

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

肝ステム細胞を用いた毒性発現の  
評価解析方法の確立に関する研究

平成 17 年度 総括研究報告書

主任研究者 三高 俊広

平成 18 (2006) 年 4 月

# 目次

ページ

## I. 総括研究報告

肝ステム細胞を用いた毒性発現の評価解析  
方法の確立

三高 俊広 ..... 1

別紙 1 ..... 2 8

別紙 2 ..... 3 0

別紙 3 ..... 7 8

別紙 4 ..... 8 9

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 1 0 2

III. 研究成果の別刷

# 厚生労働科学研究費補助金(萌芽的先端医療技術推進研究事業)

## 総括研究報告書

「肝stem細胞を用いた毒性発現の評価解析方法の確立」に関する研究

主任研究者 三高 俊広 札幌医科大学がん研究所分子病理病態学・教授

### 研究要旨

我々の研究目的は、肝幹細胞の一種と考えられる小型肝細胞をヒト及びラット成体肝組織より分離培養することにより、*in vitro* で毒性発現の評価解析方法を確立し、DNA chip による遺伝子発現解析を組み合わせて薬剤の副作用や相互作用を予測する技術を開発しようとするものである。本年度は、1)培養皿上に形成させた類肝組織を用いて、培養液中に加え小型肝細胞に取り込ませた $[^3\text{H}]$ -Estradiol 17 $\beta$ -D-glucuronide を毛細胆管内から回収する方法を確立した。2) GeneChip (Affymetrix)を用いてラット小型肝細胞に強く発現している遺伝子を網羅的に解析し、成熟肝細胞との違いを検討した。その結果、小型肝細胞において発現が上昇した遺伝子数は 992、成熟肝細胞で発現が高い遺伝子数は 620 であった。Gene Ontology を用いた解析を行い、小型肝細胞では増殖に関係する遺伝子の発現が高いこと、成熟肝細胞においては代謝関連遺伝子の発現が高いことが示された。3) 外科手術により摘出されたヒト肝組織の正常部分から小型肝細胞を単離培養する方法を確立し、*in vitro* で増殖させることに成功した。ヒト小型肝細胞はヒアルロン酸コートした培養皿上では非血清存在下でも増殖することを見出した。また中国上海市にある Research Institute for Liver Diseases (RILD)社との共同研究を開始し、中国で調整された細胞からヒト小型肝細胞を効率的に採取・培養する方法の検討を始めた。

### 研究協力者

札幌医科大学がん研究所分子病理病態学

大栄秀和 訪問研究員

今純子 助手

高松みのり 訪問研究員

陳其潔 流動研究員

札幌医科大学医学部外科学第一

大島秀紀 研究生

平田公一 教授

佐々木寿誉 研究生

水口徹 講師

東京薬科大学薬学部

吉川大和 講師

第一化学薬品株式会社 薬物動態研究所

二宮真一 部長

## 研究目的

新薬開発には100億単位の研究開発費がかかると言われている。出来るだけコストを減らすためには効率よいスクリーニングが欠かせない。従来ラットやマウスを使って毒性試験を行ってきたが、動物とヒトの種差が問題になってきている。ヒトに対する影響はヒトの細胞を使って評価する必要があると考えられるようになってきた。しかし、現実に正常ヒト肝細胞を継続的に大量に入手することは世界的に見ても困難であるため、初期のスクリーニングに動物を使わざるを得ない。そのため肝細胞機能を有している細胞、特に細胞株が存在すると良いのだが、現状では高い肝機能を維持した細胞株は存在しない。我々が見出した小型肝細胞は、肝幹細胞の一種で主要な薬物代謝酵素の活性を一ヶ月以上培養した状態でも誘導することができる。また毛細胆管を形成させることもできる。さらにこの小型肝細胞は長期間凍結保存しても凍結前と同様な機能を維持している。我々は、このような特性を持つ小型肝細胞を用いて毒性発現の評価解析方法を確立し、DNA chip による遺伝子発現解析を組み合わせることで薬剤の副作用や相互

作用を予測する技術を開発しようとするものである。またヒト正常肝臓より小型肝細胞を分離培養する方法を確立し、不足しているヒト肝細胞の供給に道を付けたいと考えている。

薬剤の相互作用によって重篤な副作用が生じることが問題となってきている。小型肝細胞は既存の細胞にはみられない、

- 1) 増殖可能、
- 2) 長期間薬物代謝酵素活性を持つ、
- 3) 代謝プロファイルをみるのが可能、
- 4) 胆汁成分を毛細胆管に分泌する、
- 5) 凍結保存が可能

などの特性を持っている。この特性を利用することでこれまでできなかった試験研究、特に薬物代謝動態を様々な条件を設定して行うことが可能になる。例えば女性ホルモンの高い状態(疑似妊娠状態)での薬物代謝動態を容易にみることができ、DNA chip を使って薬物代謝酵素遺伝子の発現をみることで薬剤効果の増強・遷延などを容易に予測可能になる。また肝細胞で代謝された物質を調べることにより代謝経路の予測や代謝産物の毒性などを調べることが可能になる。また慢性的にある薬剤を服用している患者で新規に投与された薬剤の代謝動態など薬物相互作用の研究も行うことができる。ヒト小型肝細胞の供給により新薬開発が促進されると期待される。

本年度は主に

(1) 毛細胆管へ分泌される代謝産物の同定方法の確立

- 毛細胆管がネットワークや嚢胞を形成した時にビリルビンや胆汁酸などを培養液に加え、最も効率よく毛細胆管、嚢胞に排泄させる方法の検討
- 毛細胆管内に分泌され蓄積したところで、毛細胆管から分泌物を回収する方法の検討
- 成熟化に伴う遺伝子変化、特に薬物代謝酵素、転写因子、トランスポーター遺伝子を中心に DNA chip を用いての検討

(2) 女性ホルモン異常状態(疑似妊娠状態)における薬剤の代謝酵素遺伝子誘導発現の解析

(3) ヒト小型肝細胞を効率よく分離培養する方法の確立

について研究を行った。

## 研究方法

研究項目(1)–(3)それぞれについて研究方法を示す。

(1) 毛細胆管へ分泌される代謝産物の同定方法の確立

1. 細胞分離及び培養

Sprague-Dawley ラット(雄、6-10 週齢)を用いた。前灌流液及びコラゲナーゼ含有灌流液を経門脈で灌流し、細胞培養液に分離細胞を懸濁した。細胞懸濁液を 50 x g、1

分間、4°Cで遠心し、上清を小型肝細胞画分として回収した。小型肝細胞画分はさらに 50 x g、1分間、4°Cの遠心を2回行って沈殿した細胞を除いたのち、50 x g、5分間、4°Cの遠心で沈殿した細胞を細胞培養液に懸濁する操作を2回、150 x g、5分間、4°Cの遠心で沈殿した細胞を細胞培養液に懸濁する操作を2回行った。さらに 50 x g、5分間、4°Cの遠心で沈殿した細胞を下記の組成の Plating medium に懸濁し、viability を測定後、生細胞を  $1 \times 10^5$  cells/ml の濃度で培養皿に播種した。

Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM; Sigma)

+ 10% Fetal bovine serum (大日本製薬)

+ 10 mM nicotinamide (Sigma)

+ 1 mM ascorbic acid 2-phosphate (和光純薬)

+ 10 ng/ml Epidermal growth factor (EGF; BD Biosciences)

+ 0.5 mg/L insulin (明治乳業)

+  $10^{-7}$  M dexamethasone

+ Antibiotics (Penicillin, Streptomycin, Gentamycin)

培養液は1日おきに交換し、培養4日目より 1% Dimethylsulfoxide (DMSO; Aldrich) を培養液に加えた。培養 12 日目に小型肝細胞のコロニーが 30-50 個の細胞で構成された段階で培養皿より小型肝細胞コロニーを剥離し、コラーゲンコートディッシュへ再播種した。小型肝細胞コロニーを高密度で培

養することにより小型肝細胞の成熟化を促進し、毛細胆管を有する類肝組織を形成させた。培養液は、下記の組成のものを用い、液交換は一日置きに行った。

DMEM + 10 mM nicotinamide  
+ 1 mM ascorbic acid 2-phosphate  
+ 10 ng/ml EGF  
+ 0.5 mg/L insulin  
+  $10^{-7}$  M dexamethasone  
+ Antibiotics

## 2. 細胞形態学的解析

培養細胞およびコロニーの形態学的観察は下記の機器を用い、画像を撮影した後、解析した。

顕微鏡: OLYMPUS 1X71

CCD カメラ: OLYMPUS DP50

画像解析ソフト: OLYMPUS Viewfinder Lite Ver.1.0

## 3. 免疫細胞染色法

- ① 培養皿の medium を除去、PBS にて洗浄した後、70%エタノール (Mrp2, Mrp3) または 4%パラホルムアルデヒド/PBS (Oatp2)にて 15 分間固定。
- ② 再度 PBS にて洗浄後、10% normal goat serum (CHEMICON) を用いて Blocking (30分間)。
- ③ 細胞は、PBS にて洗浄後、一次抗体として抗 Mrp2 または抗 Mrp3 抗体 を 1 時間、抗 Oatp2 抗体は Over night (約 12 時

間)で処置した。各抗体は、表 1<別紙1>に記載したのものを用いた。

- ④ PBS で洗浄後、Alexa488 または Alexa594 でラベルした二次抗体を用いて蛍光染色を行った。
- ⑤ DAPI/PPD 溶液にて mounting 施行し、前述の顕微鏡システムを用いて観察

## 4. 半定量 RT-PCR 法

培養 13、16、19、22、25、28 日目の小型肝細胞コロニーより RNeasy Midi Kit (Qiagen) を用いて総 RNA を抽出し、半定量 RT-PCR 法で解析を行った。

## 5. 肝細胞への有機アニオン基質取り込み実験

類洞側 Oatps の取り込み基質である [ $^3$ H] Estrone 3-sulfate を用いて肝細胞内への有機アニオン基質の取り込み実験を行った。小型肝細胞コロニーに基質を加えた Transport buffer を投与した。

Transfer buffer:

116 mM NaCl  
5.3 mM KCl  
1.1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0.8 mM  $\text{MgSO}_4$ ,  
1.8 mM  $\text{CaCl}_2$   
11 mM D-glucose  
20 mM HEPES

肝細胞内に基質を取り込ませた後、培養ディッシュ上の細胞表面を洗浄した。その

後、1% Triton-X100 を加えた Transport buffer でインキュベーションすることにより細胞内に取り込まれた基質をバッファー内に溶出させた。RI 基質を含むバッファーを液体シンチレーションにより RI カウントを行った。また、測定に用いた培養ディッシュの総蛋白量を BCA 法で測定し、細胞タンパク質 1  $\mu\text{g}$  あたりの取り込み量として定量化した。

## 6. 肝細胞排泄実験

毛細胆管から代謝産物を回収するときに、細胞内に存在する物質が細胞死により回収液中に混入しない様に、細胞が死なない条件を検討した。生細胞であることは 0.05% Trypan blue 液を細胞に投与することにより確認した。毛細胆管内へ排泄された代謝産物が回収されたかどうかは、肝細胞内で代謝後、毛細胆管内へ Mrp2 トランスポーターを介して排泄されることが知られている Fluorescein Diacetate (FD) を投与し、毛細胆管に Fluorescein が見られなくなることを目安とした。方法は、以前報告した方法に準じた (Sudo, et al. J. Cell. Physiol., 199(2), 252-261, 2004)。

Mrp2 の排泄基質である [ $^3\text{H}$ ]-Estradiol 17 $\beta$ -D-glucuronide を用いて排泄実験を行った。培養液を廃棄後、小型肝細胞コロニーに基質を加えた Transport buffer を投与することにより、RI ラベルした基質を肝細胞内へ取り込ませた。そして肝細胞から毛細

胆管への排泄、毛細胆管内に基質を貯留させた後、培養皿上の細胞表面を洗った。その後、Excretion buffer を加えることにより毛細胆管から基質を溶出させた。

Excretion Buffer:

Ca-free transport buffer:

+ 0.025% トリプシン

+ 0.1 M EGTA

RI 基質を含むバッファーを液体シンチレーションにより RI カウントを行った。また測定に用いた培養皿の総蛋白量を BCA 法で測定し、細胞タンパク質 1  $\mu\text{g}$  あたりの排泄量として定量化した。

## 7. 検定

Student's *t*-test を用いて検定した。

## (2) 女性ホルモン異常状態 (疑似妊娠状態) における薬剤の代謝酵素遺伝子誘導発現の解析

薬剤投与によるラット小型肝細胞の遺伝子発現を GeneChip (Affymetrix 社) により解析するために、本年度は正常成熟ラット肝細胞と小型肝細胞の遺伝子発現の差異を詳細に検討し、基礎データの集積を行った。

### 1. コラゲナーゼ灌流法によるラット小型肝細胞および成熟肝細胞の回収

8~12 週齢の F344 雄ラットを実験に用いた。肝臓からの細胞の分離は前述の方法と

同様に行った。細胞は無血清培養液に懸濁し、viability を測定後、生細胞を  $5 \times 10^4$  cells/ml の濃度でヒアルロン酸コートした培養皿に播種した。培養液は一日置きに交換した。

使用した培養液

DMEM + 10 mM nicotinamide  
+ 1 mM ascorbic acid 2-phosphate  
+ 10 ng/ml EGF  
+ 0.5 mg/L insulin  
+  $10^{-7}$  M dexamethasone  
+ Antibiotics

## 2. ラット小型肝細胞の培養とコロニーの回収

小型肝細胞は 10 日間培養した。培養皿を 5 ml の PBS で 2 回、さらに 3 ml の 0.02% EDTA/PBS で洗浄し、37°C に温めた Cell dissociation solution (Sigma) を加え、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 20 分間静置した。培養皿に 5 ml の培養液を加えてからコロニーを回収し、50 x g, 1 分間、4 °C で遠心して細胞を沈殿させ、PBS に懸濁した。さらに 50 x g, 5 分間、4°C、2000 x g、5 分間、4 °C で遠心し、コロニーを PBS で洗浄して RNA 調整に用いた。

## 3. RNA の調整

ラット小型肝細胞及び成熟肝細胞から RNeasy Midi Kit (Qiagen) を用いて総 RNA を調整した。得られた総 RNA は OD260 に

よる濃度測定と OD260/OD280 による品質測定を行い、-80°C で保存した。

## 4. マイクロアレイによる遺伝子発現解析

小型肝細胞及び成熟肝細胞から抽出した総 RNA 10 µg を用いてマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイは Rat Genome 230 2.0 Array (GeneChip, Affymetrix) を用いた。3 匹のラットから分離した細胞を 10 日間培養し、増殖した小型肝細胞から得られた RNA を用いた。小型肝細胞と成熟肝細胞の遺伝子発現を比較検討した。また有意に 2 倍以上発現差が認められた遺伝子については、Gene Ontology (GO) に基づく遺伝子機能分類をオープンソフトウェア (EASE, <http://david.niaid.nih.gov/david/ease.htm>) を用いて行った。

## (3) ヒト小型肝細胞を効率よく分離培養する方法の確立

1) ヒト小型肝細胞は、  
(A) 手術により摘出された正常肝組織からの分離  
(B) 中国上海の Research Institute for Liver Diseases (Shanghai), LTD より提供されたヒト小型肝細胞分画  
上記2つの方法により得られた細胞を用いて検討した。それぞれ順に示す。

(A) 手術により摘出された正常肝組織から



## の分離

札幌医科大学病院にて、十分なインフォームドコンセントを行なったうえで施行された肝切除術の摘出標本のなかの正常と思われる肝組織の一部を用いて、細胞の分離を試みた。方法は、下記の通り行った。

<札幌医科大学倫理委員会にて承認>

1. 肝組織離断面に小血管の断端を見出し、同部より 10 ml ディスポーザブルシリンジと 24G 血管内留置針を用いて組織灌流溶液を繰り返し注入することによって血球成分を可及的に洗浄する。

前灌流液:

Ca, Mg-free Hanks balanced salt solution (HBSS)

+0.5 mM EGTA                      500 ml

2. Collagenase、Dispase、DNase 等を含む消化溶液を同様の手技にて組織全体が十分軟化するまで繰り返し注入する。

Digestion solution - 1:

HBSS (pH7.4)                      200 ml

+Collagenase (Wako)              200 mg

+DNase (Sigma)                      8 mg

Digestion solution - 2:

HBSS (pH7.4)                      200 ml

+Collagenase                          200 mg

+Dispase (合同酒精)                200 mg

3. 消化溶液内で組織を愛護的に細切し cell suspension を作成する。

4. Cell strainer を用いて肝被膜・胆管組織等を除去した後の cell suspension を、遠心操作を用いて小型肝細胞分画に精製する。

Centrifugation solution:

Hanks solution (pH7.4)

+ 0.5  $\mu$ g/ml insulin

+ Antibiotics

5. 細胞数の計測を施行後、 $5 \times 10^4$  cells/ml の濃度に調整し、培養皿上に播種する。
6. ヒト小型肝細胞を下記の組成の無血清培養液で培養する。2~3日置きに行った。

培養液組成

DMEM / Ham's Nutrient Mixture F12

(DMEM / F12 = 1:1)

+20 mM HEPES

+ 0.1% BSA

+ ITS-X (Gibco BRL)

+ 10 mM nicotinamide

+ 1 mM ascorbic acid 2-phosphate

+ 10 ng/ml EGF

$\pm$ 20 ng/ml HGF

+  $10^{-7}$  M dexamethasone

+ Antibiotics

これまでの実験で用いた肝組織の背景は表2に示す<別紙1>。

(B) 中国上海の Research Institute for Liver Diseases (Shanghai), LTD より提供され

## ヒト小型肝細胞画分

Research Institute for Liver Diseases (Shanghai), LTD (以下、RILD 社) では臓器提供カードの記載を基に心臓死直後のヒト肝臓の提供を受け、肝細胞の調整を行っている。ヒト肝細胞を使って研究をしている実績から小型肝細胞画分の調整を依頼し、それを用いて実験を行った。

肝臓は、HBV、HCV、及び HIV ウィルス陰性のものを用いた。方法は下記の通りである。

1. 肝臓をコラゲナーゼ含有液灌流により、消化し細胞懸濁液を得る。
2. 低速遠心操作により小型肝細胞画分を得る。
3.  $1 \times 10^7$  cells/vial の濃度で凍結保存する。
4. 凍結細胞を融解後、播種し、薬物代謝酵素 CytochromeP450 1A2 及び 3A4 の活性を調べた。

<別紙3:厚生労働科学研究萌芽的先端医療技術推進研究事業・トキシコゲノミクス分野・外国人研究者招へい事業により招へいされた外国人研究者・方 思詩主任研究員の報告書にその方法・結果を添付>

5. 同時に小型肝細胞の培養を行った。24 穴培養プレートに細胞を播種後、下記の

組成の 2 種類の培養液を用いて培養した。

使用した培養液

DMEM +10% FBS  
+ 20 mM HEPES  
+ 10 mM nicotinamide  
+ 1 mM ascorbic acid 2-phosphate  
+ 10 ng/ml EGF  
+  $10^{-7}$  M dexamethasone  
+ Antibiotics  
+ 20 ng/ml HGF

DMEM / F12  
+ 0.1%BSA  
+ 20 mM HEPES  
+ ITS-X (Gibco BRL)  
+ 10 mM nicotinamide  
+ 1 mM ascorbic acid 2-phosphate  
+ 10 ng/ml EGF  
±20 ng/ml HGF  
+  $10^{-7}$  M dexamethasone  
+ Antibiotics

<札幌医科大学倫理委員会にて承認第17-4-2号>

## 2) 形態学的解析

培養皿上の小型肝細胞コロニーは、デジタルカメラを装着した位相差顕微鏡(オリンパス)を用いて観察した。ヒト小型肝細胞のコロニー数及びコロニー構成細胞数を計測した。

培養細胞およびコロニーの形態学的観察に用いたシステムは下記の機器を使用し

解析した。

顕微鏡:OLYMPUS 1X71

CCD カメラ:OLYMPUS DP50

画像解析ソフト:OLYMPUS Viewfinder

Lite Ver.1.0

### 3)免疫細胞染色

免疫染色は下記のように行った。

- ① 細胞は、培養皿の培養液を除去後、PBS にて洗浄し、70%エタノールにて15分間固定した。
- ② 再度 PBS にて洗浄後、10% Block Ace /PBS を用いて Blocking を室温で 60 分間行った。
- ③ Block Ace を除去し PBS にて洗浄後、記載した一次・二次抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。各抗体の詳細は表 1 <別紙1>に記載した。
- ④ DAPI/PPD 溶液にて包埋後、上記顕微鏡システムを用いて観察。

### 4)ラベリングインデックス (Labeling index: LI)

LIは、抗 BrdU 抗体を用いた免疫細胞染色法を用いて行った。染色後、陽性の核を有するコロニーを個別に撮影し、画像上で BrdU 陽性細胞数/総細胞数をカウントし算出した。

方法

- ① 細胞固定の 24 時間前に BrdU を (final 40  $\mu$  M) 培養液内に添加する。
- ② 培養液を除去し PBS にて洗浄した後、70%エタノールにて 15 分間固定する。
- ③ 再度 PBS にて洗浄後、2N塩酸で30分間処置する。
- ④ 10% Block Ace /PBS を用いて Blocking を室温で 60 分間行う。
- ⑤ Block Ace を除去し PBS にて洗浄後、マウス抗 Bromodeoxyuridin (BrdU) 抗体を室温で1時間作用させる。
- ⑥ PBS にて再度洗浄後、通常の VECTASTAIN ABC kit (vector laboratories inc.)を用いて細胞を処置後、DAB reaction にて発色する。
- ⑦ グリセロール/ゼラチンを用いて包埋後、前述の顕微鏡システムを用いて観察。

### 5)PCR 及び GeneChip を用いた解析 前述の方法に準じて行った。

## 研究結果

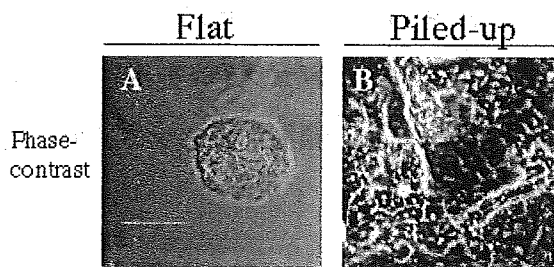
### (1)毛細胆管へ分泌される代謝産物の 同定方法の確立

#### 1. 類肝組織の形成

成熟ラット肝臓より分離した小型肝細胞は、培養3日目より分裂を開始し、7日目に

は約10個の細胞からなるコロニーを形成するようになり、培養10日目には約30個の小型肝細胞からなるコロニーに成長する。コロニーは12日目に培養皿から細胞分散液を使用して剥離し、小型肝細胞の純度を高くしてコラーゲンを塗布した新しい培養皿に再播種する。小型肝細胞コロニーは、接着し再び増殖を開始する。コロニーを高密度に培養することにより、コロニー同士が接触し、大きなコロニーを形成する。小型肝細胞は再播種後、培養2週間目ほどより一部の細胞は大型化し、成熟肝細胞の形態を示すようになる。またそのような細胞間には索状の毛細胆管様構造を形成するようになる(図1)。

図1



ラット小型肝細胞の位相差顕微鏡写真。(A)再播種後10日目の小型肝細胞コロニー。(B)再播種後28日目の小型肝細胞コロニー。盛り上がった細胞は大型化し、索状構造を形成している。それらの細胞間には白く筋状に毛細胆管様構造が形成されている。Bar, 100  $\mu$ m.

これらの結果は、以前の我々の報告と同様である(Sugimoto, et al. *J. Cell. Biochem.*, 87(1), 16-28, 2002; Miyamoto, et al. *J.*

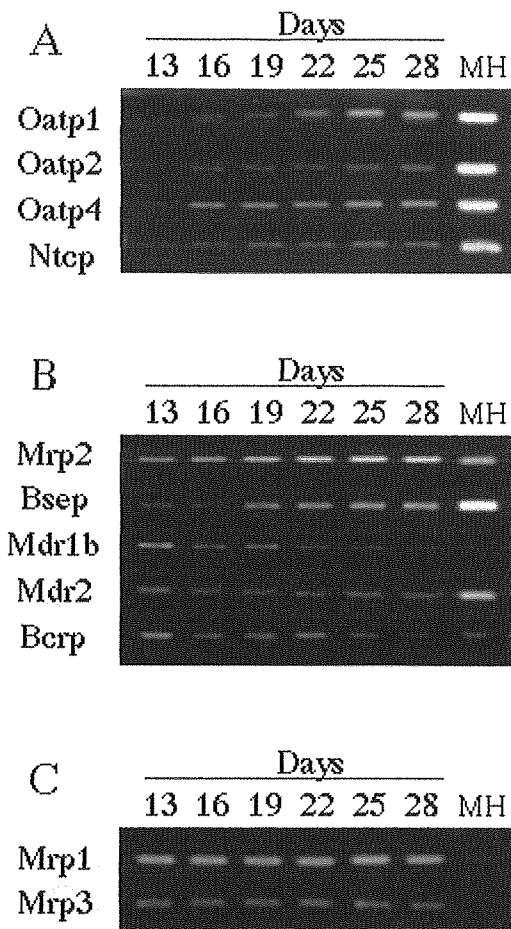
*Gastroenterol. Hepatol.*, 20(6), 865-872, 2005)。

組織学的、超微構造学的解析でも、内腔面には微絨毛が良く発達し、タイト結合により強固にシールされていることがわかっている。

## 2. 小型肝細胞成熟化におけるトランスポーターの発現

ビリルビン、胆汁酸輸送に関わるトランスポーターとして、肝類洞側取り込み型トランスポーターである Oatp (organic anion transporting polypeptide)ファミリー、Ntcp (Na taurocholate cotransporting polypeptide)、および肝毛細胆管側排出型トランスポーターMrp2 (multiple resistance associated protein 2)と Bsep (bile salt export pump)は、小型肝細胞の成熟化に伴い mRNA レベルでの発現の上昇を認めた(図2)。再播種した小型肝細胞は、当初成熟肝細胞では類洞側膜に発現している取り込みトランスポーターの Oatp1, Oatp2, Oatp4, Ntcp をほとんど発現していなかった。培養経過に伴い、それらトランスポーターの mRNA 発現は増加したが、16日目でも成熟肝細胞に比べると明らかに少なかった。毛細胆管への排出トランスポーターである Mrp2, Bsep の発現は、再播種した直後からあり、培養経過と共にその発現は増加した。

図2

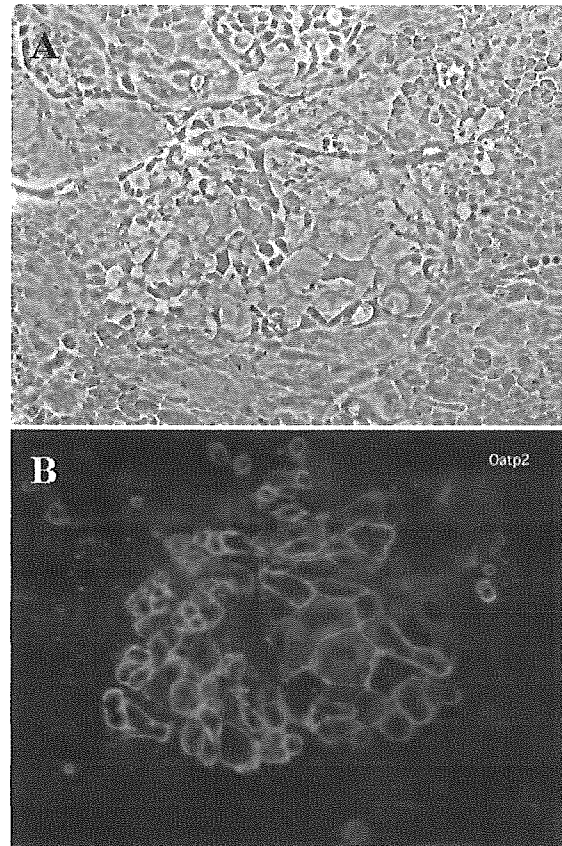


小型肝細胞におけるトランスポーターの発現。培養日数は、細胞分離後からの通算日数を示す。総RNAを分離後、RT-PCRにて解析した。(A) 類洞側取り込み型トランスポーター、(B) 毛細胆管側排出型トランスポーター、(C) 類洞側排出型トランスポーター、の結果を示す。

Mrp2 の発現は成熟肝細胞のそれとほぼ同等まで増加した。他方、Mdr1b, Mdr2, Bcrp の発現は、培養経過と共に減少し、特に Mdr1b の発現は成熟肝細胞とほぼ同様にほとんど検出できなくなった。類洞側膜に存在する排出トランスポーターの Mrp1,

Mrp3 の発現は、成熟肝細胞ではほとんど見られないのだが、小型肝細胞では常時発現していた。

図3



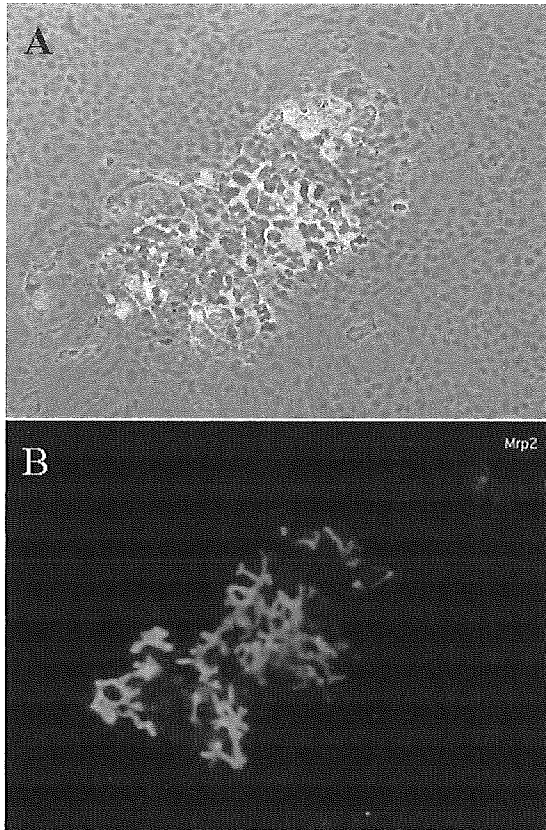
小型肝細胞に発現するOatp2トランスポーター蛋白質の免疫細胞染色写真。培養24日目の小型肝細胞コロニーを示す。(A)位相差顕微鏡写真。(B)Aと同一コロニーの免疫細胞染色写真。

### 3. 小型肝細胞コロニーの免疫細胞染色

肝類洞側膜に存在する有機アニオン取り込みトランスポーターである Oatp2 は、小型肝細胞が小型の形態を保ち、増殖し続けている時には細胞膜上での発現を認めないが、成熟化し大型化すると類洞側細胞膜上

に出現し始め、盛り上がった細胞のように成熟化が進むと類洞側膜上にさらに強く染まるようになった(図3)。

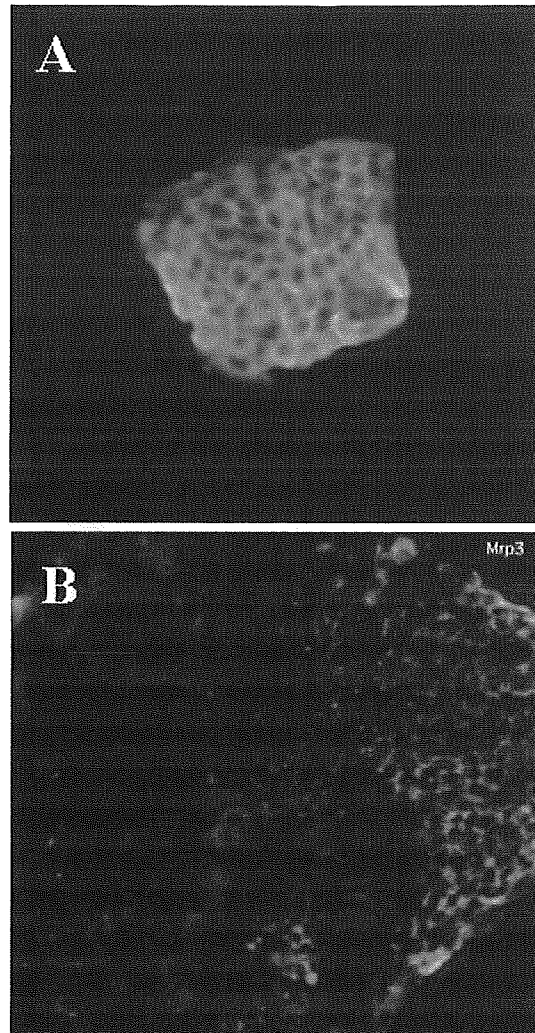
図4



小型肝細胞に発現するMrp2トランスポーター蛋白質の免疫細胞染色写真。培養24日目の小型肝細胞コロニーを示す。(A)位相差顕微鏡写真。盛り上がった細胞間に白い筋状に毛細胆管が形成されている。(B)Aと同一コロニーの免疫細胞染色写真。白い筋状構造に一致してMrp2タンパク質が発現していることがわかる。

毛細胆管へ有機アニオンを排泄するMrp2は、再播種直後よりmRNAの発現が見られるが、タンパク質は細胞質中に存在するため明瞭な染色像を示さない。

図5



小型肝細胞に発現するMrp3トランスポーター蛋白質の免疫細胞染色写真。(A)増殖している小型肝細胞コロニーの写真。培養16日目の小型肝細胞コロニーを示す。すべての細胞の膜に発現しているためHoneycomb状に染色される。(B)培養24日目の小型肝細胞コロニーの免疫細胞染色写真。大型化し、盛り上がった細胞に一致してMrp3蛋白質の発現が減少・消失していることがわかる。

しかし、小型肝細胞が成熟化し細胞間に毛細胆管様構造を作り始めるようになると、毛細胆管膜に沿って陽性顆粒が発現する

ようになり、細胞が盛り上がり、類肝組織化するようになるとネットワーク状に発達した毛細胆管様構造に沿った染色像を示した(図4)。

一方、肝類洞側膜に存在する排泄トランスポーターである Mrp3 は、小型肝細胞の出現当初より強発現しているが、小型肝細胞が成熟化し大型化するとその発現は低下し、盛り上がり類肝組織を形成するようになるとほとんど消失した(図5)。

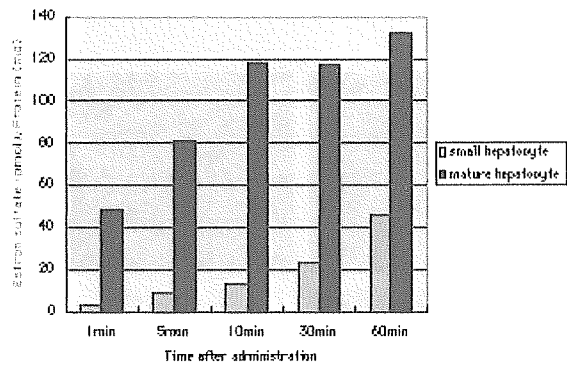
#### 4. 有機アニオン取り込み実験

成熟化させたラット小型肝細胞の有機アニオンの取り込み能力を正常成熟ラット肝臓より分離、播種後3時間経過した成熟肝細胞と比較した。

[<sup>3</sup>H]-Estron 3-sulfate の取り込み量は、成熟肝細胞が10分で飽和状態に達するのに対し、成熟化させた小型肝細胞は60分経過してもまだ取り込み量が増加し続けた。これらの取り込み量、取り込み速度の相違は肝類洞膜側にある Oatps トランスポーターの発現量の差によるものと考えられた(図6)。

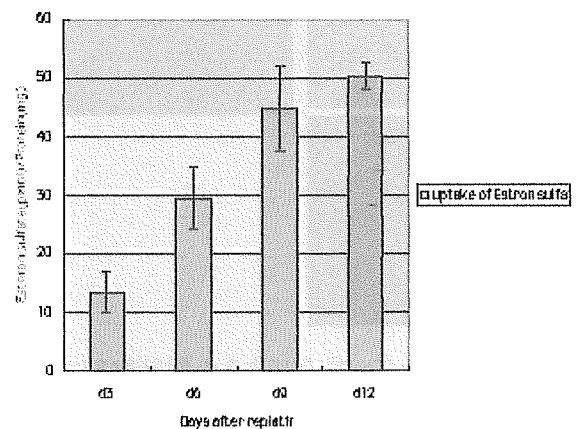
小型肝細胞培養経過と肝内 [<sup>3</sup>H]-Estron 3-sulfate 取り込み量の関係では、培養経過に伴い小型肝細胞が、成熟化し類肝組織を形成するようになると有機アニオンの取り込み量は増加した(図7)。

図6



[<sup>3</sup>H]-Estron 3-sulfate の取り込み。成熟肝細胞(赤)と小型肝細胞(青)の比較。

図7



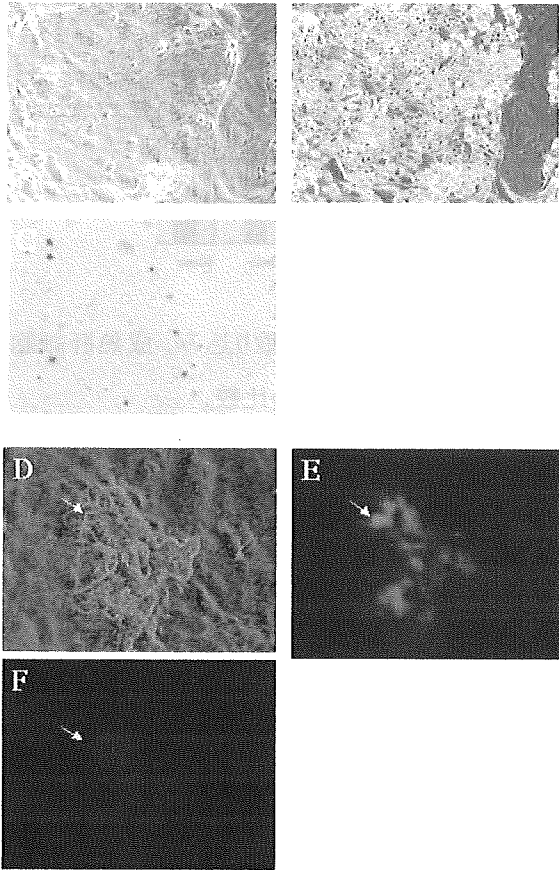
培養経過に伴う小型肝細胞の [<sup>3</sup>H]-Estron 3-sulfate の取り込み。

#### 5. Excretion buffer による変化

小型肝細胞コロニーに Excretion buffer を加えると、約10分後より細胞間結合が緩くなり、細胞間が開き、細胞が丸みをおびるようになった(図8A, B)。細胞死に伴う変化ではないことを確認するために、これら形態変化を生じた細胞をトリパンブルーで生体染色した。図8Cで示すようにほとんどの細胞は生きており、形態変化が細胞死に伴

うことではないことを確認した(図8C)。

図8



Excretion buffer投与による小型肝細胞コロニーの形態変化とFluoresceinの排出。(A) 培養28日目の小型肝細胞コロニー。(B) Excretion buffer投与20分後のコロニー。(C) トリパンプルー染色。トリパンプルーを取り込み、核が青色になった細胞は死んでいる。コロニーの細胞はほとんど死んでいないことを示す。(D) 位相差顕微鏡写真。(E) Fluorescein diacetate投与後、毛細胆管内にFluoresceinが排出されていることを示す。(F) Excretion buffer投与後、Fluoresceinが毛細胆管内から消失したことを示す。

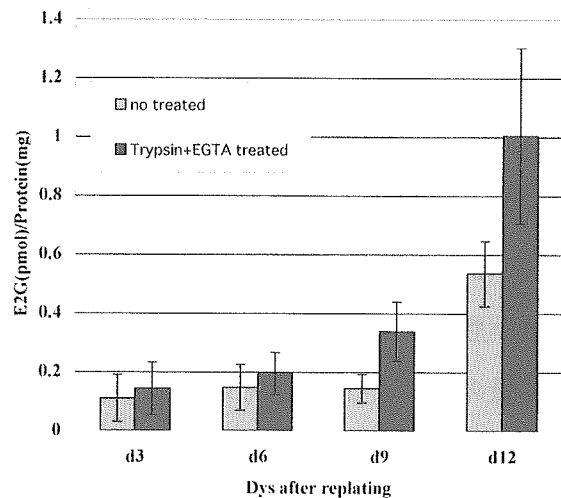
あらかじめ培養液にFDを投与し、毛細胆管にFluoresceinを排泄させ、貯留させた類肝組織に同処理を行うことにより、Fluo

resceinの毛細胆管内からの溶出を認めた(図8D, E, F)。

## 6、有機アニオン排泄実験

毛細胆管内に排泄され貯留された基質を Excretion buffer を加えることによって回収された基質量、Transport Buffer によって得られた基質量を培養日数で比較した。培養経過に伴い小型肝細胞が毛細胆管構造を形成するに伴い、Excretion buffer によって回収される基質量が増加した(図9)。この結果は、小型肝細胞が成熟化し毛細胆管を形成するようになるに従い、毛細胆管内に排泄される基質量が増していることを示している。

図9



Excretion buffer投与後に回収された<sup>[3H]</sup>-Estradiol 17β-D-glucuronide 量。横軸は再播種後の培養日数を示す。

## (2) 女性ホルモン異常状態(疑似妊娠状態)における薬剤の代謝酵素遺



## 伝子誘導発現の解析

薬剤投与によるラット小型肝細胞の遺伝子発現を GeneChip (Affymetrix 社)により解析するために、本年度は正常成熟肝細胞と小型肝細胞の遺伝子発現の差異を詳細に検討し、基礎データの集積を行った。

### 1. GeneChipによる小型肝細胞の遺伝子発現解析

ラット小型肝細胞及び成熟肝細胞から抽出した総 RNA を GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array を用いて解析を行った。解析は小型肝細胞、成熟肝細胞それぞれ 3 例ずつ行い、*t*検定を行った後、それぞれの細胞に有意な発現の差を持つ遺伝子について解析を行った。マイクロアレイ上には 31099 遺伝子が存在し、そのうち 14460 遺伝子についていずれかのサンプルにおいて発現が確認された。これらの遺伝子について *t*検定を行った結果、 $p < 0.05$  で有意差があり、且つ小型肝細胞と成熟肝細胞の発現比が 2 倍以上であるものを抽出した。その結果、小型肝細胞において発現が上昇した遺伝子数は992、成熟肝細胞で発現が高い遺伝子数は620であった。結果の詳細を本報告書に記載することは、特許出願も考慮して差し控えるが、それぞれの細胞の発現に有意差があった遺伝子名を<別紙2>に記載する。

### 2. Gene Ontology による機能分類

発現に差が認められた遺伝子について、Gene Ontology (GO)に基づく機能分類を行った。

図10<別紙1>にそのGOに従って分類された遺伝子の割合を示す。

小型肝細胞は、増殖に関連した遺伝子が多く発現している一方、成熟肝細胞は代謝に関連した遺伝子が多く発現していることがわかった。

### (3)ヒト小型肝細胞を効率よく分離培養する方法の確立

#### (A) 手術により摘出された正常肝組織からの分離

##### 1. 播種時の小型肝細胞の viability について

細胞数計測時にトリパンプルーを用いて生存率を調べたところ 91.1%であった。現在の肝組織灌流によるヒト小型肝細胞調整法を用いることで生細胞を採取できることがわかった。

##### 2. 播種直後における小型肝細胞間の cluster 形成について

ヒト肝組織より分離した細胞をヒアルロン酸コート培養皿上で培養すると、播種後4日目頃より細胞数10個程度からなる小型肝細胞コロニーが形成された。コロニーが1

個の細胞の増殖により形成されたことを示すために、播種した細胞が培養皿に接着した時点より cluster を形成していた細胞の割合を計測した。表3で示すように、播種時には約90%の細胞がシングル又はダブルットで存在していた。位相差顕微鏡を用いて経時的に同一細胞を観察した結果も集塊を作っている細胞群から小型肝細胞が増殖してくることは認めなかった。

表3 細胞を播種後一日目の接着した細胞のシングル率

細胞数	1~2	3~4	5~8	9~
割合 (%)	89.7	9.2	1.1	0

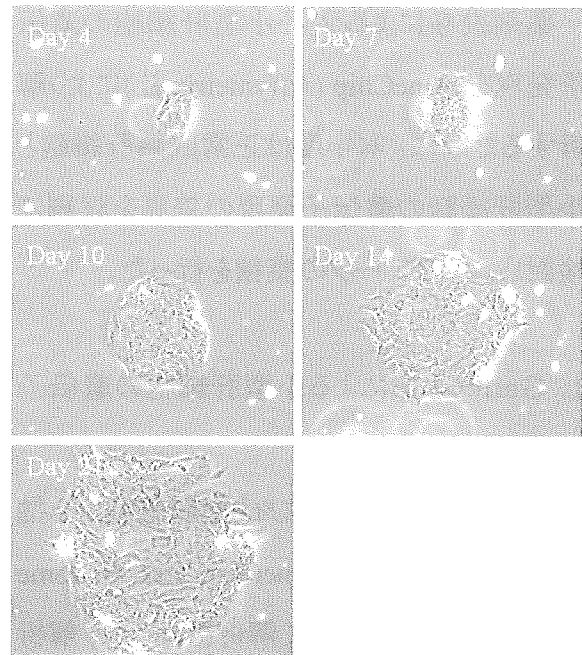
### 3. コロニー構成細胞数の推移について

無血清下培養では、血清存在下の場合と比較して非実質細胞の発育がほとんどなく、肝細胞コロニーの観察が容易であった。培養皿にはあらかじめマーキングしておき、追跡が可能であったコロニーの構成細胞数を計測した。またヒト小型肝細胞の播種濃度を低濃度 ( $5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>) および高濃度 ( $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) に分けて検討した

結果、

1) 高濃度で播種した場合、低濃度と比較して明らかに大きなコロニーが観察され、計測した結果もコロニー構成細胞数が多く、大きなコロニーが形成される傾向にあった。

図11 ヒト小型肝細胞の増殖

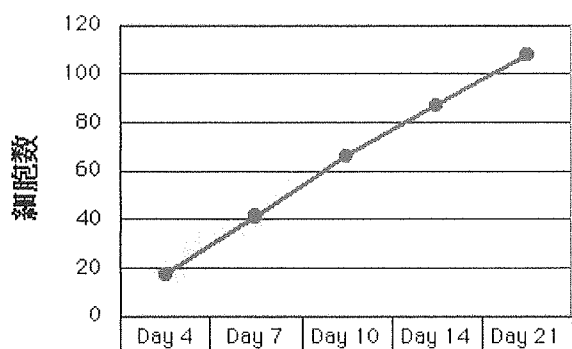


同一コロニーを経時的に観察した。培養4日目には14個の細胞からなるコロニーが、10日目には79個、14日目には128個、21日目には172個になった。

2) HGF(-)培養後14日目においてコロニー1つあたりの平均細胞数を比較すると、低濃度 / 高濃度 = 24.0 / 76.4 であった。低濃度においては細胞数のピークが培養10日目であるコロニーが多いのに対し、高濃度の方では培養21日目においても増殖を続けているコロニーが多く観察された。

3) HGFを培地に添加(20 ng/ml)した場合、コロニー数およびコロニー構成細胞数の増加が認められた。培養14日目におけるHGF添加の有無によるコロニー構成細胞数の平均を比較すると、低濃度では HGF (-)/(+) = 24.0 / 49.24、高濃度では HGF (-)/(+) = 76.39 / 87.06 であった。

図12 ヒト小型肝細胞コロニー構成細胞数の変化



高濃度で播種した細胞をHGF添加培養液で培養した。計測したコロニーの平均値の推移を示す。

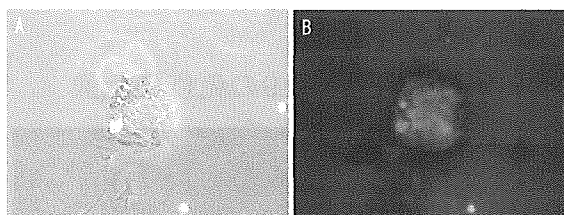
#### 4. BrdU による Labeling Index (LI)

高濃度 ( $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) でヒト小型肝細胞を播種し、培養13日目に BrdU (40 μM) を添加、24 時間後に細胞を固定した。抗 BrdU 抗体を用いて染色し、BrdU陽性核を有する細胞を計測し、LIを計算したところ平均 18.6%であった。またコロニー間における LI の値は 0%~52.6%とばらつきがみられた。コロニーを形成する小型肝細胞の増殖能に差があることがわかった。

#### 5. ヒト小型肝細胞の特徴—蛍光免疫細胞染色による解析

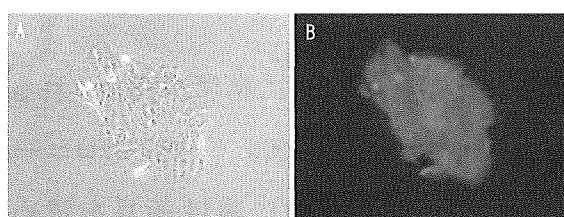
抗ヒトアルブミン抗体 (図13) および抗ヒトトランスフェリン抗体 (図14) を用いた免疫染色の結果、コロニーのすべての細胞の細胞質は陽性に染色された。

図13 アルブミンの免疫染色像



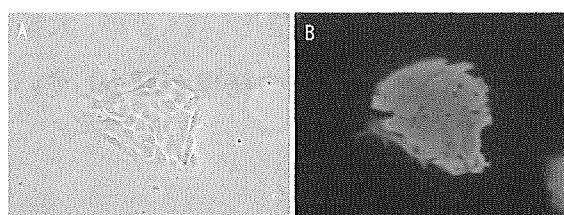
培養14日目のヒト小型肝細胞コロニー。(A)位相差顕微鏡写真。(B)同一コロニーのアルブミンに対する免疫染色。コロニーを構成するすべての細胞の細胞質に陽性像が認められる。

図14 トランスフェリンの免疫染色像



培養14日目のヒト小型肝細胞コロニー。(A)位相差顕微鏡写真。(B)同一コロニーのトランスフェリンに対する免疫染色。コロニーを構成するすべての細胞の細胞質に陽性像が認められる。

図15 サイトケラチン8の免疫染色像

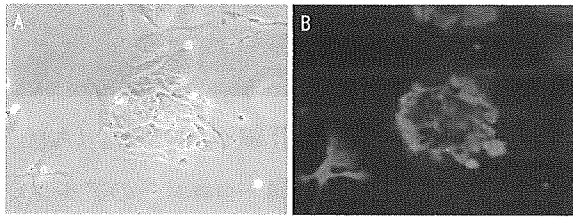


培養14日目のヒト小型肝細胞コロニー。(A)位相差顕微鏡写真。(B)同一コロニーのサイトケラチン8に対する免疫染色。コロニーを構成するすべての細胞の細胞質に陽性像が認められる。

肝細胞の細胞骨格である CK8 (図15) の染色では細胞質の線維状の陽性所見が

あった。

図16 サイトケラチン19の免疫染色像

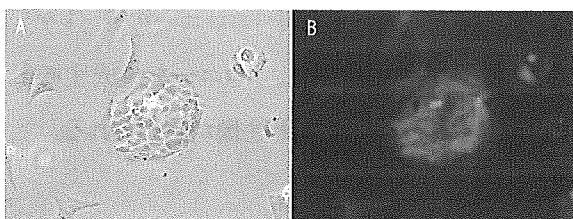


培養14日目のヒト小型肝細胞コロニー。(A)位相顕微鏡写真。(B)同一コロニーのサイトケラチン19に対する免疫染色。コロニーの辺縁の細胞に陽性像を認める。

胆管細胞上皮細胞に発現が認められるCK19(図16)の染色では、一部のコロニーにおいて辺縁の細胞に陽性所見を認めた。

ヒアルロン酸レセプターであるCD44(図17)の染色では、コロニーを形成しているすべての細胞の細胞膜に一致して蜂巢状の陽性像を認めた。また培養経過に伴い小型肝細胞の一部は大型化してくるが、大型化した細胞ではCD44の発現が減少していた(図18)。

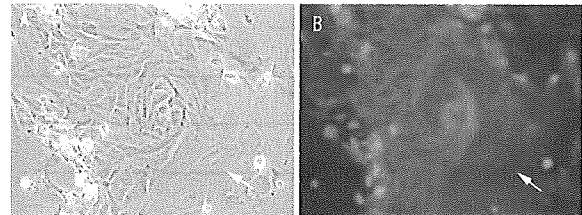
図17 CD44の免疫染色像



培養7日目のヒト小型肝細胞コロニー。(A)位相顕微鏡写真。(B)同一コロニーのCD44に対する免疫染色。細胞膜に沿って蜂巢状に染色されている。

する免疫染色。細胞膜に沿って蜂巢状に染色されている。

図18 CD44の免疫染色像



培養21日目のヒト小型肝細胞コロニー。(A)位相顕微鏡写真。(B)同一コロニーのCD44に対する免疫染色。細胞膜に沿って蜂巢状に染色されている。矢印は大型化し、CD44の発現が減少・消失している細胞を示す。

## 6. DNA microarray用の細胞調整

高い増殖能を有する細胞の遺伝子学的特徴を得る目的で、小型肝細胞および成熟肝細胞それぞれの分画から総RNAを抽出し、GeneChip(Affymetrix)による解析を現在行っている。

解析途中のため、結果の詳細は次年度以降の報告書に記載する予定である。

### (B) 中国上海の Research Institute for Liver Diseases (Shanghai)より提供されたヒト小型肝細胞分画

#### 1. 凍結小型肝細胞の融解法

RILD社から凍結小型肝細胞が液体窒素保存状態で札幌医科大学へ輸送された。凍結チューブを37℃の水浴中で融解し、細胞数計測時にトリパンブルーを用いて生