

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	乙第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

論文審査の要旨及び審査結果の要旨

平成 年入学	研究分野 生物学	氏名 川村 文彦
審査委員	主査 東邦大学理学部 教授 多田 政子 副査 東邦大学理学部 教授 久保田 宗一郎 教授 川田 健文	
<p>論文題目： 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 <i>CYP3A7</i> と成人型 <i>CYP3A4</i> の 2 色蛍光発現レポーターの開発</p>		
<p>論文審査の要旨及び審査結果の要旨</p> <p>本学位論文第 1 章では、本研究の必要性・重要性が下記のごとく背景として記載されている：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 <i>CYP3A4</i> が担っている。一方、胎児肝臓では <i>CYP3A7</i> 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ックスクリーニング (HCS) に適用することが求められている。</p> <p>本学位論文第 2 章では、<i>CYP3A7</i> 発現を赤色蛍光で、<i>CYP3A4</i> 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、この <i>CYP3A4G/7R</i> レポーターを導入したヒト肝癌細胞株 HepaRG 細胞と HepG2 細胞株を樹立し、その細胞特性について記載されている。作製したトランスジェニック細胞は、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し、薬物間相互作用を引き起こす化合物に曝されると <i>CYP3A4</i> の転写誘導に伴って緑色蛍光量が増加することを示した。このことから、本研究の成果物である <i>CYP3A4G/7R</i> レポーター導入ヒト肝癌細胞株は、ヒト肝細胞を代替するモデル細胞として活用されることが期待される。また、この <i>CYP3A4G/7R</i> BAC レポーターをヒト人工多能性幹細胞 (iPSCs) 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可能性が高い。</p> <p>本学位論文第 3 章では、この目的で入手が容易なヒト末梢血 B 細胞から iPSCs(BiPSCs)を樹立する方法を改良し、その成果について記載されている。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 細胞特異的遺伝子を抑制するステップの削除に成功した。さらに、BiPSCs は起源細胞で生じた VDJ</p>		

組み換えを *IgH* 領域に持つことから、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 の発現亢進を *in vitro* で再現するシステムを構築し、その解析結果について記載されている。本研究成果は、今後、HCS に適用可能なヒト肝細胞や B 細胞腫瘍化のモデル系を提供することで、創薬開発の加速化や B 細胞腫瘍発生機序解明への貢献が期待される。

第 2 章において提示された解析結果や成果物は、今後の創薬開発における細胞毒性試験、肝細胞分化や機能的成熟化の機構解析に資するプラットフォームを提供できると考えられる。また、第 3 章において提示された解析結果・ならびに開発成果物は、B 細胞からヒト iPS 細胞株を樹立する実用的な方法の提供や B 細胞腫瘍発生機序の解明を通じて、本疾患の治療法や創薬開発に資するプラットフォームを提供できると考えられる。このように、学位申請者の実施した研究は、国民の健康的な生活の実現を目的としたトランスレーショナルリサーチであり、今後、研究成果が広く活用されることが期待される。また、これらの成果は、筆頭著者として 2 報の英文の査読付き論文として公表され、副論文 5 報と国際特許 1 件の成立につながっている。

以上より、学位申請者は関連分野についての知識ならびに語学においても十分な能力を有すると判断される。よって審査委員一同は、学位申請者 川村文彦が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格があるものと認めた。

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。