

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	ヒト肝細胞を代替するシトクロムP450高発現肝細胞モデル細胞の作製： 胎児型CYP3A7と成人型CYP3A4の2色蛍光発現レポーターの開発
作成者（著者）	川村, 文彦
公開者	東邦大学
発行日	2021.01.20
掲載情報	東邦大学大学院理学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 多田 政子 /
著者版フラグ	none
報告番号	32661乙第2940号
学位記番号	甲第44号
学位授与年月日	2021.01.20
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD28179921

東邦大学審査学位論文（博士）の要旨

令和2年度 博士学位論文

ヒト肝細胞を代替するシトクロム P450 高発現

肝細胞モデル細胞の作製：

胎児型 *CYP3A7* と成人型 *CYP3A4* の

2色蛍光発現レポーターの開発

川村 文彦

東邦大学大学院理学研究科

生物学専攻

Production of hepatocyte-like cells that highly express the major cytochrome P450 CYP3A4 to replace human hepatocytes: Development of dual fluorescence expression reporter for fetal *CYP3A7* and adult *CYP3A4*

Fumihiko Kawamura

ABSTRACT

Drug discovery and development requires easy, quick, and accurate evaluation systems enabling us to assess the efficacy, toxicity, and drug-drug interactions of numerous candidate compounds. Preclinical studies aim to predict the average response of adult humans to each compound to avoid inaccuracy due to interspecies and individual differences in drug metabolism. In the liver, the adult hepatocyte-specific metabolic enzyme CYP3A4 carries out about 50% of drug metabolism, though CYP3A7 replaces CYP3A4 in this role in the fetal liver. To determine how the average adult liver will respond to a given compound, drugs should be tested not on adult primary hepatocytes but rather on hepatocyte-like cells that can represent the genetic components of multiple individuals and are suitable for high-content screening (HCS). HCS is a very efficient means of rapidly evaluating hepatocyte responses to numerous compounds at once. In this study, we constructed a bacterial artificial chromosome (BAC) reporter gene that can numerically evaluate *CYP3A7* expression, visualized with red fluorescence, and *CYP3A4* expression, visualized with green fluorescence, to determine whether a given cell line can produce hepatocyte-like cells suitable for HCS. When this CYP3A4G / 7R reporter was introduced into the human hepatocellular cancer cell line HepaRG, the cells exhibited red fluorescence during the proliferative phase and green fluorescence after their differentiation into mature hepatocyte-like cells. When these cells were exposed to a compound that causes a drug-drug interaction, the amount of green fluorescence increased as *CYP3A4* transcription was induced. If this CYP3A4G / 7R BAC reporter can be introduced into various human induced pluripotent stem (iPS) cell lines, hepatocyte-like cells that reflect individual differences can be obtained. For this purpose, we improved the method of generating iPS cells from readily available human peripheral blood B cells (BiPSCs). By pre-activating the B cells, we were able to eliminate the previously required B cell-specific gene repression step. Because BiPSCs have a VDJ recombination in the immunoglobulin heavy chain (*IgH*) region stemming from the cell of origin, we also constructed a system that differentiates BiPSCs into hematopoietic progenitor cells and reproduces the upregulation of activation-induced cytidine deaminase (AID) *in vitro*, which is often seen in B cell tumors. The results of this study will help to accelerate drug discovery and development and elucidate the origin and pathogenic mechanisms of B cell tumors by providing alternative model cells for human hepatocytes and tumorigenic B cells that can be subjected to HCS in the future.

要旨

創薬開発では、無数にある候補化合物の薬効・毒性・薬物間相互作用などを簡便・迅速かつ正確に評価する必要がある。化合物の主な代謝の場は肝臓であり、市販薬の 50% の代謝は成人肝細胞特異的な代謝酵素 CYP3A4 が担っている。一方、胎児肝臓では CYP3A7 がその機能の一部を代替している。薬の代謝には種差や個人差があることから、前臨床試験では、平均的な成人における化合物への反応予測が求められている。このニーズに対応するためには、複数人の遺伝的要素を盛り込んだ成人初代肝細胞を代替する細胞を開発し、無数の化合物に対する反応を迅速に評価できるハイコンテンツスクリーニング (HCS) に適用することが求められる。

本研究では、CYP3A7 発現を赤色蛍光で、CYP3A4 発現を緑色蛍光で数的評価可能な一体型細菌人工染色体(BAC)レポーター遺伝子を構築した。この CYP3A4G / 7R レポーターを導入したヒト肝癌細胞株 HepaRG 細胞は、増殖期に赤色、成熟肝細胞様細胞に分化すると緑色蛍光を示す。また、薬物間相互作用を引き起こす化合物に曝されると CYP3A4 の転写誘導に伴って緑色蛍光量が増加する。

この CYP3A4G / 7R BAC レポーターをヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) に導入できれば、個人差を反映した肝細胞様細胞の作製を実現できる。この目的で、入手が容易なヒト末梢血 B 細胞から iPS 細胞(BiPSCs)の樹立法の改良に取り組んだ。事前に B 細胞を活性化することで、これまで必要だった B 細胞特異的遺伝子の抑制ステップを削除することができた。さらに、BiPSCs は、起源細胞で生じた VDJ 組み換えを免疫グロブリン重鎖 (IgH) 領域に持つ。本研究では、BiPSCs を造血前駆細胞に分化誘導し、B 細胞腫瘍でしばしば見られる活性化誘発シチジンデアミナーゼ (AID, activation-induced cytidine deaminase) の発現亢進を *in vitro* で再現するシステムを構築した。

本研究の成果は、今後、HCS に適用可能なヒト肝細胞や腫瘍化 B 細胞の代替細胞を提供することで、創薬開発の加速化や B 細胞腫瘍の起源や発生機序解明に貢献できると期待される。