

# AMCoR

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

旭川医科大学研究フォーラム (2016.3) 16:22-23.

平成25・26年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題 11) 解糖系制御によるマウス肝細胞の分化調節メカニズムの検討

藤井 清永

# 11) 解糖系制御によるマウス肝細胞の分化調節メカニズムの検討

研究代表者 藤井 清永

## 【目的】

肝臓は全身の物質代謝の中心に位置する臓器であり、その代謝機能のほとんどは実質細胞である肝細胞が担っている。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。我々はこれまで、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、プロテオミクス的手法を用いて、マウス肝細胞の培養後のタンパク質発現の変化を検討してきた。プロテオミクスによる解析により初代培養肝細胞の代謝状態の全体像を把握することが可能であり、培養条件の違いに応じて代謝関連タンパク質の発現レベルが劇的に変動することが明らかになった。特に、通常の単層培養では解糖系に関わるタンパク質の発現が著明に減少するが、肝細胞の増殖が抑制され、分化形質が長期間にわたり維持されるスフェロイド（凝集）培養では、これらの多くのタンパク質の発現が保たれるか、亢進する傾向が見出された。そこで本研究では、解糖系の最終産物であり肝細胞機能に影響を与える可能性のあるピルビン酸を単層培養系に添加した場合におけるタンパク質の発現と分化状態の変化について調べた。

## 【方法】

肝細胞は、C57BL/6J マウスの肝臓よりコラ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、I 型コラーゲンを塗布したコラーゲン塗布ディッシュ上で単層培養した。ピルビン酸は 30 mM の濃度で培地に添加した。経時的に回収した細胞から可溶性タンパク質と total RNA を調製し、可溶性タンパク質は酵素消化した後に、LC-MS/MS による定量プロテオーム解析を行った。Total RNA は cDNA に逆転写後、分化マーカー遺伝子類を対象に、定量 RT-PCR による発現解

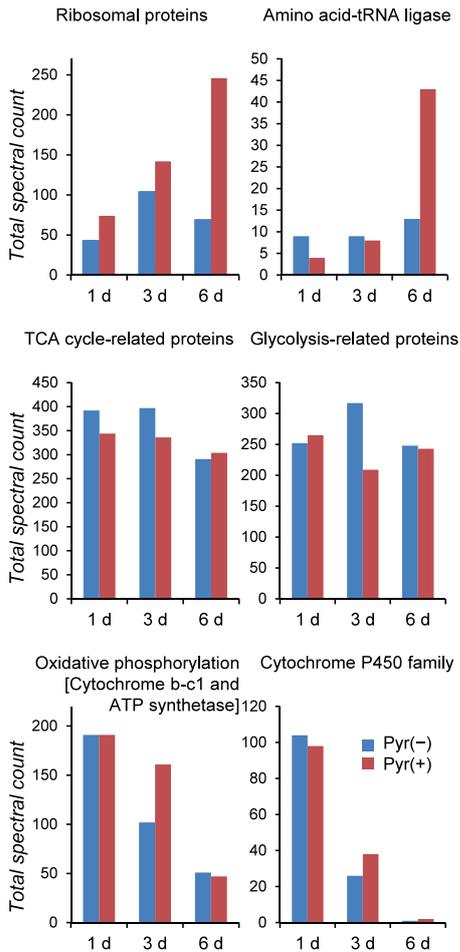


図 1 単層培養マウス肝細胞に対するピルビン酸添加の効果：機能分類されたタンパク質群の発現量変化

析を行った。

【結果】

プロテオーム解析の結果、単層培養系にピルビン酸を添加すると、培養後1日目から6日目にかけてクエン酸回路ならびに解糖系に関わるタンパク質の発現が全体的に低下する一方で、リボソームタンパク質、アミノ酸活性化酵素類および酸化的リン酸化に関わるタンパク質の発現が上昇した(図1)。また、肝細胞マーカーである albumin (Alb) ならびに胆管上皮細胞マーカーである keratin 19 (Krt19)、osteopontin (Spp1)、SRY (sex determining region Y)-box 9 (Sox9) の mRNA の発現変化を調べたところ、ピルビン酸の添加により Alb の発現が軽度に抑制される一方、胆管上皮細胞マーカーの発現が培養後3日目から6日目にかけて有意に亢進することが判明した(図2)。

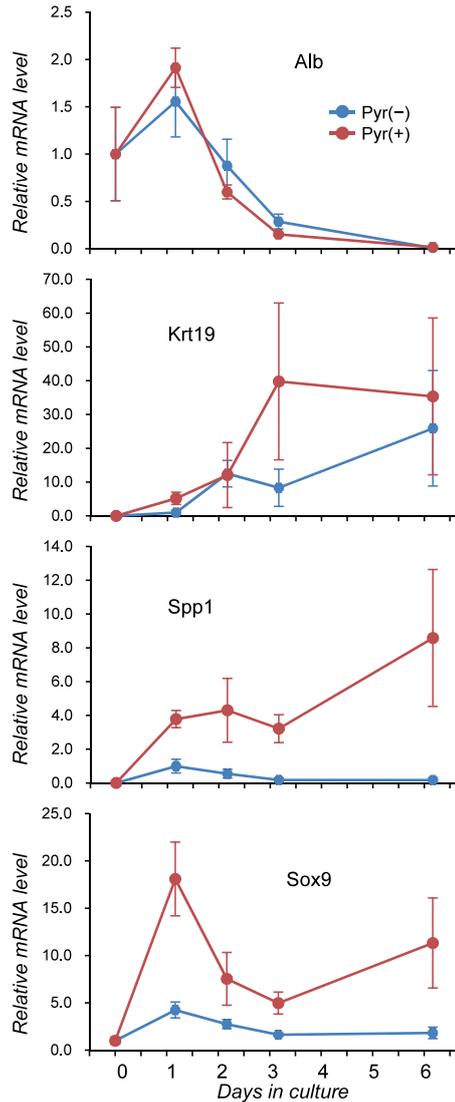


図 2 単層培養マウス肝細胞に対するピルビン酸添加の効果：肝細胞・胆管上皮細胞マーカーの mRNA 発現変化 (Reference gene, 18S rRNA)

【考察】

以上の結果は、解糖系の制御がタンパク質合成やエネルギー代謝に影響を与え、肝細胞の分化や増殖の調節に関連している可能性が示唆している。最近、肝細胞と胆管上皮細胞の間には相互的な可塑性があることが明らかになってきたが、肝上皮系細胞の分化調節メカニズムに代謝制御が関与していることはまだ報告されていない。今回の結果に基づいて、肝細胞の分化調節に関わる代謝制御の役割について、特に解糖系に焦点を当て、さらに検討を進めていきたいと考えている。