

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	初代ヒト肝細胞を代替するモデル細胞の作製:CYP2D6 の多型性を反映したヒト肝癌細胞株HepaRG の構築とヒトP450 発現量のリアルタイム評価システムの構築
別タイトル	Generation of model cells to replace primary human hepatocytes: Construction of a human hepatocarcinoma cell line HepaRG reflecting CYP2D6 polymorphism and real time evaluation system of human P450 expression levels
作成者(著者)	奥山, 翔太
公開者	東邦大学
発行日	2022.03.16
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: 久保田宗一郎
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第1044号
学位記番号	甲第166号
学位授与年月日	2022.03.16
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho.u.ac.jp/webopac/TD28197594

論文審査の要旨及び審査結果の要旨

2019 年入学	研究分野 生物学	氏名 奥山 翔太
審査委員	(主査) 東邦大学大学院理学研究科 教授 久保田 宗一郎 (副査) 東邦大学大学院理学研究科 教授 川田 健文 (副査) 東邦大学大学院理学研究科 教授 多田 政子 (副査)	
(論文題目) 初代ヒト肝細胞を代替するモデル細胞の作製：CYP2D6 の多型性を反映したヒト肝癌細胞株 HepaRG の構築とヒト P450 発現量のリアルタイム評価システムの構築		
(論文審査の要旨及び審査結果の要旨) 【概要】 本学位論文では、創薬開発や再生医療において必要とされているヒト初代肝細胞の代替細胞を以下 2 つのアプローチで作製することを試みている。1 つ目は、胚性多能性幹細胞である ES 細胞を肝細胞へと分化誘導し、これを肝細胞の代替細胞として利用するアプローチ、2 つ目はヒト肝癌細胞株 HepaRG 細胞を遺伝子改変して機能的にヒト肝細胞に近い細胞を作製するアプローチである。これらの研究では、光る分化レポーター遺伝子を導入してトランスジェニック細胞を樹立することからスタートし、薬の候補化合物に対するヒト集団の平均的反応の予測に用いる方法が提案されている。 【細目】 シトクロム P450 スーパーファミリーに属する CYP3A4 および CYP2D6 はヒト成人肝臓で主に発現し、市販薬の 50% と 25% の代謝に関与している。そのため、ヒト初代肝細胞が創薬開発の前臨床試験に用いられているが、その質的不均一性や材料の希少性などの理由により、得られる結果の再現性や信頼性がしばしば課題となってきた。この課題解決のため、創薬開発過程では、平均的なヒト CYP3A4 と CYP2D6 の発現量を示す均質なヒト成人肝細胞の代替細胞が必要とされてきた。 本学位論文の第 1 章では、この目的を達成する 1 つ目の方法として、多能性幹細胞から肝細胞様細胞を作製し、これを代替細胞として利用することを試みている。これらを安定供給するため、増殖能を持つ中間的細胞源として胎児の肝実質細胞である肝芽細胞の大量調整の開発を実施した。この開発の効率化のため、肝芽細胞特異的に発現する P450 酵素 CYP3A7 の遺伝子発現制御領域下に赤色蛍光タンパク質をコードする遺伝子を挿入した CYP3A7R レポーターを構築し、マウス ES 細胞に導入してトランスジェニック細胞およびマウスを作製した。このマウスでは、CYP3A7R レポーターが、胎児肝臓特異的に赤色蛍光を示すことを確認した。この CYP3A7R 導入 ES 細胞から高効率で肝芽細胞を分化誘導する条件を赤色蛍光量に基づいて開発することに成功した。また、成熟化した肝細胞に肝障害を与えると、再び赤色蛍光を示す肝芽細胞へと脱分化することを見出した。したがって、		

開発した CYP3A7R レポーターは、分化モニターとしての用途のみならず、肝再生や肝毒性評価系にも利用できることが示された。

本学位論文の第 2 章では、CYP3A4 を高発現しているが CYP2D6 をほとんど発現していないヒト肝癌細胞株 HepaRG 細胞を遺伝子改変し、機能的に初代ヒト肝細胞集団に近い細胞を作製することを試みている。CYP2D6 遺伝子は多型性に富み、薬物反応に個人差をもたらすことが指摘されている。この 2 つの問題を同時に解決するため、野生型およびスプライシング多型の 2 種類の CYP2D6 をさまざまなレベルで発現するトランスジェニック HepaRG 細胞クローンを複数作製した。これらのクローンには、生きたまま CYP2D6 RNA および CYP2D6 タンパク質発現量を容易に予測できる蛍光評価システムが導入されている。これらのクローンは、CYP3A4 を高発現し CYP2D6 の多型性を反映する改良型肝細胞モデル細胞として活用されることが期待される。

第 1 章で開発した肝細胞分化レポーター遺伝子を導入した多能性幹細胞は肝細胞分化誘導効率の改善に役立つことが期待され、第 2 章で開発した CYP2D6 発現を補強した HepaRG 細胞は、創薬や開発における薬物代謝、薬物-薬物相互作用、肝毒性などの *in vitro* 研究において、ヒト集団の平均的反応や個々の反応の予測に利用できると期待される。

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英語発表論文執筆に十分な語学力を有すると判断される。よって、審査員一同は、学位申請者である奥山翔太が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格があるものと認めた。

論文要旨

氏名 奥山 翔太 ㊞

論文題目

初代ヒト肝細胞を代替するモデル細胞の作製：CYP2D6 の多型性を反映したヒト肝癌細胞株 HepaRG の構築とヒト P450 発現量のリアルタイム評価システムの構築

論文要旨

シトクロム P450 スーパーファミリーに属する CYP3A4 および CYP2D6 は、ヒト成人肝臓に主に発現し、代謝に重要な役割を果たしている。CYP3A4 と CYP2D6 はそれぞれ、市販薬の 50% と 25% の代謝に関与している。そのため、創薬開発や再生医療において、多くの成人肝臓由来ヒト初代肝細胞が必要とされている。しかし、ヒト初代肝細胞は、その質的な不安訂正性や均一性、材料の希少性などの理由により、得られる結果の再現性や信頼性がしばしば課題となっていた。本研究では、この課題を解決するため、成人ヒト初代肝細胞に代わるモデル細胞を 2 つの方法で作製した。1 つ目の方法は、多能性幹細胞 (PSCs) から肝細胞様細胞 (HLCs) を作製し、これを代替細胞として利用するものである。PSCs から分化した未熟な肝芽細胞様細胞 (HB-LCs) は、成熟した HLCs を安定的に供給するための中間的細胞源となることが期待される。PSCs から HB-LCs を効率的に誘導する方法を開発するため、赤色蛍光タンパク質をコードする遺伝子をヒト胎児特異的 P450 酵素である CYP3A7 の遺伝子発現制御領域下に挿入した CYP3A7R レポーターを構築し、マウス胚性幹細胞 (ESCs) に導入してトランスジェニック細胞およびマウスを作製した。CYP3A7R レポーターはトランスジェニックマウス胎児肝臓と小腸に特異的に発現していたことから、CYP3A7R ESCs から高効率で HB-LCs へと誘導する条件を赤色蛍光量に基づいて検討した。CYP3A7R HB-LCs は、さらに無蛍光の HLCs へと分化し、肝細胞障害や肝再生条件下では、再び赤色蛍光を発現する HB-LCs へと脱分化した。したがって、CYP3A7R は、肝毒性を誘発する物質の蛍光評価システムを提供できるといえる。次に、CYP2D6 をほとんど発現していないヒト肝癌細胞株 HepaRG 細胞を遺伝子改変し、機能的に初代ヒト肝細胞集団に近い HLCs を作製することを試みた。CYP2D6 遺伝子は多型性に富み、薬物反応に個人差をもたらすことが指摘されている。この 2 つの問題を同時に解決するため、2 種類の CYP2D6 (野生型およびスプライシングバリエーション型) をさまざまなレベルで発現するトランスジェニック HepaRG 細胞クローンを多数作製した。さらに、生細胞中の CYP2D6 RNA および CYP2D6 タンパク質の発現レベルを容易にイメージングできる蛍光評価システムを開発した。今後、CYP3A4 を高発現し CYP2D6 の多型性を反映した一連の HepaRG 細胞クローンは、改良型肝細胞モデル細胞集団を提供できる。この HepaRG から分化させた HLCs 集団は、創薬や開発における薬物代謝、薬物-薬物相互作用、肝毒性などの *in vitro* 研究において、ヒト集団の平均的反応や個々の反応の予測において貢献できると期待される。