

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2015.2) 15,1:60-61.

平成24・25年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題 9) プロテオミクスによる肝細胞の増殖・分化制御機構の機能形態学的検討

藤井 清永

9) プロテオミクスによる肝細胞の増殖・分化制御機構の機能形態学的検討

研究代表者 藤井 清永

【目的】

肝細胞はきわめて高度に分化した複雑な細胞機能を持ちながら、必要に応じ幹細胞に匹敵する増殖能を示すユニークな細胞である。一方で、肝細胞の増殖・分化の異常はさまざまな非腫瘍性および腫瘍性肝疾患の病態に関わっていることが知られている。肝細胞の増殖と分化の間には密接な関連があるとされているが、これらの制御機構についてはまだ不明の点が多く残されている。

初代培養肝細胞は、肝臓の機能や薬物代謝の研究に実用的な研究材料として広く用いられており、肝細胞の増殖・分化のダイナミクスを検討する上で有用なモデルである。しかし、分離肝細胞は、培養初期には多くの生理的機能を維持しているが、培養の経過に伴って形態や分化状態が劇的に変化する。したがって、初代培養肝細胞を研究に適用する際に、その分化状態や機能的な変化を把握しておくことは重要である。本研

究では、初代培養に伴う肝細胞の機能的な変化を体系的に捉えるため、プロテオミクスの手法を用いて、マウス肝細胞の培養後のタンパク質発現の変化を解析した。加えて、通常用いられる単層培養と肝細胞の分化状態を保つのに有利とされるスフェロイド培養の違いによる変化について検討した。

【方法】

肝細胞は、C57BL/6J マウスの肝臓よりコラーゲナーゼ灌流法を用いて単離した後、EGF と insulin、nicotinamide を添加した無血清 Williams' E 培地に懸濁し、単層培養は I 型コラーゲンを塗布したコラーゲンコート ディッシュ上で、スフェロイド培養はプライマリア ディッシュ上で培養した (図 1)。経時的に回収した細胞から可溶性タンパク質を抽出した後、トリプシンを用いて酵素消化してペプチド混合物とした。得られた試料は LC-MS/MS (液体クロマトグラフィータンデム質量分析法) によるプロテオーム解析に供し、含有するタンパク質を一齐同定するとともに、スペクトルカウント法を用いて試料間における発

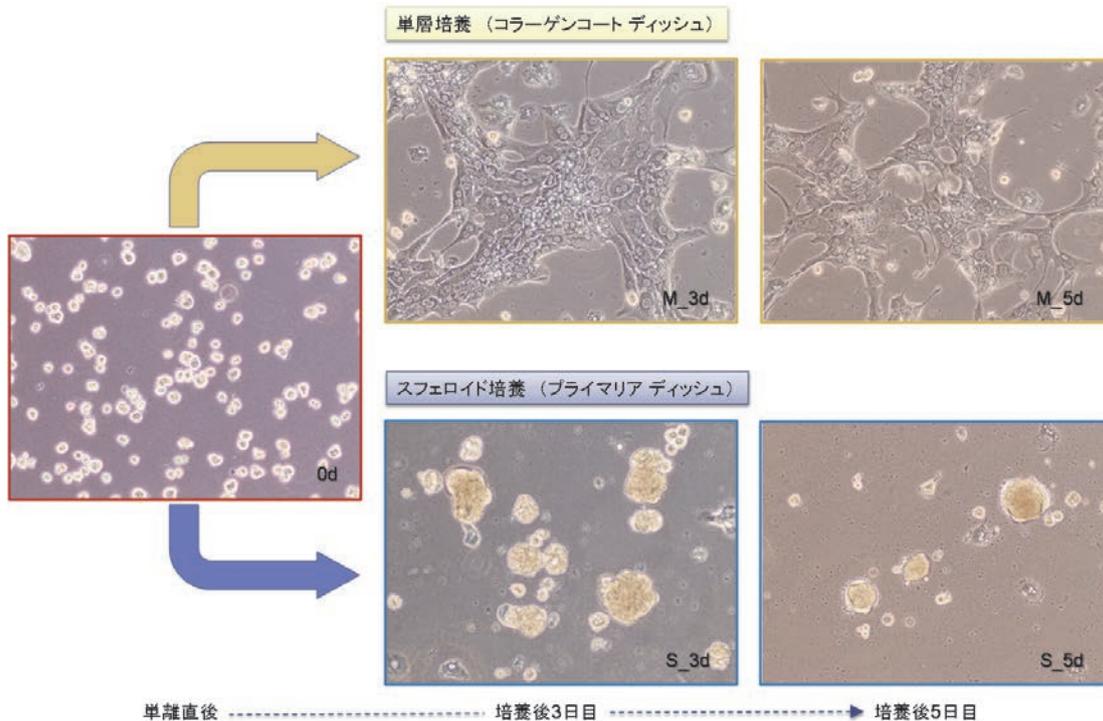


図 1 単層およびスフェロイド培養による形態の変化

単層培養では、分離肝細胞はすみやかにディッシュに接着し、その後はシート状もしくは索状の細胞集団を形成する。一方、スフェロイド培養では、一度弱くディッシュに接着した後、球状凝集塊 (スフェロイド) を形成し、次第にディッシュから遊離して浮遊する。

現変動を解析した。

**【結果】**

プロテオーム解析の結果、約 900 種類のタンパク質が同定され、約 700 種類の定量評価可能なタンパク質を用いて継時的な発現変動を調べたところ、マウス肝細胞の培養後のタンパク質発現は劇的に変化することが明らかになった。単層培養後 1 日目において、多くのタンパク質の発現が一過性に低下する一方、ミトコンドリア関連タンパク質の発現亢進が認められた。大部分のタンパク質の発現は培養後 2 日目、3 日目で種々の程度に回復するが、薬物代謝酵素 (CYP 類) の発現量は培養後に低下し続けた。また、細胞骨格系タンパク質の発現は培養後半に著明に増加したが、これは同時期の形態変化と関連するものと考えられた。さらに、単層培養とスフェロイド培養では、肝細胞のタンパク質の発現量も大きく変化することが明らかになっ

た。特に、単層培養では、脂肪酸代謝・合成やアミノ酸代謝に関わるタンパク質の発現量が維持される一方、スフェロイド培養では、解糖系・糖新生や糖代謝に関わるタンパク質の発現量が亢進・維持される傾向が認められた (図 2)。

**【考察】**

マウス肝細胞は培養によって、その形態とともにタンパク質発現が大きく影響されることが明らかとなった。プロテオーム解析は特に培養肝細胞の代謝状態を調べる上で有用であると考えられる。今回の検討に基づいて、増殖性の異なる培養条件下や肝細胞分化を誘導させる条件下などで、肝細胞の増殖・分化に関わるタンパク質群の同定を試み、肝細胞の増殖・分化制御機構メカニズムを明らかにしていきたいと考えている。

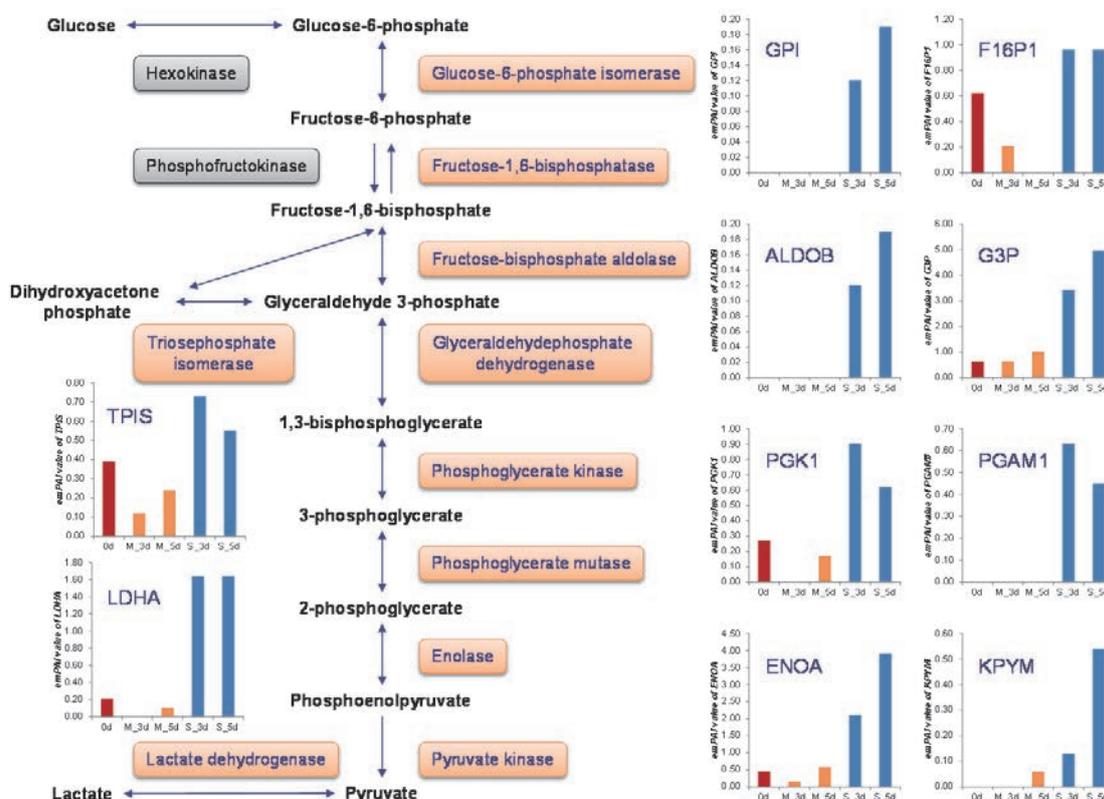


図 2 解糖系・糖新生に関わるタンパク質と発現量の変化  
糖代謝の経路とそれに関わるタンパク質の定量値 (emPAI 値) を示す。スフェロイド培養において糖代謝に関わる機能が維持・亢進していることが示唆される。