

論文内容要旨

ヒト肝キメラマウス由来肝細胞に蓄積された脂質の
減少を目的とした高酸素培養系の構築

主指導教員：古武 弥一郎 教授

(医系科学研究科 生体機能分子動態学)

副指導教員：山崎 岳 教授

(統合生命科学研究科 統合生命自然探求領域)

副指導教員：小澤 孝一郎 教授

(医系科学研究科 治療薬効学)

大月 佑也

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

薬剤誘発性肝障害 (drug-induced liver injury; DILI) は医薬品の開発中止や市場撤退の要因となる主要な副作用である。薬剤誘発性脂肪肝は DILI の 1 種であり、DILI 症例の約 30%において脂肪肝が認められる。このような背景から、DILI や薬剤誘発性脂肪肝を事前に予測することは重要である。しかしながら、実験動物とヒトにおける種差が原因となり、DILI を精度良く予測することは困難である。

本研究では、株式会社フェニックスバイオにより生産されているヒト肝キメラマウス (PXB-mice[®]) に着目した。ヒト肝キメラマウスは、マウス肝臓の約 80%がヒト化されており、DILI の予測評価モデルとして期待されている。しかしながら、PXB-mice[®]および PXB-cells[®]には脂質の蓄積が認められ、この脂質の蓄積は、DILI、特に薬剤誘発性脂肪肝の定性的・定量的な予測性を低下させることが懸念される。

近年、一般的な培養条件である 20%酸素条件下での培養では酸素消費速度が速いラット肝細胞の酸素要求性を満たせていないこと、さらには通常よりも低酸素である 1%酸素条件下で培養された HepG2 において、脂肪酸 β 酸化 (fatty acid β-oxidation; FAO) 活性が低下し、トリグリセリド量が増加していることが報告された。これらの知見を鑑みると、酸素要求性の高い肝細胞にとって一般的な培養酸素条件は嫌気的環境であり、この嫌気的環境下での培養により肝細胞における脂質代謝能が低下していることが推察された。このような背景から、通常培養条件よりも高酸素条件下でキメラマウス肝細胞を培養することにより、肝細胞に蓄積した *in vivo* 由来の脂質が減少する可能性を考えた。

本研究では、脂質代謝機構、特に FAO に着目し、高酸素培養が肝細胞に蓄積した脂質におよぼす影響とその調節機構、薬剤誘発性脂肪肝評価系としての高酸素培養系の有用性を検討した。

キメラマウス肝細胞を 40%酸素条件下で培養したところ、培養 7 日目より脂質量が有意に減少していた。また、培養 7 日目より FAO 活性が有意に増加していたことから、FAO 活性の亢進を介して *in vivo* 由来の脂質が減少することが示唆された。FAO 活性以外のメカニズムも考慮して、microarray および Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を行ったところ、20%酸素条件と比較して、40%酸素条件では脂肪酸の取り込みなどを含めた全体的な脂質代謝がより抑制されており、複数のメカニズムが脂質の減少に関与していることも明らかとなった。脂肪酸取り込み活性を評価したところ、予想に反して、高酸素培養により脂肪酸取り込み活性は増大していた。また、高酸素培養により FAO 活性の亢進が認められたが、IPA の結果においては、脂質の酸化は抑制されていた。これらの結果を踏まえると、フィードバック制御を考慮したより早期の mRNA、タンパク質、活性レベルの評価を行い、脂質減少メカニズムを精査していく必要がある。

また、IPA の結果において、細胞ストレスや障害に関連した経路がより活性化していた。高酸素培養が肝細胞にダメージを与えている可能性が考えられたことから、細胞生存率の指標として細胞内 ATP 量を評価したところ、通常培養条件と同程度の ATP 量を維持しており、40%酸素条件は細胞に大きなダメージを与える条件ではないことが明らかとなった。また、高酸素培養

によりグルコース消費量と乳酸分泌量の低下、アルブミン分泌量の増加も認められたことから、高酸素培養系は肝細胞にとって好气的環境であり、生体肝臓環境を反映した培養系である可能性が考えられた。肝細胞近傍の酸素濃度を評価したところ、20%酸素条件では検出限界以下であるのに対して、40%酸素条件では約13%であった。肝臓において、中心静脈周辺の酸素濃度は3-5%、門脈周辺では10-12%であることが報告されており、高酸素培養系は生体肝臓、特に門脈周辺の環境を模倣できる系であることが示唆された。肝機能にはゾネーションが存在し、アルブミン分泌やFAO活性は門脈周辺で高いことが報告されていることやIPAにおいて細胞成長及び増殖細胞機能・維持に関連する経路が40%酸素条件でより活性化されていたことも、この結果を支持しているといえる。

高酸素培養系は生体における肝臓、特に門脈周辺の酸素濃度を反映した培養系であり、キメラマウス肝細胞を高酸素培養することにより、FAO活性の亢進を介して肝細胞に蓄積した脂質が減少することが明らかとなった。このキメラマウス肝細胞を用いて、薬剤誘発性脂肪肝を評価できるかを、脂質生成を活性化することが報告されているLXRアゴニストT0901317を用いて検討した。その結果、濃度依存的な脂肪滴、トリグリセリドの蓄積が認められ、高酸素培養により脂質を減少させたキメラマウス肝細胞は薬剤誘発性脂肪肝を定性的・定量的に評価できる系であることが示唆された。

今後、検証化合物を増やすなどのさらなる検証は必要であるが、高酸素培養により脂質が減少したキメラマウス肝細胞はDILIや薬剤誘発性脂肪肝の評価に使用できる可能性があり、安全性の高い医薬品の創出に貢献できることが期待される。