

合成生物学的手法による肝機能誘導型ヘパトーマ細胞株の開発

北野, 裕之

<https://hdl.handle.net/2324/4784584>

出版情報 : Kyushu University, 2021, 博士 (工学) , 課程博士
バージョン :
権利関係 :



合成生物学的手法による肝機能誘導型
ヘパトーマ細胞株の開発

北野 裕之

目次

第一章	序論.....	1
1.1	肝臓.....	1
1.1.1	肝臓の構造.....	1
1.1.2	肝臓の機能.....	3
1.1.3	肝疾患.....	5
1.2	肝細胞の利用.....	9
1.2.1	肝細胞移植.....	9
1.2.2	バイオ人工肝臓.....	9
1.2.3	肝毒性・薬物動態評価系.....	10
1.2.4	肝炎ウイルスモデル.....	10
1.3	機能的肝細胞源の研究.....	11
1.3.1	初代肝細胞利用.....	11
1.3.2	ヘパトーマ細胞.....	12
1.3.3	iPS 細胞由来肝細胞様細胞.....	14
1.3.4	繊維芽細胞からのダイレクトリプログラミング.....	15
1.4	合成生物学.....	15
1.4.1	Tet 転写活性化システム.....	16
1.4.2	熱応答遺伝子発現システム.....	18
1.4.3	光応答遺伝子発現システム.....	19
1.4.4	細胞間コミュニケーションシステム.....	20
1.4.5	細胞種特異的遺伝子発現システム.....	21
1.5	本研究の背景と目的.....	22
1.6	本研究の方針.....	24
1.7	本論文の構成.....	25

第二章	加温によって高肝機能を誘導可能なマウスヘパトーマ細胞の開発	26
	26
2.1	緒言.....	26
2.2	本章の目的.....	27
2.3	実験方法.....	28
2.4	結果と考察.....	33
2.5	本章のまとめ.....	40
第三章	加温によって高肝機能を誘導可能なヒトヘパトーマ細胞の開発	42
3.1	緒言.....	42
3.2	肝特異的転写因子遺伝子導入細胞株の構築と肝機能評価.....	43
3.2.1	本節の目的.....	43
3.2.2	実験方法.....	44
3.2.3	結果と考察.....	52
3.2.4	本節のまとめ.....	65
3.3	スフェロイド培養による高肝機能化.....	66
3.3.1	本節の目的.....	66
3.3.2	実験方法.....	67
3.3.3	結果と考察.....	68
3.3.4	本節のまとめ.....	70
3.4	網羅的な転写産物解析による特性評価.....	71
3.4.1	本節の目的.....	71
3.4.2	実験方法.....	72
3.4.3	結果と考察.....	73
3.4.4	本節のまとめ.....	79
3.5	本章のまとめ.....	80
第四章	総括.....	82
4.1	本論文のまとめ.....	82

4.2	今後の展望.....	84
	参考文献.....	86
	謝辞.....	97

第一章 序論

1.1 肝臓[1]-[3]

肝臓は1～1.5 kgほどの重量であり、体重の約50分の1を占める人体における最大の臓器であり、かつ最大の腺でもある。また、肝臓は生体における化学工場と例えられるように、生命維持に欠かせない多くの機能を担っている。1.1.1では肝臓の構造、1.1.2では肝臓の機能、1.1.3では肝疾患について述べる。

1.1.1 肝臓の構造

肝臓は、臓器としての機能を営むのに必要な最小の単位である肝小葉が50万個ほど集まって構成されている。肝小葉は直径1～2 mm程の六角柱の形態をなしており、その中心部を貫く中心静脈の周りに約50万個の肝実質細胞（肝細胞）が放射状に配列した構造を有している（Fig. 1）。したがって、肝臓は約2,500億個の肝細胞から構成されている。肝臓は肝細胞の他、類洞の壁をつくる細胞群（クッパー細胞、星細胞、類洞内皮細胞およびピット細胞）、毛細血管、胆管壁をつくる細胞群（細胆管、肝内胆管、肝外胆管および胆嚢）、静動脈、リンパ管、グリソン鞘の結合織および神経によってつくられている（Table 1）。しかし、肝臓を構成する細胞の約7割は肝細胞であり、残りの3割は肝非実質細胞と呼ばれ、それぞれ独自の機能を有しているものの、肝臓における代表的な肝機能は、そのほとんどが肝細胞によって発揮されている。

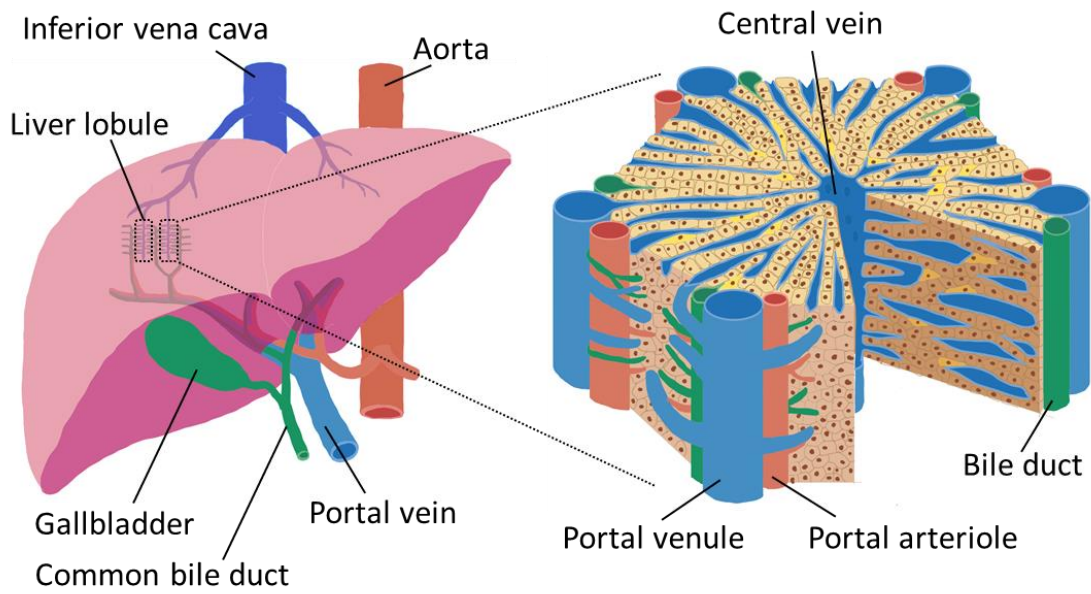


Fig. 1 Liver structure.

Table 1. Cells and functions of the liver.

Classification	Name	Main functions
Parenchymal cells	Hepatocytes	Drug metabolism, carbohydrate metabolism, ammonia detoxification, and bile production and secretion
	Kupffer cells	Removal of toxic substances and xenobiotics
	Hepatic stellate cells	Vitamin A Storage and production of collagen fibers
	Sinusoidal endothelial cells	Removal of waste products
Non-parenchymal cells	Dendritic cells	Antigen presentation
	Natural killer cells	Treatment of cancer cells and virus-infected cells
	Monocyte-derived macrophages	Removal of toxic substances and xenobiotics
	Myofibroblast	Production of collagen fibers
	Biliary epithelial cells	Bile transportation

1.1.2 肝臓の機能

肝臓には、判明しているだけで 500 以上の働きがあるが、それらは 4 つの機能に大別される。第一の代謝機能には、糖、脂質、アミノ酸、タンパク、核酸といった物質の代謝が含まれる。門脈からきたそれらの物質を取り込んで、血糖、リポタンパクあるいは血漿タンパクといった形で血中に送り出している。また、その他の臓器の代謝にも重要なビタミンやホルモンなども代謝し、活性化または不活性化している。第二の機能は、内因性あるいは外因性の物質を解毒し、排泄する機能である。薬物などを水酸化反応やグルクロン酸抱合、グリシン抱合などによって、極性を高めて水溶性の高い状態に変え、血中あるいは胆汁中に排泄する。胆汁を生成し、腸管に送ることが第三の機能である。第四には、造血や血液凝固に必要な因子の生成および排出、また血液の循環調節の機能も果たしている。このように肝臓は、肝臓のみならずその他の臓器、筋肉、神経、消化器、呼吸器などの維持にも重要なはたらきを担っている。

(1) 代謝機能

まず、肝臓は糖質代謝を担っている。肝臓では、門脈を介して入ってくる食事のブドウ糖や筋肉の運動によって生じたピルビン酸、乳酸、グリセリン、ある種のアミノ酸まで利用してグリコーゲンの形で貯えることができる。必要に応じてこれらをブドウ糖、さらにピルビン酸を経て炭酸ガスと水に燃焼し、生体のエネルギーにかえる。この糖の取り込み利用と生成放出のバランスは、インスリンとグルカゴンによって調節されている。

アミノ酸の大部分は肝臓に取り込まれ、粗面小胞体のリボソームによって、肝臓自体のタンパクおよび血中に放出される血漿タンパクの合成が行われる。このタンパクの約半分は酵素タンパクであり、生物の代謝を迅速かつ円滑に行う

ために必要となる。また、血清中のタンパクの大部分は肝臓で生成されているため、その他の臓器の維持にも関与している。重要な血漿タンパクの一つであるアルブミンも肝臓で産生される。アルブミンは、血管内の水分を保持し血液を正常に循環させるための浸透圧の維持と、体内のいろいろな物と結合しこれを目的地に運ぶ運搬作用を有する。

血中の脂質は、ごく一部分を占める脂肪酸を除いてほとんどが肝臓でリポタンパクとして合成され、血中に放出されたものである。また脂肪組織から動員された脂肪酸も、各組織でエネルギー源として利用される以外は肝臓に取り込まれ、そのうちの一部は酸化され、またケトン体を生成するが、大部分は再びトリグリセリドその他に利用され、肝臓からリポタンパクとして放出される。

(2) 解毒機能

肝細胞における酸化・還元反応は、上清、ミトコンドリア、ミクロソームで行われているが、そのうち肝ミクロソーム局在の酵素が薬物代謝酵素と総称される。これらの酵素はシトクロム P450 と NADPH-シトクロム C レダクターゼからなり、その反応には NADPH と酵素が必要である。薬物の酸化反応にはアルキル側鎖の酸化、芳香環の水酸化、非芳香環の水酸化、n-アルキル化合物の脱アルキル化などの反応があり、還元反応にはニトロ基の還元、アゾ基の還元などの反応がある。また、この酵素系は外因性の物質のみでなく、内因性のステロイドホルモンなどの代謝にも関与しており、種々の薬物によってその活性が促進または阻害される。

生体内にとりこまれたエタノールの 90%以上が肝臓で代謝される。肝細胞の上清分画にあるアルコール脱水素酵素によってエタノールはアセトアルデヒドへと酸化され、アセトアルデヒド脱水素酵素を介してアセチル CoA へ、さらに酢酸を経て炭酸ガスと水になるか、クエン酸回路に入って脂肪酸その他の物質

に転換される。また、他の経路として、ミクロソームにある MEOS (microsomal ethanol oxidizing system) やカタラーゼによる酸化が存在する。

(3) 排泄機能

胆汁とは胆汁色素 (ビリルビン)、胆汁酸、コレステロールを主成分とする、肝臓から十二指腸に排出される液体である。ビリルビンはヘモグロビン、シトクロム、カタラーゼなどに含まれる、補欠分子族ヘムの代謝産物である。ビリルビンは主に血漿アルブミンと結合することで可溶化され、血液中を運ばれる。胆汁は腸管内を循環し、脂肪の消化吸収や脂溶性ビタミンの吸収といった役割を担っており、その一部は便として排泄される。

(4) 循環血液量の調節および水、電解質代謝機能

肝臓は体内血液の約 1/3、一時的には 1/2 までも貯えることができ、体内の血液循環量を調節するために重要なはたらきをもっている。また、鉄をもった末梢血管の拡張因子の生成や、下垂体の利尿抑制物質の抑制による、体内水分代謝も行っている。

1.1.3 肝疾患

肝臓は臓器の中で唯一、再生能を有しており、正常な肝臓であれば 7 割を切除しても、半年ほどでほとんどもとの状態に戻る。そのため肝臓は沈黙の臓器と言われ、ある程度病気が進行しないと自覚症状が出ないため、病気が見つかった時点ではかなり病状が進行しており、完治が難しいことが多い。また、上述のように、肝臓は生命維持に欠かせない数多くの機能を担っているため、肝疾患が多

臓器にも影響を及ぼし、様々な障害を併発する可能性もある。ここでは、代表的な肝疾患である脂肪肝、肝炎、肝硬変、肝がんについて述べる。

(1) 脂肪肝

脂肪肝とは、中性脂肪が肝臓に多く蓄積し、肝細胞の 30%以上が脂肪化した状態を示す。脂肪肝は、飲酒によるアルコール性脂肪肝と、肥満、糖尿病、高脂血症などのメタボリックシンドロームとの関連性が高いと言われている非アルコール性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) に大別される。肝臓に脂肪が蓄積する一般的な原因は、遊離脂肪酸 (free fatty acid; FFA) の肝臓への運搬量の増加、肝臓での脂肪酸の合成量の増加、FFA の酸化の低下、超低密度リポタンパク質 (very-low-density lipoprotein; VLDL) の合成または分泌の低下などである[4]。NAFLD の有病率は、米国では 20%程度、全世界では 11.5%から 46%程度、メタボリックシンドローム患者では 80%と推定される[5],[6]。通常は自覚症状がなく、症状がある場合でも、非特異的な体質的なものや右上腹部の不快感などにとどまり、他の目的で行われた画像診断において偶発的に診断されることが主である。血糖値と脂質のコントロールを含む、生活習慣の改善と体重減少が治療の柱となり、著しい肥満のある患者には、胃バイパス術やその他の減量のための外科的治療法が施される場合がある。また、3~5%の減量によって、脂肪症を改善可能であることが証明されている[8]。90%前後の患者は、そのまま脂肪肝の状態推移するが、10%前後の患者は、肝炎が持続し徐々に線維化が進行する、非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis; NASH) と呼ばれる状態へと進行する。現在、FDA (米国食品医薬品局) で承認された NASH の治療薬はなく、NASH が改善しなければ、肝硬変や肝がんへと進行していく。

(2) 肝炎

肝炎は、アルコールの大量摂取、自己免疫、薬物、毒素など様々な原因で起こる肝臓の炎症と定義されており、最も頻繁に起こる肝炎の原因はウイルス感染によるものである。肝臓の炎症が6ヶ月未満の場合は急性肝炎と呼ばれ、6ヶ月以上続く場合は慢性肝炎と呼ばれる。急性肝炎は、通常は自然治癒するが、病因によっては劇症肝炎を引き起こすことがある。一方、慢性肝炎は、肝線維症、肝硬変、肝細胞がん、門脈圧亢進症などの肝障害を引き起こし、肝移植を必要とする場合がある[9]。ウイルス性肝炎は、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎が多く、D型肝炎とE型肝炎は遭遇する頻度は低い[10]。世界保健機関 (WHO) の推計によると、2015年には130万人が肝炎により死亡しており、世界の3人に1人がB型肝炎ウイルスまたはC型肝炎ウイルスに感染した経験があるとされている。B型肝炎ウイルスは20億人、C型肝炎ウイルスは1億8500万人、E型肝炎ウイルスは2000万人の感染が報告されている[11],[12]。

(3) 肝硬変

肝臓は、ウイルス感染、毒素、遺伝性疾患、自己免疫疾患など、さまざまな要因で長期にわたる傷害を受けると、肝組織の大部分が線維化し、機能が失われて肝硬変が発症する。先進国では、C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus; HCV)、アルコール性肝疾患、NASH が最も一般的な肝硬変の原因であり、発展途上国では、B型肝炎ウイルス (HBV) と HCV が最も一般的な原因である。肝硬変の世界的な有病率は不明だが、米国では0.15%～0.27%と推定されている[13]。肝硬変により肝機能が悪化し、アルブミンを合成できなくなると、血中アルブミン濃度が低下し浸透圧も低下、血管の内側から外側に水分が漏れ、足のむくみや腹水といった症状が現れる。また、不要物の代謝機能が低下すると、アンモニア濃度

が上昇し、肝性脳症を引き起こす。肝の線維化を治療する根本的な治療法はないため、慢性肝疾患の予防および肝障害が見つかった際にそれ以上病状が進行しないよう原因に応じた対応をする必要がある。

(4) 肝がん

肝臓に発生するがんを肝がんと呼び、その95%は肝細胞がんで、4%が肝内胆管がん、残りは混合型肝がん、胆管嚢胞腺がん、肝芽腫等の、まれながん種である。また、肝細胞がんの多くはB型およびC型の慢性ウイルス性肝炎や肝硬変から発症する。慢性肝炎に加えて、D型肝炎ウイルス (HDV) の重複感染、飲酒、喫煙など、他の関連する危険因子がある場合、肝臓がんのリスクが高くなる可能性がある[14],[15]。肝細胞がんは、世界で5番目に多いがんであり、がんによる死亡者数では2位を占めている。男性および女性での発生率はそれぞれ10万人あたり11.5人および3.9人となっており、年間3.1%の発生率の増加が報告されている。また、肝細胞がんの死亡率は、男性では年間2.8%、女性では年間3.4%増加している。

ほとんどの患者で唯一証明されている治療方法は、切除または移植だが、ほとんどの患者は手術の対象にならない。肝細胞がんのステージが早期の患者は切除対象であり、切除によって無再発生存率は40%、5年全生存率は90%となる。移植には、腫瘍の大きさ、数、侵襲状況等の基準があり、さらに緊急性の高い患者から臓器が提供され、肝移植により、無再発生存率は80%、4年全生存率は75%となる。移植までの期間が数ヶ月に及ぶことも多く、つなぎの治療 (肝動脈化学塞栓術、ラジオ波焼灼療法、肝部分切除、抗がん剤治療など) が行われる。

1.2 肝細胞の利用

1.1 で述べたように肝臓は人体において重要な役割を担っている。そのため肝細胞は幅広い分野への利用が検討されている。1.2.1 では肝細胞移植、1.2.2 ではバイオ人工肝臓、1.2.3 では肝毒性・薬物動態評価系、1.2.4 では肝炎ウイルス感染モデルへの肝細胞の利用について紹介する。

1.2.1 肝細胞移植

末期の肝疾患治療法としての肝移植の成功により、肝移植は重症肝疾患に対する標準的治療として普及した。そのため、利用可能なドナー臓器の供給を上回る需要が続いている。一方 1992 年、肝機能を担う肝細胞を移植することによって肝不全を補う、肝細胞移植が世界で初めて実施された[16]。以来、臨床的に肝細胞移植が行われてきたものの、一時的な肝機能の改善にとどまり、肝移植への橋渡し程度の効果しか得られていない[17]。しかし、これまでの肝細胞移植の臨床例の多くは、肝移植適応外となったレシピエントあるいはグラフトを利用して行われたものである。

1.2.2 バイオ人工肝臓

重篤な肝疾患に対する唯一の根治治療は肝臓移植のみであるが、ドナー不足の問題は世界的に深刻であり、移植医療の恩恵を受けられない患者が多数存在する。そこで、肝細胞を担体に組込んでモジュール化したバイオ人工肝臓 (bio artificial liver; BAL) が期待されている。BAL は、患者の血液を装置内に導き、充填した肝細胞の代謝能を利用して血液中の毒素の除去および肝細胞が合成する凝固因子などの生理活性物質の供給を行うシステムである。生体由来の細胞を

用いることにより、人工材料のみでは実現が困難である強力な肝機能補助を行い、生体肝臓の再生を促し、自己再生させることが期待される。これまでにアメリカやイタリア、オランダ、中国などのグループから、主にブタ肝細胞を用いたBALの試験的臨床適用が報告されているが、肝移植までの橋渡しとしての利用にとどまる[18]-[21]。

1.2.3 肝毒性・薬物動態評価系

創薬プロセスの途中で開発が中止になる場合や、医薬品として市場に出たものの撤退する場合があるため、医薬品の開発には長期にわたる研究と莫大な費用が必要となる[22]-[24]。開発中止、販売中止に至る原因として最も多いものが薬物性肝障害 (drug-induced liver injury; DILI)である[25]。95%以上の薬物は肝臓で代謝されるため、薬剤によっては肝毒性を示す可能性がある。したがって製薬企業にとって、新薬開発の初期段階での毒性試験システムの開発が求められる。創薬の前臨床段階では、齧歯類や非齧歯類を用いた投与毒性試験で安全性評価が行われているが、ヒトと動物モデルの間には種の違いによる毒性結果の不一致が生じる[26]。そこで、毒性試験に用いることができる、低コストで品質の安定したヒト肝細胞モデルの開発が求められている。

1.2.4 肝炎ウイルスモデル

ウイルス性肝炎は、急性肝炎および慢性肝炎の両方を引き起こす可能性があり、繊維化、肝硬変、肝細胞がんを含む肝疾患の主要な原因になっている[27],[28]。疾患の進行を防ぐためには、早期診断、早期治療が不可欠である。近年、HCVの基礎研究の成果により、C型肝炎の治療が飛躍的に進歩しているにも関わらず、他のウイルスによる肝臓の病因の根本的な分子・細胞メカニズムへの理解は十

分ではない。肝炎ウイルスに対する新規の特効薬の開発のために、ミディアム/ハイスループットな薬剤スクリーニングに使用できる生理学的に最適な細胞培養モデルの開発が求められている。

1.3 機能的肝細胞源の研究

1.2 で述べたように、肝細胞は様々な分野への利用が検討されているが、品質が安定した高機能な細胞を安価に供給することは難しい。本節では、機能的肝細胞源候補とそれに関する研究を紹介する。

1.3.1 初代肝細胞利用

肝細胞研究に用いる細胞源として第一に、ヒト肝臓組織からコラゲナーゼを用いて分離した、初代ヒト肝細胞 (primary human hepatocyte; PHH) が考えられる。分離直後の PHH は、肝細胞としての機能をほぼ全て有しているが、通常の培養液で培養すると、その機能は時間と共に急速に失われ、また細胞は増殖することができない。国内では制度上、生体の余剰肝からしか健常肝細胞がとれず、余剰肝としてとれる組織量は少なく、辺縁の組織であることが多いため細胞採取効率が悪い。このように、ドナーが限られている上に、ドナー間での肝機能に大きな差がある。また、肝細胞は凍結保存が難しく、凍結融解による損傷を受けやすいという特徴がある[29]。

肝細胞の機能を長持ちさせるために、初代肝細胞の標準的な培養方法に対して、多くの改変がなされてきた。例えば、コラーゲンタイプI/IV、フィブロネクチン、または他の細胞外マトリックス (ECM) でコーティングされたプレートでの細胞培養や[30],[31]、I型コラーゲンおよびマトリゲルの 2 層の間での培養が検討された[32]-[34]。しかし、これらの改変は、シトクロム P450 活性を向上

させ、PHH の機能的寿命をある程度延伸させたものの、肝臓の重要な機能を全て再現することはできなかった。また、肝実質細胞とマウス胚性繊維芽細胞との共培養や[35]、肝実質細胞と肝星細胞やクッパー細胞といった肝非実質細胞との共培養[36]-[38]、さらに実質細胞および非実質細胞を含む3次元肝臓共培養リアクターなど[39]-[42]、より複雑なヒト肝臓システムが開発された。

上述のように、PHH の肝機能と生存率は向上したものの、様々な用途に用いるための機能的な PHH を長期的に増殖・維持することは依然として困難である。近年、複数のグループが PHH から増殖能力のある肝前駆細胞様細胞へのリプログラミングを報告した[43]-[45]。これらの手法によって肝前駆細胞へと誘導後、増殖された細胞は、再び代謝機能を有する肝細胞に戻ることができる。しかし、小分子やサプリメント、成長因子などの添加が必須であり、また肝前駆細胞様細胞を経由するため、高肝機能細胞取得まで時間とコストがかかる。さらに、使用する初代肝細胞のロットによる肝機能のばらつきが生じる。

1.3.2 ヘパトーマ細胞

ヘパトーマ細胞 (肝がん由来株化細胞) は、肝がんの組織から樹立された細胞株であり、元の肝細胞の表現型をある程度保持したまま、生体外で無限に増殖することができる。代表的なヒトヘパトーマ細胞である HepG2 細胞は、他の株化細胞と同様に簡易な培養環境の下で無限に増殖し、 α -フェトプロテイン、アルブミン、トランスフェリン、 α 1-アンチトリプシン、シトクロム P450 などの肝細胞に特異的なタンパク質を発現する[46]。しかし、その正常肝細胞と異なる細胞内シグナル伝達と代謝活動は、ウイルスと細胞の自然免疫の相互作用や、細胞の増殖、代謝、アポトーシス経路への影響を調査する上での障害となっている。さらに、シトクロム P450 をはじめとする第 I 相、第 II 相、第 III 相の薬物代謝酵素などの様々な機能的酵素の活性レベルが低く、多くの肝臓特異的機能を欠いて

いるため、抗ウイルス剤の相互作用や代謝の評価には適していない[47]-[49]。このように、通常のヘパトーマ細胞株では、様々な肝細胞研究に用いる際に発揮する能力に限りがある。そのため、遺伝子改変や培養方法の改変によって、HepG2細胞の限られた肝機能を拡張し、機能的肝細胞源として利用するための研究が盛んに行われている。

アンモニア除去に関連している酵素であるグルタミン合成酵素を導入し、HepG2細胞にアンモニア除去能を付与した報告がある[50]。この細胞を用いてBALを構築し、虚血性肝不全のブタに適用したところ、ブタ肝細胞の15%のアンモニア除去活性を示し、野生型HepG2細胞からなるBALを適用した群と比較して生存期間が有意に延長された[51]。また、オルニチンカルバミルトランスフェラーゼとアルギナーゼ1という2つの尿素サイクル関連酵素をHepG2細胞へと組み込むことで、尿素サイクルの機能回復を促し、アンモニア除去能を回復させた報告がある[52]。この報告では、アルギン酸カプセル化したHepG2細胞を流動床式バイオリアクターに充填するという培養方法の工夫によって、ビリルビン抱合、CYP450 1A活性といった解毒機能が確認された。しかし、どちらの研究においても、遺伝子改変によって向上した肝機能は、アンモニア代謝という特定の肝機能に限られている。

HepG2細胞は、薬剤スクリーニングのためのハイスループットな肝毒性試験にも利用されている[53]。マイクロ流体バイオリアクター装置内で直接書き込み式バイオプリンティングによって作製された肝スフェロイドを用いた、肝臓オンチッププラットフォームが開発された[54]。この系においてHepG2細胞は、アセトアミノフェンを添加した培養液では、6日間にわたって代謝活性が著しく低下し、細胞密度、活性、バイオマーカー産生量の低下も認められ、動物および*in vitro*モデルで報告されているアセトアミノフェンによる肝毒性と同様の結果を示した。

ヒト胆汁酸トランスポーター (Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide;

NTCP) が HBV 感染に対する肝臓特異的受容体として報告され[55]、NTCP を過剰発現させた HepG2 細胞が HBV 研究に用いられている[56],[57]。NTCP 導入 HepG2 細胞株は、3%のジメチルスルホキシドで細胞を前処理することで、HBV の感染が促進され、約 50%の細胞が HBV に感染した。また、HBV の感染は、抗 HBV 表面タンパク質中和抗体、NTCP トランスポーター活性を阻害することが知られている化合物、シクロスポリン A およびその誘導体によって阻止された。さらに、化学物質のスクリーニングにより、コレステロールの酸化誘導体であるオキシステロールが HBV 感染の阻害剤として同定された。このように HepG2 細胞株は、HBV 感染の阻害剤を同定するだけでなく、HBV 感染の分子メカニズムを解析するためのツールとしての実績もある。

1.3.3 iPS 細胞由来肝細胞様細胞

人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPS 細胞) は、2006 年に京都大学の山中教授より報告された、マウス体細胞に 4 つの転写因子 (Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4) を導入することで、様々な組織や臓器の細胞に分化する能力とほぼ無限に増殖する能力をもつ細胞である[58]。また、2007 年にはヒト iPS 細胞の作製も可能となった。[59]現在までに様々な細胞への分化誘導が研究されており、肝細胞様細胞への分化も多くのグループによって実現されている[60]-[66]。iPS 細胞由来肝細胞様細胞は、薬物毒性評価や肝疾患モデル研究に用いられている[67]-[71]。

iPS 細胞由来の 3 つの前駆細胞集団 (肝内胚葉、内皮、中隔間葉) を用いて、再現性の高い方法で効率的に肝芽を作製できる、オムニウェルアレイ培養プラットフォームが報告された[72]。標準的な治療規模が患者 1 人あたり 10^9 個以上の肝細胞が必要であり[73],[74]、小児患者においては 10^8 個以上の細胞を移植することで臨床効果が得られているなか[75]、この研究では 10^8 個以上の肝芽の作

製に成功している。しかし、iPS 細胞は、未分化状態を保つために塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor; bFGF) を含んだ特別な培養環境を必要とし、未分化維持にかかるコストは高価となる。また、これらの細胞の未分化状態は細胞の密集度など様々な要因に左右されるため、培養スケールが大きくなるほど細胞の品質を保つことが難しくなる。さらに、機能的な細胞へ変化するまである程度長期間の培養が必要であり、分化誘導のためにはサイトカインや専用の培地といった高価な因子が必要となる。これらの理由から、iPS 細胞由来肝細胞様細胞の利用は、依然として多くの課題が存在する。

1.3.4 繊維芽細胞からのダイレクトリプログラミング

系統特異的な転写因子の過剰発現は、細胞の運命を変えるために広く用いられており[76],[77]、マウスの繊維芽細胞にいくつかの転写因子を導入することによって直接肝細胞系譜に変換することに成功している[78],[79]。2014年には、ヒト繊維芽細胞およびヒト間葉系幹細胞へと3種類の肝特異的転写因子 (liver-enriched transcription factor; LETF) を導入することによる直接的な肝細胞誘導が報告された[80]。この細胞は、成熟した肝機能、特に CYP 酵素活性と薬物の胆道排泄を示した。また、フマリルアセトアセテートヒドロラーゼ欠損による代謝性肝疾患やコンカナバリン A 誘発性の急性肝不全に対して、治療効果を示した。

1.4 合成生物学

個々の細胞は、相互に連結した様々な生体ネットワークを形成し、重要な生物学的プロセスを動的に制御し、貴重な生体分子を生産することで、生存を保っている。したがって、細菌から哺乳類の特殊な細胞に至るまで、それぞれの細胞には、特定の制御を行う独創的な生物学的パーツが備わっている。合成生物

学は、個々の細胞の有する複雑な制御能力を利用して、バイオテクノロジーや治療に大きな影響を与える細胞や分子の操作を制御することを目的としている。合成生物学では、工学的なアプローチにより、さまざまな生物種から得られた特定の機能を持つ生体分子の特性を明らかにし、カタログ化することで、普遍的なツールボックスを作製する。このツールボックスをカスタマイズして、多成分の回路を作ることができる[81],[82]。

合成生物学的手法によって細胞を高機能化する際、多くの場合は任意のタイミングで遺伝子発現することが求められる。例えば、合成回路の構築には正確な遺伝子発現が必要であり、人工的な細胞工場の構築には中心的な代謝経路の転写制御が必要であり、新しい細胞治療薬には安全性を高めるために遺伝子プログラムの誘導制御を利用することができる。したがって、多くの研究者が、細胞が有する多様な環境ストレスへの応答や、特定の生理機能を実行するための複雑なプロセスを利用した遺伝子発現制御系の構築を目指してきた。本節では、合成生物学分野において利用されている、遺伝子発現制御システムについて紹介する。

1.4.1 Tet 転写活性化システム

テトラサイクリン (Tet) を用いた遺伝子発現制御系は、*in vitro* および *in vivo* での遺伝子発現を制御するために広く用いられている[83]。このシステムでは、大腸菌由来の Tet リプレッサータンパク質 (TetR) またはその逆変異型 (rTetR) と単純ヘルペスウイルス由来の転写活性化ドメイン (VP16) を融合させた、テトラサイクリン制御性転写活性化因子 (Tet-regulated transcriptional activator; tTA) または逆テトラサイクリン制御性転写活性化因子 (rtTA) という人工転写活性化因子を細胞内で発現させる。同時に、標的遺伝子上流には、TetR 応答性エレメント (tetR-response element; TRE) と最小サイトメガロウイルス

(cytomegalovirus; CMV) プロモーター領域 (P_{CMVmin}) からなる合成プロモーターを配置し、tTA または rtTA が TRE 配列に結合することで標的遺伝子の発現を高レベルで誘導する。その際、rtTA は Tet やその類似体であるドキシサイクリン (doxycycline; Dox) 存在下のみで TRE 配列と結合することができ、tTA は Tet や Dox の非存在下でのみ TRE 配列と結合することができる。したがって、Tet 転写活性化システムにおいては Dox という誘導薬剤の有無によって目的遺伝子の発現を制御することができる。

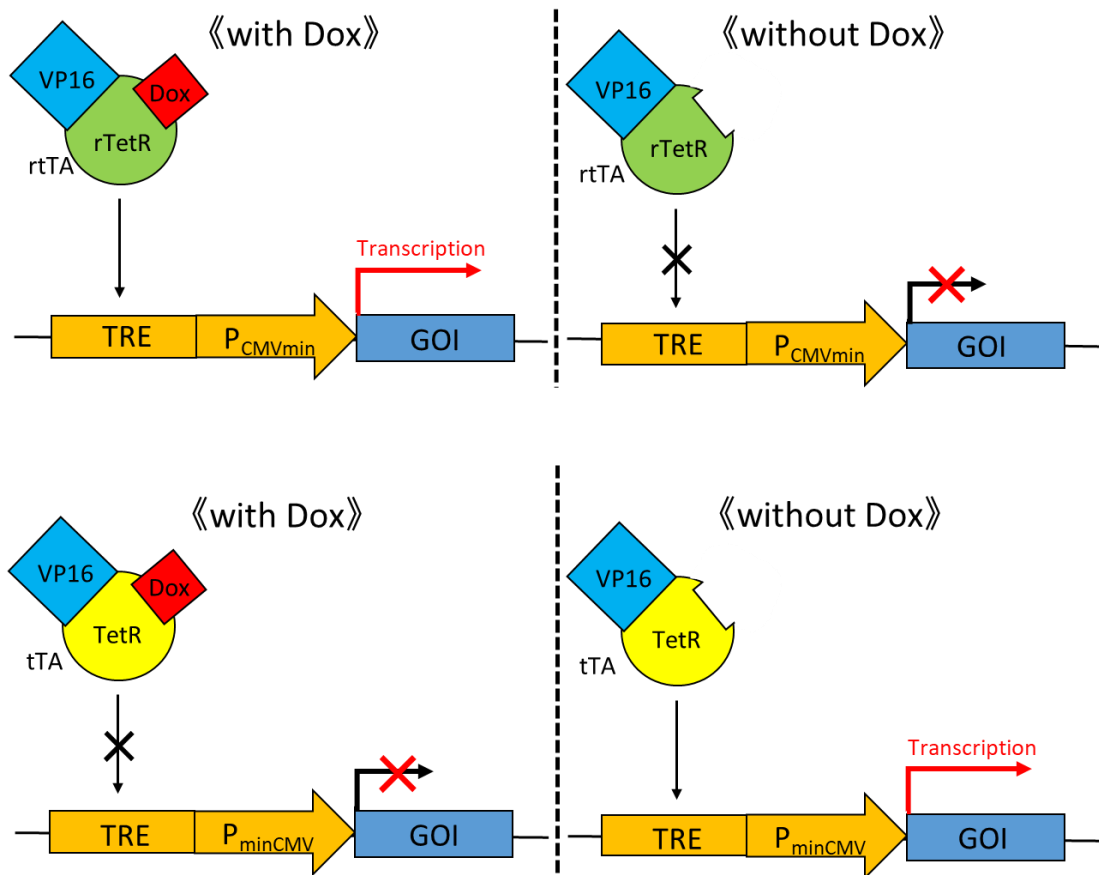


Fig. 2 Tet transcription activation system. GOI, gene of interest.

1.4.2 熱応答遺伝子発現システム

1970年代半ばに、熱刺激によって誘導されてくる、熱ショックタンパク質 (heat shock protein; HSP) が同定され、この反応を熱ショック応答 (heat shock response) と呼んでいる。後の研究で熱ショック応答は熱刺激だけでなく、エタノール、ヒ素、カドミウムなどの化学的ストレス、X線や紫外線、浸透圧などの物理的ストレス、過酸化水素などの酸化的ストレスなどによっても誘導されることがわかってきた[84]。また、HSPは熱刺激などによるタンパク質の変性の防護、またはすでに変性してしまったタンパク質の修復または分解を担う、分子シャペロンの一群であることが報告されている[85]。HSPの発現は、活性化した熱ショック転写因子 (heat shock transcription factor-1; HSF-1) がHSPプロモーター配列中に存在する熱ショック転写要素 (heat-shock element; HSE) に結合することによって開始される[86],[87]。ストレス下でない細胞内では、HSFはHSPと結合し単量体として細胞質に存在している[88]。ここに熱刺激が加わると、HSPはタンパク質保護のためにHSFから離れ、HSFは三量体を形成し活性型となり、核内に移行してHSEに結合する[89]。これによりHSPの転写が活性化され、細胞内のHSPが豊富になり、変性したタンパク質の修復が終了すると、再びHSFはHSPと結合し不活性化され、HSPの転写が抑制される。ヒトHSP70B'プロモーターは、加温をスイッチとして遺伝子発現を厳密に制御可能であることから *in vitro* および *in vivo* において幅広く用いられている。

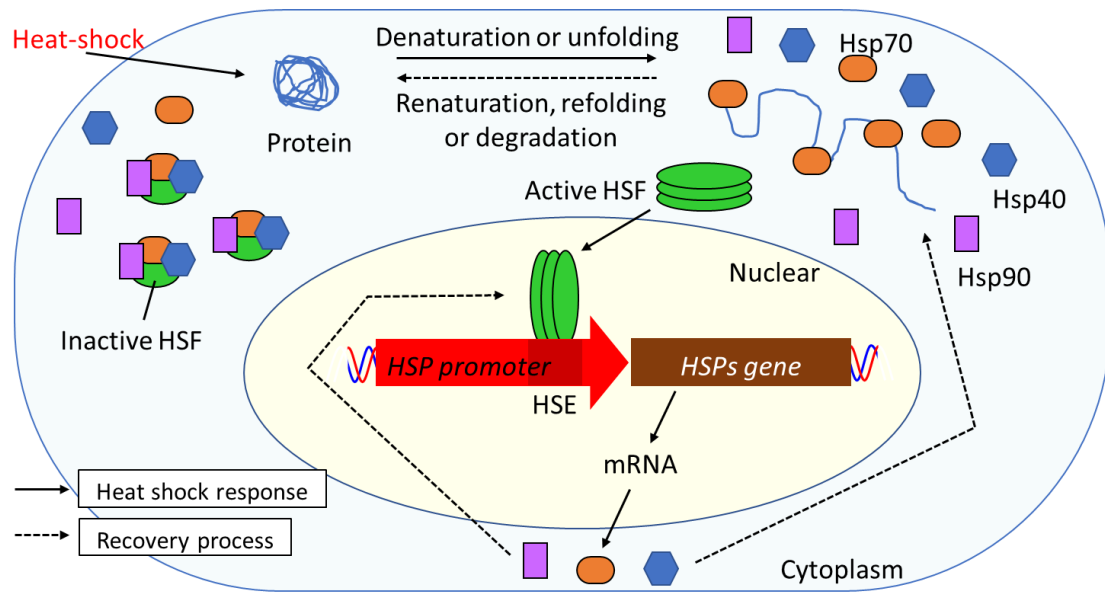


Fig. 3 Heat shock response.

1.4.3 光応答遺伝子発現システム

フィトクロムは植物や細菌、シアノバクテリアに存在する光を感知するタンパクであり、不活性な Pr 状態で合成され、光を吸収すると活性な Pfr 構造に変換される。Pfr は、遠赤外光を吸収するか、温度に依存する熱緩和によって不活性化され、明所では両形態が常に存在し、暗所ではすべてのフィトクロムが Pr に戻る。フィトクロムは二量体として作用し、Pr-Pr、Pfr-Pr、Pfr-Pfr の形態を取り得る[90]。こうした光受容タンパクとそのシグナル伝達成分は合成生物学に用いられており、光を正確に当てたり消したりすることで、細胞の反応を空間的・時間的に制御することができる。また、このようなシステムは、通常、内在性の制御システムと直交しているため、望ましくないシグナル伝達の相互作用を避けることができ、シアノバクテリアの光受容体を用いた光遺伝学的システムは、プラスミド、染色体組み込みツール、プロモーター、低分子 RNA 制御因子、CRISPR 干渉システム、レポーターなどに利用されている[91],[92]。例えば大腸菌では、Cph1 の光感知領域を大腸菌のセンサーである EnvZ のキナーゼドメイン

ンに結合させることで、赤色および遠赤色の光で応答制御因子 OmpR の活性を制御することができた[93]。また哺乳類細胞では、色光によるフィトクロム感光領域のホモ二量化を利用して、ヒト胚性腎臓細胞において受容体チロシンキナーゼや MAPK-ERK 経路を活性化させることができた[94]。

化学合成細菌のフィトクロム (バクテリオフィトクロム) もまた、哺乳類でのオプトジェネティクスに利用されている[95]。哺乳類細胞は、主要なシアノバクテリアの発色団であるフィコシアノビリンは産生せず、バクテリオフィトクロムの発色団であるビリベルジン IX α を産生するためである。また、バクテリオフィトクロムは近赤外光を感知するが、シアノバクテリアのフィトクロムファミリーは感知できない。組織に存在するヘムなどの内因性発色団は、赤色光をよく吸収するが、近赤外光は吸収しないため、バクテリオフィトクロムが好んで用いられる。

1.4.4 細胞間コミュニケーションシステム

バクテリアは、大規模な細胞集団の中で運動や遺伝子発現などの活動を同期させ、集団全体の行動を適応させている[96],[97]。また人体の細胞は、免疫系や内分泌系などの特殊な細胞が、シグナル分子を介して伝達し、重要な生物学的プロセスを制御している。このように細胞間シグナルによって調整された特定のタスクを実行する特殊な細胞が自然に存在することから、合成多細胞集合体の設計が盛んに行われている。

Weber らは、哺乳類細胞における最初の細胞間コミュニケーションシステムを構築した[98]。送信側の細胞は、マウス由来のアルコール脱水素酵素 (alcohol dehydrogenase; ADH) を発現し、エタノールをアセトアルデヒドに変換するよう設計された。受信側の細胞には、*Aspergillus nidulans* 由来の遺伝子成分を用いたアセトアルデヒド誘導制御システムを組み込み、アセトアルデヒドを受信する

と遺伝子が発現するようにした。これらの細胞をマウスに移植すると、飲料水から供給されたエタノールは、送信側の細胞でアセトアルデヒドに変換されて受信側の細胞に送られ、遺伝子発現の引き金となった。また Bacchus らは、L-トリプトファンに反応する細胞間コミュニケーションシステムを構築した[99]。このシステムでは、送信側の細胞ではトリプトファン合成酵素 (tryptophan synthase; TrpB) が発現されており、補給されたインドールを L-トリプトファンに変換する。受信側の細胞は、*Chlamydia trachomatis* 由来の遺伝子成分をもとに構築した L-トリプトファン誘導性制御システムを介して、目的の遺伝子を発現させた。

1.4.5 細胞種特異的遺伝子発現システム

遺伝子発現の制御を生体内での治療に用いる際には、治療薬の作用をがん細胞に部分的に限定する必要がある。そのために、複数のがん特異的バイオマーカーの検知やプロモーター、マイクロ RNA (miRNA) の活性、mRNA、タンパク質レベルなど、最大 2 つの組織特異的シグナルを組み合わせ、細胞の状態を検出し、治療行為を正確に制御する必要がある。

Xie らは、細胞内で一過性に発現した 6 種類の内因性 miRNA の発現プロファイルが、子宮頸がん細胞株 HeLa に特徴的な所定の参照プロファイルと一致するかどうかを判断し、一致すると、その細胞は HeLa と同定され、アポトーシスが引き起こされるシステムを構築した[100]。HeLa 参照プロファイルは、HeLa 細胞が高レベルに発現するマーカー (HeLa-high) セットおよびその逆 (HeLa-low) で構成される。HeLa-high マーカーセンサーは、マーカーが HeLa 細胞内でそのレベル以上に存在する場合にのみ出力発現を許可するだけでなく、マーカーのレベルが低い場合には効率的に出力を抑制される。このデザインは、siRNA 標的の転写型 Lac repressor (LacI) と、LacI 制御のプロモーター CAGop (LacO サイトを持つイントロンに続く CAG プロモーター) からなる、モジュールに基づいて

いる[101]。LacI を制御するために rtTA を導入し、フィードフォワードループの中で miRNA を用いてリプレッサーとアクチベーターの両方を標的とした。また、完全に相補的な標的部位の 4 つのリピートを出力の 3'-UTR に融合させることで HeLa-low マーカーセンサーは実現された。複数の HeLa-high センサーは、同じ出力を並行して調節することで統合されるため、CAGOP からの出力発現を可能にするには、すべての HeLa-high マーカーが同時に存在しなければならない。

1.5 本研究の背景と目的

上述したように、肝臓は、人体における最大の臓器であり、糖質、脂質、タンパク質の代謝と貯蔵、薬物の解毒、胆汁の合成など生命維持に欠かせない多くの機能を有する。そのため、長期に及ぶ慢性肝不全や劇症肝炎などの急性の肝不全によって肝臓の機能に重度の障害が及ぶと、生体はその機能を維持できなくなり、非常に危険な状態に陥る。現在、多くの肝疾患患者が存在するが、重篤な肝不全に対する根本的で効果的な治療法は生体肝移植のみである。しかし、供給を超える需要が続いており、世界規模で慢性的なドナー不足が問題となっている。肝細胞は、移植やバイオ人工肝臓への利用などによって直接的に肝疾患を治療することや、肝毒性・薬物動態評価系や肝疾患モデルの構築による治療薬の開発といった間接的にも貢献することが期待されている。しかし、最も理想的な肝機能を有する PHH は、生体の余剰肝からしか取得することができず、その量は限られている。また、生体外における初代ヒト肝細胞の増殖や機能維持が研究されているが、ドナーの不足を覆せるほどの成果は得られていない。増殖能力が高く、培養が容易であるヒトヘパトーマ細胞の高肝機能化が研究されているが、発揮される機能は一部の肝機能のみに限定されている。多くのグループが iPS 細胞の肝細胞様細胞への分化誘導に成功しているが、細胞の大量培養時や肝細胞への分化誘導時にかかるコストの高さ、品質管理の難しさ、そして要する時間の長

さなど、実用化への課題は多い。

我々の研究室においては、マウスヘパトーマ細胞に 8 つの LETF 遺伝子 (HNF-1 α 、HNF-1 β 、HNF-3 β 、HNF-4 α 、HNF-6、C/EBP- α 、C/EBP- β 、C/EBP- γ) を導入して、過剰発現させることで、高い肝機能を発揮する細胞株 (Hepa/8F5) が樹立されている[102]。LETF は、肝臓で高度に発現している転写因子であり、互いに転写ネットワークを形成し、肝機能や肝細胞の表現型に関連する様々な遺伝子の発現を制御している[103]。そのため、LETF の過剰発現によって誘導される肝機能は多岐にわたる[104]。また、導入した LETF の過剰発現は、薬剤添加によって制御されており、任意のタイミングで誘導できるため、細胞を大量に増殖させた後に高肝機能化することが可能である。しかし、誘導された肝機能を持続するためには誘導薬剤を培地中に添加し続ける必要があり、これはバイオ人工肝臓や肝毒性・薬物動態評価系等に用いる際にあまり好ましくない。本研究では、まず、遺伝子改変によって Hepa/8F5 細胞の肝機能誘導スイッチを薬剤誘導型から温熱誘導型へと変更することを目的とした。次に、この高肝機能誘導型マウスヘパトーマ細胞株樹立に関する知見を活かし、高肝機能誘導型ヒトヘパトーマ細胞株の樹立を目指した。

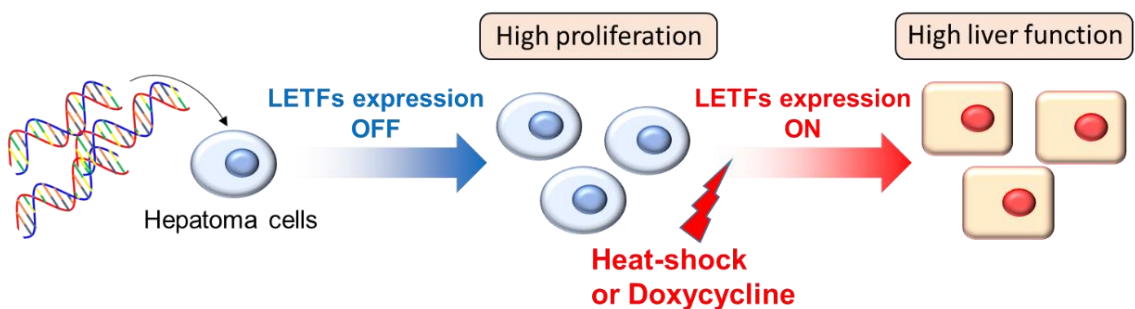


Fig. 4 Strategy for the development of hepatoma cells with inducible high liver function.

1.6 本研究の方針

本研究では、まず、加温をスイッチとする遺伝子発現システムを構築し、Hepa/8F5 細胞へと導入した。遺伝子導入バルク細胞へと様々な条件で加温を与え、生細胞数および誘導される CYP3A4 活性を測定することで、遺伝子発現システムの評価および加温条件の検討を行った。次に、遺伝子導入バルク細胞からクローン細胞を取得し、加温によって高い肝機能を安定的に発現する細胞株を樹立した。最も高い CYP3A4 活性を発現した細胞株に対して、アルブミン分泌能、アンモニア除去能、CYP3A4 活性といった肝機能を経時的に測定した。さらに、細胞増殖を抑制する薬剤であるマイトマイシン C を添加することで、加温によって誘導される肝機能を持続できるか調べた。

次に、高肝機能誘導型ヒトヘパトーマ細胞を作製するために、人工転写因子によって発現が制御可能な LETF 遺伝子導入ベクターを構築した。構築したベクターを用いて、我々の研究室で以前に開発した遺伝子改変ヒトヘパトーマ細胞株 (HepG2-HSP) に遺伝子導入を行った。HepG2-HSP 細胞には、温熱誘導型遺伝子発現システムが導入されており、加温に応じて人工転写因子および緑色蛍光タンパク質 (Enhanced green fluorescent protein; EGFP) を持続的に高発現する [105]。LETF 発現誘導の最適条件を決定するために、HepG2-HSP 細胞を様々な条件で加温し、生細胞数および EGFP 蛍光を観察した。次に、決定した条件で遺伝子導入バルク細胞に加温を与え、ヒトヘパトーマ細胞においてもマウスヘパトーマ細胞と同種の 8 つの LETF 過剰発現によって、高肝機能を誘導可能か確認した。また、遺伝子導入バルク細胞からクローン細胞を取得後、最も高いアルブミン分泌能を示した細胞株を選抜し、アルブミン分泌能、アンモニア除去能、CYP3A4 活性を経時的に測定した。続いて、加温によって誘導される EGFP 蛍光強度を利用して、肝機能が高い細胞を分取できるか検討した。さらに、細胞凝集塊 (スフェロイド) を形成し三次元的に培養し、誘導される肝機能および持続期

間への影響を評価した。最後に、網羅的転写産物解析を行い、樹立した細胞株が加温による LETF 過剰発現によって、様々な肝機能関連遺伝子がどの程度向上しているか調べた。

1.7 本論文の構成

第 1 章では、まず肝臓について概説するとともに本研究の関連分野の既往の研究について紹介し、次いで、本研究の背景および目的を説明し、最後に、目的を達成するための方針について示した。

第 2 章では、まず、加温をスイッチとして目的の遺伝子を発現する温熱誘導型遺伝子発現システムを構築した。構築したシステムを、以前開発した薬剤添加に応じて高肝機能を誘導可能なマウスヘパトーマ細胞株へと導入することで、加温によって高肝機能を誘導可能なマウスヘパトーマ細胞株を作製し、その特性評価を行った。

第 3 章では、高肝機能誘導型マウスヘパトーマ細胞株の樹立に関する知見に基づいて、加温によって高肝機能を誘導可能なヒトヘパトーマ細胞の開発に取り組んだ。以前に開発した加温に応じて人工転写活性化因子を持続的に発現するヒトヘパトーマ細胞に、肝特異的転写因子遺伝子を導入することで達成した。また、スフェロイド培養を行うことで、この細胞株の肝機能発現をさらに向上させることが可能であるかについて検討した。さらに、網羅的な転写産物解析によって、様々な肝細胞研究への利用可能性を示した。

第 4 章では、本論文の総括を行うとともに、本研究の成果に基づいた今後の展望について述べた。

第二章 加温によって高肝機能を誘導可能なマウスヘパトーマ細胞の開発

2.1 緒言

Hepa/8F5 細胞では、恒常的に発現している転写活性化因子 rtTA と TRE 配列が結合することで、LETf 遺伝子の転写が始まり、肝機能が誘導される (Fig. 5)。rtTA が TRE 配列に結合するためには Dox が必要であるため、Hepa/8F5 細胞の肝機能を持続させるためには、継続的な誘導薬剤 Dox の添加が必要である。しかし、Hepa/8F5 細胞をバイオ人工肝臓や肝毒性・薬物動態評価系等に適用する際に、Dox は妨げと成り得る。そこで本章では、薬剤添加によって高肝機能を発現する Hepa/8F5 細胞を、加温によって高肝機能を誘導できるように遺伝子改変を試み、作製した細胞株の機能評価に関する成果を示す。加温を遺伝子発現のスイッチとするために、すでに幅広く用いられている HSP プロモーターを利用した。本研究で用いる HSP70B'プロモーターは加温に厳密に応答するプロモーターであるが、一方で CMV などの構成的に下流の遺伝子発現を誘導するウイルスプロモーターと比較して、その発現量が低いという欠点を有する。我々の研究室では、TRE 配列と最小 CMV プロモーターを結合させた TRE/P_{CMVmin} と HSP70B'プロモーターを組み合わせることで、転写増幅を伴う合成プロモーターを開発している[106]。TRE/P_{CMVmin} は、rtTA によって活性化され、標的遺伝子の発現を高レベルで誘導する。

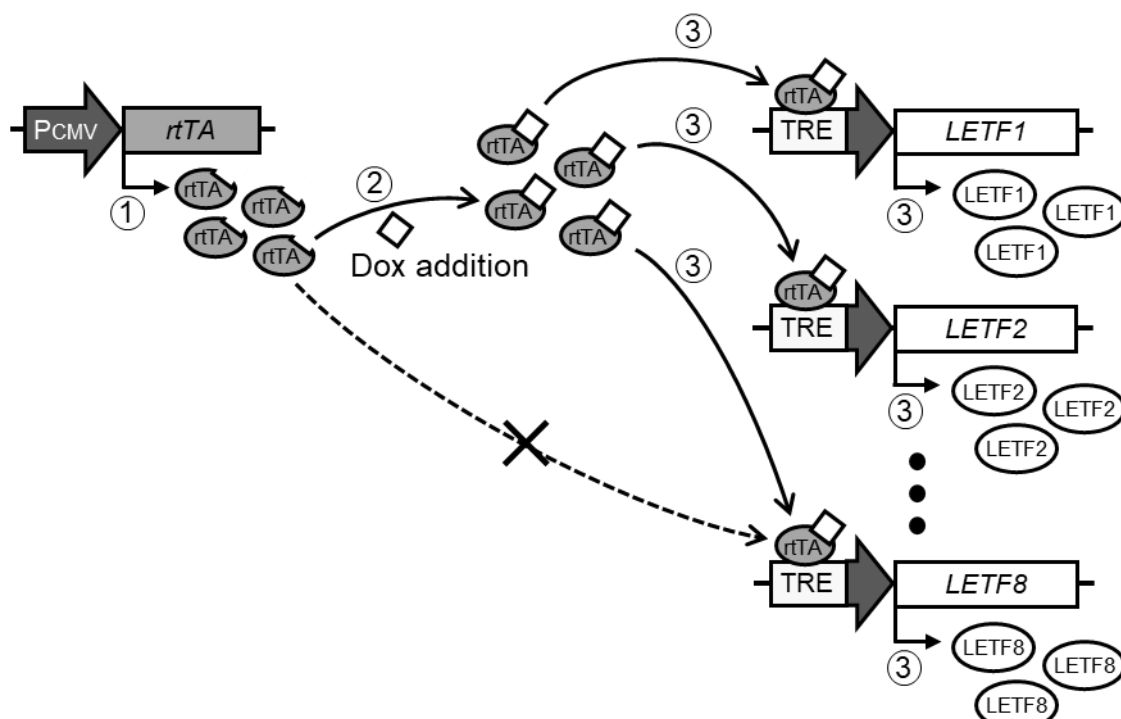


Fig. 5 Schematic diagram for liver-enriched transcription factors (LETFs) overexpression of Hepa/8F5 cells. EGFP, enhanced green fluorescent protein; PCMV, CMV promoter; rtTA, reverse tetracycline-responsive transactivator; TRE, tetracycline-responsive element sequence.

2.2 本章の目的

本章では、Hepa/8F5 細胞を遺伝子改変することで、加温によって高肝機能を誘導可能とすることを目的とした。まず、加温を遺伝子発現のスイッチとするために、TRE/PCMV_{min} と HSP70B' プロモーターを組み合わせた、転写増幅を伴う合成プロモーターを構築し、Hepa/8F5 細胞へと導入した。次に、遺伝子導入バルク細胞を様々な条件で加温し、生細胞数と CYP3A4 活性のバランスを考慮して最適な加温条件を決定した。続いて、遺伝子導入バルク細胞から限界希釈法によってクローン細胞を取得し、決定した条件で加温を与え、最も高い CYP3A4 活性を示すクローン細胞を選抜した。さらに、選抜したクローン細胞を加温し、細胞形態の観察および生細胞数、アルブミン分泌能、アンモニア除去能、CYP3A4

活性を経時的に測定した。機能性肝細胞をバイオ人工肝臓や肝毒性・薬物動態評価系へと用いる際、誘導された肝機能を長期間持続することが重要となる。そのため、肝機能が誘導されていない細胞の増殖を抑制することで肝機能を持続できるかどうか調べるために、マイトマイシンCを添加して培養を行った。

本研究では、3つの肝機能を測定した。アルブミンは、血液中に100種類以上存在しているタンパクのうち最も多い60%を占めるタンパクであり、主に肝臓で産生される。そのはたらきは、血液中の水分をとどめて血管内の浸透圧を維持したり、血管内の物質の運搬や保持をしたりすることである。そのため、血液中のアルブミン量が低下すると、血管の外に水分が漏れ出て、全身のむくみ、腹水や胸水などの症状を引き起こす。アンモニアは、体内でグルタミンやアミノ酸の代謝等によって産生され、肝臓で尿素に変換され、体外へと排泄される。肝機能が低下し、血液中のアンモニア濃度が上昇すると、高アンモニア血症、肝性脳症を引き起こす。CYP3A4はシトクロム450の一種であり、人体に存在する生体異物を代謝する主要な酵素の一つである。

2.3 実験方法

(1) 遺伝子発現システムの設計

本研究で設計した温熱誘導型遺伝子発現システムでは、まず、加温をスイッチとしてHSPプロモーターが活性化されtTAが発現する。発現したtTAが下流のTRE/PCMV_{min}プロモーターを活性化すると、新たにtTAが発現する。これによって、tTA発現のポジティブフィードバックループが成立し、tTAが持続的に大量生産される。このtTAがHepa/8F5細胞に導入されているLETF遺伝子上流のTRE/PCMV_{min}プロモーターを活性化すると、LETFが過剰発現し、肝機能が向上する (Fig. 6)。また、遺伝子導入細胞の選抜のために、ピューロマイシン耐性遺

伝子を組み込んでいる。

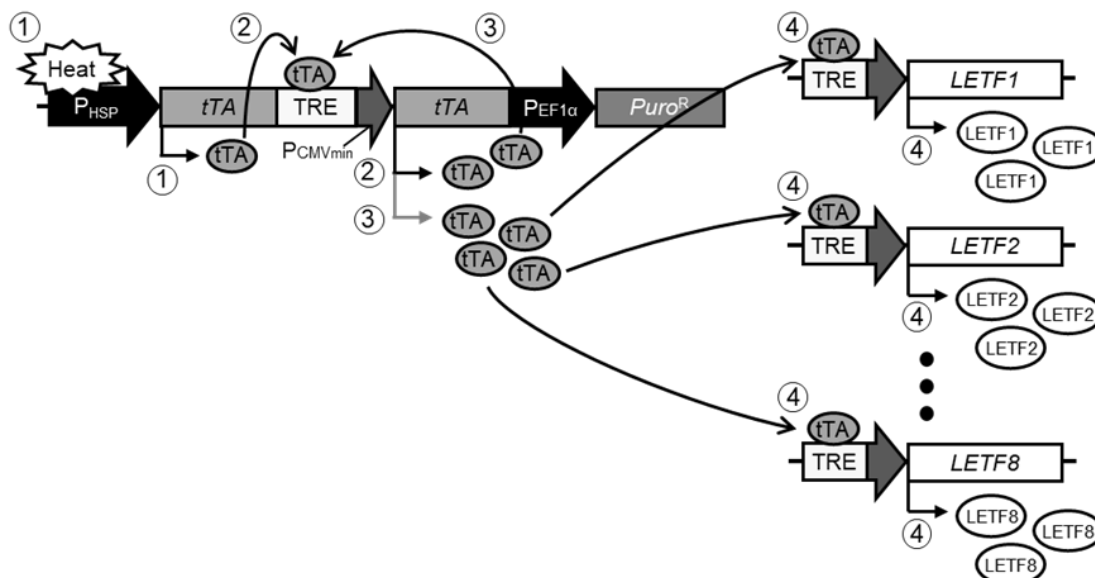


Fig. 6 Schematic diagram of the heat-inducible expression of liver-enriched transcription factor genes mediated by an artificial transactivator with transcriptional amplification. P_{HSP} , HSP70B' promoter; tTA, tetracycline transactivator; TRE, Tet-responsive element sequence; P_{CMVmin} , CMV minimum promoter; $P_{EF1\alpha}$, EF1 α promoter; $Puro^R$, Puromycin resistance gene; $LETF$, liver-enriched transcription factor gene.

(2) トランスポゾンベクターの作製

$PB/P_{HSP-tTA-TRE-tTA-P_{EF1\alpha}-Puro^R}$ のコンストラクトとその作製手順を Fig. 7 に示す。まず、 $pUC57/P_{HSP-tTA-TRE-tTA}$ (Genewiz) を *SpeI* と *EcoRV*、 $PB513B-1$ (System Biosciences) を *SpeI* と *NruI* によってそれぞれ制限酵素処理し、目的遺伝子断片を回収し、CIAP 処理 (DNA5'末端の脱リン酸化処理) を行った。得られた 2 断片を用いてライゲーション反応を行い、 $PB/P_{HSP-tTA-TRE-tTA-P_{EF1\alpha}-Puro^R}$ を作製した。

第二章 加温によって高肝機能を誘導可能なマウスヘパトーマ細胞の開発

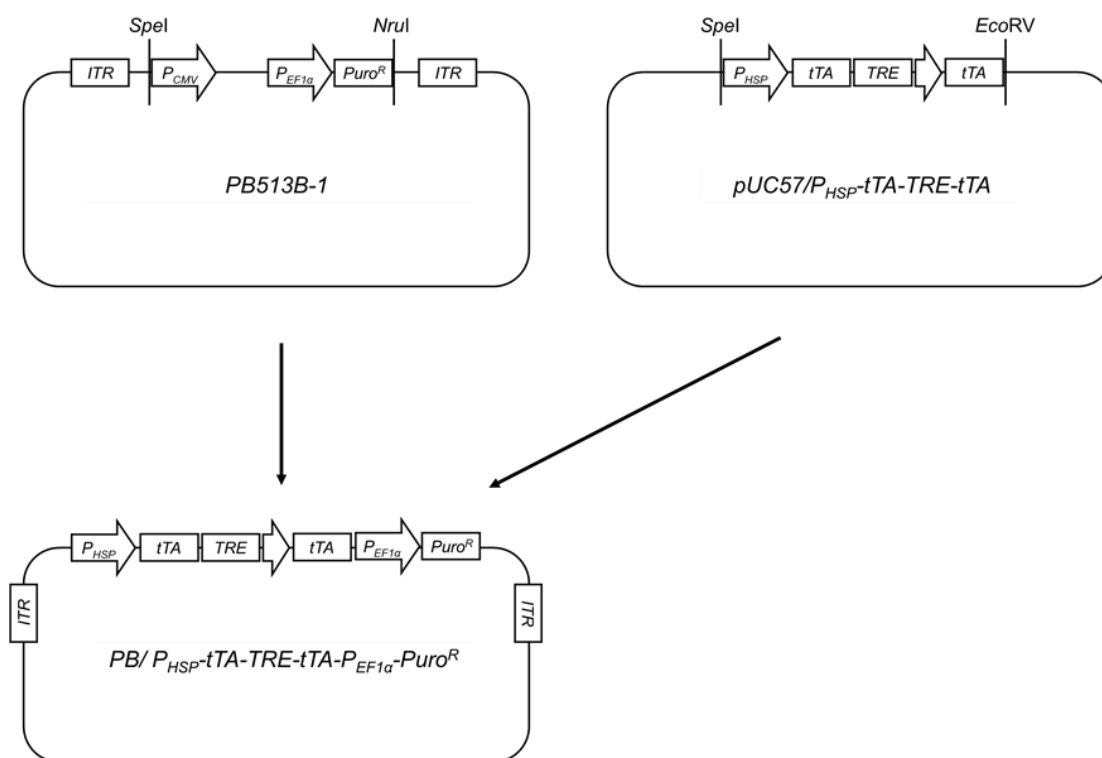


Fig. 7 Flowchart for the construction of PB/PHSP-tTA-TRE-tTA-P_{EF1 α} -Puro^R.

(3) マウスヘパトーマ細胞の培養

遺伝子組換えマウスヘパトーマ細胞を 10%牛胎児血清および 0.1 mg/mL ストレプトマイシン硫酸塩 (Fujifilm Wako Pure Chemical)、100 U/mL ベンジルペニシリンカリウム (Fujifilm Wako Pure Chemical) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (DMEM、Sigma-Aldrich) を用いて、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。

(4) 遺伝子導入および株構築

Hepa/8F5 細胞を 6 well plate (Thermo Fisher Scientific) に 8.4×10^5 cells/well で播種し、翌日に pCMV/transposase (大坪大征氏より供与) および PB/PHSP-tTA-TRE-tTA-PEF1 α -PuroR を Lipofectamine3000 (Invitrogen) を用いて、共導入した。遺伝

第二章 加温によって高肝機能を誘導可能なマウスヘパトーマ細胞の開発

子導入 48 時間後に 100 mm dish (Thermo Fisher Scientific) に 8.8×10^3 cells 播種し、翌日から 10 日間、遺伝子導入細胞選抜のために 10 mg/mL ピューロマイシン (Thermo Fisher Scientific) 含有培地を用いて培養した。形成されたコロニーを単離し、遺伝子導入細胞株を取得した。

(5) 加温条件の検討

遺伝子導入バルク細胞を 24 well plate (Thermo Fisher Scientific) に 2.0×10^4 cells/well で播種した。翌日 (Day 0) に、24 well plate の内部に水が入らないようビニールテープで密封し、41°C、43°C、45°C となった恒温水中にプレートを 0.5、1、1.5 時間沈めることで加温した。加温後、プレートを 37°C、5%CO₂ インキュベーター内へと直ちに戻した。偶数日に培地交換を行い、5 日目にトリパンブルー色素排除法による細胞計数および CYP3A4 活性測定を行った。

(6) 細胞形態の観察

遺伝子導入マウスヘパトーマ細胞を 6 well plate に 1.0×10^5 cells/well で播種し、0.1 µg/mL Dox (Sigma-Aldrich) の存在下、非存在下で培養した。加温ありの条件においては、播種翌日 (Day 0) に細胞を 43°C の恒温槽に 1 時間沈めた。培地は 1 日おきに交換した。Day 5 に細胞を 4%パラホルムアルデヒド (奈良病理研究所) で 15 分間固定し、0.1% Triton X-100 (Fujifilm Wako Pure Chemical) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 10 分間透過処理した。次に 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen) を加え 15 分間インキュベートし、PBS で 3 回洗浄した後、BZ-X810 蛍光顕微鏡 (Keyence) を用いて細胞を観察した。

(7) 肝機能の測定

遺伝子導入マウスヘパトーマ細胞を 24 well plate に 2.0×10^4 cells/well で播種し、0.1 $\mu\text{g/mL}$ Dox (Sigma-Aldrich) の存在下、非存在下で培養した。加温ありの条件においては、播種翌日 (Day 0) に細胞を 43°C の恒温槽に 1 時間沈めた。Day 0,2,4,6,8 に培地交換を行い、Day 5,7,9 の時点で培養培地上清を回収し、 -80°C で保存して解析に用いた。24 時間内に細胞が分泌したアルブミン量を、培養上清より Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定した。測定は Mouse Albumin ELISA Quantitation Set (Bethyl) を用い、製品プロトコールに基づいて行った。Coating antibody (goat anti-mouse albumin) は、0.1 M 炭酸ナトリウムと 0.1 M 炭酸水素ナトリウムを 8:17 の比で混合したバッファー (pH 9.6) により、100 倍に希釈して用いた。プレートは 96 well ELISA plate (AGC Techno Glass) を用いた。洗浄は 0.05 % Tween 20 (Fujifilm Wako Pure Chemical) 含有 PBS (PBS-T) を用い、ImmunoWash (Bio-rad) を使用して 3 回ずつ行った。ブロッキング処理には、スキムミルク粉末 (Fujifilm Wako Pure Chemical) を PBS-T に溶かした 2% スキムミルク溶液を用いた。HRP detection antibody (goat anti-mouse albumin-HRP conjugate) は PBS-T で 35,000 倍に希釈して使用した。酵素反応の基質には、o-フェニレンジアミン (Fujifilm Wako Pure Chemical) を用い、過酸化水素 (Fujifilm Wako Pure Chemical) を触媒として酵素反応を進行させた。酵素反応の停止には 8M 硫酸を用い、吸光度は 490 nm の波長で測定した。

アンモニア除去能測定においては、Day 5,7,9 の時点で 2 mM NH_4Cl (Fujifilm Wako Pure Chemical) を含む新鮮な培地 (500 $\mu\text{L/well}$) に交換し、さらに 6 時間培養した上清を回収した。培地中のアンモニア濃度は、アンモニアテストワコー (Fujifilm Wako Pure Chemical) を用いて、製品プロトコールにしたがって測定した。

CYP3A4 活性測定においては、Day 5,7,9 の時点で 3.0 μM Luciferin-IPA (Promega)

含有培地 (300 μ L/well) に交換し、さらに 1 時間培養した培養液を回収した。ルシフェラーゼ (Luciferin Detection Reagent, Promega) を添加して CYP3A4 酵素が生成したルシフェリンと反応させ、Glo-max Luminometer (Promega) を用いて発光強度を測定した。

(8) マイトマイシン C 処理実験

上記肝機能測定実験における Day 6 に、10 μ g/mL マイトマイシン C (Nacalai Tesque) 含有培地にて細胞を 2 時間インキュベート後、新鮮な培地に交換した。Day 9 に生細胞数およびアルブミン分泌能、CYP3A4 活性を測定した。

2.4 結果と考察

(1) 加温条件の検討

まず、肝機能誘導のための加温条件を決定するために、遺伝子導入バルク細胞に対して 41°C、43°C、45°C で 0.5、1、1.5 時間加温を与えた。Fig. 8A および 8B は、それぞれ加温 5 日後の生細胞数および CYP3A4 活性を示している。41°C での加温においては、加温時間に関わらず細胞生存率に大きな影響を与えなかったが、45°C で 30 分加温すると細胞生存率が低下し、1 時間以上の加温では細胞死が生じた。CYP3A4 活性は、43°C での加温において有意に向上し、特に 1 時間の加温では約 48 倍向上した。したがって、肝機能誘導の条件を 43°C で 1 時間の加温に決定した。

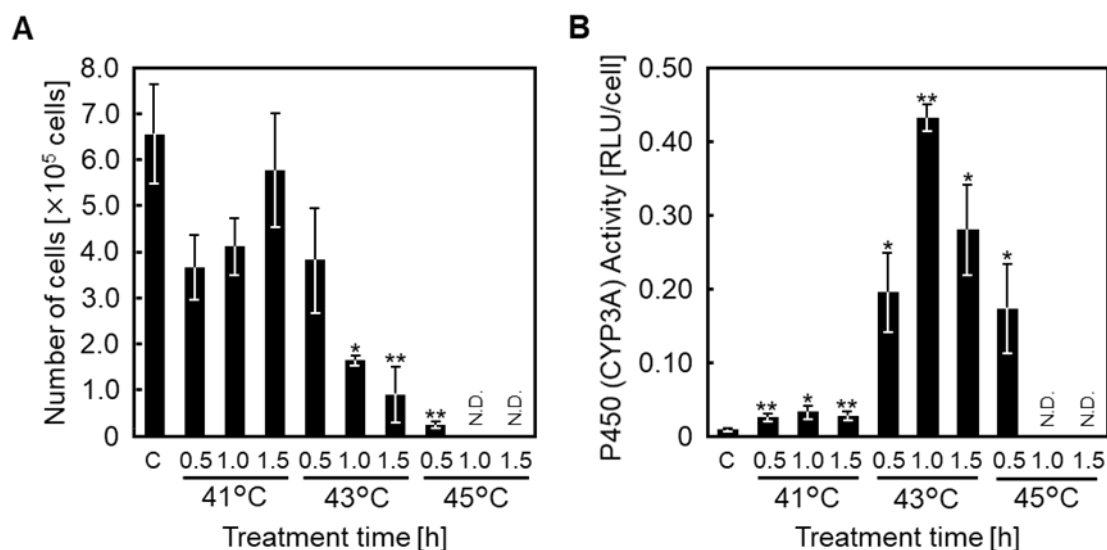


Fig. 8 Determination of optimum heat-shock conditions. Cells were cultured at 37°C (control) or exposed to heat-shock at 41, 43 or 45°C for 0.5, 1 or 1.5 h. Five days after heat-shock, (A) the number of viable cells and (B) cytochrome P450 activity were measured for each condition. Data are presented as means \pm standard deviations ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control by the Student's t -test. C, control; N.D., not detected.

(2) 高肝機能誘導株の選抜

次に、遺伝子導入バルク細胞から単離したクローン細胞に加温を与え、5日後に細胞数と CYP3A4 活性を測定した (Fig. 9)。多くのクローンで細胞増殖の抑制および CYP3A4 活性の向上が見られ、向上の程度はクローン間で異なっていた。これは、トランスポゾンベクターが細胞のゲノムにランダムに導入遺伝子を組み込むためであり、遺伝子導入バルク細胞には、加温に対する導入遺伝子の発現挙動が異なる様々な細胞が混在していたと考えられる。したがって、遺伝子導入バルク細胞からクローン細胞を樹立することで、CYP3A4 活性が特に向上したクローン#13 を取得することができ、この細胞を Hepa/HS と名付け、以降の実験に用いた。

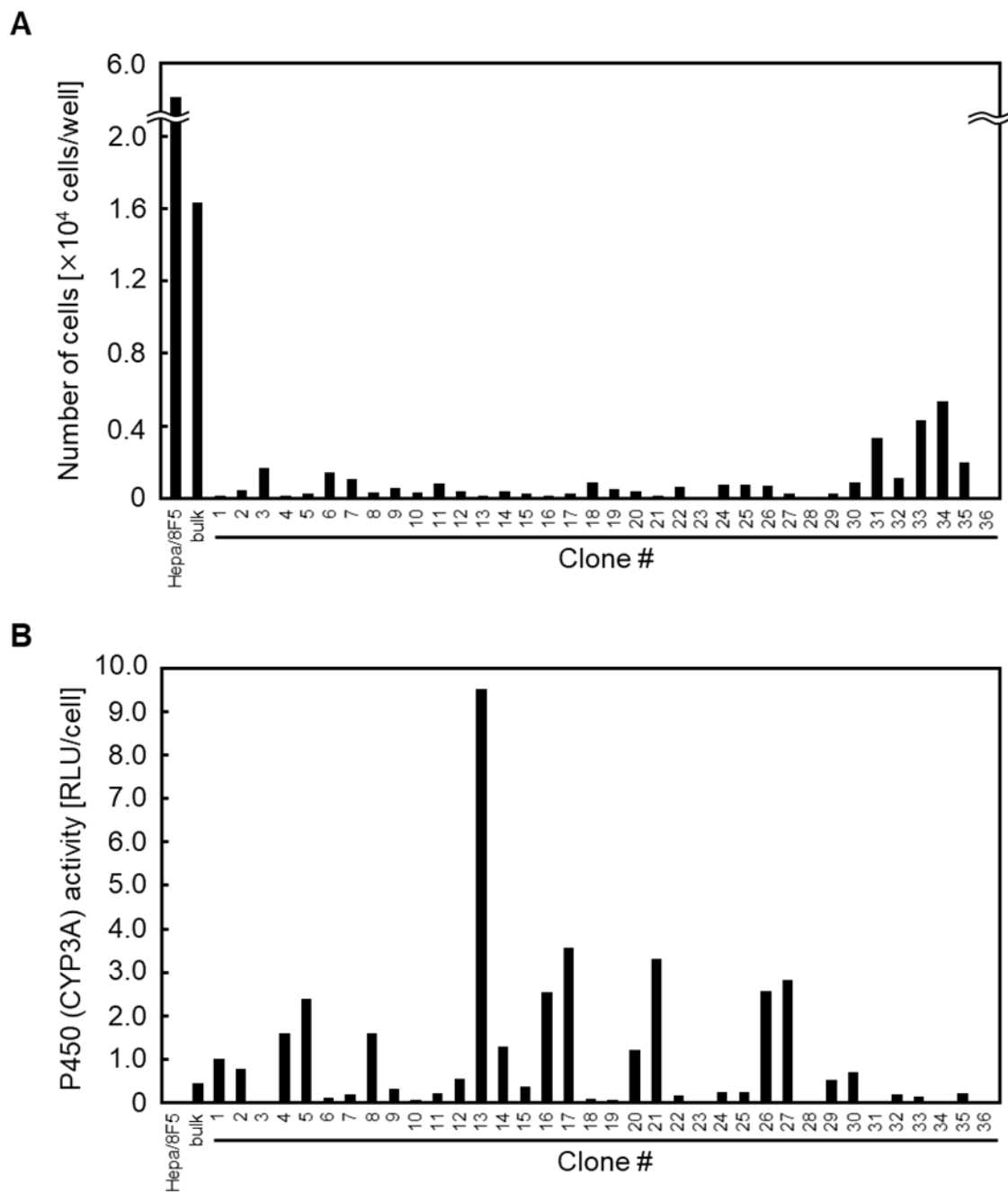


Fig. 9 The viability and cytochrome P450 activity of transduced clones with heat-shock. (A) The number of viable cells and (B) cytochrome P450 activity were measured on day 5 after heat-shock. “Bulk” represents the transduced cell pool before cloning. RLU, relative light units.

(3) 細胞形態および増殖性の観察

次に、Hepa/8F5 細胞および Hepa/HS 細胞の加温および Dox の有無による細胞形態および増殖性を観察した (Fig. 10 and 11)。通常の場合では、Hepa/8F5 細胞と Hepa/HS 細胞は旺盛に増殖し、培養 5 日目には 100%コンフルエントに達し、この時の細胞数はそれぞれ約 8×10^5 cells/well、約 1.4×10^6 cells/well であった。この細胞数の違いは、細胞の大きさが異なることに起因する。43°C で 1 時間加温した Hepa/8F5 細胞は、細胞の形態に変化はなく、7 日目には 100%コンフルエントに達し、依然として増殖性を維持していた。一方、Hepa/HS 細胞は、加温により増殖が抑制され、培養初代肝細胞で報告されているように、細胞サイズの増大や二核細胞の出現が観察された[107]。これらの結果から、加温によって Hepa/HS 細胞では LETF の過剰発現が誘導され、細胞増殖の抑制や肝細胞様への形態変化が生じることが明らかになった。

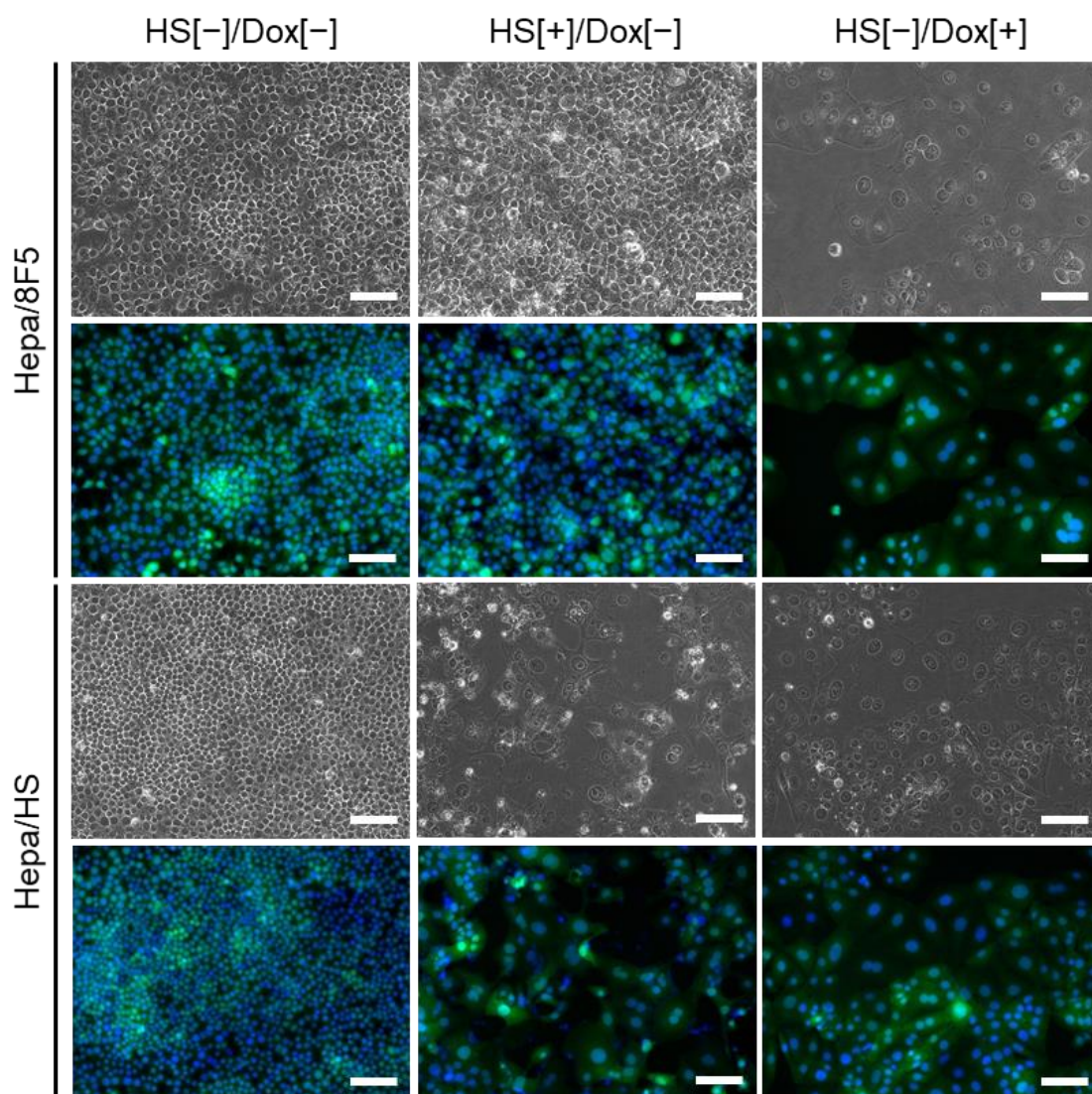


Fig. 10 Microscopy images showing the morphology of Hepa/8F5 and Hepa/HS cells. Bright-field (upper) and fluorescence (lower) micrographs cells after 5 days of culture with no treatment (HS[-]/Dox[-]), with heat-shock (HS[+]/Dox[-]) or with the addition of doxycycline (HS[-]/Dox[+]). Expression of enhanced green fluorescent protein, which indicates the shapes of cells, and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining (blue) were merged in fluorescence micrographs. Scale bars = 100 μ m. HS, heat-shock; Dox, doxycycline.

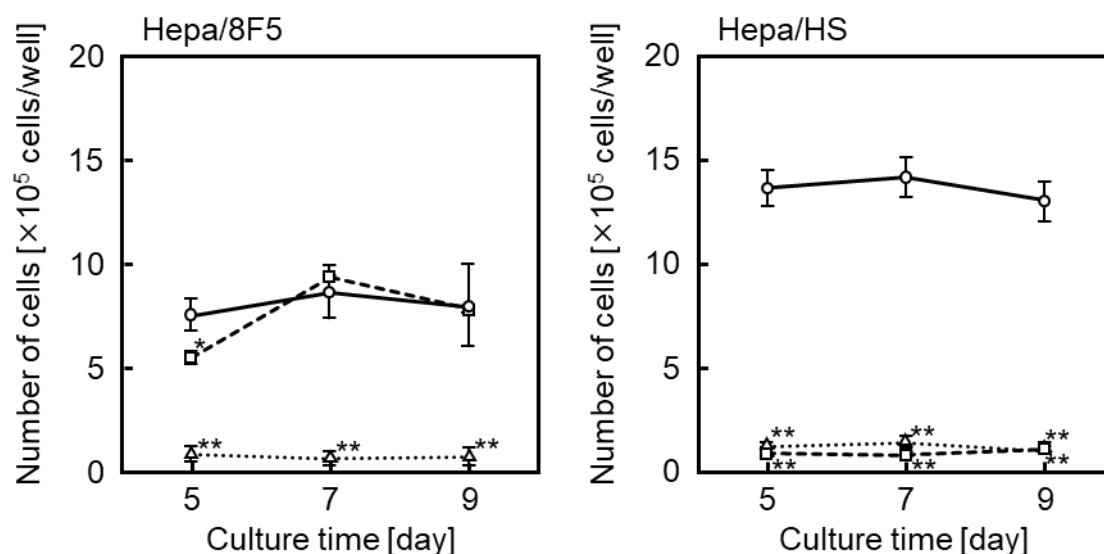


Fig. 11 Graphs of the total numbers of cells on days 5, 7 and 9 of culture with no treatment (circles), heat-shock (squares) or doxycycline addition (triangles). Data are presented as means \pm standard deviations ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. untreated by Student's t -test. HS, heat-shock; Dox, doxycycline.

(4) 肝機能の測定

次に、Hepa/8F5 細胞および Hepa/HS 細胞の加温および Dox の有無による肝機能を測定した。Hepa/8F5 細胞では、Dox 添加によってアルブミン分泌能およびアンモニア除去能、CYP3A4 活性が向上したが、加温による影響は見られなかった。一方、Hepa/HS 細胞では、Dox 添加だけでなく加温によってもこれらの肝機能が向上した (Fig. 12)。また、Hepa/8F5 細胞では、通常の培養条件および加温条件においては、アミノ酸代謝に起因すると考えられるアンモニアの産生が見られた。これらの結果から、Hepa/HS 細胞では、温熱誘導型遺伝子発現システムの導入によって、加温によっても Dox 添加と同様に LETF を過剰発現させ、高肝機能を誘導可能であることがわかった。

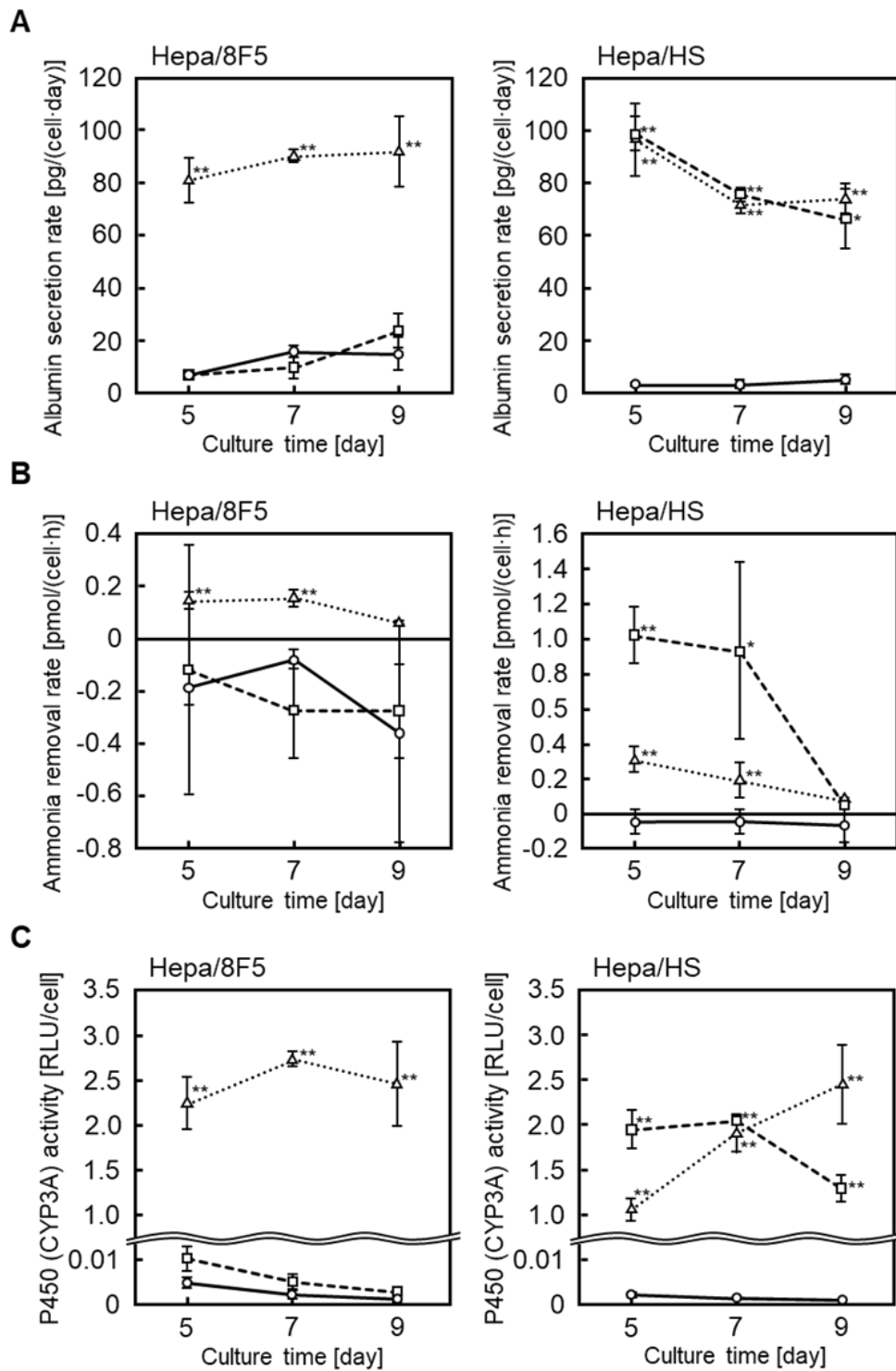


Fig. 12 Liver function analyses of Hepa/8F5 and Hepa/HS cells. (A) The albumin secretion rate, (B) the ammonia removal rate and (C) cytochrome P450 activity were measured on days 5, 7 and 9 of culture for untreated (circles), heat treated (squares) or doxycycline exposed cells (triangles). Data are presented as means \pm standard deviations ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. untreated by Student's t -test.

(5) マイトマイシン C 処理による肝機能の維持

Hepa/HS 細胞において、加温によって誘導された肝機能は、培養 9 日目には低下が見られた。そこで、培養 6 日目にマイトマイシン C 処理を開始して細胞増殖を抑制した。その結果、アルブミン分泌能と CYP3A4 活性レベルを 9 日間維持することができた (Fig. 13)。この結果から、加温による tTA 転写のポジティブフィードバックループが十分ではなく、増殖状態から肝機能発現状態へと切り替わっていない一部の細胞が徐々に増殖し、全体として肝機能が低下していることが示唆された。また、加温による tTA ポジティブフィードバックループが十分に誘導された細胞は、9 日目においても肝機能を維持していることがわかった。

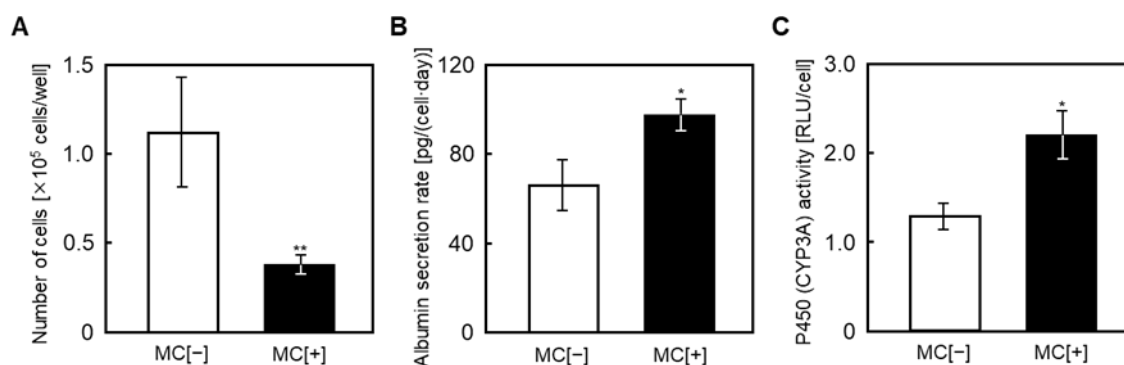


Fig. 13 The effect of mitomycin C treatment on heat-induced liver function of Hepa/HS cells in prolonged culture. (A) The number of cells, (B) the albumin secretion rate and (C) cytochrome P450 activity were measured on day 9 of culture with (MC[+]) or without (MC[-]) mitomycin C treatment. Data are presented as means \pm standard deviations ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. untreated by Student's t -test. MC, mitomycin C; RLU, relative light units.

2.5 本章のまとめ

本章では、温熱誘導型遺伝子発現システムを構築し、Hepa/8F5 細胞へと導入

第二章 加温によって高肝機能を誘導可能なマウスヘパトーマ細胞の開発

した。最初に、遺伝子導入バルク細胞を用いて、加温による肝機能誘導確認および加温条件検討を行った。その結果、構築したシステムが期待通りにはたらし、遺伝子導入バルク細胞は加温に応じて CYP3A4 活性が向上した。43°C での 1 時間の加温によって最も高い CYP3A4 活性が誘導され、加温なしと比較して約 48 倍向上した。次に、遺伝子導入バルク細胞からクローン細胞を樹立した。その結果クローン#13 (Hepa/HS 細胞) は、加温に応じて細胞増殖が抑制され、肝細胞様形態へと変化し、アルブミン分泌能、アンモニア除去能、CYP3A4 活性が顕著に向上した。誘導された肝機能は 9 日目において低下が観察されたが、マイトマイシン C 処理により細胞増殖を抑制したところ、9 日目においても機能を維持することができた。したがって、加温による tTA ポジティブフィードバックループが十分に誘導された細胞は、9 日目においても肝機能を維持していることがわかった。Hepa/HS 細胞は通常の培養条件で容易に増殖し、高価なサイトカインや低分子薬剤の添加を必要とせず、一度の加温によって高い肝機能を誘導し、持続することが可能である。したがって、マウス由来細胞であるため、その機能の一部がヒト細胞と異なることが考えられるものの、BAL システムや肝毒性・薬物動態評価系への利用が期待できる。

第三章 加温によって高肝機能を誘導可能なヒトヘパトーマ細胞の開発

3.1 緒言

本論文では、第二章において加温によって高肝機能を誘導可能なマウスヘパトーマ細胞株を樹立した。しかし、ヒト細胞と動物細胞の間には種の違いによる、異種免疫反応やタンパク質型の違い、薬物毒性結果の不一致などが存在する。そのため、肝細胞をバイオ人工肝臓や肝毒性・薬物動態評価系、肝疾患モデルへと利用する際には、ヒト由来細胞を用いる方が望ましい。本章では、様々な肝細胞研究において一般的に使用されているヒトヘパトーマ細胞である HepG2 細胞を、遺伝子改変によって高肝機能化することを試みた。ヘパトーマ細胞の肝機能を向上させるための方法としては、高肝機能誘導型マウスヘパトーマ細胞での実績がある 8 種類の LETF 遺伝子 (HNF-1 α 、HNF-1 β 、HNF-3 β 、HNF-4 α 、HNF-6、C/EBP- α 、C/EBP- β 、C/EBP- γ) のヒト型を使用した。肝臓では肝特異的転写因子が高度に発現され、互いに転写ネットワークを形成しつつ、肝機能に関連する様々な遺伝子発現を調節し、肝細胞表現型を作り上げている。中でも、これら 8 種類の LETF は相互作用の上流に位置しているため、これらの因子の過剰発現により、ヒト細胞においても肝機能を全体的に向上させることが期待できる。また、LETF 遺伝子の発現制御にもマウスヘパトーマ細胞に用いた、TRE/P_{CMVmin} と HSP70B'プロモーターを組み合わせた、転写増幅を伴う合成プロモーターを採用した。我々の研究室では以前に、温熱誘導型合成プロモーターを導入したヒトヘパトーマ (HepG2-HSP) 細胞を開発している[105]。

3.2 肝特異的転写因子遺伝子導入細胞株の構築と肝機能評価

3.2.1 本節の目的

本節では、HepG2-HSP 細胞へと LETF 遺伝子を導入することで、加温に応じて高肝機能を誘導可能なヒトヘパトーマ細胞を樹立することを目的とした。HepG2-HSP 細胞は、加温に応じて人工転写因子および EGFP を持続的に高発現する (Fig. 14A)。まず、LETF 遺伝子が入っていない HepG2-HSP 細胞を用いて加温条件の検討を行った。次に、LETF 遺伝子発現を加温によって制御するために、TRE/P_{CMVmin} 制御下に LETF 遺伝子が存在する 2 つのトランスポゾンベクターを構築し、HepG2-HSP 細胞へと導入した (Fig. 14B)。続いて遺伝子導入バルク細胞に対して加温を与え、ヒトヘパトーマ細胞における 8 種類の LETF 遺伝子の過剰発現による影響を評価した。また、遺伝子導入細胞からクローン細胞を取得し、最も高いアルブミン分泌能が発揮されるクローンを樹立した。さらに、選抜したクローン細胞を加温し、細胞形態の観察および生細胞数、アルブミン分泌能、アンモニア除去能、CYP3A4 活性を経時的に測定した。最後に EGFP 蛍光強度を利用して、高肝機能発現細胞を分取し、肝機能測定を行った。



Fig. 14 (A) Schematic diagram of heat-inducible expression with transcriptional amplification. (B) Construction of transposon vectors for LETFs introduction. Each LETF gene is linked by a 2A peptide sequence and is co-expressed by a single promoter. To select the transduced cells, the two vectors include a puromycin resistance (Puro^R) gene and a blasticidin resistance (Bla^R) gene under the control of the elongation factor 1 alpha (EF1 α) promoter, respectively. HNF, hepatocyte nuclear factor; C/EBP, CCAAT/enhancer binding protein.

3.2.2 実験方法

(1) 加温条件の検討

HepG2-HSP 細胞を collagen-coated 24-well plate (AGC Techno Glass) に 4.0×10^4 cells/well で播種した。翌日 (Day 0) に、24 well plate の内部に水が入らないようビニールテープで密封し、41°C、42°C、43°C、44°C となった恒温水中にプレートを 0.5、1、2 時間沈めることで加温した。加温後、プレートを 37°C、5%CO₂ インキュベーター内へと直ちに戻した。偶数日に培地交換を行い、5 日目に生細胞数および EGFP 陽性細胞の割合を測定した。生細胞数はトリパンブルー色素排除法によりカウントし、EGFP 発現量はセルソーターSH800 (Sony) を用いて

測定した。

(2) トランスポゾンベクターの作製

tTA を介した 8 つの LETF 遺伝子の発現系の導入には、PiggyBac トランスポゾンベースとした 2 つのトランスポゾンベクター (PB/TRE-hHNF1 α -hHNF3 β -hCEBP α -hCEBP β -hCEBP γ -P_{EF1 α} -Puro^R および PB/TRE-hHNF1 β -hHNF4 α -hHNF6-P_{EF1 α} -Bla^R) を用いた。各 LETF 遺伝子は 2A ペプチド配列で連結されており、単一のプロモーターで発現している。また、2 つのベクターにはそれぞれ、EF1 α プロモーター制御下にピューロマイシン耐性遺伝子とブラストサイジン耐性遺伝子あり、遺伝子導入細胞を選抜することができる。2 つのトランスポゾンベクターの作製法を以下に示す。

<PB/TRE-hHNF1 α -hHNF3 β -hCEBP α -hCEBP β -hCEBP γ -P_{EF1 α} -Puro^R の作製>

PB/TRE-hHNF1 α -hHNF3 β -hCEBP α -hCEBP β -hCEBP γ -P_{EF1 α} -Puro^R のコンストラクトとその作製手順を Fig. 15 に示す。まず、目的遺伝子配列の格端に制限酵素認識サイトを付加したプラスミド DNA の合成を pUC57/TRE-hHNF1 α は Genewiz に、pMA-T/hCEBP α -hCEBP β -hCEBP γ -P_{EF1 α} -Puro^R および pMA-T/hHNF3 β は Invitrogen に委託した。PB/P_{HSP}-tTA-TRE-tTA-P_{EF1 α} -Puro^R および pMA-T/hCEBP α -hCEBP β -hCEBP γ -P_{EF1 α} -Puro^R を制限酵素 *SpeI* および *NheI* によって切断し、2 つの DNA 断片を回収した。以上の 2 断片を LigaFastTM Rapid DNA Ligation System (Promega) 用いてライゲーション反応を行い、組み換え中途産物 PB/hCEBP α -hCEBP β -hCEBP γ -P_{EF1 α} -Puro^R を作製した。次に、PB/hCEBP α -hCEBP β -hCEBP γ -P_{EF1 α} -Puro^R および pMA-T/hHNF3 β を制限酵素 *BglII* および *EcoRI* を用いて切断し、目的 DNA 断片を回収した。以上の 2 断片を用いてライゲーション反応を行い、組み換え中途産物 PB/hHNF3 β -hCEBP α -hCEBP β -hCEBP γ -P_{EF1 α} -Puro^R を作製した。

第三章 加温によって高肝機能を誘導可能なヒトヘパトーマ細胞の開発

続いて、PB/hHNF3 β -hCEBP α -hCEBP β -hCEBP γ -P_{EF1 α} -Puro^Rを制限酵素 *SpeI*および *BgIII*によって切断し、同様に pUC57/TRE-hHNF1 α を制限酵素 *SpeI*および *BamHI*によって切断した。得られた2つのDNA断片を用いてライゲーション反応を行い、PB/TRE-hHNF1 α -hHNF3 β -hCEBP α -hCEBP β -hCEBP γ -P_{EF1 α} -Puro^Rを作製した。作製した PB/TRE-hHNF1 α -hHNF3 β -hCEBP α -hCEBP β -hCEBP γ -P_{EF1 α} -Puro^Rは、QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen) を用いたカラム抽出により精製した。

第三章 加温によって高肝機能を誘導可能なヒトヘパトーマ細胞の開発

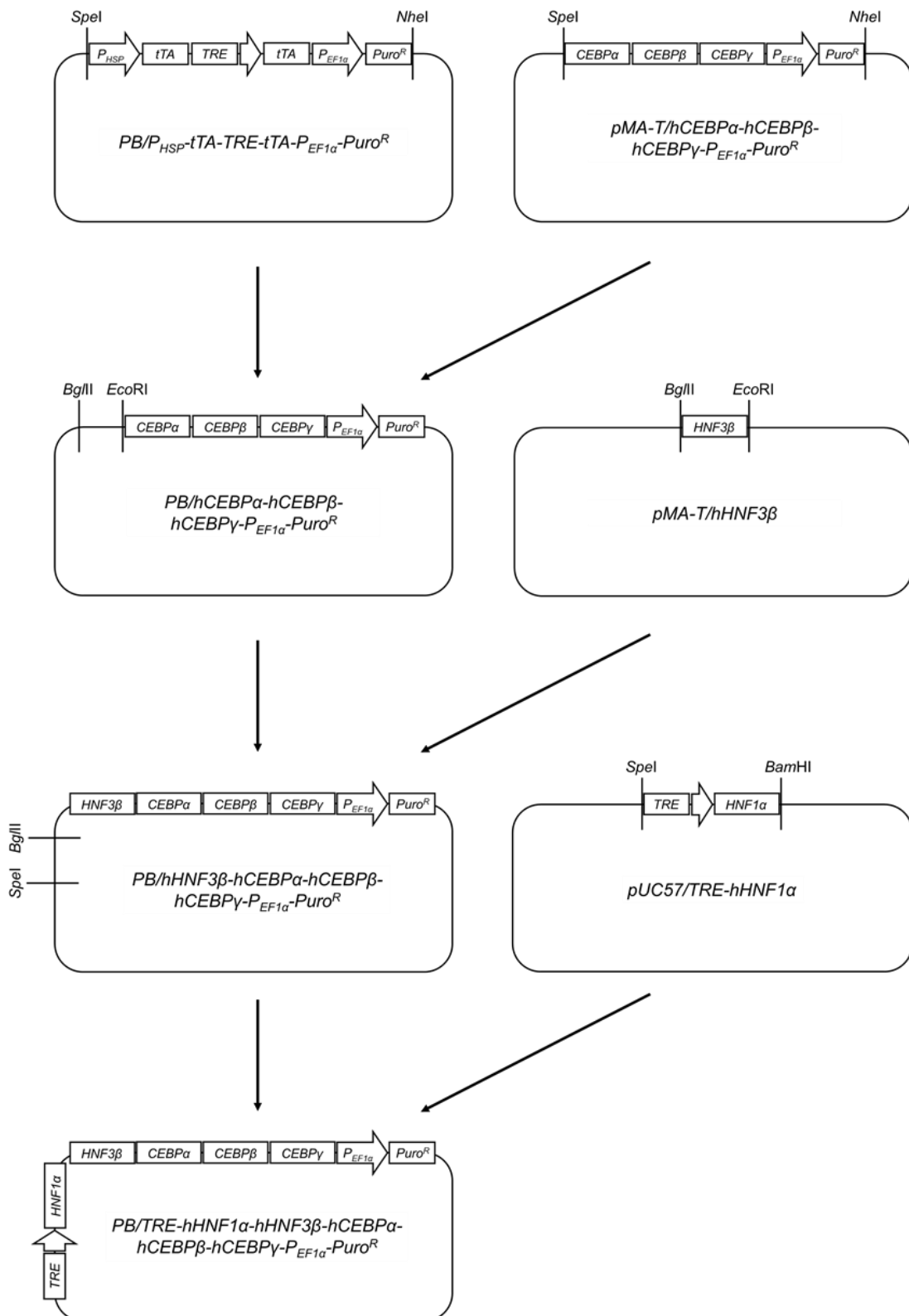


Fig. 15 Flowchart for the construction of PB/TRE-hHNF1α-hHNF3β-hCEBPα-hCEBPβ-hCEBPγ-P_{EF1α}-Puro^R.

< PB/TRE-hHNF1 β -hHNF4 α -hHNF6-P_{EF1 α} -Bla^R の作製 >

PB/TRE-hHNF1 β -hHNF4 α -hHNF6-P_{EF1 α} -Bla^R のコンストラクトとその作製手順を Fig. 16 に示す。まず、目的遺伝子配列の格端に制限酵素認識サイトを付加したプラスミド DNA、pMK-RQ-Bb/hHNF6-P_{EF1 α} -Bla^R および pMK-RQ-Bb/hHNF4 α 、pMA-T/hHNF1 β の合成を Invitrogen に委託した。PB/P_{HSP}-tTA-TRE-tTA-P_{EF1 α} -Puro^R および pMK-RQ-Bb/hHNF6-P_{EF1 α} -Bla^R を制限酵素 *Xba*I および *Hpa*I によって切断し目的 DNA 断片を回収した。以上の 2 断片を用いてライゲーション反応を行い、組み換え中途産物 PB/P_{HSP}-hHNF6-P_{EF1 α} -Bla^R を作製した。次に、PB/P_{HSP}-hHNF6-P_{EF1 α} -Bla^R および pMK-RQ-Bb/hHNF4 α を制限酵素 *Bgl*II および *Eco*RI を用いて切断し、2 つの DNA 断片を回収した。以上の 2 断片を用いてライゲーション反応を行い、組み換え中途産物 PB/P_{HSP}-hHNF4 α -hHNF6-P_{EF1 α} -Bla^R を作製した。次いで、PB/P_{HSP}-hHNF4 α -hHNF6-P_{EF1 α} -Bla^R を制限酵素 *Xba*I および *Bgl*II によって切断し、同様に pMA-T/hHNF1 β を制限酵素 *Xba*I および *Bam*HI によって切断し、2 つの DNA 断片を回収した。以上の 2 断片を用いてライゲーション反応を行い、組み換え中途産物 PB/P_{HSP}-hHNF1 β -hHNF4 α -hHNF6-P_{EF1 α} -Bla^R を作製した。続いて、PB/P_{HSP}-hHNF1 β -hHNF4 α -hHNF6-P_{EF1 α} -Bla^R および pUC57/TRE-hHNF1 α を制限酵素 *Spe*I および *Xba*I によって切断し、目的 DNA 断片を取得した。以上の 2 断片を用いてライゲーション反応を行い、PB/TRE-hHNF1 β -hHNF4 α -hHNF6-P_{EF1 α} -Bla^R を作製した。作製した PB/TRE-hHNF1 β -hHNF4 α -hHNF6-P_{EF1 α} -Bla^R は、カラム抽出により精製した。

第三章 加温によって高肝機能を誘導可能なヒトヘパトーマ細胞の開発

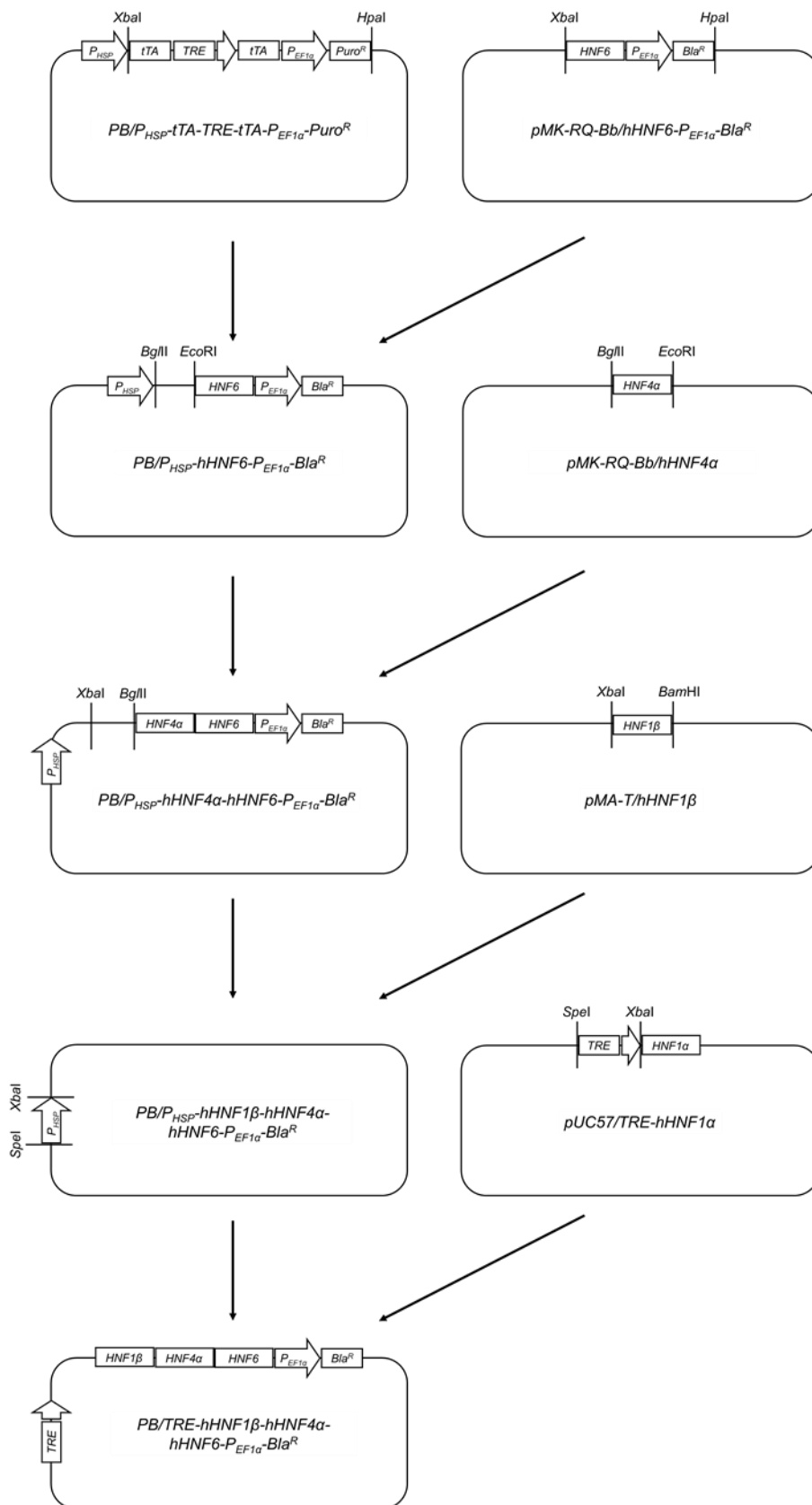


Fig. 16 Flowchart for the construction of *PB/TRE-hHNF1β-hHNF4α-hHNF6-PEF1α-Bla^R*.

(3) ヒトヘパトーマ細胞の培養

遺伝子組換えヒトヘパトーマ細胞を 10%牛胎児血清および 0.1 mg/mL ストレプトマイシン硫酸塩、100 U/mL ベンジルペニシリンカリウムを添加した DMEM high glucose を用いて、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。培養基材には collagen-coated dishes (AGC Techno Glass) を用いた。

(4) 遺伝子導入および株構築

HepG2-HSP 細胞を collagen-coated 6-well plate (AGC Techno Glass) に 4.0×10^5 cells/well で播種した。翌日、pCMV/transposase および 2 つのトランスポゾンベクター PB/TRE-hHNF1 α -hHNF3 β -hCEBP α -hCEBP β -hCEBP γ -P_{EF1 α} -Puro^R、PB/TRE-hHNF1 β -hHNF4 α -hHNF6-P_{EF1 α} -Bla^R を Lipofectamine3000 を用いて導入した。6 時間後に新鮮な培地へと交換した。遺伝子導入バルク細胞を取得するために、トランスフェクション 2 日後から 12 日間、10 μ g/mL ピューロマイシンおよび 5 μ g/mL ブラストサイジン (Thermo Fisher Scientific) 含有培地にて培養した。遺伝子導入バルク細胞から限界希釈法によって、クローン細胞を樹立した。

(5) 細胞形態の観察

ヒトヘパトーマ細胞を collagen-coated 24-well plate に 4.0×10^4 cells/well で播種した。翌日 (Day 0) に細胞を 43°C で 30 分間加温後、培地交換を行った。Day 3 において、4%パラホルムアルデヒドを用いて細胞を固定化し、0.1% Triton X-100 を含む PBS を用いて透過処理を行った。1%ウシ血清アルブミン (Fujifilm Wako Pure Chemical) 含有 PBS を用いてブロッキングした。次に、細胞を Human albumin Antibody affinity purified (Bethyl) 含有 PBS でインキュベートし、次いで rabbit

anti-goat IgG-R with rhodamine (sc-3945; Santa Cruz Biotechnology) 含有 PBS でインキュベートした。細胞核を DAPI で染色し、BZ-X810 蛍光顕微鏡を用いて細胞を観察した。

(6) EGFP 高発現細胞の分取

遺伝子改変ヒトヘパトーマ細胞を collagen-coated 100 mm dish (AGC Techno Glass) に細胞を播種し、細胞密度が 80% コンフルエントに達した時点で細胞を 43°C で 30 分間加温した。翌日 (Day 0)、EGFP の蛍光強度が高い細胞集団をセルソーターを用いて分取した。

(7) 肝機能の測定

ヒトヘパトーマ細胞を collagen-coated 24-well plate に 4.0×10^4 cells/well で播種した。翌日 (Day 0) に細胞を 43°C で 30 分間加温した。EGFP 高発現細胞を分取した条件においては、加温の翌日に、collagen-coated 24-well plate に 1.0×10^5 cells/well で播種した (Day 0)。また、培地は偶数日に交換した。アルブミン分泌能測定用の培養上清は、培地交換の 24 時間後に回収した。アンモニア除去能測定用の培養上清は、回収の 24 時間前に 2 mM NH_4Cl 含有培地 (500 μL /well) に交換した。CYP3A4 活性測定用の培養上清は、回収の 1 時間前に 3.0 μM Luciferin-IPA 含有培地 (300 μL /well) に交換した。これらのサンプルは -80°C で保存し、2.3(7) と同様の手順で解析を行った。ただし、アルブミン ELISA の際、一次抗体および二次抗体にはそれぞれ Coating antibody (goat anti-human albumin) および HRP detection antibody (goat anti-human albumin-HRP conjugate) を使い、二次抗体は 100,000 倍に希釈して使用した。

(8) ウェスタンブロッティング

HepG2/8F_HS 細胞を collagen-coated 100 mm dish に播種し、細胞が 80%コンフルエントに達した時点において 43°C で 30 分間加温した。加温から 3 日後、トリプシンを用いて細胞を剥離し、遠心分離にて回収した。1 mM の PMSF (Sigma-Aldrich) 含有 PBS に細胞を懸濁し、超音波で破碎した。細胞ライセートを Wes 自動キャピラリーウェスタンブロッティング (ProteinSimple) にセットした。Mouse monoclonal anti-HNF-1 α (sc-393668)、mouse monoclonal anti-HNF-1 β (sc-130407)、mouse monoclonal anti-HNF-3 β (sc-101060)、mouse monoclonal anti-HNF-4 α (sc-374227)、mouse monoclonal anti-HNF-6 (sc-376167)、mouse monoclonal anti-C/EBP- α (sc-166258)、mouse monoclonal anti-C/EBP- β (sc-7962)、mouse monoclonal anti-C/EBP- γ (sc-517003) を Santa Cruz Biotechnology から購入し、一次抗体として使用した。Anti-mouse secondary antibody (042-205; ProteinSimple) を二次抗体として用いた。

3.2.3 結果と考察

(1) 加温条件の検討

最初に、tTA ポジティブフィードバックループ誘導のための加温条件を決定するために、HepG2-HSP 細胞を 41、42、43、44°C で 0.5、1、2 時間加温した。各条件について、加温の 5 日後に生細胞数 (Fig. 17A) と EGFP 陽性細胞割合 (Fig. 17B) を測定した。加温によって EGFP の発現が誘導され、42°C で 2 時間、43°C で 1 または 2 時間、44°C で 0.5 時間の条件では、90%以上の細胞が EGFP 蛍光を示した。44°C で 1 または 2 時間の条件では、細胞死が生じたため、細胞数と EGFP 陽性細胞割合を測定できなかった。高い EGFP 陽性細胞率を示し、細胞増

殖への影響が少ないことから、43°Cでの30分間の加温を最適条件に決定した。

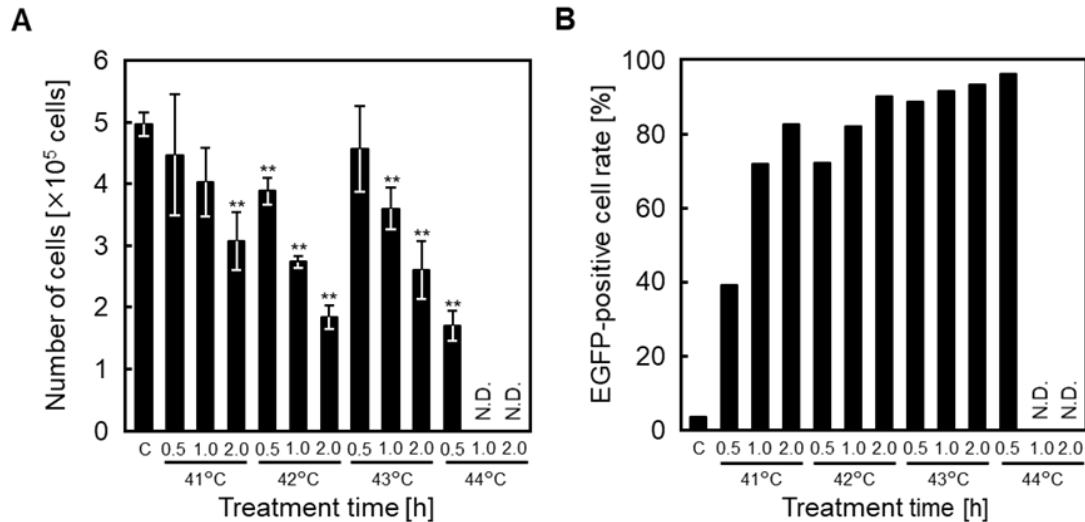


Fig. 17 Determination of optimal heat-shock (HS) conditions. Cells were consistently cultured at 37°C (control) or exposed to HS (41, 42, 43 or 44°C for 0.5, 1 or 2 h). Five days after HS, (A) the number of viable cells and (B) EGFP-positive cell rate were measured. Data are presented as means \pm standard deviations ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control by the Student's t -test. C, control; EGFP, enhanced green fluorescent protein; N.D., not detected.

(2) 高肝機能誘導株の選抜

HepG2-HSP 細胞に PB/TRE-hHNF1 α -hHNF3 β -hCEBP α -hCEBP β -hCEBP γ -P_{EF1 α} -Puro^R および PB/TRE-hHNF1 β -hHNF4 α -hHNF6-P_{EF1 α} -Bla^R をトランスフェクションした後、ピューロマイシンとブラストサイジンを用いて遺伝子導入バルク細胞を得た。LETF の過剰発現によって誘導される肝機能の発現を評価するために、HepG2 および遺伝子導入バルク細胞を、加温ありまたはなしの条件で培養した。細胞数およびアルブミン分泌能、アンモニア除去能、CYP3A4 活性を経時的に測定した (Fig. 18)。HepG2 細胞は、加温の有無にかかわらず、測定した 3 つの機能のいずれも見られなかった。一方、加温したバルク細胞では、ピーク時のアルブミン分泌能と CYP3A4 活性は、HepG2 細胞に比べてそれぞれ 17.7 倍、5.1 倍

向上した。しかし、加温したバルク細胞においてもアンモニア除去能は向上しなかった。

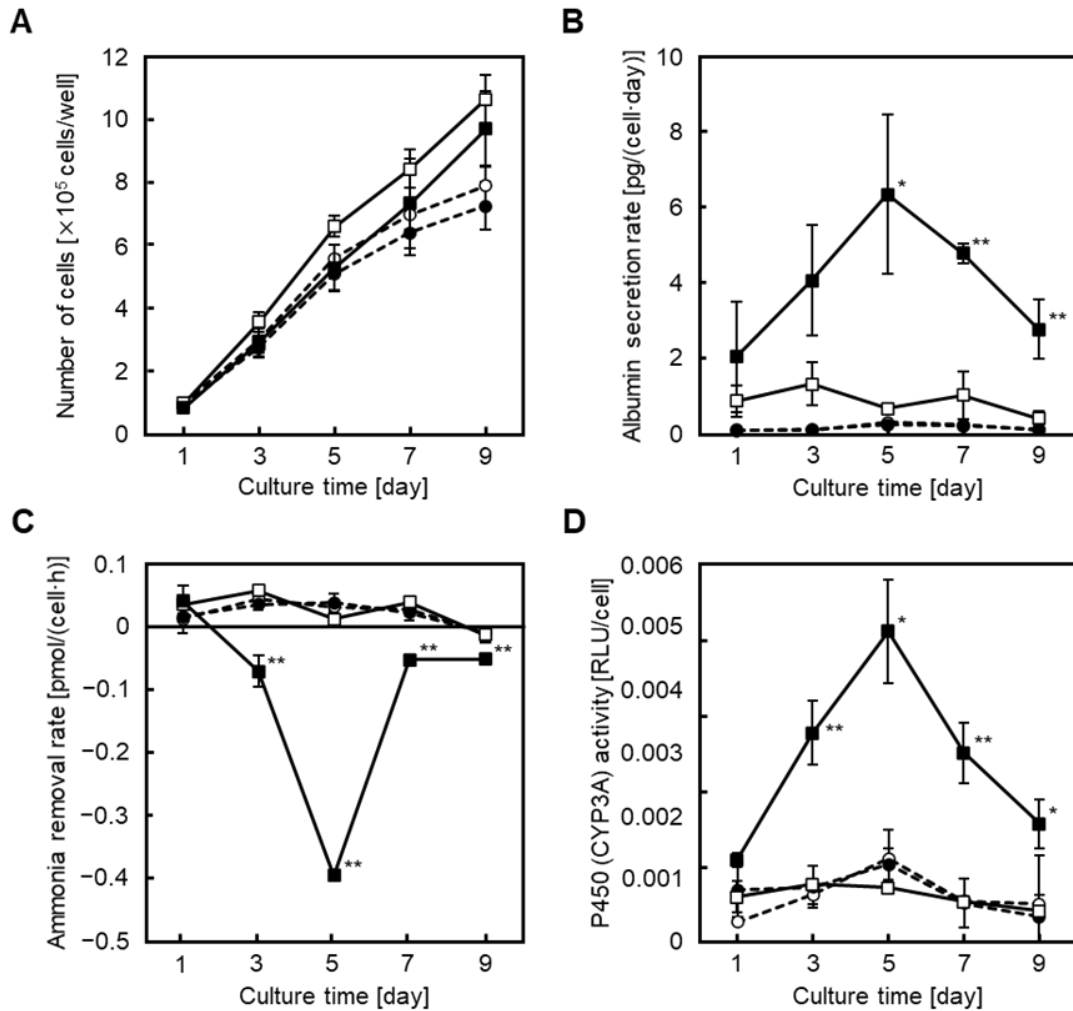


Fig. 18 Liver function analyses of HepG2 and genetically modified hepatoma bulk cells. (A) Number of cells, (B) albumin secretion rate, (C) ammonia removal rate and (D) P450 activity were measured over time with HS[-] (open columns) or HS[+] (closed columns). Circles show HepG2 cells and squares show HepG2/8F_HS cells. Data are presented as means \pm standard deviations ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. HS[-] by Student's t -test.

次に、遺伝子導入バルク細胞から限界希釈法によってクローン細胞を取得し、加温ありまたはなしの条件で5日間培養した。その結果、ほとんどのクローン細胞において細胞増殖の抑制およびアルブミン分泌能の向上が見られた (Fig.

19)。最もアルブミン分泌能が向上したクローン#29 を HepG2/8F_HS 細胞と名付け、以降の実験に用いた。

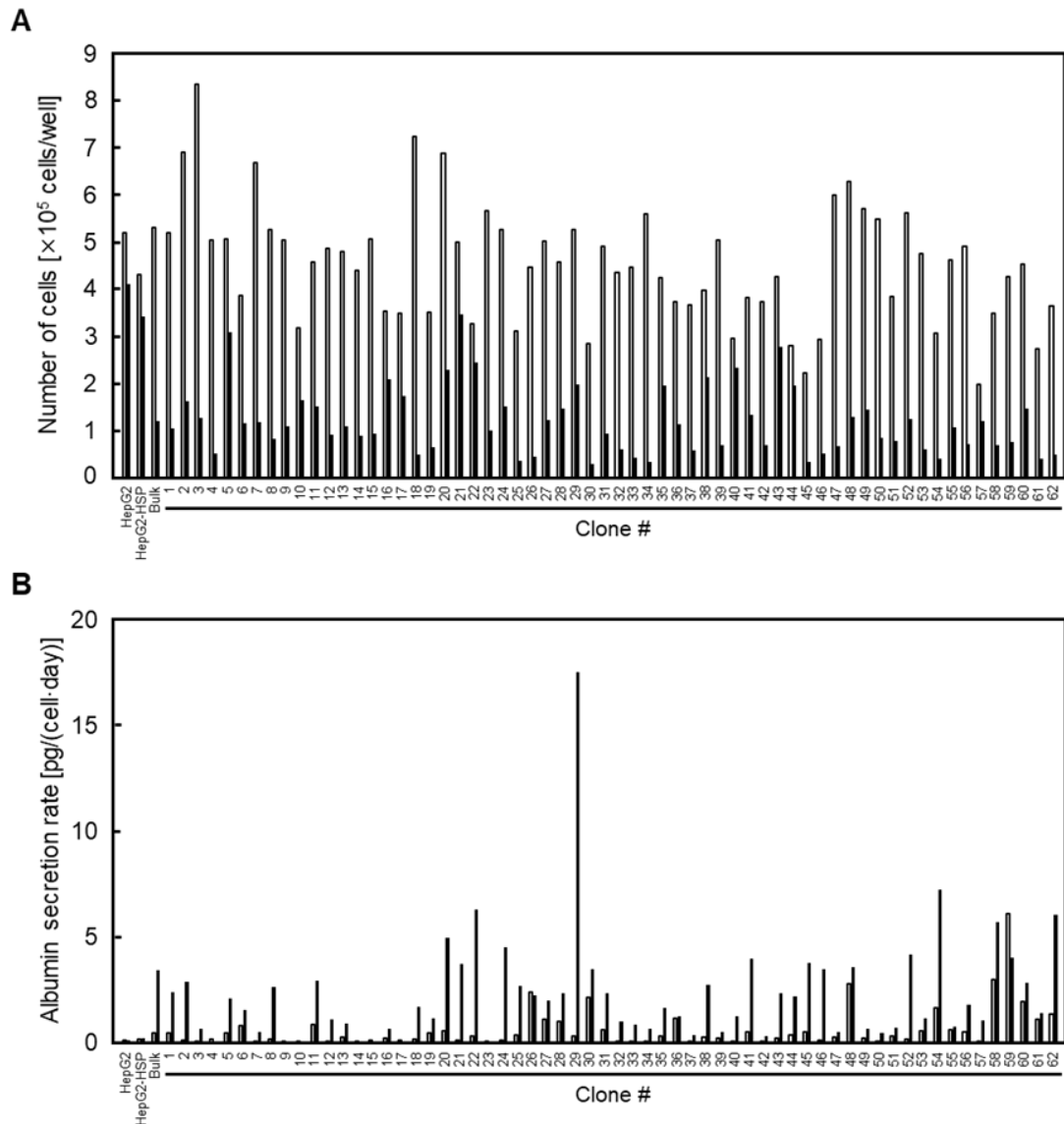


Fig. 19 Liver function analyses of genetically modified hepatoma clone cells. (A) Number of cells, (B) albumin secretion rate and (C) ammonia removal rate were measured with HS[-] (open columns) or HS[+] (closed columns) at day 5.

(3) HepG2/8F_HS 細胞の肝機能評価

HepG2 細胞と HepG2/8F_HS 細胞を、加温した場合と加温しない場合で培養し、細胞の形態を観察した。HepG2 細胞では、加温の有無による違いは見られなかった。一方、HepG2/8F_HS 細胞では、加温により増殖を抑制され、培養初代肝細胞で報告されているように、細胞サイズが大きくなり、2 核細胞の出現が観察された (Fig. 20)[107]。また、加温後の HepG2/8F_HS 細胞では、EGFP の蛍光が観察され、導入した LETF 遺伝子が発現していることがわかった。さらに、肝機能の指標としてアルブミンの発現を免疫細胞化学的に観察した。その結果、HepG2 細胞と加温していない HepG2/8F_HS 細胞ではアルブミンの発現は見られなかったが、加温した HepG2/8F_HS 細胞では蛍光が観察された (Fig. 20)。また、細胞数およびアルブミン分泌能、アンモニア除去能、CYP3A4 活性を経時的に測定した。HepG2/8F_HS 細胞では、加温によって細胞増殖は抑制されたが、9 日目に向けて細胞はわずかに増殖した (Fig. 21A)。また、加温した HepG2/8F_HS 細胞では、アルブミン分泌能およびアンモニア除去能、CYP3A4 活性が顕著に向上した (Fig. 21B-D)。誘発された肝機能は、3 日目にピークに達し、その後徐々に低下したが、9 日目においても HepG2 細胞よりも高い値を維持した。

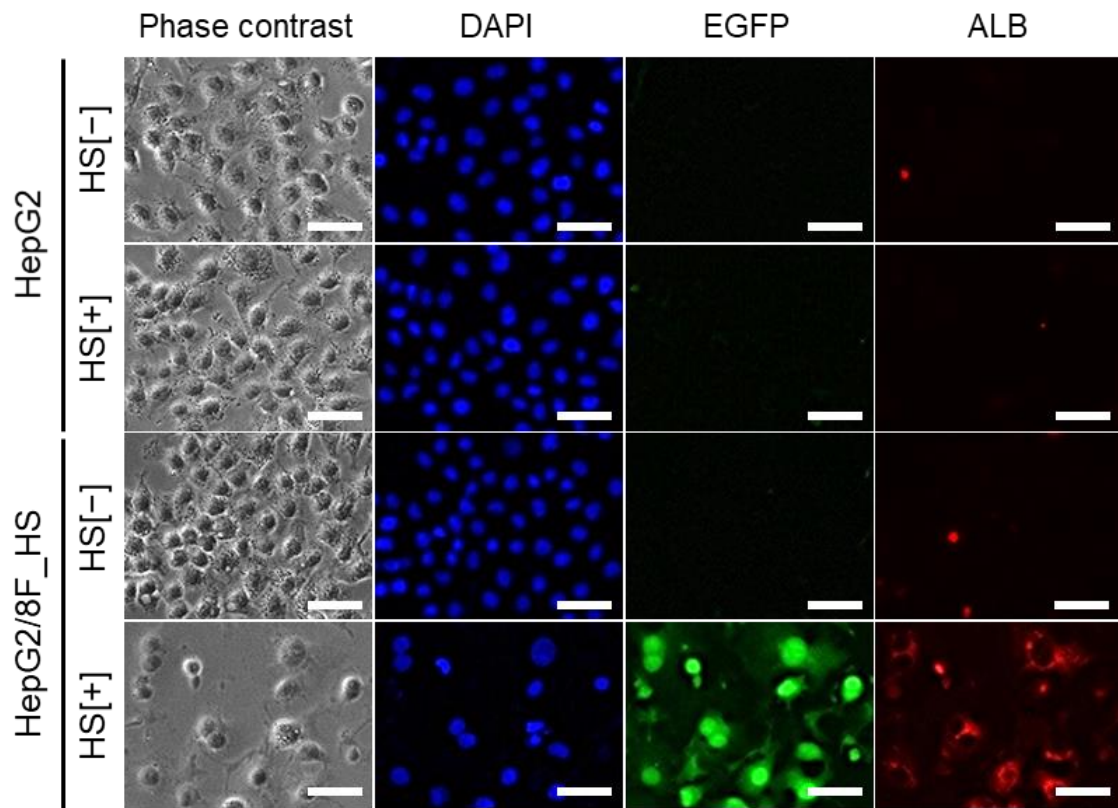


Fig. 20 Morphological analysis of HepG2/8F_HS cells with (HS[+]) or without (HS[-]) heat-shock. Phase contrast and fluorescence images of HepG2 and HepG2/8F_HS cells dyed with DAPI (blue), EGFP (green) and ALB (red). Scale bars = 50 μ m. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; EGFP, enhanced green fluorescent protein.

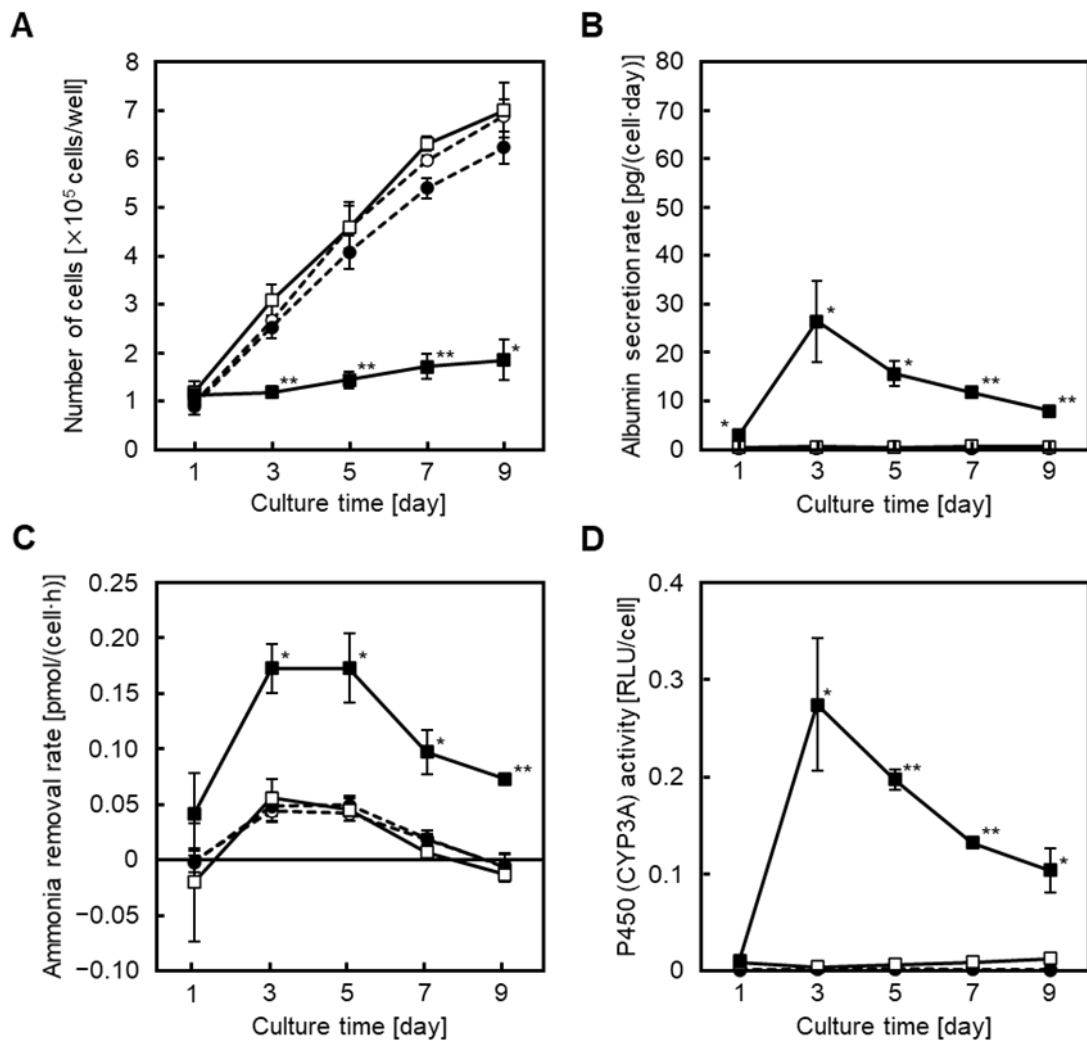


Fig. 21 Liver function analyses of HepG2 (circles) and HepG2/8F_HS (squares) cells with (HS[+]) or without (HS[-]) heat-shock. (A) Number of cells, (B) albumin secretion rate, (C) ammonia removal rate and (D) P450 activity were measured over time with HS[-] (open columns) or HS[+] (closed columns). Data are presented as means \pm standard deviations (n = 3). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. HS[-] by Student's *t*-test.

遺伝子導入バルク細胞は、加温に応じてアンモニアを産生したが、限界希釈法によって樹立された HepG2/8F_HS 細胞はアンモニアを除去した (Fig. 18C and 21C)。また、他のいくつかのクローン細胞においてアンモニア除去能を測定したところ、全てのクローン細胞が加温に応じてアンモニアを除去した (Fig. 22)。トランスポゾンベクターは、目的遺伝子を DNA 上の TTAA サイトにランダムに組

み込むため、遺伝子導入バルク細胞には様々な挙動を示す細胞が含まれている。しかし、限界希釈法を経ることで、増殖性の高い細胞がスクリーニングされた結果、得られたクローン細胞の特徴が似通った可能性がある。

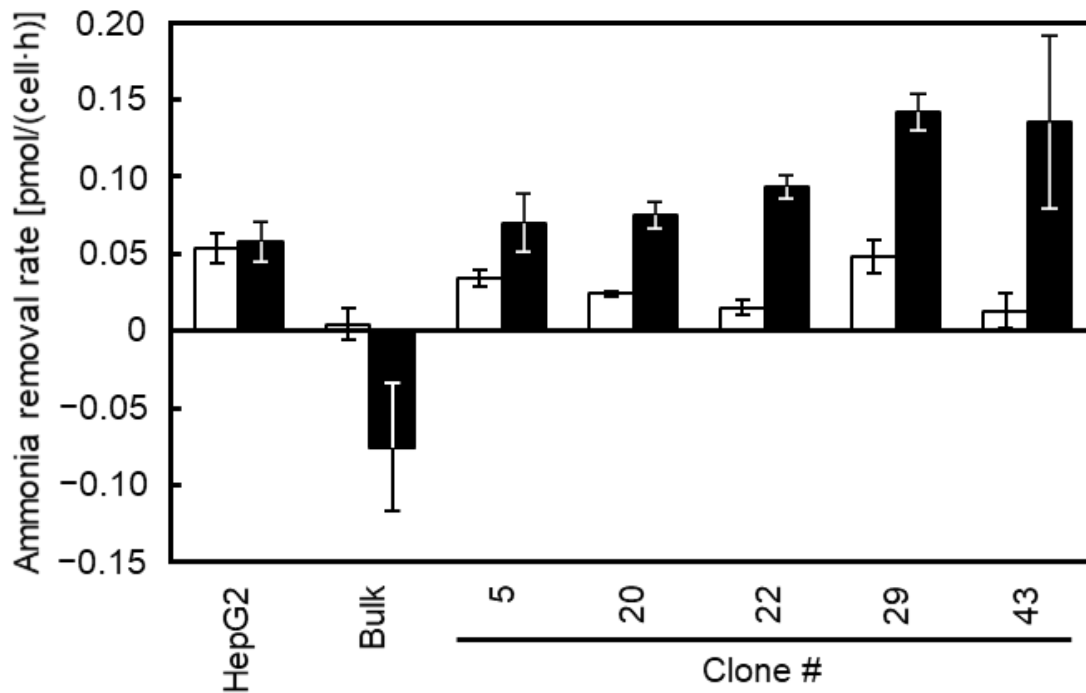


Fig. 22 Ammonia removal rate of genetically modified hepatoma clone cells. Cells were cultured with HS[-] (open columns) or HS[+] (closed columns).

(4) EGFP 蛍光強度を利用した高肝機能細胞分取による肝機能維持

次に、HepG2/8F_HS 細胞の加温後の EGFP 発現細胞割合を経時的に測定した (Fig. 23)。加温 1 日後には 96.0%の細胞が EGFP 蛍光を示し、5 日目には EGFP 蛍光強度がより向上した細胞集団と EGFP 蛍光強度の低い集団に分かれた。さらに 9 日目には EGFP 蛍光強度の高い集団はその蛍光強度を維持しているものの、EGFP 蛍光強度の低い集団の割合が増加した。また、培養皿上には局所的に細胞密度の高い EGFP 陰性細胞の集団が観察された (Fig. 24)。そこで加温の翌日に EGFP 蛍光強度の高い細胞を分取して経時的に EGFP 発現細胞割合および生細胞

第三章 加温によって高肝機能を誘導可能なヒトヘパトーマ細胞の開発

数、肝機能を測定した。EGFP 蛍光強度の高い細胞を分取すると、9 日目においても分取なしに比べて高い EGFP 蛍光細胞割合を維持した (Fig. 23)。また GFP 蛍光強度の高い細胞は 9 日間培養しても増殖することはなかった (Fig. 24 and 25A)。アルブミン分泌能は分取しない場合と比べてピーク時で 2.3 倍に向上し、9 日目においても分取なしのピーク時と同等の機能を維持した (Fig. 25B)。アンモニア除去能および CYP3A4 活性は分取なしと比較して最大値は有意に向上しなかったものの、高いレベルを維持できる期間が延長された (Fig. 25C and D)。

HepG2/8F_HS 細胞における LETF 遺伝子発現は、加温をスイッチとする tTA のポジティブフィードバックループによって制御されており、その発現は GFP 蛍光によってモニタリングすることができる。加温の翌日、GFP 蛍光強度の低い細胞は、tTA ポジティブフィードバックループが十分に働いていないため、培養日数の経過にしたがって、その発現は徐々に消失した。また、GFP 蛍光強度が低いまたは GFP を全く発現していない細胞は LETF 遺伝子発現が十分でないため増殖した。一方、GFP 蛍光強度が高い細胞は tTA ポジティブフィードバックループにより GFP が蓄積されることで、培養日数の経過に従って蛍光強度は向上した。これらの細胞は LETF 遺伝子の過剰発現により肝機能が增強されており増殖しないため、肝機能が誘導されていない細胞の増殖に伴って割合が減少した。したがって、培養 9 日目には加温によって誘導された肝機能の低下が見られ (Fig. 21B-D)、GFP 蛍光強度の高い細胞を分取した場合には誘導した肝機能を維持することができた (Fig. 25B-D)。

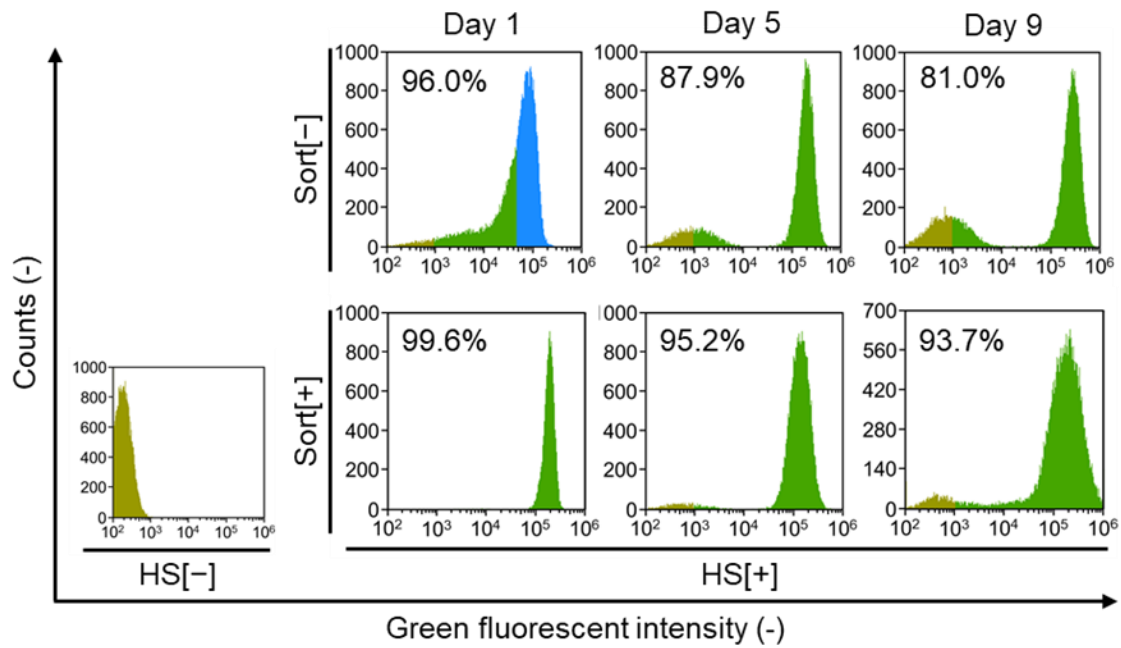


Fig. 23 Green fluorescence analysis of HepG2/8F_HS cells after heat-shock (HS) and sorting. Yellow and green indicate EGFP-negative or -positive cells, respectively, and the percentage of EGFP-positive cells is shown in the figure. Blue indicates the fraction that was isolated. EGFP, enhanced green fluorescent protein.

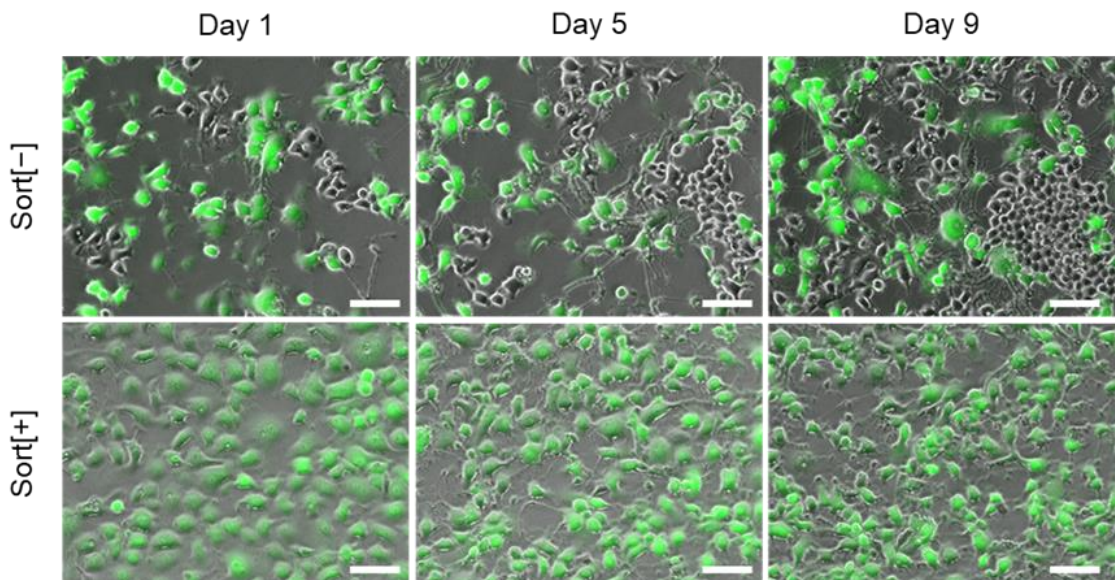


Fig. 24 Microscopy images showing the EGFP expression of HepG2/8F_HS cells. Cells were cultured for 9 days after heat-shock with (Sort[+]) or without (Sort[-]) of sorting. Scale bars = 100 μ m. EGFP, enhanced green fluorescent protein.

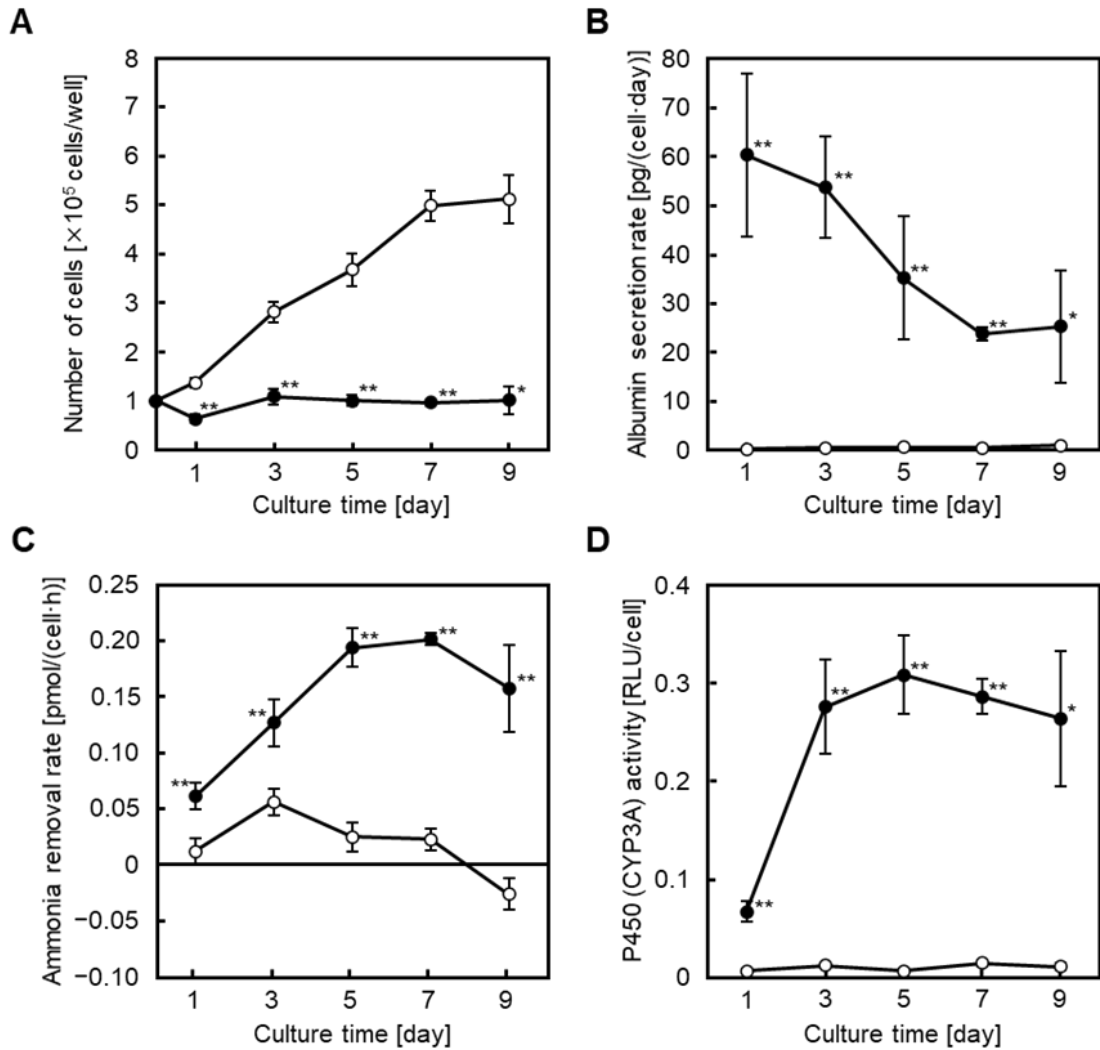


Fig. 25 Liver function analyses of HepG2/8F_HS cells after heat-shock (HS) and sorting. (A) Number of cells, (B) albumin secretion rate, (C) ammonia removal rate and (D) P450 activity were measured over time with HS[-] (open columns) or HS[+] (closed columns). Data are presented as means \pm standard deviations ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. HS[-] by Student's t-test. EGFP, enhanced green fluorescent protein.

また、HepG2-HSP 細胞および 8 種の LETF 遺伝子を導入したバルク細胞、HepG2/8F_HS 細胞に対して、加温ありまたはなし、Dox ありまたはなしの条件で EGFP の FACS 解析を 9 日間行った (Fig. 26)。その結果、HepG2-HSP 細胞は、加温によって約 96% の細胞の EGFP 発現が誘導された。3 日目には tTA ポジティブフィードバック誘導の十分でない細胞の EGFP 蛍光が失われ、EGFP 発現細胞

第三章 加温によって高肝機能を誘導可能なヒトヘパトーマ細胞の開発

割合は約 89%となり、以降そのレベルを維持した。遺伝子導入バルク細胞は、加温によって約 94%の細胞において EGFP 発現が誘導されたものの、その割合は直ちに減少した。これは、LETf 遺伝子の導入に伴い、ポジティブフィードバックが十分に機能している EGFP 陽性細胞は増殖が抑制され、ポジティブフィードバックが機能していない EGFP 陰性細胞のみが増殖したためであると考えられる。HepG2/8F_HS 細胞は、加温によって約 96%の細胞が EGFP を発現し、多くの細胞が 9 日目においても EGFP を高発現していたが、その割合はわずかに減少した。これは tTA ポジティブフィードバックの十分でない一部の細胞が徐々に増殖したためだと考えられる。また、全ての細胞において Dox を添加することで、EGFP 発現が抑制され、Dox による tTA と TRE 配列との結合が阻害されることが確認できた。

第三章 加温によって高肝機能を誘導可能なヒトヘパトーマ細胞の開発

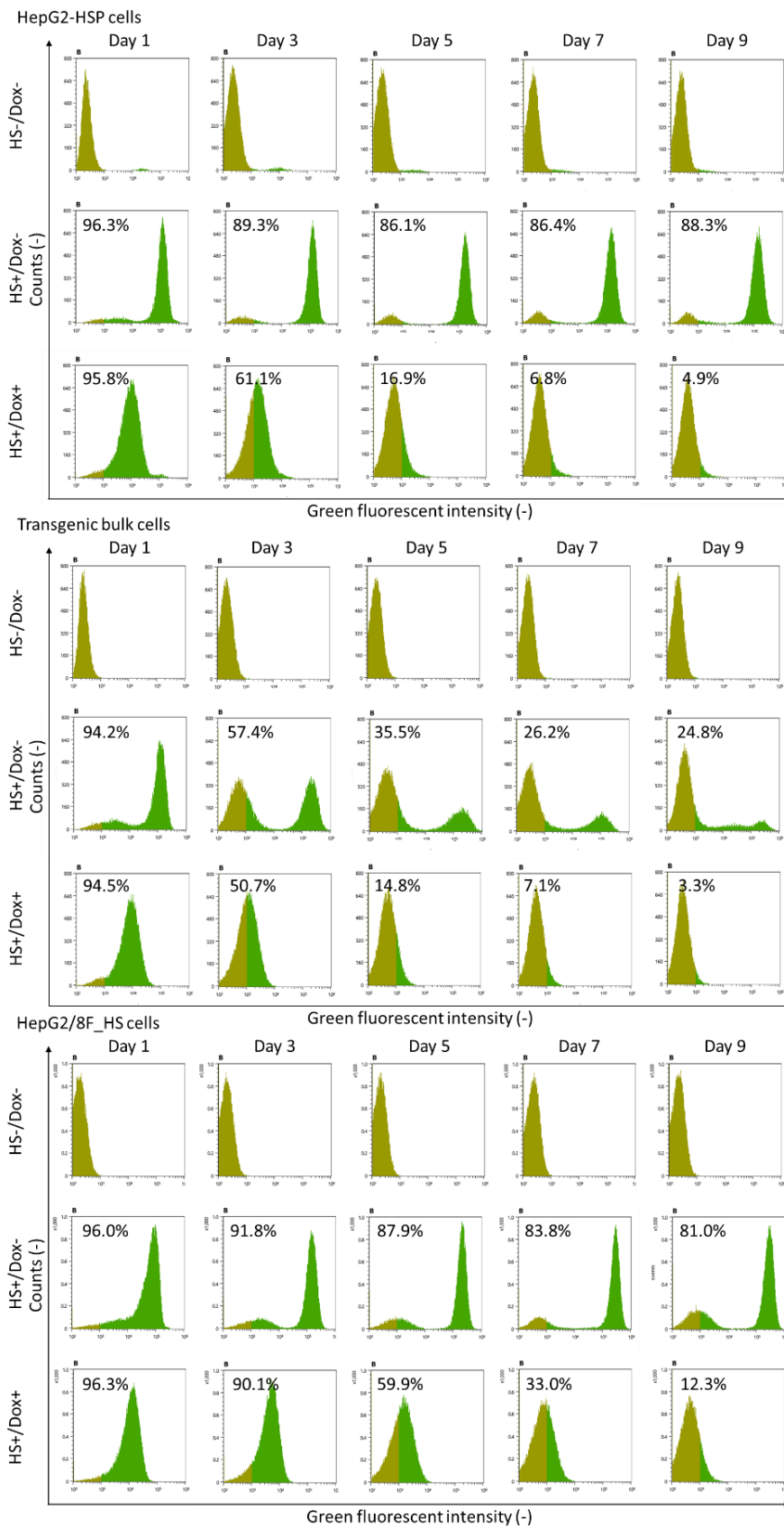


Fig. 26 Green fluorescence analysis of HepG2, transgenic bulk and HepG2/8F_HS cells.

HepG2/8F_HS 細胞に対するウエスタンブロッティングによって、過剰発現させた 8 種類の肝特異的転写の発現を確認した (Fig. 27)。肝特異的転写因子は親細胞である HepG2 細胞でもわずかに発現しているため、加温なしでも発現している因子が見られた。一方、加温ありの条件においては全ての因子の発現が確認できた。

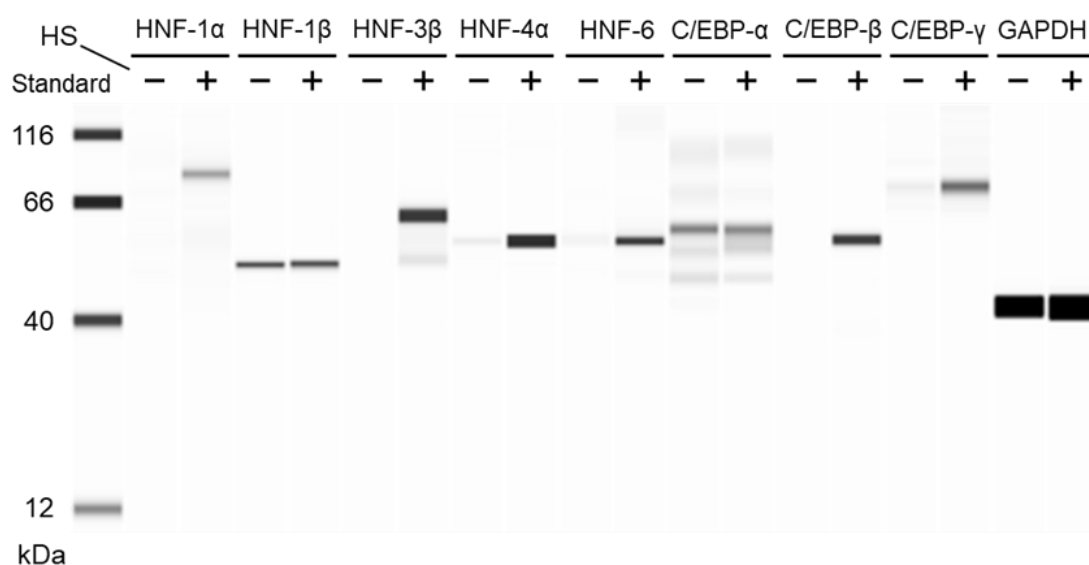


Fig. 27 Western blot analysis of HepG2/8F_HS cells.

3.2.4 本節のまとめ

本節では、まず、HepG2-HSP 細胞へと様々な条件で加温を与え、加温条件の検討を行った。その結果、43°C での 30 分間の加温により、細胞へダメージを与えることなく、約 90% の細胞の EGFP 発現を誘導できた。次に、TRE/P_{CMVmin} 制御下にある 8 つの LETF 遺伝子を構築し、HepG2-HSP 細胞へと導入した。遺伝子導入バルク細胞を加温すると、肝機能が向上したため、ヒトヘパトーマ細胞においても 8 種類の LETF の過剰発現が肝機能向上のために有効であることが確認できた。また、遺伝子導入バルク細胞からクローン細胞を樹立し加温を与えた。

その結果、クローン#29 (HepG2/8F_HS 細胞) は Hepa/HS 細胞と同様に、加温に応じて細胞増殖が抑制され、肝細胞様形態へと変化し、アルブミン分泌能、アンモニア除去能、CYP3A4 活性が顕著に向上した。誘導された肝機能は3日目をピークに徐々に低下してしまっていたが、9日目においても親細胞よりも高い機能を維持した。また、EGFP 蛍光強度と肝機能には相関関係があり、EGFP 高発現細胞を分取することによって、誘導された肝機能を9日間高いレベルで維持できることを示した。HepG2/8F_HS 細胞は、遺伝子改変されたヘパトーマ細胞であるため、特別な添加物を必要としないシンプルな培地で培養することができ、大量の細胞を迅速かつ安価に得ることができる。また、一度の加温で肝機能を誘導することができ、誘導後3日目には高い肝機能が発揮される。さらに、EGFP の発現を利用した細胞の分取により、細胞を容易に高品質に揃えることが可能であり、誘導された肝機能も一定期間維持される。

3.3 スフェロイド培養による高肝機能化

3.3.1 本節の目的

PHH や Hepa/8F5 を含むヘパトーマ細胞、iPS 細胞由来肝細胞などにおいて、スフェロイドと呼ばれる細胞凝集塊を形成させ、三次元的な培養を行うことで、肝機能が向上され、持続期間が延伸されることがわかっている。本節では、HepG2/8F_HS 細胞をスフェロイド培養することでさらに高肝機能化することを目的とした。スフェロイドの形成には EZSPHERE SP 24 well plate (AGC Techno Glass) を用いた。EZSPHERE SP は、表面が低接着加工されており、1 well あたりに約 470 個の微細 well があるため、簡単に均一なスフェロイドを作製することができる。まず、EZSPHERE へと細胞を播種しスフェロイドを形成させた後に加温を与え、肝機能を誘導できるか調べた。次に、細胞に加温を与え肝機能を

誘導後、セルソーターを用いて EGFP 高発現細胞のみを集めスフェロイドを形成し、肝機能を測定した。

3.3.2 実験方法

(1) スフェロイド形成→肝機能誘導実験

HepG2/8F_HS 細胞を EZSPHERE SP 24-well plate に 50, 100, 200 cells/microwell で播種し (Day 0)、播種から 0, 24, 48 時間後に 43°C で 30 分間加温した。培地交換は毎日行い、スフェロイドが微細ウェルから飛び出さないように、200 μ L ずつ 5 回に分けて丁寧に交換した。測定日の前日に細胞を回収し、300 rpm で 3 分遠心し培地を一度完全に取除いた。その後、細胞を新鮮な培地で優しく懸濁して超低接着 24 well plate (Corning) へと移した。24 時間後に培養上清を回収し、トリパンブルー色素排除法による細胞計数を行った。回収した上清中の上清中のアルブミン量を ELISA 法により測定した。

(2) 肝機能誘導→スフェロイド形成実験

HepG2/8F_HS 細胞を collagen-coated 100 mm dish に細胞を播種し、細胞密度が 80% コンフルエントに達した時点で細胞を 43°C で 30 分間加温した。翌日 (Day 0)、EGFP の蛍光強度が高い細胞集団をセルソーターを用いて分取した。分取した細胞を EZSPHERE SP 24-well plate に 50, 100 cells/microwell で播種した。培地は一日おきにスフェロイドが微細ウェルから飛び出さないように、200 μ L ずつ 5 回に分けて丁寧に交換した。以降 (1) と同様の手順で行った。

3.3.3 結果と考察

(1) スフェロイド形成→肝機能誘導実験

最初に、HepG2/8F_HS 細胞を EZSPHERE SP へと播種後に、加温を与えて肝機能が誘導できるか検討した。どの条件においても加温を与えることでアルブミン分泌能の向上が確認できたものの、そのレベルは単層培養と比較して有意な差は見られなかった (Fig. 28)。

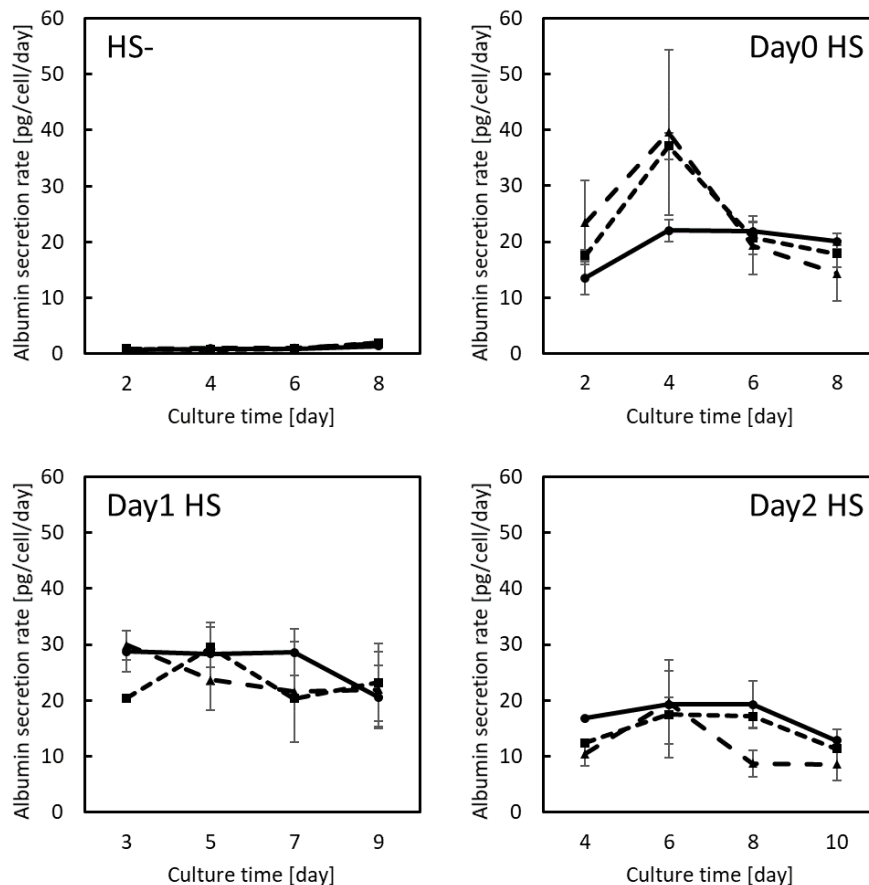


Fig. 28 Albumin secretion rate of HepG2/8F_HS cells with (HS[+]) or without (HS[-]) heat-shock in spheroid. Cells were seeded at 50 cells/microwell (circles), 100 cells/microwell (squares) or 200 cells/microwell (triangles). Data are presented as means \pm standard deviations (n = 3). *P < 0.05, **P < 0.01 vs. HS[-] by Student's t-test. Abbreviations: EGFP, enhanced green fluorescent protein.

(2) 肝機能誘導→スフェロイド形成実験

そこで、加温を与えた翌日にセルソーターを用いて EGFP 高発現細胞のみを分取して、スフェロイドを形成させた。培養翌日には直径約 100 μm の球状のスフェロイドが形成された。加温なしでは徐々に細胞が増殖し、9 日目には直径約 200 μm 程度の大きさになった。一方で加温をした場合、細胞は増殖せず 9 日目においてもスフェロイドの直径は 100 μm ほどにとどまった。また、生細胞数およびアルブミン分泌能、アンモニア除去能、CYP3A4 活性を経時的に測定した。単層培養と同様に加温なしでは細胞が増殖し、加温ありでは細胞増殖が抑制されていることが確認できた (Fig. 30A)。100 cells/microwell の条件では、培養後期に多くの死細胞が観察された。アルブミン分泌能は、単層培養と比較してわずかに向上し、誘導された機能は高いレベルで維持された (Fig. 30B)。また、アンモニア除去能および CYP3A4 は 100 cells/microwell よりも 50 cells/microwell の方が高く、単層培養のピーク時と比較してそれぞれ 2.1 倍、1.6 倍向上した (Fig. 30C and D)。

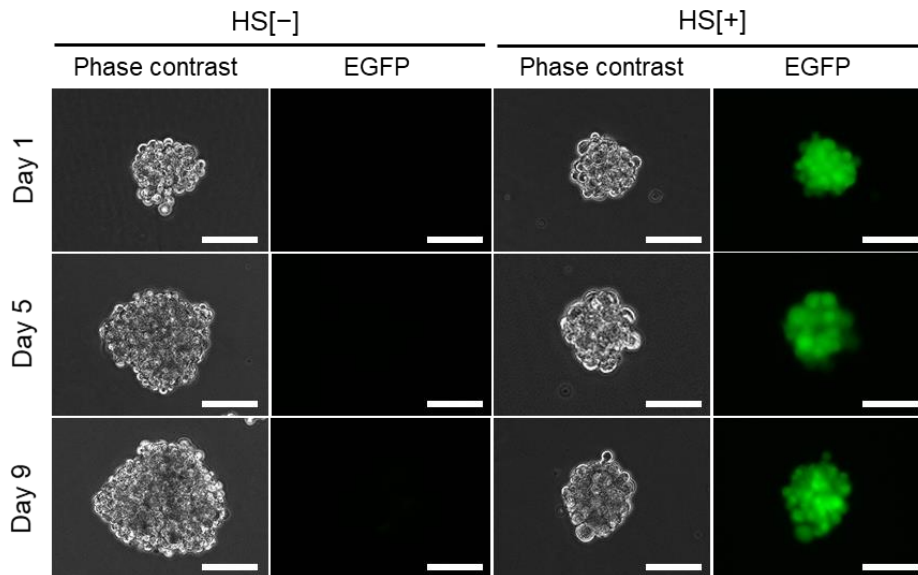


Fig. 29 Phase contrast and EGFP fluorescence (green) micrographs of HepG2/8F_HS cells with (HS[+]) or without (HS[-]) heat-shock in spheroid. Cells were seeded at 50 cells/microwell and observed over time. Scale bars = 100 μm . EGFP, enhanced green fluorescent protein.

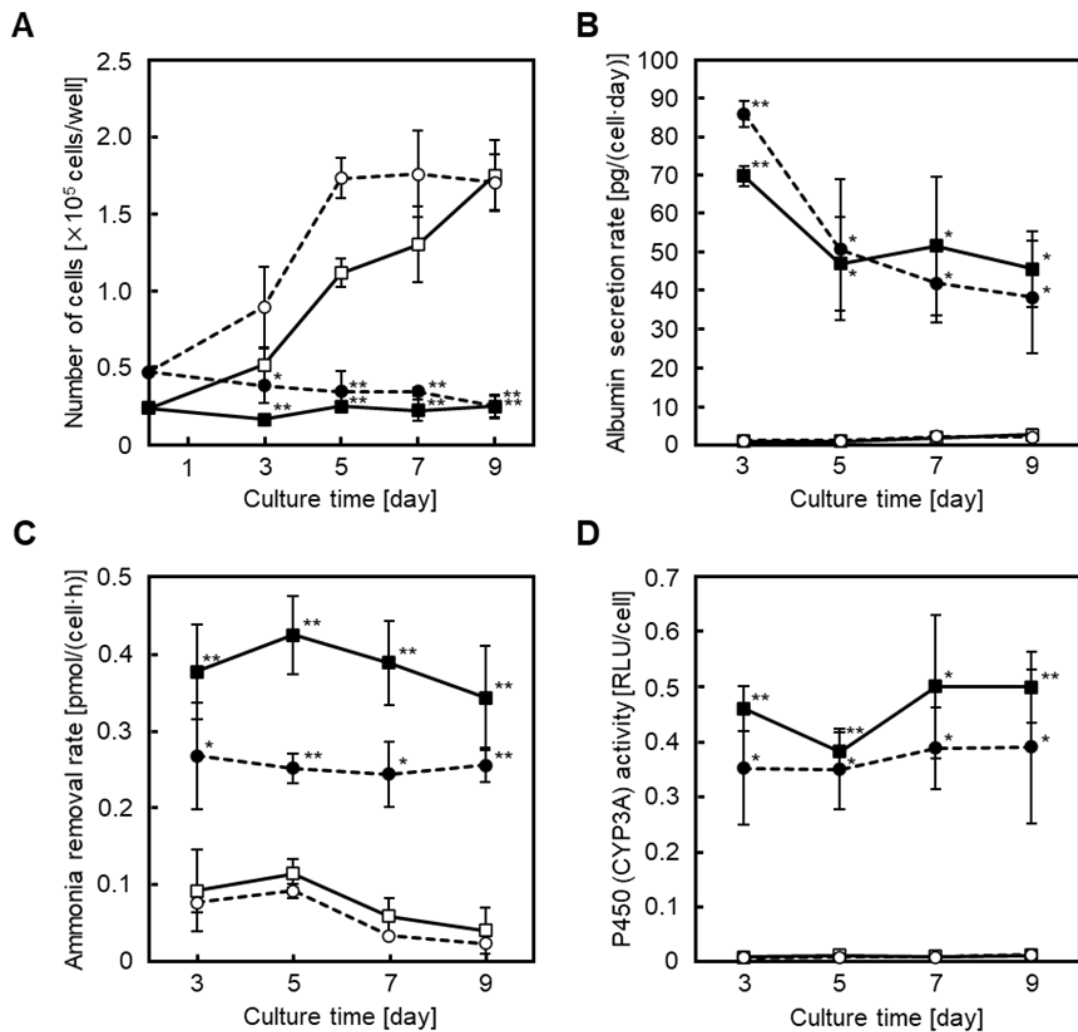


Fig. 30 Liver function analyses of HepG2/8F_HS cells with (HS[+]) or without (HS[-]) heat-shock in spheroid. (A) Number of cells, (B) albumin secretion rate, (C) ammonia removal rate and (D) P450 activity were measured over time with HS[-] (open columns) or HS[+] (closed columns). Cells were seeded at 50 cells/microwell (squares) or 100 cells/microwell (circles). Data are presented as means \pm standard deviations (n = 3). *P < 0.05, **P < 0.01 vs. HS[-] by Student's t-test. Abbreviations: EGFP, enhanced green fluorescent protein.

3.3.4 本節のまとめ

本節では、肝機能の向上、維持を目的として HepG2/8F_HS 細胞のスフェロイド培養を検討した。その結果、EZSPHERE SP プレートに播種した後で加温し肝

機能誘導した場合は、単層培養と比較して十分な肝機能が発揮されなかった。一方、加温を与え肝機能誘導後に、肝機能の高い細胞のみを分取してスフェロイドを形成させた場合は、単細胞と比較して3つの肝機能が全て向上し、9日後にも高いレベルを維持していた。以前開発した Hepa/8F5 細胞においても似た傾向があり、スフェロイドを形成した後に誘導薬剤を添加しても十分な肝機能を誘導することができなかった。これは、細胞と足場との接着環境による影響の可能性があり、ゲルなどの足場を用いたスフェロイド培養によって改善される可能性がある。HepG2/8F_HS 細胞の肝機能の改善のためにスフェロイド培養が有用であり、一定期間肝機能の高い状態を持続するため、バイオ人工肝臓や肝毒性・薬物動態評価系等への利用が期待できる。

3.4 網羅的な転写産物解析による特性評価

3.4.1 本節の目的

本節では、網羅的な転写産物解析を行うことで、HepG2/8F_HS 細胞を特徴づけることを目指した。まず、HepG2 および HepG2/8F_HS 細胞の単層培養およびスフェロイド培養、加温ありまたはなしの条件において、DNA マイクロアレイを用いて全遺伝子発現解析を行った。次に、各条件における転写レベルを比較し、変動遺伝子数をまとめ、変動遺伝子に対して Gene Ontology (GO) エンリッチメント解析を行った。また、肝関連遺伝子リストを取得し、ヒートマップによって遺伝子発現を比較した。さらに、肝機能関連遺伝子をピックアップし、各条件における発現レベルを比較した。最後に、初代肝細胞の DNA マイクロアレイデータを取得し、加温した HepG2/8F_HS 細胞と比較した。

本節では、肝関連遺伝子として、血清タンパクであるアルブミン (ALB) とトランスサイレチン (TTR)、肝細胞特有な代謝酵素であるチロシンアミノトラン

第三章 加温によって高肝機能を誘導可能なヒトヘパトーマ細胞の開発

スフェラーゼ (TAT) とグルコース 6 リン酸 (G6P)、脂質であるアポリポタンパク (ApoA1、ApoB)、肝細胞表面の膜タンパク (ASGPR1)、肝細胞で高発現な転写因子 (GATA4、PPAR α) などの遺伝子を比較した。また、尿素回路において重要な役割を果たすカルバミルリン酸合成酵素 1 (CPS1)、オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC)、アルギニノコハク酸合成酵素 (ASS)、アルギナーゼ 1 (ARG1) といった酵素を比較した。生体内の薬物代謝は、酸化・還元・加水分解により薬物の水溶性を向上させる第一相反応 (変性)、グルクロン酸・硫酸・グリシンなどを抱合し極性をより高くする第 2 相反応 (抱合)、代謝物を肝細胞内から胆汁中へ移行させる第 3 相反応 (排泄) に大別される。本節では最後に、第一相 (CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7)、第二相 (UGT1A6、GSTA2)、第三相 (ABCB1、ABCC3、ABCC6、ABCG2、SLC22A1、SLC22A7、SLC22A9) の薬物代謝に関わる酵素を比較した。

3.4.2 実験方法

(1) マイクロアレイ解析

ヘパトーマ細胞を collagen-coated 100 mm dish に細胞を播種し、細胞密度が 80% コンフルエントに達した時点で細胞を 43°C で 30 分間加温した。翌日、セルソーターを用いて EGFP の蛍光強度が高い細胞集団を分取した。単層培養では、細胞を collagen-coated 24-well plate に 1.0×10^5 cells/well、スフェロイド培養では EZSPHERE SP 24-well plate に 50 cells/microwell、の細胞数で加温ありまたはなしの条件で播種した。5 日目に細胞を回収し、細胞ペレットとして凍結した。マイクロアレイによる遺伝子発現解析は、株式会社セルイノベーターに委託し、SurePrint G3 Human Gene Expression v3 $8 \times 60K$ Microarray Kit (Agilent, Santa Clara, CA)を用いて行った。

(2) GO エンリッチメント解析

HepG2 細胞と比較して発現が 2 倍以上向上した遺伝子を抽出して、g:Profiler を用いて GO エンリッチメント解析を行った。有意に濃縮された上位 5 個の GO: biological process (BP)、cellular component (CC)、molecular function (MF) 用語をグラフにした。

3.4.3 結果と考察

DNA マイクロアレイを用いて、全遺伝子発現解析を行った。HepG2/8F_HS 細胞は親である HepG2 細胞と比較して、解析したどの条件においても多くの遺伝子発現が変化していた。特に単層培養での加温ありの条件においては、2 倍、5 倍、10 倍以上発現が変化した遺伝子がそれぞれ 1888 個、1756 個、1054 個見られた (Table 2)。次に、HepG2 細胞と比較して加温ありの HepG2/8F_HS 細胞において発現が 2 倍以上向上した遺伝子に対して GO エンリッチメント解析を行った (Fig. 31)。有意に濃縮された上位 5 個の GO: Biological Process 用語は、全て代謝プロセスに関するものであった。次に、HepG2/8F_HS 細胞の加温なしの単層培養に対して、各条件における 2 倍以上発現が変動した遺伝子数をまとめた (Fig. 32)。加温ありの単層培養と加温ありのスフェロイド培養では、570 の遺伝子が共通していた。

Table 2. Relative fold change in genes comparing HepG2/8F_HS to HepG2 cells. The total number of genes that showed fold increase or decrease in both monolayer and spheroid cultures with (HS[+]) or without (HS[-]) heat-shock is shown.

HepG2/8F_HS vs HepG2				
Fold change	Gene numbers			
	Monolayer HS[-]	Monolayer HS[+]	Spheroid HS[-]	Spheroid HS[+]
2	1744	1888	1663	1751
5	1356	1756	1365	1587
10	701	1054	841	1057

HepG2/8F_HS monolayer HS[+] vs HepG2 monolayer

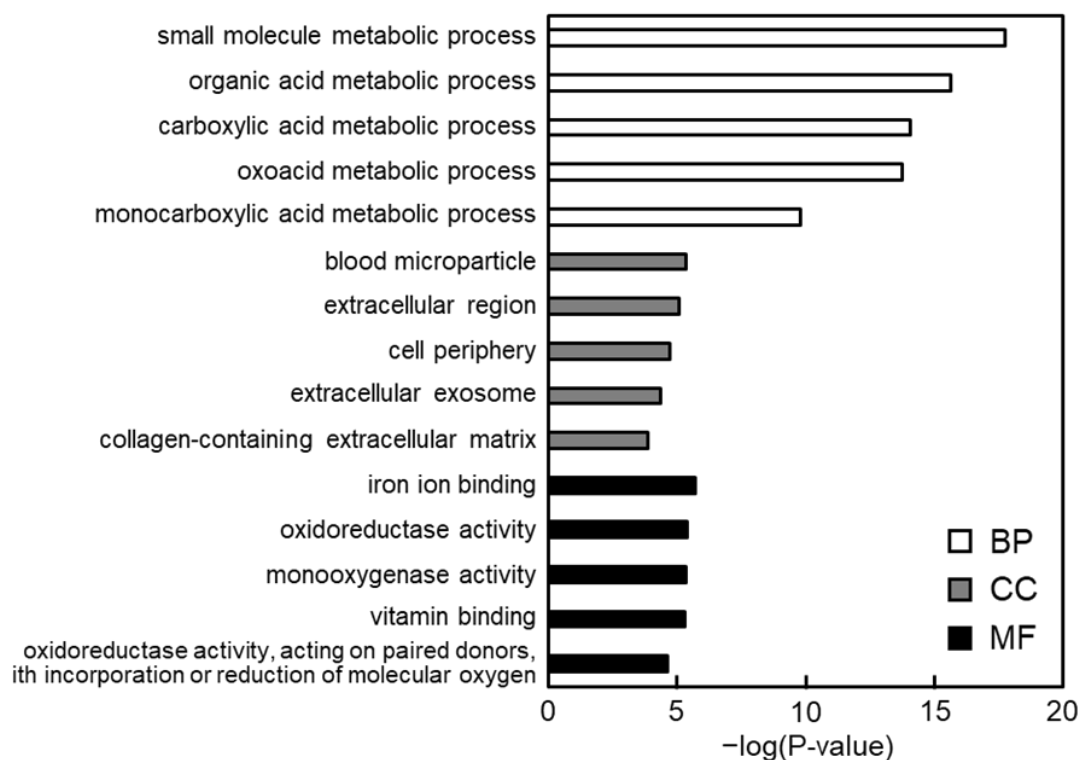


Fig. 31 Gene ontology (GO) analysis of 1888 genes that were increased more than 2-fold in HepG2/8F_HS monolayer HS[+] compared to HepG2. The 5 most significantly ($P < 0.05$) enriched GO terms in biological process (BP), cellular component (CC) and molecular function (MF) branches are presented.

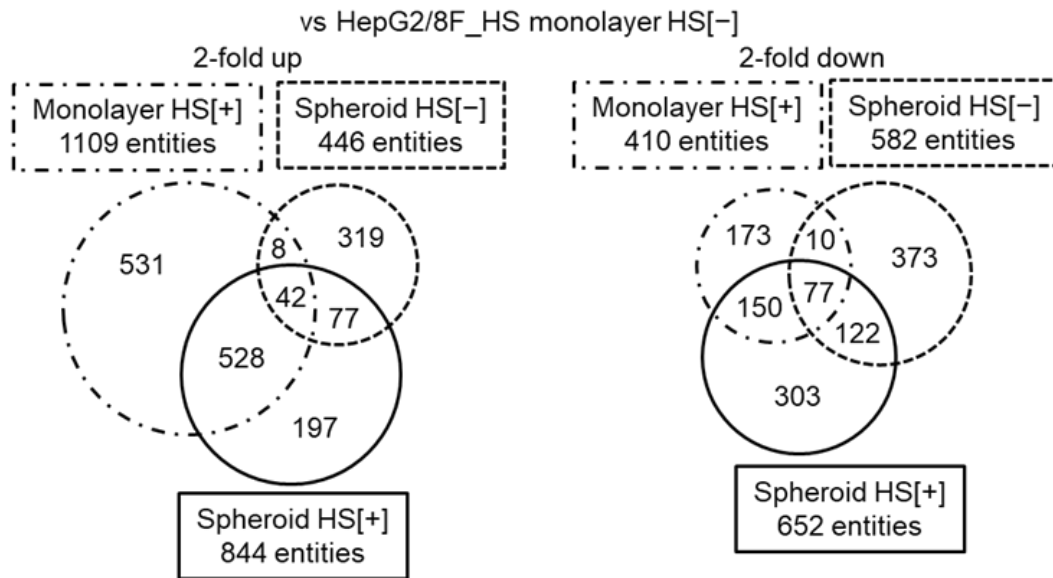


Fig. 32 The Venn diagrams represent the number of genes from the DNA microarray analyses that changed in comparison with the HepG2/8F_HS monolayer HS[-] conditions. The left Venn diagram shows the genes that increased more than 2-fold compared to HepG2/8F_HS monolayer HS[-] conditions. The right Venn diagram shows the genes that decreased more than 2-fold compared to HepG2/8F_HS monolayer HS[-] conditions.

次に、At least four-fold higher mRNA level in liver compared to any other tissues (The Human Protein ATLAS から取得) 遺伝子発現についてヒートマップを作成した (Fig. 33)。LETF 遺伝子の導入によって、加温を与えていない条件において多くの肝関連遺伝子発現の向上が見られた。これは LETF 遺伝子のリーク発現によるものと考えられる。また、加温を与えた HepG2/8F_HS 細胞において、さらに多くの肝関連遺伝子の発現が見られた。また、加温した HepG2/8F_HS 細胞において、多くの肝機能関連遺伝子 (Fig. 34A)、尿素回路関連遺伝子 (Fig. 34B)、薬物代謝第一相、第二相、第三相反応に関わる多くの酵素遺伝子 (Fig. 34C) 発現が向上していた。

第三章 加温によって高肝機能を誘導可能なヒトヘパトーマ細胞の開発

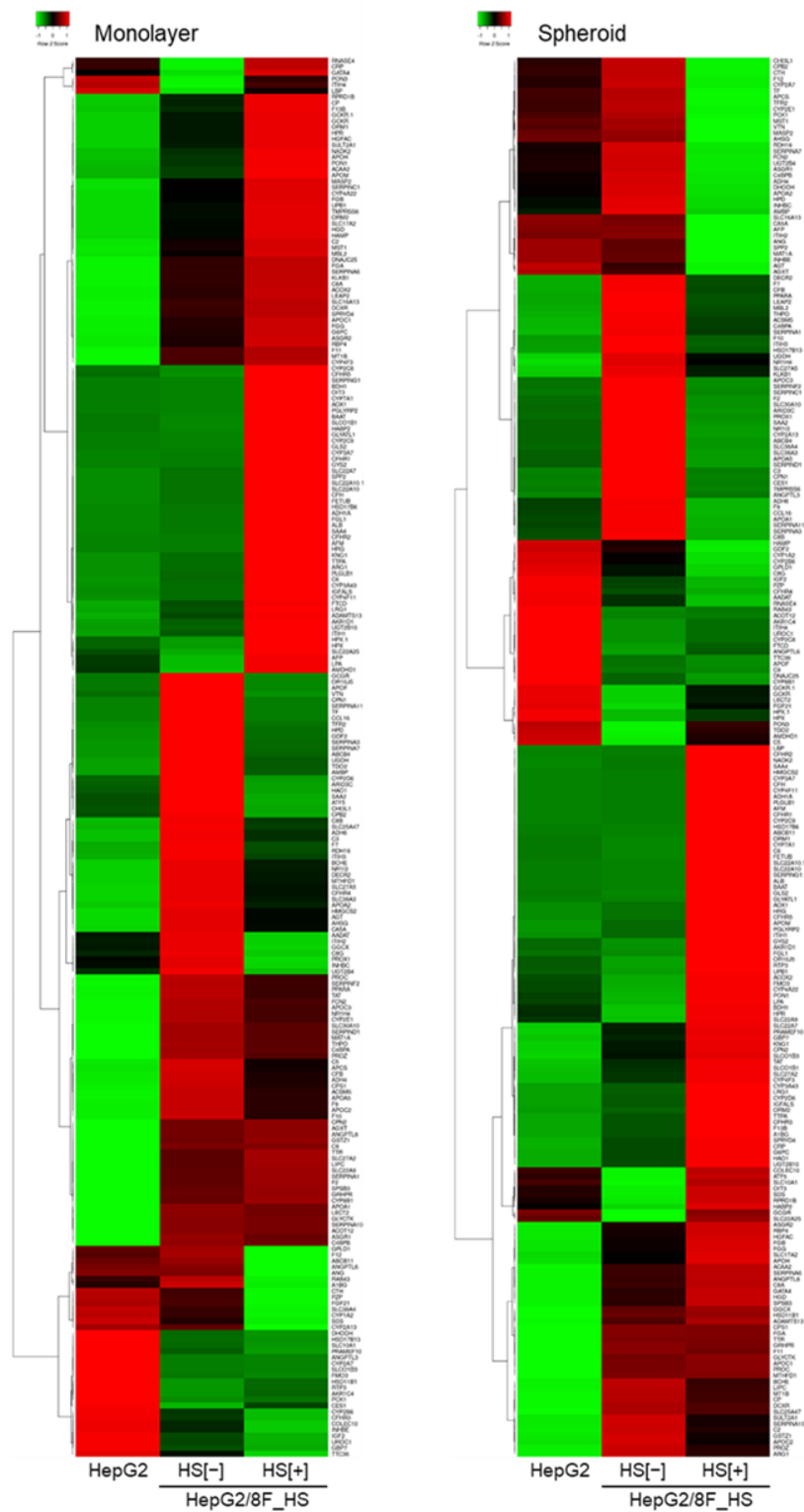
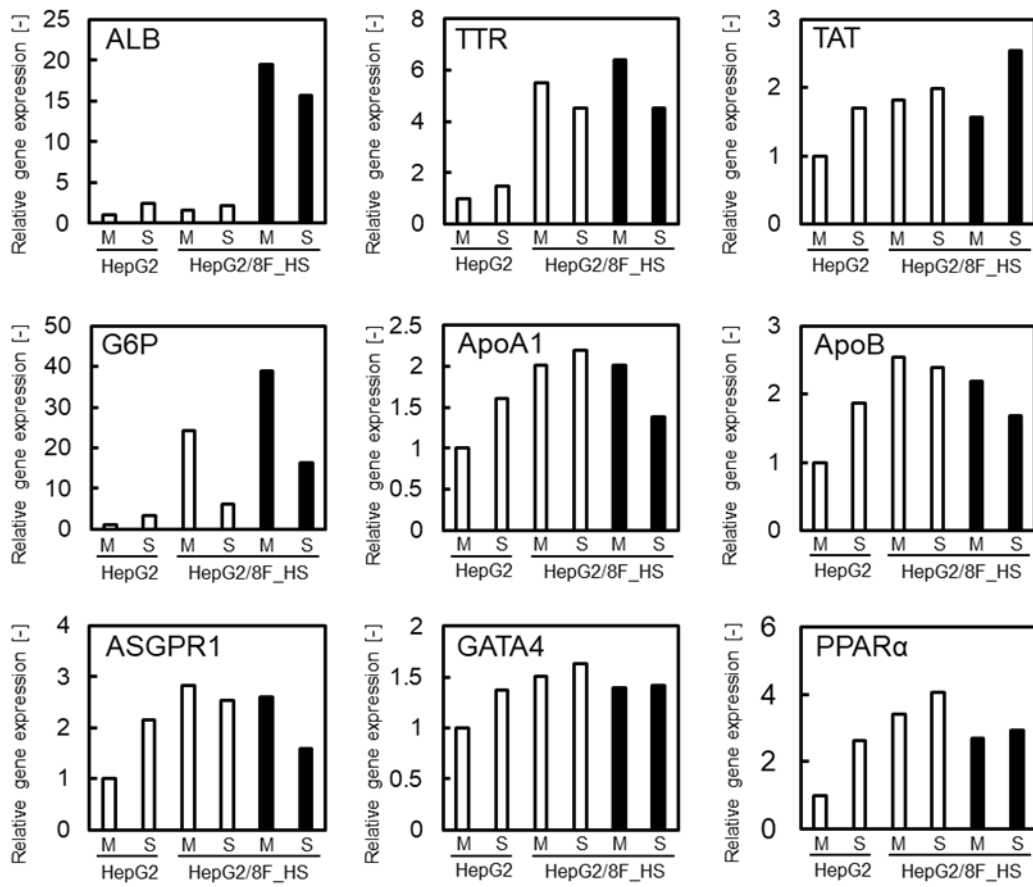


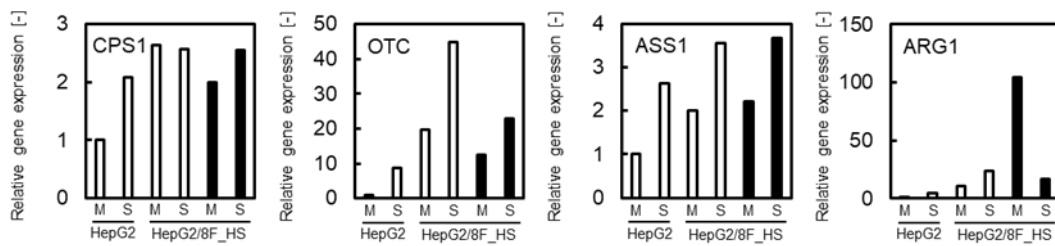
Fig. 33 Heat map of liver-enriched genes. The left heat map shows HepG2 and HepG2/8F_HS cells with (HS[+]) or without (HS[-]) heat-shock in monolayer. The right heat map shows HepG2 and HepG2/8F_HS cells with (HS[+]) or without (HS[-]) heat-shock in spheroid.

第三章 加温によって高肝機能を誘導可能なヒトヘパトーマ細胞の開発

A



B



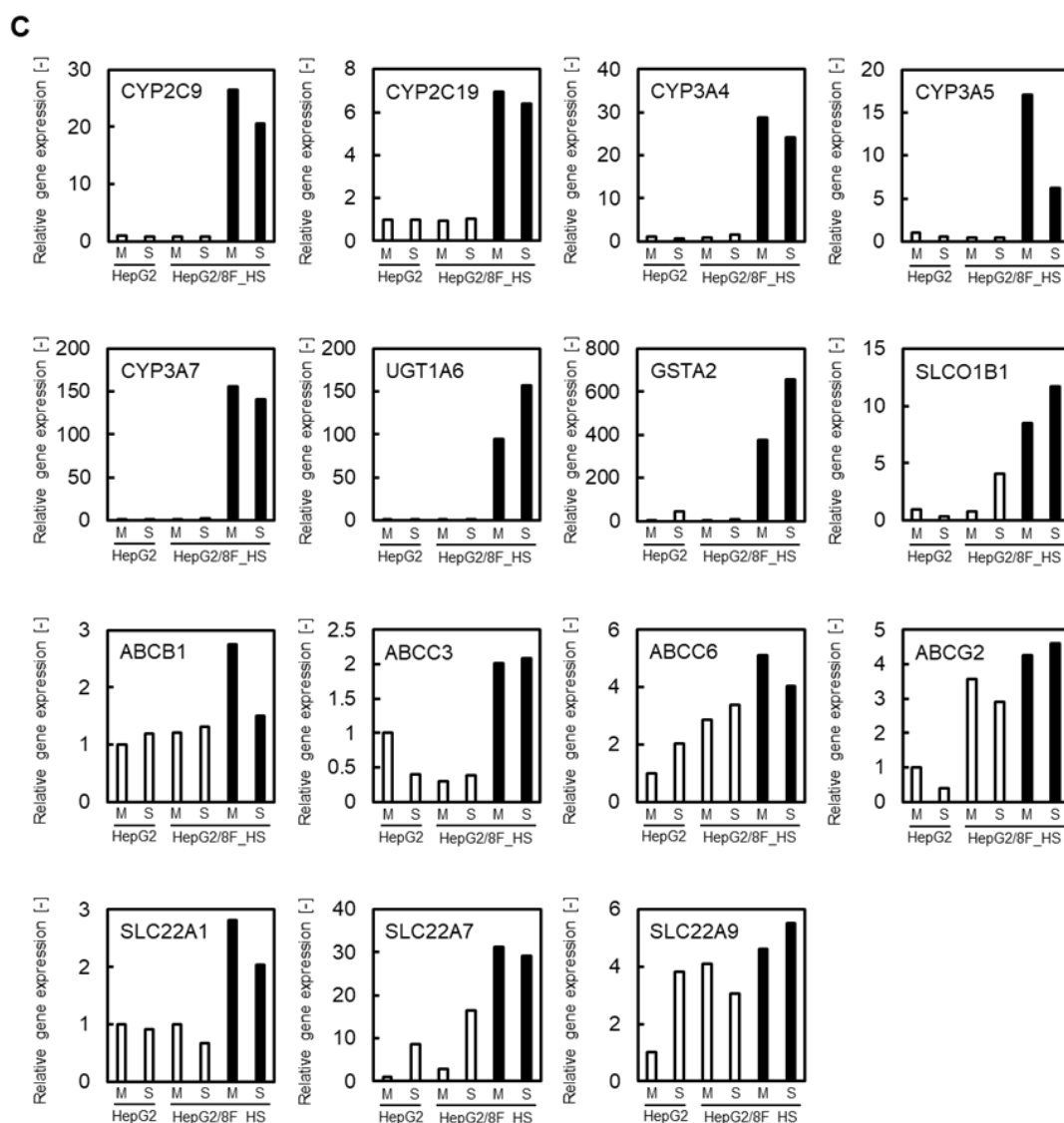


Fig. 34 Liver-enriched gene expression analysis of HepG2 and HepG2/8F_HS cells by DNA microarray. Relative gene expression of (A) liver function-related genes, (B) urea cycle enzyme genes and (C) drug metabolism response-related genes. The cells were cultured without HS (open columns) or with HS (closed columns). M, monolayer; S, spheroid.

また、National Center for Biotechnology Information Search database の Gene Expression Omnibus から初代ヒト肝細胞 HC5 のマイクロアレイ解析データ (GSM3963162) を取得し、HepG2 細胞と比較して 2 倍以上発現が高い遺伝子に対して GO エンリッチメント解析を行った (Fig. 35)。その結果、有意に濃縮され

た GO 用語上位 15 個のうち 10 個が加温を与えた HepG2/8F_HS 細胞において有意に濃縮が確認された用語と共通していた。

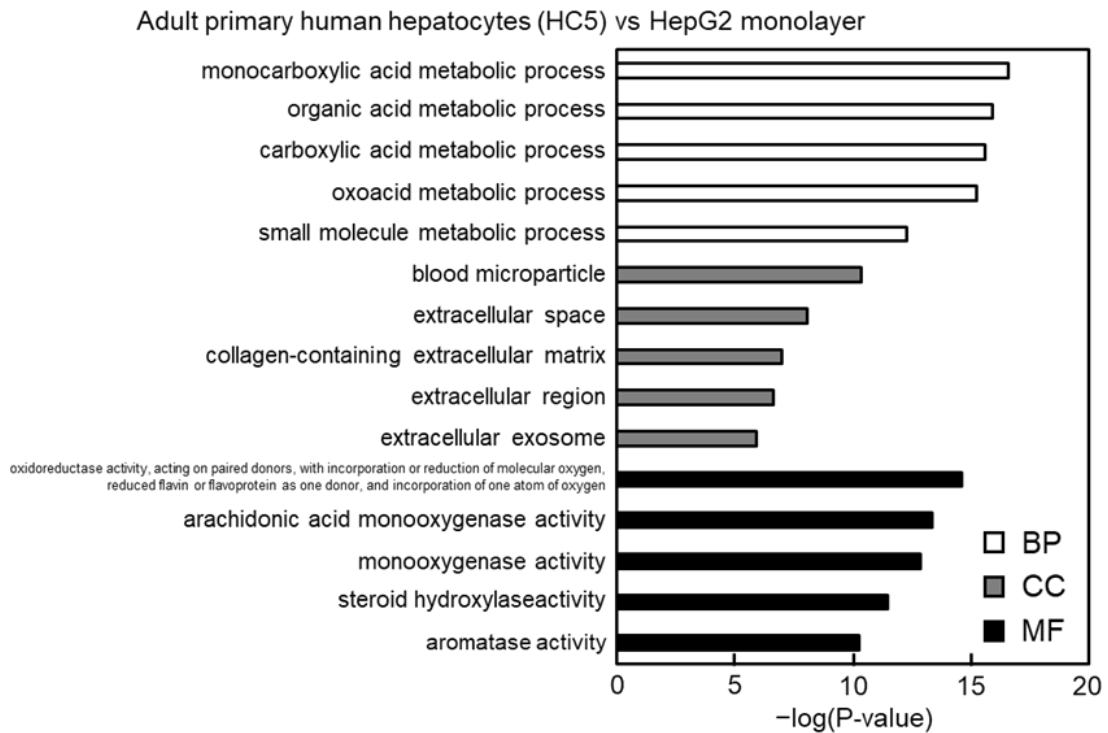


Fig. 35 Gene ontology (GO) analysis of genes that are higher than 2-fold in adult primary human hepatocytes (HC5) compared to HepG2. Gene expression data of HC5 cells (GSM3963162) was obtained from Gene Expression Omnibus of National Center for Biotechnology Information. The 5 most significantly ($P < 0.05$) enriched GO terms in biological process (BP), cellular component (CC) and molecular function (MF) branches are presented.

3.4.4 本節のまとめ

本節では、HepG2/8F_HS 細胞について網羅的転写産物解析を行った。その結果、作製した HepG2/8F_HS 細胞は親細胞である HepG2 細胞とは遺伝子発現が大きく異なり、加温することでさらに変化することが分かった。GO エンリッチメント解析によって、特に代謝プロセスに関する遺伝子発現が向上していた。ま

た、初代肝細胞についても同様に HepG2 細胞と比較して発現が 2 倍以上高い遺伝子に対して GO エンリッチメント解析を行った結果、有意に濃縮された GO 用語上位 15 個のうち 10 個が HepG2/8F_HS 細胞と共通していた (Fig. 31 and 35)。さらに、HepG2/8F_HS 細胞は加温することで、尿素経路関連酵素や薬物代謝関連酵素を含む多くの肝関連遺伝子の発現が HepG2 細胞と比較して向上していることを示した。これらの結果から、HepG2/8F_HS 細胞は、一部の肝機能だけでなく様々な肝機能を発現している機能的肝細胞へと変化したことが示唆された。

3.5 本章のまとめ

本章では、加温によってヒトヘパトーマ細胞の肝機能を誘導するために、以前に開発した HepG2-HSP 細胞へと、tTA の制御下にある LETF 遺伝子を導入した。その結果、遺伝子導入細胞においては、加温に応じて発現する tTA によって LETF 発現が誘導され、肝機能が向上した。加温条件は、HepG2-HSP 細胞に組み込まれている EGFP 蛍光をもとに、43°C、30 分間に決定され、この条件においては細胞に熱によるダメージを与えることなくほとんどの細胞の肝機能発現を誘導することが可能であった。また、遺伝子導入細胞からクローン細胞を樹立することで、加温をスイッチとして、アルブミン分泌能、アンモニア除去能、CYP3A4 活性を顕著に向上する細胞株が樹立された。また、HepG2/8F_HS 細胞は加温後、EGFP 蛍光強度の高い細胞を分取することで、誘導された肝機能を高いレベルで持続させることができた。さらに、正常な肝機能を模倣するために三次元培養を試みた。その結果、スフェロイド形成後に加温しても肝機能を十分に発現することはできなかったものの、加温後肝機能の高い細胞を分取してスフェロイドを形成することで、発現する肝機能は単層培養と比較して向上し、その機能は 9 日間持続した。最後に、網羅的転写産物解析により、その他の肝機能の発現可能性を調べた。その結果、薬物代謝関連酵素や尿素回路関連酵素といった

第三章 加温によって高肝機能を誘導可能なヒトヘパトーマ細胞の開発

肝機能関連遺伝子の向上が確認できた。また、GO エンリッチメント解析を行ったところ、HepG2 細胞と比較して顕著に濃縮が見られた GO 用語が、初代肝細胞と類似していた。これらの結果から、HepG2/8F_HS 細胞は、バイオ人工肝臓や肝毒性・薬物動態評価系、肝疾患モデルといった様々な研究における細胞源としての利用が期待できる。

第四章 総括

4.1 本論文のまとめ

本研究では、バイオ人工肝臓や肝毒性・薬物動態評価系、肝疾患モデルなどの用途で供給が足りていない機能的肝細胞源を開発するために、遺伝子工学的手法を用いてヘパトーマ細胞の改変を行い、高増殖状態から高肝機能発現状態へと任意のタイミングで切り替えが可能な細胞株の開発に取り組んだ。まず、以前に開発した薬剤誘導型マウスヘパトーマ細胞株を遺伝子改変によって、熱誘導型へと改変することによって肝細胞研究への利便性を高めた。次に、高肝機能誘導型マウスヘパトーマ細胞に使用した肝特異的転写因子遺伝子および HSP プロモーターをヒトヘパトーマ細胞へと適用した。これにより樹立されたヒトヘパトーマ細胞株は、増殖性および機能性、品質の安定性といった面において、機能的肝細胞源としての利点を示した。

第一章では、肝臓について概説し、本研究の関連分野の既往の研究を紹介し、本研究の背景、目的、意義を示し、研究方針について説明した。

第二章では、薬剤添加によって高肝機能を発現するマウスヘパトーマ細胞株を、加温によって高肝機能を誘導可能な細胞へと遺伝子改変を行った。HSP70B'プロモーターと Tet 転写活性化システムを組み合わせることで、一度の加温に応じて LETF を高レベルで発現し続けるシステムを構築した。これにより肝機能の維持に誘導薬剤を添加し続ける必要が無くなり、より汎用性の高い細胞株となった。加温を与えると、細胞の形態が変化し、アルブミン分泌能、アンモニア除去能、CYP3A4 活性といった肝機能の向上が確認できた。しかし、加温によって肝機能が誘導される細胞は 100%ではなく、加温後は肝機能が誘導さ

れなかった細胞のみ増殖してしまうため、9日目になると全体としての肝機能は低下してしまった。細胞増殖を抑制するマイトマイシン C を添加し、肝機能が誘導されていない細胞の増殖を抑えることで、誘導された肝機能を 9 日後においても維持することができた。

第三章では、高肝機能誘導型マウスヘパトーマ細胞樹立に関する知見に基づいて、加温によって高肝機能を誘導可能なヒトヘパトーマ細胞の開発に取り組んだ。目的達成のために、以前開発された HepG2-HSP 細胞へと 8 種類の LETF 遺伝子を導入した。導入した LETF の発現は tTA によって誘導される。HepG2-HSP 細胞は、HSP プロモーターと Tet 転写活性化システムを組み合わせることで、一度の加温によって転写増幅を伴う tTA と EGFP の発現が誘導される。したがって、作製した細胞は加温を与えると、tTA および EGFP、LETF を大量に発現し高肝機能化される。実際に条件検討によって決定した 43°C での 30 分間の加温を与えると、HepG2/8F_HS 細胞は LETF の発現により増殖が抑制され、アルブミン分泌能、アンモニア除去能、CYP3A4 活性が顕著に向上した。しかし、温熱誘導型マウスヘパトーマ細胞と似たように誘導された肝機能は 3 日目をピークに徐々に低下してしまった。ここで、上述したように、本細胞は LETF と共に EGFP が発現しているため、EGFP 蛍光強度をもとに肝機能が持続する細胞を分取することができた。これにより、誘導された肝機能を長期間維持できるだけでなく、品質を肝機能の高い細胞に揃えることができるため、実験ロットによるばらつきを抑えることができ、肝毒性・薬物動態評価系などに用いる際に適正な評価ができる。また、HepG2/8F_HS 細胞はスフェロイドを形成することで、より高い機能を持続的に発揮した。さらに、網羅的転写産物解析によって、様々な肝関連遺伝子発現の向上を示した。

4.2 今後の展望

本研究では、通常培養条件下では旺盛に増殖し、熱刺激に応答して高肝機能を誘導可能なヒトヘパトーマ細胞株 HepG2/8F_HS を樹立した。バイオ人工肝臓や肝毒性・薬物動態評価系へと利用する候補となる細胞源には、効率的な細胞増殖能力や安定的な品質が求められる。肝非実質細胞（クッパー細胞、肝星細胞、肝類洞内皮細胞など）との共培養やスフェロイドへの凝集などのアプローチによりヒト初代肝細胞の機能と生存率は向上したものの、機能的な初代肝細胞を長期的に増殖・維持することは困難である[30]-[42]。近年、複数のグループがヒト初代肝細胞から増殖能力のある肝前駆細胞様細胞へのリプログラミングを報告した[43]-[45]。しかし、これらの方法では小分子やサプリメント、成長因子などの添加が必須であり、また肝前駆細胞を経由するため高肝機能細胞取得まで時間とコストがかかる。さらに、使用する初代肝細胞のロットによる肝機能のばらつきが生じる。別の細胞源として iPS 細胞由来肝細胞が考えられる[60]-[66]。マイクロウェルプレートを用いたヒト iPS 細胞から大量の肝芽を効率的に作製する手法が開発されたものの[72]、iPS 細胞由来肝細胞の使用には依然として細胞の分化のための時間やコスト、品質の不均一性などの問題がある。我々の HepG2/8F_HS 細胞は、ヘパトーマ細胞 HepG2 を親細胞としており、特殊な添加物を必要としない単純な培地で増殖するため、安価に迅速に大量の細胞を取得することが可能である。また、肝機能を誘導するためには一度の熱処理で十分であり、誘導の 3 日後には高い肝機能が発揮される。さらに、GFP 発現を利用して細胞を分取することで、品質を安定させ、誘導された肝機能を一定期間維持できる。

しかし、HepG2/8F_HS 細胞において誘導される肝機能発現レベルは、単離直後の初代肝細胞と比較すると低く、今後、この細胞の肝機能発現レベルをさらに向上させる必要がある。その手段としては、本研究で使用した 8 種類以外の肝

特異的転写因子をさらに追加して遺伝子導入することが考えられる。本研究では、マウスヘパトーマ細胞の肝機能向上をもたらした 8 種類の肝特異的転写因子を用いたが、これらの因子がヒトヘパトーマ細胞の肝機能向上に十分でない可能性も考えられる。また、Hepa/8F5 細胞株樹立の知見から、より多くの肝特異的転写因子を過剰に発現させ、それらの転写因子による相乗効果を引き起こすことが、さらなる肝機能向上に有効な手段であると考えられる。肝機能レベルを向上させる手段として培地成分の変更も考えられる。本研究では、全ての細胞の培養にヘパトーマ細胞培養培地である 10%FBS 含有 DMEM high glucose を用いているが、初代肝細胞や HepaRG といった機能的肝細胞の培養には、ほとんどの場合 Epidermal growth factor (EGF) や Hepatocyte growth factor (HGF) といった成長因子やデキサメタゾンやヒドロコルチゾンといったグルココルチコイドなどを添加している。また基礎培地も Williams' E や DMEM/Ham's F-12 などを用いる場合が多い。さらに FBS には細胞増殖をサポートするのに必要とされる、タンパク質、電解質、脂質、炭水化物、ホルモン、酵素、および他の不確定成分など、1000 以上の成分が含まれており、細胞培養を容易にする反面、肝機能誘導を阻害する成分が含まれている可能性もある。実際に初代肝細胞培養においては FBS の添加を避け、インスリン、トランスフェリン、セレンウム、エタノールアミンなどを添加している場合も多い。したがって、HepG2/8F_HS 細胞において、加温による肝機能誘導後からは初代肝細胞等で利用されている培地を用いることで、肝機能が改善される可能性がある。

参考文献

- [1] H. Elis, J.C. Sherrick, Morphology of the liver, *Academic Press*, 1969
- [2] 織田敏次, 肝臓の生物学, 東京大学出版会, 1990
- [3] 水野丈夫, 平良珠美子, 肝臓, 朝倉書店, 1980
- [4] E. Cleveland, A. Bandy, L.B. VanWagner, Diagnostic challenges of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis (Hoboken), *Clin. Liver Dis.*, 11 (2018), pp. 98–104
- [5] S. Leoni, F. Tovoli, L. Napoli, I. Serio, S. Ferri, L. Bolondi, Current guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review with comparative analysis, *World J. Gastroenterol.*, 24 (2018), pp. 3361–3373
- [6] L. Schiavo, L. Busetto, M. Cesaretti, S. Zelber-Sagi, L. Deutsch, A. Iannelli, Nutritional issues in patients with obesity and cirrhosis, *World J. Gastroenterol.*, 24 (2018), pp. 3330–3346
- [8] W. von Schönfels, J.H. Beckmann, M. Ahrens, A. Hendricks, C. Röcken, S. Szymczak, J. Hampe, C. Schafmayer, Histologic improvement of NAFLD in patients with obesity after bariatric surgery based on standardized NAS (NAFLD activity score), *Surg. Obes. Relat. Dis.*, 14 (2018), pp. 1607–1616
- [9] S.D. Ryder, I.J. Beckingham, ABC of diseases of liver, pancreas, and biliary system: Acute hepatitis, *BMJ*, 322 (2001), pp. 151–153
- [10] A.J. Zuckerman, Hepatitis Viruses, *Medical Microbiology*, 1996
- [11] B. Hajarizadeh, J. Grebely, G.J. Dore, Epidemiology and natural history of HCV infection, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 10 (2013), pp. 553–562
- [12] J.J. Ott, G.A Stevens, J. Groeger, S.T. Wiersma, Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity, *Vaccine*, 30 (2012), pp. 2212–2219
- [13] D. Schuppan, N.H. Afdhal, Liver cirrhosis, *Lancet*, 371 (2008), pp. 838–851
- [14] L. Puustinen, N. Barner-Rasmussen, E. Pukkala, M. Färkkilä, Incidence, prevalence, and causes of death of patients with autoimmune hepatitis: A nationwide register-based cohort study in Finland, *Dig. Liver Dis.*, 51 (2019), pp. 1294–1299

- [15] M. Colombo, A. Lleo, Refining surgical therapy of liver cancer in cirrhosis: etiology makes the difference, *Transl. Gastroenterol. Hepatol.*, 3 (2018), p. 104
- [16] M. Mito, M. Kusano, Hepatocyte transplantation in man, *Cell Transplant* 2, 1993, pp. 65–74
- [17] V. Dixit, Hepatocyte transplantation in liver disease, *Transplantation of the liver*, 2005, pp. 1379–1386
- [18] G. Pless, Bioartificial liver support systems, *Methods Mol. Biol.*, 640 (2010), pp. 511–523
- [19] Y. Wang, T. Susando, X. Lei, C. Anene-Nzelu, H. Zhou, L.H. Liang, H. Yu, Current development of bioreactors for extracorporeal bioartificial liver (Review), *Biointerphases*, 5 (2010), FA116–FA131
- [20] L.F. Zhao, X.P. Pan, L.J. Li, Key challenges to the development of extracorporeal bioartificial liver support systems, *Hepatobiliary Pancreat. Di. Int.*, 11 (2012), pp. 243–249
- [21] V. Starokozhko, G.M.M. Groothuis, Challenges on the road to a multicellular bioartificial liver, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 12 (2018), p. e227–e236
- [22] S.M. Paul, D.S. Mytelka, C.T. Dunwiddie, C.C. Persinger, B.H. Munos, S.R. Lindborg, A.L. Schacht, How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 9 (2010), pp. 203–214
- [23] F. Pammolli, L. Magazzini, M. Riccaboni, The productivity crisis in pharmaceutical R&D, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 10 (2011), pp. 428–438
- [24] M. Hay, D.W. Thomas, J.L. Craighead, C. Economides, J. Rosenthal, Clinical development success rates for investigational drugs, *Nat. Biotechnol.*, 32 (2014), pp. 40–51
- [25] Y. Zhou, J.X. Shen, V.M. Lauschke, Comprehensive evaluation of organotypic and microphysiological liver models for prediction of drug-induced liver injury, *Front. Pharmacol.*, 10 (2019), p. 1093
- [26] K.L. Chapman, H. Holzgreffe, L.E. Black, M. Brown, G. Chellman, C. Copeman, J. Couch, S. Creton, S. Gehen, A. Hoberman, L.B. Kinter, S. Madden, C. Mattis, H.A. Stemple, S. Wilson, Pharmaceutical toxicology: Designing studies to reduce animal use, while maximizing human translation, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 66 (2013), pp. 88–103

- [27] D. Ginzberg, R.J. Wong, R. Gish, Global HBV burden: guesstimates and facts, *Hepatol. Int.*, 12 (2018), pp. 315–329
- [28] S. Chevaliez, J.M. Pawlotsky, New virological tools for screening, diagnosis and monitoring of hepatitis B and C in resource-limited settings, *J. Hepatol.*, 69 (2018), pp. 916–926
- [29] C. Terry, A. Dhawan, R.R. Mitry, S.C. Lehec, R.D. Hughes, Optimization of the cryopreservation and thawing protocol for human hepatocytes for use in cell transplantation, *Liver Transpl.*, 16 (2010), pp. 229–237
- [30] D.M. Bissell, D.M. Arenson, J.J. Maher, F.J. Roll, Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver, *J. Clin. Invest.*, 79 (1987), pp. 801–812
- [31] R.T. Mingoia, D.L. Nabb, C.H. Yang, X. Han, Primary culture of rat hepatocytes in 96-well plates: effects of extracellular matrix configuration on cytochrome P450 enzyme activity and inducibility, and its application in in vitro cytotoxicity screening, *Toxicol. In Vitro*, 21 (2007), pp. 165–173
- [32] C. Guguen-Guillouzo, A. Guillouzo, General review on in vitro hepatocyte models and their applications, *Methods Mol. Biol.*, 640 (2010), pp. 1–40
- [33] N.J. Hewitt, M.J. Lechon, J.B. Houston, D. Hallifax, H.S. Brown, P. Maurel, J.G. Kenna, L. Gustavsson, C. Lohmann, C. Skonberg, A. Guillouzo, G. Tuschl, A.P. Li, E. LeCluyse, G.M. Groothuis, J.G. Hengstler, Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies, *Drug Metab. Rev.*, 39 (2007), pp. 159–234
- [34] E.L. Lecluyse, R.P. Witek, M.E. Andersen, M.J. Powers, Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing, *Crit. Rev. Toxicol.*, 42 (2012), pp. 501–548
- [35] S.R. Khetani, S.N. Bhatia, Microscale culture of human liver cells for drug development, *Nat. Biotechnol.*, 26 (2008), pp. 120–126

- [36] S. Hasmall, N. James, K. Hedley, K. Olsen, R. Roberts, Mouse hepatocyte response to peroxisome proliferators: dependency on hepatic nonparenchymal cells and peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha), *Arch. Toxicol.*, 75 (2001), pp. 357–361
- [37] E.L. Lecluyse, R.P. Witek, M.E. Andersen, M.J. Powers, Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing, *Crit. Rev. Toxicol.*, 42 (2012), pp. 501–548
- [38] R.A. Roberts, P.E. Ganey, C. Ju, L.M. Kamendulis, I. Rusyn, J.E. Klaunig, Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis, *Toxicol. Sci.*, 96 (2007), pp. 2–15
- [39] A. Dash, W. Inman, K. Hoffmaster, S. Sevidal, J. Kelly, R.S. Obach, L.G. Griffith, S.R. Tannenbaum, Liver tissue engineering in the evaluation of drug safety, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 5 (2009), pp. 1159–1174
- [40] J.C. Gerlach, K. Mutig, I.M. Sauer, P. Schrade, E. Efimova, T. Mieder, G. Naumann, A. Grunwald, G. Pless, A. Mas, S. Bachmann, P. Neuhaus, K. Zeilinger, Use of primary human liver cells originating from discarded grafts in a bioreactor for liver support therapy and the prospects of culturing adult liver stem cells in bioreactors: a morphologic study, *Transplantation*, 76 (2003), pp. 781–786
- [41] A. Sivaraman, J.K. Leach, S. Townsend, T. Iida, B.J. Hogan, D.B. Stolz, R. Fry, L.D. Samson, S.R. Tannenbaum, L.G. Griffith, A microscale in vitro physiological model of the liver: predictive screens for drug metabolism and enzyme induction, *Curr. Drug Metab.*, 6 (2005), pp. 569–591
- [42] K. Zeilinger, T. Schreiter, M. Darnell, T. Soderdahl, M. Lubberstedt, B. Dillner, D. Knobloch, A.K. Nussler, J.C. Gerlach, T.B. Andersson, Scaling down of a clinical three-dimensional perfusion multicompartiment hollow fiber liver bioreactor developed for extracorporeal liver support to an analytical scale device useful for hepatic pharmacological in vitro studies, *Tissue Eng. Part C Methods*, 17 (2011), pp. 549–556

- [43] G.B. Fu, W.J. Huang, M. Zeng, X. Zhou, H.P. Wu, C.C. Liu, H. Wu, J. Weng, H.D. Zhang, Y.C. Cai, C. Ashton, M. Ding, D. Tang, B.H. Zhang, Y. Gao, W.F. Yu, B. Zhai, Z.Y. He, H.Y. Wang, H.X. Yan, Expansion and differentiation of human hepatocyte-derived liver progenitor-like cells and their use for the study of hepatotropic pathogens. *Cell Res.*, 29 (2018), pp. 8–22
- [44] T. Katsuda, J. Matsuzaki, T. Yamaguchi, Y. Yamada, M. Prieto-Vila, K. Hosaka, A. Takeuchi, Y. Saito, T. Ochiya, Generation of human hepatic progenitor cells with regenerative and metabolic capacities from primary hepatocytes, *eLife*, 8 (2018), e47313
- [45] Y. Kim, K. Kang, S.B. Lee, D. Seo, S. Yoon, S.J. Kim, K. Jang, Y.K. Jung, K.G. Lee, V.M. Factor, J. Jeong, D. Choi, Small molecule-mediated reprogramming of human hepatocytes into bipotent progenitor cells, *J. Hepatol.*, 70 (2019), pp. 97–107
- [46] N.B. Javitt, Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids, *FASEB J.*, 4 (1990), pp. 161–168
- [47] S. Wilkening, F. Stahl, A. Bader, Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line hepg2 with regard to their biotransformation properties, *Drug. Metab. Dispos.*, 31 (2003), pp. 1035–1042
- [48] K.J. Blight, J.A. McKeating, J. Marcotrigiano, C.M. Rice, Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture, *J. Virol.*, 77 (2003), pp. 3181–3190
- [49] K. Sa-ngiamsuntorn, A. Wongkajornsilp, K. Kasetsinsombat, S. Duangsa-ard, L. Nuntakarn, S. Borwornpinyo, P. Akarasereenont, S. Limsrichamrern, S. Hongeng, Upregulation of CYP 450s expression of immortalized hepatocyte-like cells derived from mesenchymal stem cells by enzyme inducers, *BMC Biotechnol.*, 11 (2011), p. 89
- [50] S. Enosawa, T. Miyashita, S. Suzuki, X.K. Li, M. Tsunoda, H. Amemiya, M. Yamanaka, S. Hiramatsu, N. Tanimura, T. Omasa, K. Suga, T. Matsumura, Long-term culture of glutamine synthetase-transfected HepG2 cells in circulatory flow bioreactor for development of a bioartificial liver, *Cell Transplant.*, 9 (2000), pp. 711–715

- [51] S. Enosawa, T. Miyashita, T. Saito, T. Omasa, T. Matsumura, The significant improvement of survival times and pathological parameters by bioartificial liver with recombinant HepG2 in porcine liver failure model. *Cell Transplant.*, 15 (2006), pp. 873–880
- [52] S.M. Coward, C. Legallais, B. David, M. Thomas, Y. Foo, D. MavriDamelin, H.J. Hodgson, C. Selden, Alginate-encapsulated HepG2 cells in a fluidized bed bioreactor maintain function in human liver failure plasma, *Artif. Organs*, 12 (2009), pp. 1117–1126
- [53] S. Knowlton, S. Tasoglu, A bioprinted liver-on-a-chip for drug screening applications, *Trends Biotechnol.*, 34 (2016), pp. 681–682
- [54] N.S. Bhise, V. Manoharan, S. Massa, A. Tamayol, M. Ghaderi, M. Miscuglio, Q. Lang, Y.S. Zhang, S.R. Shin, G. Calzone, N. Annabi, T.D. Shupe, C.E. Bishop, A. Atala, M.R. Dokmeci, A. Khademhosseini, A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids, *Biofabrication*, 8 (2016), 014101
- [55] H. Yan, G. Zhong, G. Xu, W. He, Z. Jing, Z. Gao, Y. Huang, Y. Qi, B. Peng, H. Wang, L. Fu, M. Song, P. Chen, W. Gao, B. Ren, Y. Sun, T. Cai, X. Feng, J. Sui, W. Li, Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus, *eLife*, 1 (2012), e00049
- [56] M. Iwamoto, K. Watashi, S. Tsukuda, H.H. Aly, M. Fukasawa, A. Fujimoto, R. Suzuki, H. Aizaki, T. Ito, O. Koiwai, H. Kusuhara, T. Wakita, Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 443 (2014), pp. 808–813
- [57] A. König, B. Doring, C. Mohr, A. Geipel, J. Geyer, D. Glebe, Kinetics of the bile acid transporter and hepatitis B virus receptor Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in hepatocytes, *J. Hepatol.*, 61 (2014), pp. 867–875
- [58] K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, 126 (2006), pp. 663–676
- [59] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, 131 (2007), pp. 861–872

- [60] Z. Song, J. Cai, Y. Liu, D. Zhao, J. Yong, S. Duo, X. Song, Y. Guo, Y. Zhao, H. Qin, X. Yin, C. Wu, J. Che, S. Lu, M. Ding, H. Deng, Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells, *Cell Res.*, 19 (2009), pp. 1233–1242
- [61] K. Si-Tayeb, F.K. Noto, M. Nagaoka, J. Li, M.A. Battle, C. Duris, P.E. North, S. Dalton, S.A. Duncan, Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells, *Hepatology*, 51 (2010), pp. 297–305
- [62] H. Liu, Y. Kim, S. Sharkis, L. Marchionni, Y.Y. Jang, In vivo liver regeneration potential of human induced pluripotent stem cells from diverse origins, *Sci. Transl. Med.*, 82 (2011)
- [63] S. Zhu, M. Rezvani, J. Harbell, A.N. Mattis, A.R. Wolfe, L.Z. Benet, H. Willenbring, S. Ding, Mouse liver repopulation with hepatocytes generated from human fibroblasts, *Nature*, 508 (2014), pp. 93–97
- [64] L.T. Ang, A.K.Y. Tan, M.I. Autio, S.H. Goh, S.H. Choo, K.L. Lee, J. Tan, B. Pan, J.J.H. Lee, J.J. Lum, C.Y.Y. Lim, I.K.X. Yeo, C.J.Y. Wong, M. Liu, J.L.L. Oh, C.P.L. Chia, C.H. Loh, A. Chen, Q. Chen, I.L. Weissman, K.M. Loh, B. Lim, A roadmap for human liver differentiation from pluripotent stem cells, *Cell Rep.*, 22 (2018), pp. 2190–2205
- [65] Q. Wang, D. Sun, Z. Liang, J. Wang, X. Zhong, Y. Lyu, J. Cao, Z. Lin, Y. Du, Z. Miao, S. Lu, C. Li, J. Xu, Y. Shi, H. Deng, Generation of human hepatocytes from extended pluripotent stem cells, *Cell Res.*, 30 (2020), pp. 810–813
- [66] T. Takebe, K. Sekine, M. Enomura, H. Koike, M. Kimura, T. Ogaeri, R.R. Zhang, Y. Ueno, Y.W. Zheng, N. Koike, S. Aoyama, Y. Adachi, H. Taniguchi, Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant, *Nature*, 499 (2013), pp. 481–484
- [67] S. Deguchi, T. Shintani, K. Harada, T. Okamoto, A. Takemura, K. Hirata, K. Ito, K. Takayama, H. Mizuguchi, In vitro model for a drug assessment of cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4 substrates using human induced pluripotent stem cells and genome editing technology, *Hepatol. Commun.*, 5 (2021), pp. 1385–1399

- [68] M. Lorvellec, A.F. Pellegata, A. Maestri, C. Turchetta, E.A. Mediavilla, S. Shibuya, B. Jones, F. Scottoni, D.P. Perocheau, A.C. Cozmescu, J.M. Delhove, D. Kysh, A. Gjinovci, J.R. Counsell, W.E. Heywood, K. Mills, T.R. McKay, P.D. Coppi, P. Gissen, An in vitro whole-organ liver engineering for testing of genetic therapies, *iScience*, 23 (2020), p. 101808
- [69] T.H. Nghiem-Rao, C. Pfeifer, M. Asuncion, J. Nord, D. Schill, K. Pulakanti, S.B. Patel, L.A. Cirillo, S. Rao, Human induced pluripotent stem cell derived hepatocytes provide insights on parenteral nutrition associated cholestasis in the immature liver, *Sci. Rep.*, 11 (2021), 12386
- [70] A. Schöbel, K. Rösch, E. Herker, Functional innate immunity restricts Hepatitis C Virus infection in induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes, *Sci. Rep.*, 8 (2018), 3893
- [71] R. Ouchi, S. Togo, M. Kimura, T. Shinozawa, M. Koido, H. Koike, W. Thompson, R.A. Karns, C.N. Mayhew, P.S. McGrath, H.A. McCauley, R.R. Zhang, K. Lewis, S. Hakozi, A. Ferguson, N. Saiki, Y. Yoneyama, I. Takeuchi, Y. Mabuchi, C. Akazawa, H.Y. Yoshikawa, J.M. Wells, T. Takebe, Modeling steatohepatitis in humans with pluripotent stem cell-derived organoids, *Cell Metab.*, 30 (2019), pp. 374–384
- [72] T. Takebe, K. Sekine, M. Enomura, H. Koike, M. Kimura, E. Yoshizawa, S. Ayano, M. Koido, S. Funayama, N. Nakanishi, T. Hisai, T. Kobayashi, T. Kasai, R. Kitada, A. Mori, H. Ayabe, Y. Ejiri, N. Amimoto, Y. Yamazaki, S. Ogawa, M. Ishikawa, Y. Kiyota, Y. Sato, K. Nozawa, S. Okamoto, Y. Ueno, H. Taniguchi, Massive and reproducible production of liver buds entirely from human pluripotent stem cells, *Cell Rep.*, 21 (2017), pp. 2661–2670
- [73] S. Enosawa, R. Horikawa, A. Yamamoto, S. Sakamoto, T. Shigeta, S. Nosaka, J. Fujimoto, A. Nakazawa, A. Tanoue, K. Nakamura, A. Umezawa, Y. Matsubara, A. Matsui, M. Kasahara, Hepatocyte transplantation using a living donor reduced graft in a baby with ornithine transcarbamylase deficiency: a novel source of hepatocytes, *Liver Transpl.*, 20 (2014), pp. 391–393
- [74] K.R. Vogel, A.A. Kennedy, L.A. Whitehouse, K.M. Gibson¹, Hepatocyte transplantation for inherited metabolic diseases of the liver, *J. Intern. Med.*, 272 (2012), pp. 201–223

- [75] S.P. Horslen, I.J. Fox, Hepatocyte transplantation, *Transplantation*, 77 (2004), pp. 1481–1486
- [76] T. Vierbuchen, M. Wernig, Direct lineage conversions: unnatural but useful?, *Nat. Biotechnol.*, 29 (2011), pp. 892–907
- [77] S. Yamanaka, H.M. Blau, Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches, *Nature*, 465 (2010), pp. 704–712
- [78] S. Sekiya, A. Suzuki, Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors, *Nature*, 475 (2011), pp. 390–393
- [79] P. Huang, Z. He, S. Ji, H. Sun, D. Xiang, C. Liu, Y. Hu, X. Wang, L. Hui, Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors, *Nature*, 475 (2011), pp. 386–389
- [80] P. Huang, L. Zhang, Y. Gao, Z. He, D. Yao, Z. Wu, J. Cen, X. Chen, C. Liu, Y. Hu, D. Lai, Z. Hu, L. Chen, Y. Zhang, X. Cheng, X. Ma, G. Pan, X. Wang, L. Hui, Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes, *Cell Stem Cell*, 14 (2014), pp. 370–384
- [81] P.M. Boyle, P.A. Silver, Harnessing nature's toolbox: regulatory elements for synthetic biology, *J. R. Soc. Interface*, 6 (2009), pp. S535–S546
- [82] M. Müller, S. Ausländer, D. Ausländer, C. Kemmer, M. Fussenegger, A novel reporter system for bacterial and mammalian cells based on the non-ribosomal peptide indigoidine, *Metab. Eng.*, 14 (2012), pp. 325–335
- [83] Gossen M, Bujard H, Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (1992), pp. 5547–5551
- [84] J. Joutsen, L. Sistonen, Tailoring of proteostasis networks with heat shock factors, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 11 (2018), a034066
- [85] D.A. Parsell, S. Lindquist, The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins, *Annu. Rev. Genet.*, 27 (1993), pp. 437–496
- [86] J.T. Silver, E.G. Noble, Regulation of survival gene hsp70, *Cell Stress Chaperones*, 17 (2012), pp. 1–9
- [87] W. Walther, U. Stein, Heat-responsive gene expression for gene therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61 (2009), pp. 641–649

- [88] B. Chu, F. Soncin, B.D. Price, M.A. Stevenson, S.K. Calderwood, Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996), pp. 30847–30857
- [89] P.B. Mason, J.T. Lis, Cooperative and competitive protein interactions at the Hsp70 promoter, *J. Biol. Chem.*, 272 (1997), pp. 33227–33233
- [90] C. Klose, F. Venezia, A. Hussong, S. Kircher, E. Schäfer, C. Fleck, Systematic analysis of how phytochrome B dimerization determines its specificity, *Nat. Plants*, 1 (2015), 15090
- [91] H.H. Huang, D. Camsund, P. Lindblad, T. Heidorn, Design and characterization of molecular tools for a synthetic biology approach towards developing cyanobacterial biotechnology, *Nucleic Acids Res.*, 38 (2010), pp. 2577–2593
- [92] A. Taton, F. Unglaub, N.E. Wright, W.Y. Zeng, J. Paz-Yepes, B. Brahmsha, B. Palenik, T.C. Peterson, F. Haerizadeh, S.S. Golden, J.W. Golden, Broad-host-range vector system for synthetic biology and biotechnology in cyanobacteria, *Nucleic Acids Res.*, 42 (2014), e136
- [93] A. Levskaya, A.A. Chevalier, J.J. Tabor, Z.B. Simpson, L.A. Lavery, M. Levy, E.A. Davidson, A. Scouras, A.D. Ellington, E.M. Marcotte, C.A. Voigt, Synthetic biology: engineering *Escherichia coli* to see light, *Nature*, 438 (2005), pp. 441–442
- [94] E. Reichhart, A. Ingles-Prieto, A.M. Tichy, C. McKenzie, H. Janovjak, A phytochrome sensory domain permits receptor activation by red light, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 55 (2016), pp. 6339–6342
- [95] T. Ziegler, A. Möglich, Photoreceptor engineering, *Front. Mol. Biosci*, 2 (2015), p. 30
- [96] B.L. Bassler, How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2 (1999), pp. 582–587
- [97] C.M. Waters, B.L. Bassler, Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21 (2005), pp. 319–346
- [98] W. Weber, M.D.E. Baba, M. Fussenegger, Synthetic ecosystems based on airborne inter- and intrakingdom communication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 104 (2007), pp. 10435–10440

- [99] W. Bacchus, M. Lang, M.D. El-Baba, W. Weber, J. Stelling, M. Fussenegger, Synthetic two-way communication between mammalian cells, *Nat. Biotechnol.*, 30 (2012), pp. 991–996
- [100] Z. Xie, L. Wroblewska, L. Prochazka, R. Weiss, Y. Benenson, Multi-input RNAi-based logic circuit for identification of specific cancer cells, *Science*, 333 (2011), pp. 1307–1311
- [101] K. Rinaudo, L. Bleris, R. Maddamsetti, S. Subramanian, R. Weiss, Y. Benenson, A universal RNAi-based logic evaluator that operates in mammalian cells, *Nat. Biotechnol.*, 25 (2007), pp. 795–801
- [102] H. Yamamoto, Y. Kawabe, A. Ito, M. Kamihira, Enhanced liver functions in mouse hepatoma cells by induced overexpression of liver-enriched transcription factors, *Biochem. Eng. J.*, 60 (2012), pp. 67–73
- [103] Y. Hayashi, W. Wang, T. Ninomiya, H. Nagano, K. Ohta, H. Itoh, Liver enriched transcription factors and differentiation of hepatocellular carcinoma, *Mol. Pathol.*, 52 (1999), pp. 19–23
- [104] H. Yamamoto, J.M. Tonello, T. Sambuichi, Y. Kawabe, A. Ito, M. Kamihira, Characterization of genetically engineered mouse hepatoma cells with inducible liver functions by overexpression of liver-enriched transcription factors. *J. Biosci. Bioeng.*, 125 (2018), pp. 131–139
- [105] A. Ito, R. Teranishi, K. Kamei, M. Yamaguchi, A. Ono, S. Masumoto, Y. Sonoda, M. Horie, Y. Kawabe, M. Kamihira, Magnetically triggered transgene expression in mammalian cells by localized cellular heating of magnetic nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.*, 128 (2019), pp. 355–364
- [106] M. Yamaguchi, A. Ito, N. Okamoto, Y. Kawabe, and M. Kamihira, Heat-inducible transgene expression system incorporating a positive feedback loop of transcriptional amplification for hyperthermia-induced gene therapy, *J. Biosci. Bioeng.*, 114 (2012), pp. 460–465
- [107] M. BouNader, S. Caruso, R. Donne, S. CeltonMorizur, J. Calderaro, G. Gentric, M. Cadoux, A. L’Hermitte, C. Klein, T. Guilbert, M. Albuquerque, G. Couchy, V. Paradis, J.P. Couty, J. ZucmanRossi, C. Desdouets, Polyploidy spectrum: a new marker in HCC classification, *Gut*, 69 (2020), pp. 355–36

謝辞

本論文は、九州大学大学院工学府化学システム工学専攻において行われた研究の成果についてまとめたものであります。

本研究を遂行するにあたり、終始適切なご指導ご鞭撻を賜りました九州大学大学院工学研究院化学工学部門 上平 正道 教授 に心より感謝するとともに厚くお礼を申し上げます。先生からは本研究に関する知見に限らず、研究者としての姿勢を学ばせていただきました。誠に有難うございました。6年間の研究生活での経験を活かし、研究者としてより一層精進してまいります。

本論文の審査にあたり、有意義な議論をさせていただきました九州大学大学院工学研究院化学工学部門の 井嶋 博之 教授 並びに 九州大学大学院工学研究院応用化学部門の 神谷 典穂 教授 に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、幅広い視野から有益なご助言とご指導を賜りました九州大学工学研究院化学工学部門 井藤 彰 准教授（現、名古屋大学大学院工学研究科化学システム工学専攻 教授）に心より感謝申し上げます。

実験を円滑に行えるように常に配慮して頂いたばかりでなく、困難な場面でもフォローして頂いた九州大学大学院工学研究院化学工学部門 河邊 佳典 准教授 には心より感謝いたします。

研究生活において温かくご指導下さった研究室の先輩方、また、至らない私を常に支え、励まして頂いた後輩方に心よりお礼申し上げます。特に、同じ研究チームの一員として常に配慮し、手厚く指導して頂いた Jane Marie Tonello 氏、佐

藤 一輝氏、永江 裕樹氏を始め、積極的にサポートして下さり、終始和やかな雰囲気
で接して頂いた Manuel Soto Souvervielle 氏、堀之内 恭太氏、芦刈 政亮氏、
Silas Habimana 氏、遠藤 淳平氏に深く感謝致します。

最後に、9年間という長い学生生活を温かく見守り、支えて下さった両親、兄、
妹を始め、祖父母、友人たちには感謝の意が絶えません。皆様の支えがなければ
こうして私の研究が形になることはありませんでした。ここに深く感謝いたし
ます。

令和4年1月

北野 裕之