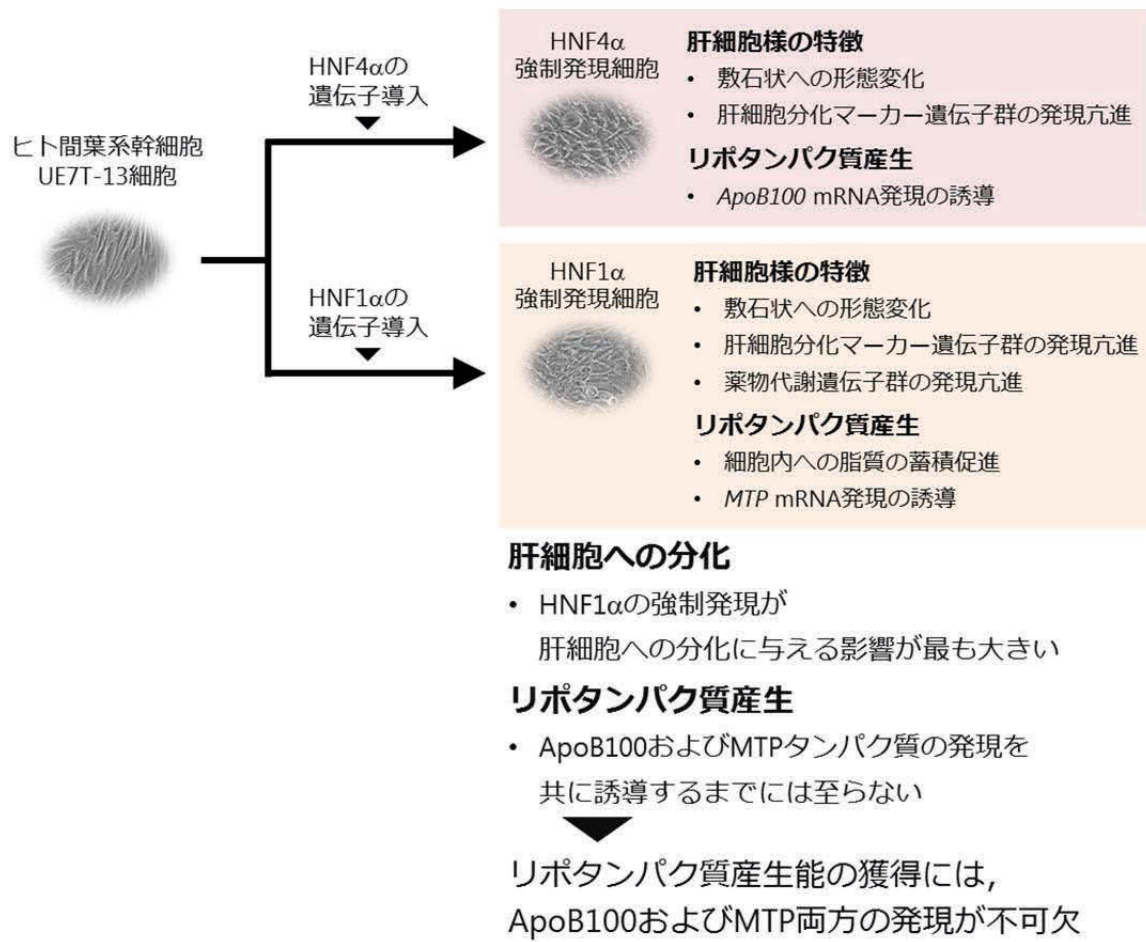
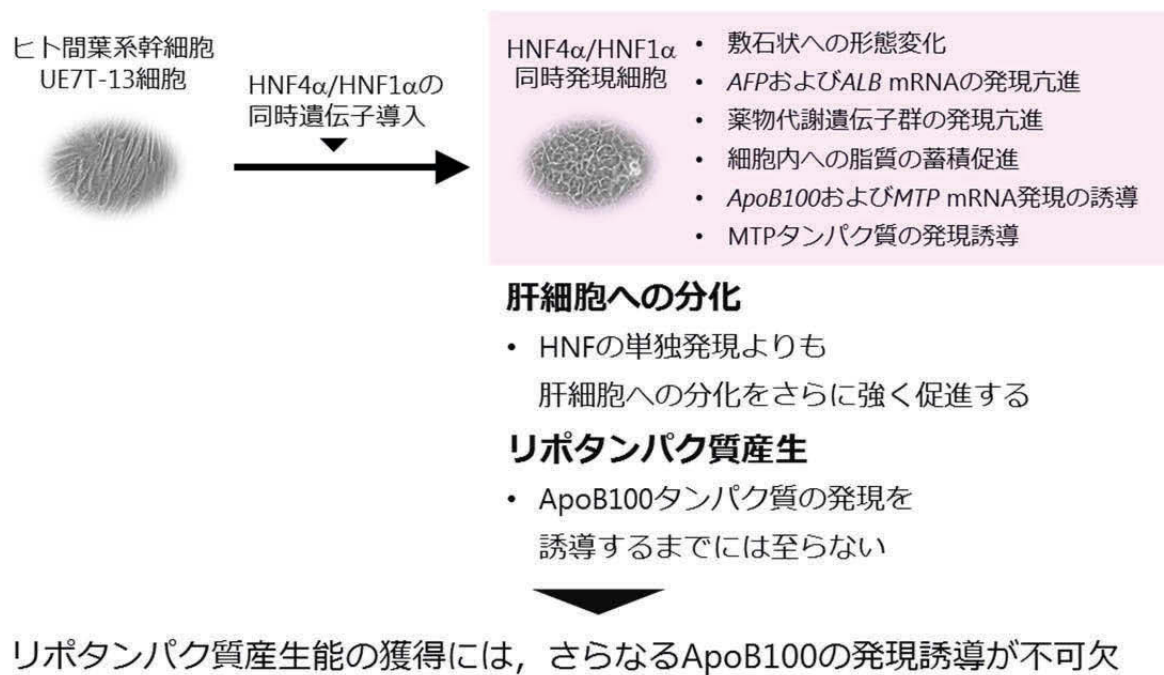


図 44. 考察: HNF 単独強制発現が肝細胞への分化とリポタンパク質産生に与える影響

続いて第4章 実験2では、*ApoB100* mRNA 発現量を上昇させた HNF4 $\alpha$ , および *MTP* mRNA 発現量を上昇させた HNF1 $\alpha$ を UE7T-13 細胞に共に導入することで、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ の同時発現がヒト間葉系幹細胞における肝細胞への分化とリポタンパク質産生に与える影響について詳細に検証した。HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ の同時発現は、*AFP*に加え、アルブミン (*ALB*) mRNA 発現量を増加させた (図 34)。加えて、*CYP3A4*, *CYP2B6* および *CYP2C9* mRNA 発現量も大きく増加させた (図 35)。そのため、UE7T-13 細胞において、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ の同時発現は、それぞれの単独発現よりも肝細胞への分化をさらに強く促進させると考えられる。

次に、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ の同時発現によるリポタンパク質産生に与える影響について検証した。HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ の同時発現は細胞内への脂質蓄積量を HepG2 細胞と同程度まで亢進させた (図 37A, 38A)。そして脂質合成遺伝子の mRNA 発現解析から、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ の同時発現は *DGAT2* mRNA 発現を誘導することが明らかとなった (図 41D)。*DGAT2* は TG 合成の最終反応を触媒し、細胞内への TG の蓄積を促進することから、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ の同時発現は *DGAT2* の発現誘導を介して、細胞内への TG の蓄積を促進したと考えられる (図 42)。一方、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ の同時発現によってもそれぞれの単独発現と同様に、培養上清から検出される TG およびコレステロール量はわずかであった (図 37B, 38B)。また、*ApoB100* および *MTP* の発現解析の結果、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ の同時発現は、*ApoB100* および *MTP* mRNA 発現量を共に増加させ

(図 39)、さらに依然として *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することが明らかとなった (図 40)。リポタンパク質の産生には、*ApoB100* および *MTP* の発現が不可欠であり、リポタンパク質を産生しないヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa 細胞において、*ApoB53* (*ApoB100* の N 末側 53%) および *MTP* を同時に強制発現させることで、*ApoB53* を含んだ粒子が細胞外に分泌されることが報告されている [109]。これらのことから、リポタンパク質産生能の獲得には、HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ の同時発現による *MTP* の発現誘導に加えて、他の肝細胞への分化関連遺伝子の導入などによる、さらなる *ApoB100* の発現誘導が必要であることが示唆された (図 45)。



**図 45. 考察 : HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ の同時発現が  
肝細胞への分化とリポタンパク質産生に与える影響**

以上のように本研究により，分化段階の異なる肝細胞におけるリポタンパク質の産生能，および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た。すなわち，肝細胞の産生するリポタンパク質の解析は，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（図43）。ヒト間葉系幹細胞において，肝芽細胞のマーカー遺伝子である HNF4 $\alpha$ の強制発現は *ApoB100* mRNA の発現を，肝細胞のマーカー遺伝子である HNF1 $\alpha$ の強制発現は *MTP* mRNA の発現をそれぞれ誘導し（図44），さらに HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ の同時発現は *ApoB100* および *MTP* mRNA の発現を共に誘導することを明らかにした（図45）。これらのことから，肝細胞はリポタンパク質産生能を分化過程の後期において段階的に獲得すると考えられる（図46）。また HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 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すこと，さらに *MTP* タンパク質の発現を誘導することを明らかにした（図45）。これらの結果は，肝細胞の形成過程におけるリポタンパク質産生機能の獲得に関して新たな知見を供するものである。

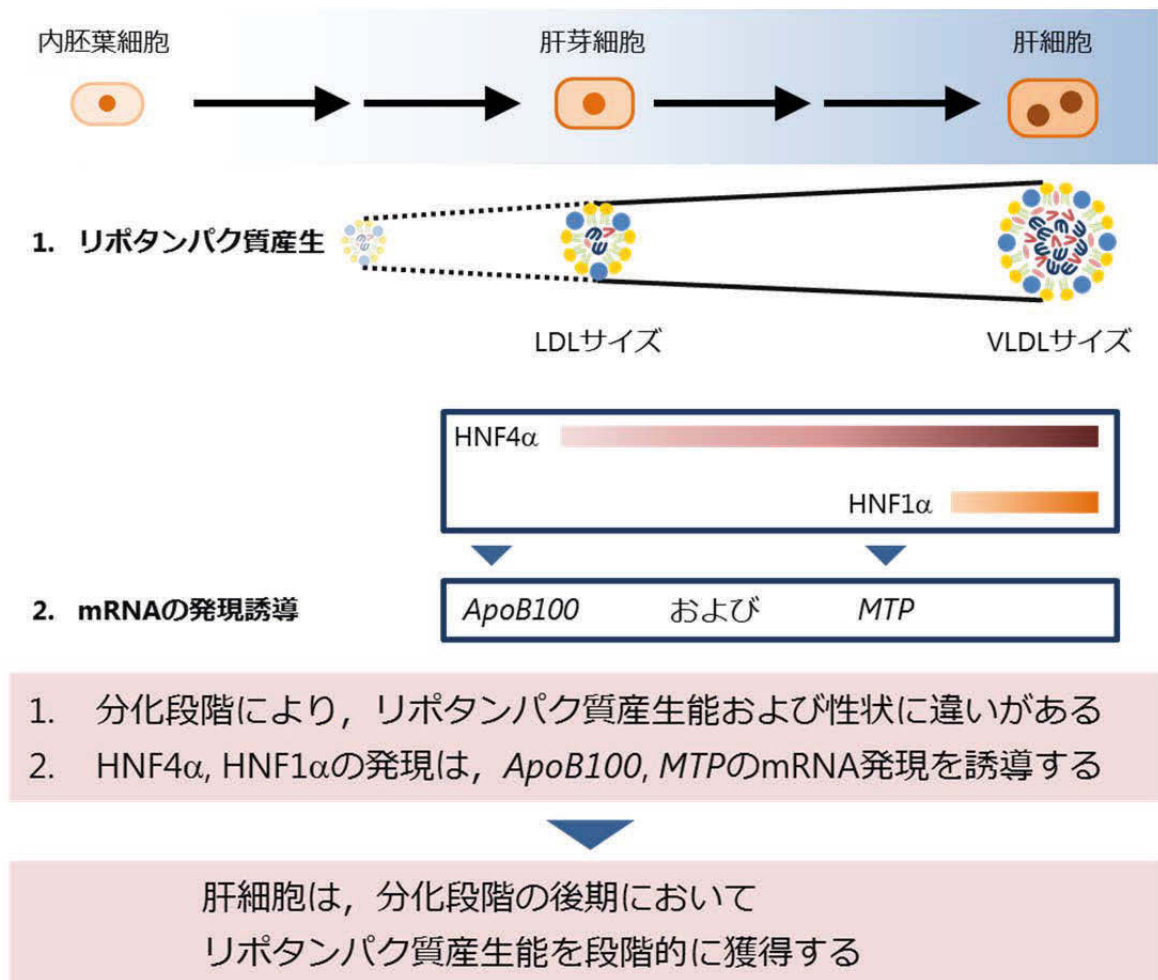


図46. 考察：肝細胞のリポタンパク質産生能獲得機構

## 5. 今後の展望

近年、iPS 細胞 [13, 14] に代表されるように、いくつかの転写因子を組み合わせることで細胞の分化をコントロールする研究が数多く報告されている [122–124]。肝臓の組織形成において、肝細胞への分化に重要な転写因子が数多く報告され、肝細胞への分化を誘導する転写因子の組み合わせも報告され始めてはいる [24, 125, 126] が、未だすべての肝機能を有する分化誘導肝細胞は得られていない。

肝細胞における VLDL の形成には ApoB100 および MTP の発現が必須である。本研究により、ヒト間葉系幹細胞において HNF4 $\alpha$  および HNF1 $\alpha$  を同時に発現させることにより、MTP タンパク質の発現を誘導できることが示された。しかしながら、ApoB100 タンパク質の発現を誘導するまでには至らず、今後はいかに ApoB100 の発現を誘導することができるかが課題となる。ApoB100 の発現は、本研究で用いた HNF4 $\alpha$  および HNF1 $\alpha$  以外にも C/EBP $\alpha$  の制御下にあることが報告されている [127]。本研究により UE7T-13 細胞において、HNF4 $\alpha$  および HNF1 $\alpha$  の同時発現は、C/EBP $\alpha$  の mRNA 発現量に影響を与えない (図 47) ことが示されており、ApoB100 の発現誘導には、HNF4 $\alpha$  および HNF1 $\alpha$  に加えて、C/EBP $\alpha$  の発現も有力な手段と考える。また、本研究で *ApoB100* の mRNA 発現を誘導した HNF4 $\alpha$  には、PGC-1 や GRIP-1, SRC-1 といったコアクティベーターが存在する。HNF4 $\alpha$  はこれらと相互作用することで、種々の HNF4 $\alpha$  標的遺伝子の転写活性化を促すことが報告されている [128–130] ことから、これらのコアクティベーターの存在によって、HNF4 $\alpha$  による ApoB100 の発現誘導がさらに促進されると考えられる。また、ApoB や MTP の発現は、インスリンや IL-6 などの生体内代謝に関与する多くのホルモンやサイトカインの影響を受けることが報告されており [3, 131, 132]、これら液性因子の存在は ApoB100 や MTP の発現亢進に非常に重要であると考えられる。

以上の知見を踏まえ、今後は HNF4 $\alpha$  および HNF1 $\alpha$  に続く転写因子の組み合わせや培養時における様々な液性因子 (HGF やインスリンなど) の組み合わせなどについて詳細に検討することにより、肝細胞への分化過程におけるリポタンパク質産生能の獲得機構について明らかにする予定である (図 48)。

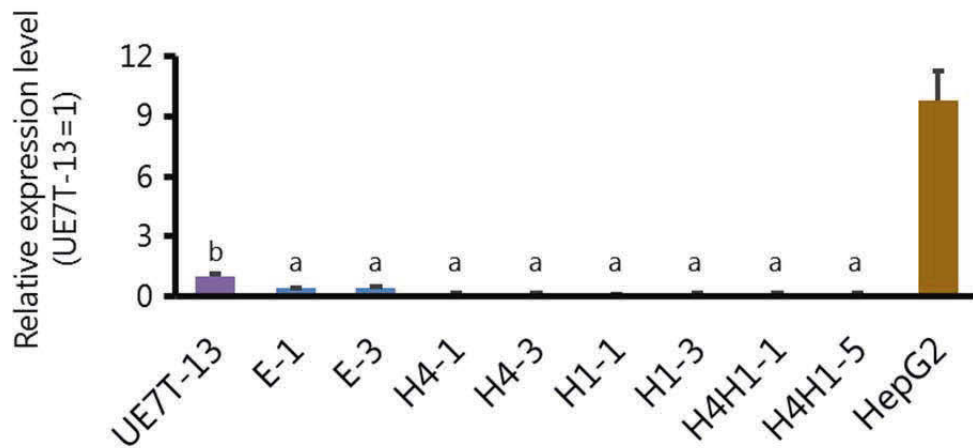


図 47. HNF4 $\alpha$ /HNF1 $\alpha$ 同時発現ベクター導入細胞における

**C/EBP $\alpha$ 遺伝子の mRNA 発現 (リアルタイム RT-PCR 解析)**

各 mRNA 発現量は、ハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* の mRNA 発現量で補正した。

UE7T-13: UE7T-13 細胞, E-1, E-3: pMN1Pur 導入細胞,

H4-1, H4-3: pMN1/HNF4 $\alpha$ 導入細胞, H1-1, H1-3: pMN1/HNF1 $\alpha$ 導入細胞,

H4H1-1, H4H1-5: pMN1/HNF4 $\alpha$ -T2A-HNF1 $\alpha$ 導入細胞, HepG2: HepG2 細胞

n=3, 異なる異符号間 (a, b) で有意差あり ( $p<0.05$ )

## ApoB100の発現誘導

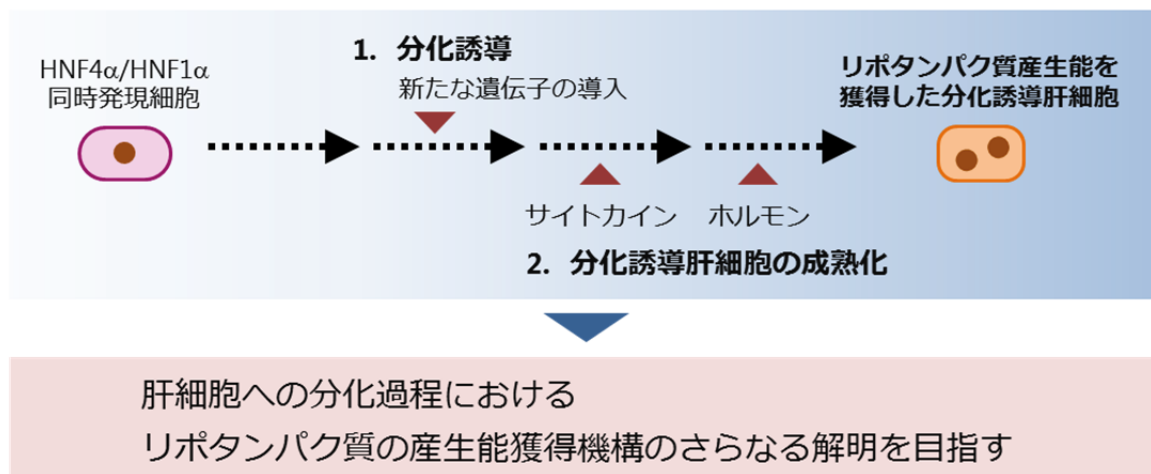


図 48. 今後の展望：リポタンパク質産生能を獲得した分化誘導肝細胞の創出

## 引用文献

1. Jung, J., Zheng, M., Goldfarb, M., Zaret, K.S. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science*. 1999; 284: 1899–2003.
2. Rossi, J. M., Dunn, N. R., Hogan, B. L. M., Zaret, K. S. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum, transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev*. 2001; 15: 1998–2009.
3. Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E., Birchmeier, C. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature*. 1995; 373: 699–702.
4. Ishikawa, K. S., Masui, T., Ishikawa, K., Shiojiri, N. Immunolocalization of hepatocyte growth factor and its receptor (c-Met) during mouse liver development. *Histochem Cell Biol*. 2001; 116: 453–462.
5. Kamiya, A., Kinoshita, T., Ito, Y., Matsui, T., Morikawa, Y., Senba, E., Nakashima, K., Taga, T., Yoshida, K., Kishimoto, T., Miyajima, A. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J*. 1999; 15: 2127–2136.
6. Kamiya, A., Kinoshita, T., Miyajima, A. Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett*. 2001; 9: 90–94.
7. Chinzei, R., Tanaka, Y., Shimizu-Saito, K., Hara, Y., Kakinuma, S., Watanabe, M., Teramoto, K., Arai, S., Takase, K., Sato, C., Terada, N., Teraoka, H. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology*. 2002; 36: 22–29.
8. Agarwal, S., Holton, K. L., Lanza, R. Efficient differentiation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2008; 26: 1117–1127.
9. Godoy, P., Hewitt, N. J., Albrecht, U., Andersen, M. E., Ansari, N., Bhattacharya, S., Bode, J. G., Bolleyn, J., Borner, C., Böttger, J., Braeuning, A., Budinsky, R. A., Burkhardt, B., Cameron, N. R., Camussi, G., Cho, C. S., Choi, Y. J., Craig Rowlands, J., Dahmen, U., Damm, G., Dirsch, O., Donato, M. T., Dong, J., Dooley, S., Drasdo, D., Eakins, R., Ferreira, K. S., Fonsato, V., Fraczek, J., Gebhardt, R., Gibson, A., Glanemann, M., Goldring, C. E. P., Gómez-Lechón, M. J., Groothuis, G. M. M., Gustavsson, L., Guyot, C., Hallifax, D., Hammad, S., Hayward, A., Häussinger, D., Hellerbrand, C., Hewitt, P., Hoehme, S., Holzhütter, H. G., Houston, J. B., Hrach, J., Ito, K., Jaeschke, H., Keitel, V., Kelm, J. M., Kevin Park, B., Kordes, C., Kullak-Ublick, G. A., Lecluyse, E. L.,



- Lu, P., Luebke-Wheeler, J., Lutz, A., Maltman, D. J., Matz-Soja, M., McMullen, P., Merfort, I., Messner, S., Meyer, C., Mwinyi, J., Naisbitt, D. J., Nussler, A. K., Olinga, P., Pampaloni, F., Pi, J., Pluta, L., Przyborski, S. A., Ramachandran, A., Rogiers, V., Rowe, C., Schelcher, C., Schmich, K., Schwarz, M., Singh, B., Stelzer, E. H. K., Stieger, B., Stöber, R., Sugiyama, Y., Tetta, C., Thasler, W. E., Vanhaecke, T., Vinken, M., Weiss, T. S., Widera, A., Woods, C. G., Xu, J. J., Yarborough, K. M., Hengstler, J. G. Recent advances in 2D and 3D *in vitro* systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol.* 2013; 87: 1315–1530.
10. Ebert, A. D. Svendsen, C. N. Human stem cells and drug screening: opportunities and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9: 367–372.
  11. Evans, M. J., Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature.* 1981; 292: 154–156.
  12. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 282: 1145–1147.
  13. Takahashi, K., Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126: 663–676.
  14. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007; 131: 861–872.
  15. Si-Tayeb, K., Noto, F. K., Nagaoka, M., Li, J., Battle, M. A., Duris, C., North, P. E., Dalton, S. Duncan, S. A., Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology.* 2010; 51: 297–305.
  16. Liu, H., Kim, Y., Sharkis, S., Marchionni, L., Jang, Y. Y. *In vivo* liver regeneration potential of human induced pluripotent stem cells from diverse origins. *Sci Transl Med.* 2011; 3: 82ra38.
  17. Touboul, T., Hannan, N. R., Corbineau, S., Martinez, A., Martinet, C., Branchereau, S., Mainot, S., Strick-Marchand, H., Pedersen, R., Di Santo, J., Weber, A., Vallier, L. Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. *Hepatology.* 2010; 51: 1754–1765.
  18. Nakamura, N., Saeki, K., Mitsumoto, M., Matsuyama, S., Nishio, M., Saeki, K., Hasegawa, M., Miyagawa, Y., Ohkita, H., Kiyokawa, N., Toyoda, M., Akutsu, H., Umezawa, A., Yuo, A. Feeder-free and serum-free production of hepatocytes, cholangiocytes, and their proliferating progenitors from human pluripotent stem cells: application to liver-specific functional and cytotoxic assays. *Cell*

- Reprogram. 2012; 14: 171–185.
19. D'Amour, K. A., Agulnick, A. D., Eliazer, S., Kelly, O. G., Kroon, E., Baetge, E. E. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol.* 2005; 23: 1534–1541.
  20. Cai, J., Zhao, Y., Liu, Y., Ye, F., Song, Z., Qin, H., Meng, S., Chen, Y., Zhou, R., Song, X., Guo, Y., Ding, M., Deng, H. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology.* 2007; 45: 1229–1239.
  21. Hay, D. C., Fletcher, J., Payne, C., Terrace, J. D., Gallagher, R. C., Snoeys, J., Black, J. R., Wojtacha, D., Samuel, K., Hannoun, Z., Pryde, A., Filippi, C., Currie, I. S., Forbes, S. J., Ross, J. A., Newsome, P. N., Iredale, J. P. Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 12301–12306.
  22. Takayama, K., Inamura, M., Kawabata, K., Tashiro, K., Katayama, K., Sakurai, F., Hayakawa, T., Furue, M. K., Mizuguchi, H. Efficient and directive generation of two distinct endoderm lineages from human ESCs and iPSCs by differentiation stage-specific SOX17 transduction. *PLoS One.* 2011; 6(7): e21780.
  23. Takayama, K., Inamura, M., Kawabata, K., Katayama, K., Higuchi, M., Tashiro, K., Nonaka, A., Sakurai, F., Hayakawa, T., Furue, M. K., Mizuguchi, H. Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 $\alpha$  transduction. *Mol Ther.* 2012; 20: 127–137.
  24. Takayama, K., Inamura, M., Kawabata, K., Sugawara, M., Kikuchi, K., Higuchi, M., Nagamoto, Y., Watanabe, H., Tashiro, K., Sakurai, F., Hayakawa, T., Furue, M. K., Mizuguchi, H. Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 $\alpha$  transduction. *Hepatology.* 2012; 57: 628–636.
  25. Schrem, H., Klempnauer, J., Borlak, J. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: the hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression. *Pharmacol Rev.* 2002; 54: 129–158.
  26. Bossard, P., Zaret, K. S. GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation. *Development.* 1998; 125: 4909–4917.
  27. Shen, C. N., Slack, J. M. Tosh, D. Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nature Cell Biol.* 2000; 2: 879–887.
  28. Keng, V. W., Yagi, H., Ikawa, M., Nagano, T., Myint, Z., Yamada, K., Tanaka, T., Sato, A., Muramatsu, I., Okabe, M., Sato, M., Noguchi, T. Homeobox gene Hex is essential for onset of mouse embryonic liver development and differentiation of the monocyte lineage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 276: 1155–

1161.

29. Martinez Barbera, J. P., Clements, M., Thomas, P., Rodriguez, T., Meloy, D., Kioussis, D., Beddington, R. S. The homeobox gene *Hex* is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development*. 2000; 127: 2433–2445.
30. Shen, C. N., Slack, J. M. Tosh, D. Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nature Cell Biol*. 2000; 2: 879–887.
31. Westmacott, A. Burke, Z., Oliver, G., Slack, J., Tosh, D. C/EBP $\alpha$  and C/EBP $\beta$  are markers of early liver development. *Int J Dev Biol*. 2006; 50: 653–567.
32. Jones, E. A., Tosh, D., Wilson, D. I., Lindsay, S., Forrester, L. M. Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Exp Cell Res*. 2002; 272: 15–22.
33. Smith, L. C., Pownall, H. J., Gotto, A. M. The plasma lipoproteins: structure and metabolism. *Annu Rev Biochem*. 1978; 47: 751–757.
34. Davis, R A., Boogaerts, J. R., Borchardt, R. A., Malone-McNeal, M., Archambault-Schexnayder, J. Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins. Varied synthetic response of individual apolipoproteins to fasting. *J Biol Chem*. 1985; 260: 14137–14144.
35. Havel, R. J. The formation of LDL: mechanisms and regulation. *J Lipid Res*. 1984; 25: 1570–1576.
36. Tall, A. R. An overview of reverse cholesterol transport. *Eur Heart J*. 1998; 19: A31–35.
37. Elovson, J., Chatterton, J. E., Bell, G. T., Schumaker, V. N., Reuben, M. A., Puppione, D. L., Reeve, J.R., Young, N. L. Plasma very low density lipoproteins contain a single molecule of apolipoprotein B. *J Lipid Res*. 1988; 29: 1461–1473.
38. Hussain, M. M., Shi, J., Dreizen, P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res*. 2003; 44: 22–32.
39. Hussain, M. M., Bakillah, A. New approaches to target microsomal triglyceride transfer protein. *Curr Opin Lipidol*. 2008; 19: 572–578.
40. Sparks, J. D., Dong, H. H., FoxO1 and hepatic lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2009; 20: 217–226.
41. Mead, J. R., Irvine, S. A., Ramji, D. P. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med (Berl)*. 2002; 80: 753–769.
42. Santamarina-Fojo, S., Haudenschild, C., Amar, M. The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 1998; 9: 211–219.
43. Segrest, J. P., Jones, M. K., De Loof, H., Dashti, N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res*. 2001; 42: 1346–1367.
44. Goldstein, J. L., Kita, T., Brown, M. S. Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. Lessons from an animal counterpart of familial

- hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* 1983; 309: 288–296.
45. Eisenberg, S. High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res.* 1984; 25: 1017–1058.
  46. McLean, J., Fielding, C., Drayna, D., Dieplinger, H., Baer, B., Kohr, W., Henzel, W., Lawn, R. Cloning and expression of human lecithin-cholesterol acyltransferase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83: 2335–2339.
  47. Tall, A. R. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res.* 1993; 34: 1255–1274.
  48. Lamarche, B., Tchernof, A., Moorjani, S., Cantin, B., Dagenais, G. R., Lupien, P. J., Despre's, J. P. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. *Circulation.* 1997; 95: 69–75.
  49. Wilcox, H. G., Davis, D. C., Heimberg, M. The isolation of lipoproteins from human plasma by ultracentrifugation in zonal rotors. *J Lipid Res.* 1971; 12: 160–172.
  50. Usui, S., Hara, Y., Hosaki, S., Okazaki, M. A new on-line dual enzymatic method for simultaneous quantification of cholesterol and triglycerides in lipoproteins by HPLC. *J Lipid Res.* 2002; 43: 805–814.
  51. Okazaki, M., Usui, S., Ishigami, M., Sakai, N., Nakamura, T., Matsuzawa, Y., Yamashita, S. Identification of unique lipoprotein subclasses for visceral obesity by component analysis of cholesterol profile in high-performance liquid chromatography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 578–584.
  52. Toshima, G., Iwama, Y., Kimura, F., Matsumoto, Y., Miura, M., Takahashi, J., Yasuda, I., Arai, N., Mizutani, H., Hata, K., Usui, S., Okazaki, M. LipoSEARCH®; Analytical GP-HPLC method for lipoprotein profiling and its applications. *J.Biol.Macromol.* 2013; 13: 21–32.
  53. Okazaki, M., Yamashita, S. Recent advances in analytical methods on lipoprotein subclasses: calculation of particle numbers from lipid levels by gel permeation HPLC using "spherical particle model". *J.Oleo Sci.* 2016; 65: 265–282.
  54. Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., Knowles, B. B. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature.* 1979; 282: 615–616.
  55. Dixon, J. L., Ginsberg, H. N. Regulation of hepatic secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins: information obtained from cultured liver cells. *J Lipid Res.* 1993; 34: 167–174.
  56. Itoh, M., Abe, Y., Iwama, Y., Kimura, F., Satoh, M., Shoji, M., Takahashi, J., Toshima, G., Sasaki, H., Hiwatashi, K., Hata, K. HPLC analysis of lipoproteins in culture medium of hepatoma cells: an *in vitro* system for screening antihyperlipidemic drugs. *Biotechnol Lett.* 2009; 31: 953–957.
  57. Takahashi, J., Toshima, G., Matsumoto, Y., Kimura, F., Kiuchi, T., Hamada, K.,

- Hata, K. *In vitro* screening for antihyperlipidemic activities in foodstuffs by evaluating lipoprotein profiles secreted from human hepatoma cells. *J Nat Med.* 2011; 65: 670–674.
58. Doi, I., Namba, M., Sato, J. Establishment and some biological characteristics of human hepatoma cell lines. *Gan.* 1975; 66: 385–392.
  59. Hou, X., Xu, S., Maitland-Toolan, K. A., Sato, K., Jiang, B., Ido, Y., Lan, F., Walsh, K., Wierzbicki, M., Verbeuren, T. J., Cohen, R. A., Zang, M. SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2008; 283: 20015–20026.
  60. Fukuda, Y., Sassa, S. Suppression of cytochrome P450IA1 by interleukin-6 in human HepG2 hepatoma cells. *Biochem Pharmacol.* 1994; 47: 1187–1195.
  61. Yin, J., Hu, R., Chen, M., Tang, J., Li, F., Yang, Y., Chen, J. Effects of berberine on glucose metabolism *in vitro*. *Metabolism.* 2002; 51: 1439–1443.
  62. Lee, J. H., Jang, S. I., Yang, J. M., Markova, N. G., Steinert, P. M. The proximal promoter of the human transglutaminase 3 gene: Stratified squamous epithelial-specific expression in cultured cells is mediated by binding of Sp1 and ets transcription factors to a proximal promoter element. *J Biol Chem.* 1996; 271: 4561–4568.
  63. Benn, J., Su, F., Doria, M., Schneider, R. J. Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J Virol.* 1996; 70: 4978–4985.
  64. Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., Sato, J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* 1982; 42: 3858–3863.
  65. Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le S. J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Treppe, C. Guguen-Guillouzo, C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 15655–15660.
  66. Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le C. T., Langouët, S., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C., Guillouzo, A. Expression of cytochrome P450 enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG Cells. *Drug Metab Dispos.* 2006; 34: 75–73.
  67. Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C. The human hepatoma HepaRG cells: A highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact.* 2007; 168: 66–73.
  68. Kanebratt, K. P., Andersson, T. B. Evaluation of HepaRG cells as an *in vitro* model for human drug metabolism studies. *Drug Metab Dispos.* 2008; 36: 1444–1452.
  69. Mori, T., Kiyono, T., Imabayashi, H., Takeda, Y., Tsuchiya, K., Miyoshi, S.,

- Makino, H., Matsumoto, K., Saito, H., Ogawa, S., Sakamoto, M., Hata, J., Umezawa, A. Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential. *Mol Cell Biol*. 2005; 25: 5183–5195.
70. Caplan, A. I., Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991; 9: 641–650.
  71. Pittenger, M. F., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284: 143–147.
  72. Ohgushi, H., Caplan, A. I., Stem cell technology and bioceramics: From cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res*. 1999; 48: 913–927.
  73. Dezawa, M., Kanno, H., Hoshino, M., Cho, H., Matsumoto, N., Itokazu, Y., Tajima, N., Yamada, H., Sawada, H., Ishikawa, H., Mimura, T., Kitada, M., Suzuki, Y., Ide, C., Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest*. 2004; 113: 1701–1710.
  74. Ikeda, E., Yagi, K., Kojima, M., Yagyuu, T., Ohshima, A., Sobajima, S., Tadokoro, M., Katsube, Y., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Go, M. J., Adachi, H., Yokota, Y., Kirita, T., Ohgushi, H. Multipotent cells from the human third molar: Feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation*. 2008; 76: 495–505.
  75. Vidali, G., Boffa, L. C., Bradbury, E. M., Allfrey, V. G. Butyrate suppression of histone deacetylation leads to accumulation of multiacetylated forms of histones H3 and H4 and increased DNase I sensitivity of the associated DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978; 75: 2239–2243.
  76. Schwartz, B., Avivi-Green, C., Polak-Charcon, S. Sodium butyrate induces retinoblastoma protein dephosphorylation, p16 expression and growth arrest of colon cancer cells. *Mol Cell Biochem*. 1998; 188: 21–30.
  77. Jiang, Z., Sharfstein, S. T., Sodium butyrate stimulates monoclonal antibody over-expression in CHO cells by improving gene accessibility. *Biotechnol Bioeng*. 2008; 100: 189–194.
  78. Nakagawa, T., Nakao, Y., Matsui, T., Koizumil, T. Matsuda, S., Maeda, S., Fujita, T. Effects of sodium n-butyrate on  $\alpha$ -fetoprotein and albumin secretion in the human hepatoma cell line PLC/PRF/5. *Br J Cancer*. 1985; 51: 357–363.
  79. Takahashi, J., Kimura, F., Miura, M., Iwama, Y., Toshima, G., Hata, K. Advantages of assessing lipoprotein profiles in hepatic cell differentiation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2013; 49: 554–556.
  80. Brandon, E. F., Raap, C. D., Meijerman, I., Beijnen, J. H., Schellens, J. H. An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003; 189: 233–246.
  81. Castell, J. V., Jover, R., Martnez-Jimnez, C. P., Gmez-Lechn, M. J. Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies. *Expert*

- Opin Drug Metab Toxicol. 2006; 2: 183–212.
82. Olofsson, S. O., Stillemark-Billton, P., Asp, L. Intracellular assembly of VLDL: two major steps in separate cell compartments. *Trends Cardiovasc Med.* 2000. 10: 338–345.
  83. Lee, C. S., Friedman, J. R., Fulmer, J. T., Kaestner, K. H. The initiation of liver development is dependent on Foxa transcription factors. *Nature.* 2004; 435: 944–947.
  84. Parviz, F., Matullo, C., Garrison, W. D., Savatski, L., Adamson, J. W., Ning, G., Kaestner, K. H., Rossi, J. M., Zaret, K. S., Duncan, S. A. Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat Genet.* 2003; 34: 292–296.
  85. Hayhurst, G.P., Lee, Y.H., Lambert, G., Ward, J.M., Gonzalez, F.J. Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol.* 2001; 21: 1393–1403.
  86. Crabtree, G. R., Schibler, U., Scott, M. P. Transcriptional regulatory mechanisms in liver and midgut morphogenesis of vertebrates and invertebrates. *Transcriptional Regulation.* 1992; 1063–1102.
  87. Becker, A. J., McCulloch, E. A., Till, J. E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature.* 1963; 197: 452–454.
  88. Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., Petrakova, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966; 16: 381–390.
  89. Ishii, K., Yoshida, Y., Akechi, Y., Sakabe, T., Nishio, R., Ikeda, R., Terabayashi, K., Matsumi, Y., Gonda, K., Okamoto, H., Takubo, K., Tajima, F., Tsuchiya, H., Hoshikawa, Y., Kurimasa, A., Umezawa, A., Shiota, G. Hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by tetracycline-regulated hepatocyte nuclear factor 3 $\beta$ . *Hepatology.* 2008; 48: 597–606.
  90. Hu, X., Xie, P., Li, W., Li, Z., Shan, H. Direct induction of hepatocyte-like cells from immortalized human bone marrow mesenchymal stem cells by overexpression of HNF4 $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun.* 2016; 478: 791–797.
  91. Ladas, J.A., Hadzopoulou-Cladaras, M., Kardassis, D., Cardot, P., Cheng, J., Zannis, V., Cladaras, C. Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes ApoB, ApoCIII, and ApoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF- 4, ARP-1, EAR-2, and EAR-3. *J Biol Chem.* 1992; 267: 15849–15860.
  92. Sheena, V., Hertz, R., Nussbeck, J., Berman, I., Magenheimer, J., Bar-Tana, J. Transcriptional regulation of human microsomal triglyceride transfer protein by hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$ . *J Lipid Res.* 2005; 46: 328–341.
  93. Kozak, M. Compilation and analysis of sequences upstream from the

- translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 1984; 12: 857–872.
94. Saito, K., Abe, H., Nakazawa, M., Irokawa, E., Watanabe, M., Hosoi, Y., Soma, M., Kasuga, K., Kojima, I., Kobayashi, M. Cloning of complementary DNAs encoding structurally related homeoproteins from preimplantation mouse embryos: their involvement in the differentiation of embryonic stem cells. *Biol Reprod.* 2010; 82: 687–697.
  95. Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene.* 1991; 108: 193–199.
  96. Ibeanu, G. C., Goldstein, J. A., Transcriptional regulation of human CYP2C genes: functional comparison of CYP2C9 and CYP2C18 promoter regions. *Biochemistry.* 1995; 34: 8028–8036.
  97. Gibson, G. G., El-Sankary, W., Plant, N. J. Receptor-dependent regulation of the CYP3A4 gene. *Toxicology.* 2002; 181–182: 199–202.
  98. Wang, D., Jiang, Z., Shen, Z., Wang, H., Wang, B., Shou, W., Zheng, H., Chu, X., Shi, J., Huang, W. Functional evaluation of genetic and environmental regulators of P450 mRNA levels. *PLoS One.* 2011; 6: e24900.
  99. Lamba, V., Panetta, J. C., Strom, S., Schuetz, E. G. Genetic predictors of interindividual variability in hepatic CYP3A4 expression. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010; 332: 1088–1099.
  100. Lee, KD., Kuo, TK., Whang-Peng, J., Chung, YF., Lin, CT., Chou, SH., Chen, JR., Chen, YP., Lee, OK. *In vitro* hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology.* 2004; 40: 1275–1284.
  101. Lee, O. K., Kuo, T. K., Chen, W. M., Lee, K. D., Hsieh, S. L., Chen, T. H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood.* 2004; 103: 1669–1675.
  102. Shimomura, T., Yoshida, Y., Sakabe, T., Ishii, K., Gonda, K., Murai, R., Takubo, K., Tsuchiya, H., Hoshikawa, Y., Kurimasa, A., Hisatome, I., Uyama, T., Umezawa, A., Shiota, G. Hepatic differentiation of human bone marrow-derived UE7T-13 cells: Effects of cytokines and CCN family gene expression. *Hepatol Res.* 2007; 37: 1068–1079.
  103. 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.* 2004; 56: 291–330.
  104. Dixon, J. L., Furukawa, S., Ginsberg, H. N. Oleate stimulates secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from HepG2 cells by inhibiting early intracellular degradation of apolipoprotein B. *J Biol Chem.* 1991; 266: 5080–5086.



105. Gómez-Lechón, M. J., Donato, M. T., Martínez-Romero, A., Jiménez, N., Castell, J. V., O'Connor, J. E. A human hepatocellular *in vitro* model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact.* 2007; 165: 106–116.
106. Au, W. S., Lu, L., Yeung, C. M., Liu, C. C., Wong, O. G., Lai, L., Kung, H. F., Lin, M. C., Hepatocyte nuclear factor 1 binding element within the promoter of microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) gene is crucial for MTTP basal expression and insulin responsiveness. *J Mol Endocrinol.* 2008; 41: 229–238.
107. Hussain, M M., Nijstad, N., Franceschini, L. Regulation of microsomal triglyceride transfer protein. *Clin Lipidol.* 2011; 6: 293–303.
108. Fisher, E. A., Ginsberg, H. N. Complexity in the secretory pathway: the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *J Biol Chem.* 2002; 277: 17377–17380.
109. Leiper, J. M., Bayliss, J. D., Pease, R. J., Brett, D. J., Scott, J., Shoulders, C. C. Microsomal triglyceride transfer protein, the abetalipoproteinemia gene product, mediates the secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from heterologous cells. *J Biol Chem.* 1994; 269: 21951–21954.
110. Kim, J. H., Lee, S. R., Li, L. H., Park, H. J., Park, J. H., Lee, K. Y., Kim, M. K., Shin, B. A., Choi, S. Y. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS One.* 2011; 6: e18556.
111. Liao, W., Hui, T. Y., Young, S. G., Davis, R. A. Blocking microsomal triglyceride transfer protein interferes with apoB secretion without causing retention or stress in the ER. *J Lipid Res.* 2003; 44: 978–985.
112. Gordon, D. A., Jamil, H., Sharp, D., Mullaney, D., Yao, Z., Gregg, R. E., Wetterau, J. Secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from HeLa cells is dependent on expression of the microsomal triglyceride transfer protein and is regulated by lipid availability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91: 7628–7632.
113. Zaret, K. S. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat Rev Genet.* 2002; 3: 499–512.
114. Pani, L., Quian, X. B., Clevidence, D., Costa, R. H. The restricted promoter activity of the liver transcription factor hepatocyte nuclear factor 3 $\beta$  involves a cell-specific factor and positive autoactivation. *Mol Cell Biol.* 1992; 12: 552–562.
115. Samadani, U., Costa, R. H. The transcriptional activator hepatocyte nuclear factor 6 regulates liver gene expression. *Mol Cell Biol.* 1996; 16: 6273–6284.
116. Tian, J. M., Schibler, U. Tissue-specific expression of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 may involve hepatocyte nuclear factor 4. *Genes Dev.* 1991; 5: 2225–2234.
117. Zhong, W., Mirkovitch, J., Darnell, J. E. Tissue-specific regulation of mouse

- hepatocyte nuclear factor 4 expression. *Mol Cell Biol.* 1994; 14: 7276–7284.
118. Cases, S., Smith, S. J., Zheng, Y. W., Myers, H. M., Lear, S. R., Sande, E. Novak, S., Collins, C., Welch, C. B., Lusis, A. J., Erickson, S. K., Farese, R. V. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 13018–13023.
  119. Cases, S., Stone, S. J., Zhou, P., Yen, E., Tow, B., Lardizabal, K. D., Voelker, T., Farese, R. V. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J Biol Chem.* 2001; 276: 38870–38876.
  120. Yamazaki, T., Sasaki, E., Kakinuma, C., Yano, T., Miura, S., Ezaki, O. Increased very low density lipoprotein secretion and gonadal fat mass in mice overexpressing liver DGAT1. *J Biol Chem.* 2005; 280: 21506–21514.
  121. Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., Melton, D. A. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to  $\beta$ -cells. *Nature.* 2008; 455: 627–632.
  122. Ahfeldt, T., Schinzel, R. T., Lee, Y. K., Hendrickson, D., Kaplan, A., Lum, D. H., Camahort, R., Xia, F., Shay, J., Rhee, E. P., Clish, C. B., Deo, R. C., Shen, T. Lau, F. H., Cowley, A., Mowrer, G., Al-Siddiqi, H., Nahrendorf, M., Musunuru, K., Gerszten, R. E., Rinn, J. L., Cowan, C. A. Programming human pluripotent stem cells into white and brown adipocytes. *Nat Cell Biol.* 2012; 14: 209–219.
  123. Bai, F., Ho Lim, C., Jia, J., Santostefano, K., Simmons, C., Kasahara, H., Wu, W., Terada, N., Jin, S. Directed differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes by bacterial injection of defined transcription factors. *Sci Rep.* 2015; DOI: 10.1038/srep15014.
  124. Nakamori, D., Takayama, K., Nagamoto, Y., Mitani, S., Sakurai, F., Tachibana, M., Mizuguchi, H. Hepatic maturation of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells by ATF5, c/EBP $\alpha$ , and PROX1 transduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016; 469: 424–429.
  125. Ding, Y., Chang, C., Niu, Z., Dai, K., Geng, X., Li, D., Guo, J., Xu, C. Overexpression of transcription factor Foxa2 and Hnf1 $\alpha$  induced rat bone mesenchymal stem cells into hepatocytes. *Cytotechnology.* 2016; 68: 2037–2047.
  126. Metzger, S., Halaas, J. L., Breslow, J. L., Sladek, F. M. Orphan receptor HNF-4 and bZip protein C/EBP $\alpha$  bind to overlapping regions of the apolipoprotein B gene promoter and synergistically activate transcription. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 16831–16838.
  127. Rhee, J., Inoue, Y., Yoon, J. C., Puigserver, P., Fan, M., Gonzalez, F., J. Spiegelman, B. M. Regulation of hepatic fasting response by PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1): Requirement for hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  in

- gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003; 100: 4012–4017.
128. Wang, J. C., Stafford, J. M., Granner, D. K. SRC-1 and GRIP1 coactivate transcription with hepatocyte nuclear factor 4. *J Biol Chem.* 1998; 273: 30847–30850.
  129. Miao, J., Fang, S., Bae, Y., Kemper, J. K. Functional inhibitory cross-talk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1 $\alpha$ . *J Biol Chem.* 2006; 281: 17–14546.
  130. Sparks, J. D., Sparks, Ch. E. Insulin regulation of triacylglycerol-rich lipoprotein synthesis and secretion. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1215: 9–32.
  131. Kosone, T., Takagi, H., Horiguchi, N., Ariyama, Y., Otsuka, T., Sohara, N., Kakizaki, S., Sato, K., Mori, M. HGF ameliorates a high-fat diet-induced fatty liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 293: G204–G210.
  132. Sparks, J. D., Cianci, J., Jokinen, J., Chen, L. S., Sparks, C. E. Interleukin-6 mediates hepatic hypersecretion of apolipoprotein B. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010; 299: G980–G989.

## 謝辞

本研究の遂行と論文の作成にあたり、終始変わらぬ親切なご指導とご高配を賜りました秋田県立大学大学院 生物資源科学研究科 生物資源科学専攻 分子細胞機能研究グループ 動物分子工学研究室 教授 小林正之 博士に深い感謝の意を表します。

本論文を査読して頂くとともに、日頃より多大なるご指導、ご助言を賜りました秋田県立大学大学院 生物資源科学研究科 生物資源科学専攻 分子細胞機能研究グループ 分子生物学研究室 教授 村田純 博士に深く感謝いたします。また、本論文を査読して頂き、貴重なご意見を頂いた秋田県立大学大学院 生物資源科学研究科 生物資源科学専攻 微生物機能研究グループ 生物化学研究室 准教授 春日和 博士、および秋田県立大学 理事 (研究・地域貢献本部長)・教授 小嶋郁夫 博士に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、日頃よりご助言を賜りました、秋田県立大学大学院 生物資源科学研究科 生物資源科学専攻 分子細胞機能研究グループ 分子生命科学研究室 教授 穂坂正博 博士、秋田県立大学大学院 生物資源科学研究科 生物資源科学専攻 分子細胞機能研究グループ 分子生物学研究室 助教 岩下淳 博士に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導を賜りました秋田県総合食品研究センター 食品加工研究所 食品機能グループ 上席研究員 畠恵司 博士に深く感謝いたします。また日頃より多くのご助言を頂いた、秋田県総合食品研究センター 食品加工研究所 食品機能グループ 上席研究員 熊谷昌則 博士、秋田県総合食品研究センター 企画管理室 主任研究員 樋渡一之 博士に感謝申し上げます。

本研究の遂行に格別のご理解とご高配を頂きました秋田総合食品研究センター 所長 熊谷譲 様、食品加工研究所 所長 高橋砂織 博士、ならびに多くのご支援を頂きました研究センターの皆様には厚くお礼申し上げます。

最後に、勉学、研究の機会を与えると共に、常に私を支えてくれた妻の千瑞、長男の奏祐に心から感謝いたします。