

様式3

愛媛大学沿岸環境科学研究センター  
共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」  
共同研究報告書

平成 30 年 3 月 20 日

化学汚染・沿岸環境研究拠点 拠点長 殿

申請者（研究代表者）

所属機関 北海道大学

職 准教授

氏名 池中 良徳

e-mail y\_ikenaka@vetmed.hokudai.ac.jp

下記の共同研究について、別紙の通り報告します。

1 研究課題

野生動物 iHep 細胞の確立と異物代謝第 II 相抱合反応の種差の解明

2 研究組織

| 氏名                  | 所属             | 職        | 分担研究課題   |
|---------------------|----------------|----------|----------|
| 代表者<br>池中良徳         | 北海道大学          | 准教授      | 同上       |
| 分担者<br>石井千尋<br>武田一貴 | 北海道大学<br>北海道大学 | D4<br>D2 | 同上<br>同上 |
| 拠点対応教員<br>野見山 桂     | 愛媛大学           | 准教授      |          |

3 研究内容 （別紙）

別紙

## 研究課題名

野生動物 iHep 細胞の確立と異物代謝第 II 相抱合反応の種差の解明

## 研究目的

本研究の目的は、実験動物によって得られた毒性データだけでは予測が難しい、野生動物の化学物質感受性を明らかにすることである。世界各国で野生動物の Mass Death が報告されており、特に希少トッププレデター種では絶滅の危機に追いやられている種も少なくない。化学物質の感受性を明らかにするためには、*in vivo* レベルの投与実験が有効であるが、特に希少野生動物では実質不可能である。そこで、当該研究では各動物種からダイレクトリプログラミングにより iHep 細胞（誘導性肝臓様細胞）を作成することで新たな *in vitro* による評価系の構築を目指す。

ここで、ダイレクトリプログラミングによる iHep 細胞の作成には、齧歯類において Hnf4 $\alpha$  と Foxa という肝細胞分化に関連した 2 つの転写因子が少なくとも必要である事が共同研究者らの先行研究により明らかになっている<sup>1)</sup>。一方、本研究がチャレンジする野生動物における iHep 細胞の作成は、先行研究において、ハイエナの皮膚線維芽細胞に上記因子を導入することで、肝臓マーカーであるアルブミンや E-cadherin の顕著な発現が確認できている。しかし、iHep 細胞への転換頻度が非常に低いことや、cytochrome P450 や UGT 等、異物代謝に関与する酵素群の発現量が低い事など、クリアしなければならない“種差の壁”が存在する。そこで、当該研究では、種を問わず iHep 細胞へ誘導できる因子および培養条件を比較生物学的な視点で探索し、全ての動物種で“共通”の誘導因子および培養条件を明らかにする。

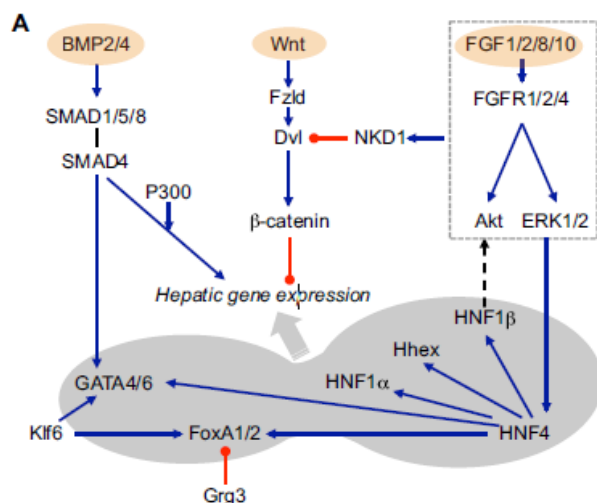
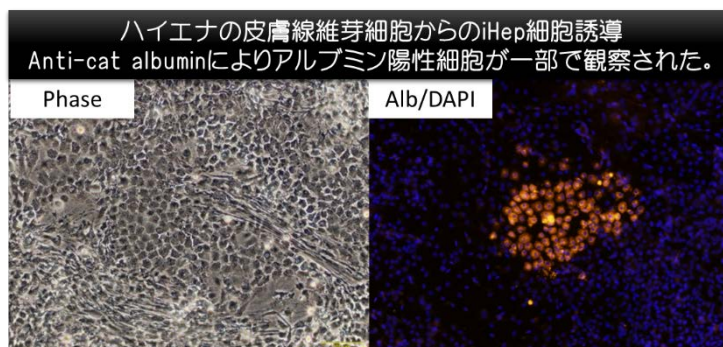
今回の研究では①特に生態系の高次に位置する食肉目を用いた iHep 細胞への誘導の試み、②これまで極めて限られた報告しかなくない食肉目の硫酸抱合酵素の機能および遺伝的性状について報告する。

## 研究内容

### ① iHep 細胞への誘導の試み

当該研究では、食肉目として、ハイエナに注目した。ハイエナの皮膚線維芽細胞に鈴木因子である  $Hnf4\alpha$  と  $Foxa$  ( $Foxa1$ ,  $Foxa2$ ,  $Foxa3$  のいずれか一つ) を導入した。その結果、肝臓

マーカーであるアルブミンや E-cadherin の顕著な増加を確認できた(上図)。しかし、誘導効率が低い事や cytochrome P450 や UGT 等、異物代謝に關与する酵素群の発現量が低い事などが改めて浮き彫りとなった。



線維芽細胞から肝細胞への誘導に、今回は鈴木因子を用いた。一方、最近の報告では HNF や  $Foxa$  以外にも、肝臓の初期発生にはいくつかの重要な Key factor が報告され始めている(右図)。また、これらの因子には種差があり、例えば、マウスの肝臓への分化誘導には  $HNF4\alpha$  が重要であるが、ヒトでは  $HNF1\alpha$  が重要であると言った知見である。

今後、種を超えた iHep 細胞への誘導を考慮すると、発生学的に各種でどのような因子が重要であるのか、明らかにしていく必要がある。また、これら遺伝的因子に依存しない誘導法の確立も重要になる。Chemical を用いた誘導法もその一つであり、今後はこれらの組み合わせにより“種共通”の分化因子を探索していく予定である。

## ②食肉目の硫酸抱合活性

遺伝子データベースの解析より SULT 分子種の遺伝子は1ファミリーに属する分子種として食肉目で 1A1, 1B1, 1C1, 1C2, 1C4, 1D1, 1E1 の存在が明らかとなった。

遺伝子コード領域の比較検討の結果、ヒトとほとんどの食肉目動物において SULT1B1, 1D1, 1E1 の 3 分子種は UGT2A1/2 遺伝子と CSN1S1 遺伝子の間にコードしていることが明らかとなった。しかし、鰭脚類のアザラシとセイウチでは UGT2A1/2 遺伝子と CSN2 遺伝子の間にコードされ、SULT1E1 分子種の欠損が示唆された(図 1)。

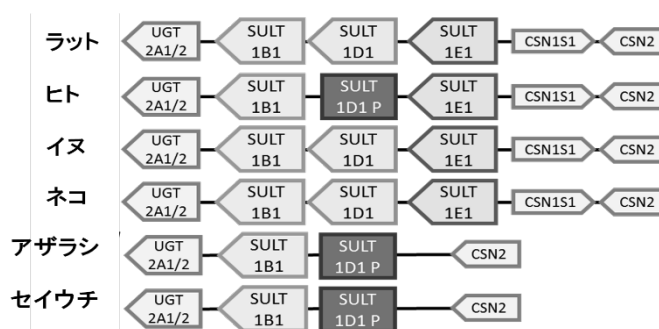


図 1：SULT1 ファミリーの遺伝子コード領域の一部

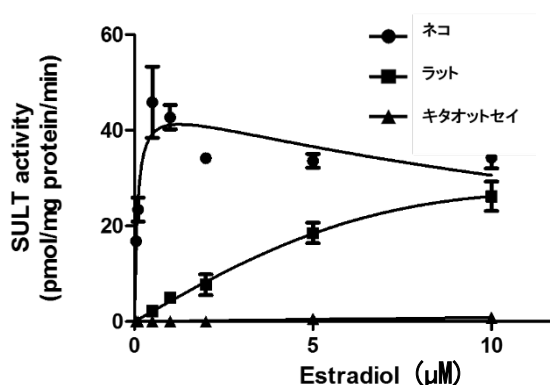


図 2：SULT1E1 活性の Michaelis-Menten 図

更に、*in vitro*にて SULT1E1 特異的な基質を用いた活性試験の結果、ネコ、およびラットと比較して鰭脚類のキタオットセイでは非常に低い  $V_{max}$  および  $V_{max}/K_m$ 、更には非常に高い  $K_m$  値が見受けられた(図 2)。これらのことから鰭脚類では SULT1E1 分子種の活性が非常に低く、機能的な役割を持っていないことが示唆される。SULT1E1 分子種は Bisphenol A や Hydroxypolychlorinated biphenyls 等の環境化学物質の代謝に重要な酵素である一方、内因性物質のエストロゲン代謝を担う酵素群である。エストロゲン代謝は UGT と SULT で相補的に担われているが、ネコでは SULT 活性が比較的高く、主に SULT を用いた代謝が行われている可能性が考えられた。一方鰭脚類では UGT と SULT 共にエストロゲンに対する活性が低い。そのため鰭脚類においては代償的な代謝経路を含む、その他のエストロゲン代謝経路に大きな種差がある可能性が示唆された。

## 成果発表リスト

1 : Kondo T, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Kawai YK, Mizukawa H, Mitani Y, Nomiya K, Tanabe S, Ishizuka M. UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B subfamily interspecies differences in carnivores. *Tox. Sci.* 158: 90-100 (2017)  
DOI: 10.1093/toxsci/kfx072

2 : Saengtienchai A, Ikenaka Y, Kawata M, Kawai Y, Takeda K, Kondo T, Bortey-Sam N, Nakayama SMM, Mizukawa H, Ishizuka M. Comparizon of xenobiotic metabolism in phase I oxidation and phase II conjugation between rats and bird species. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C* (accepted)