

厚生労働科学研究費補助金

トキシコゲノミクス研究事業

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 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 三高 俊広

平成 19 (2007) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告

	ページ
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 抗体・Primer・組織リスト …	41
別紙 2 札幌医科大学倫理委員会承認結果 …	46
別紙 3 札幌医科大学倫理委員会承認結果 …	47
別紙 4 委託業務報告書 …	48
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 …	83
III. 研究成果の別刷	

厚生労働科学研究費補助金（トキシコゲノミクス研究事業）

総括研究報告書

「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

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部門・教授

研究要旨

我々が見出した小型肝細胞は、肝幹細胞の一種で次のような特徴を持っている。1) 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。2) 毛細胆管を形成させることができる。3) 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技術を確立し、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。平成18年度は主に(1)～(3)の研究を行ってきた。

(1) “毛細胆管へ分泌される代謝産物の同定方法の確立” に関して

成熟化した小型肝細胞も生体内と同様な極性を有しているか検討してきた。その結果、成熟化した小型肝細胞においては、生体内の肝細胞と同様に類洞膜面には、Oatp, Ntcp などのトランスポーターが発現し、毛細胆管膜面には Mrp2, Bsep が発現するようになった。つまり成熟化した小型肝細胞は極性を持った胆汁排出機能を有している。キレート剤と低濃度のトリプシンの併用により、細胞を障害せずに毛細胆管中に蓄積した代謝産物を回収することに成功した。

(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” に関して

小型肝細胞は、生体内の正常ラット肝臓では同定できず、培養することによって初めて小型肝細胞としての表現型を呈し同定できる。そのため生体内と培養という条件の違いによる遺伝子変化、また静止期の細胞と増殖期の細胞という条件の違いも考慮する必要があった。成熟肝細胞、2/3 部分肝切除術後の再生期の肝細胞に加えて、重度の肝障害を受けた肝臓では小型肝細胞特異的遺伝子である CD44 を発現している肝細胞が出現することから、生体内における小型肝細胞としての CD44 陽性肝細胞、などの遺伝子発現を GeneChip により解析した。

CD44 陽性細胞と培養小型肝細胞の遺伝子発現パターンは良く似ており、また再生肝細胞と成熟肝細胞では、増殖関連遺伝子以外の遺伝子発現パターンは似ていた。しかしながら、<小型肝細胞/CD44 陽性細胞>と<成熟肝細胞/再生肝細胞>でそれらの遺伝子パターンを比較すると、その違いは大きく、小型肝細胞は成熟肝細胞とは明らかに別の細胞群であることが証明された。

小型肝細胞を用いて薬物代謝を検討する場合、成熟化した小型肝細胞と成熟肝細胞の代謝酵素の発現の相違を十分に検討しておく必要がある。凍結保存をした小型肝細胞において CYP2B の活性が誘導されないことが判明し、その原因が CYP2B1 遺伝子の発現を調節している核内受容体の CAR の発現低下により起こっていることがわかった。さらにこの現象は無血清で培養していると起こり、血清添加で回復すること、血清中に含まれる量の甲状腺ホルモンを培養液に加えることで CYP2B1 遺伝子の発現を回復させられることがわかった。

(3) “ヒト小型肝細胞を効率よく分離培養する方法の確立” に関して

ヒト小型肝細胞は、(A)外科手術により摘出された正常部分肝組織からの分離、(B)中国上海市にある Research Institute for Liver Diseases (Shanghai), LTD (RILD 社)より提供されたヒト小型肝細胞分画、の2つの方法により得られた細胞を用いて検討してきた。

(A)札幌医科大学病院にて、大腸癌の肝転移などによって施行された肝切除術の摘出組織の正常と思われる部分肝組織から細胞を分離した(札幌医科大学倫理委員会にて承認済み)。ヒト小型肝細胞は、ヒアルロン酸をコートした培養皿と無血清培養液を併用すると選択的に増殖し、大きなコロニーを作ることがわかった。平均すると培養後3週間で約100倍に増えること、培養経過に伴いアルブミン分泌が増えることがわかった。またラット小型肝細胞と同様に前駆細胞のマーカー遺伝子を発現しており、肝細胞特異的遺伝子の多くも発現していた。多くの CYP 遺伝子の発現も確認した。これまで16例以上の分離培養を行ってきたが、その患者年齢はほとんどが50歳以上であり、中には80歳以上の例もあったが、全例において小型肝細胞コロニーの形成が認められた。

(B)RILD 社より心臓死後に分離されたヒト小型肝細胞分画の細胞を入手し、ヒト小型肝細胞コロニーが出現するかどうか検討してきた(札幌医科大学倫理委員会にて承認済み)。これまでの検討結果から、中国において一旦培養した細胞は輸送を経ても生存していたが、ヒアルロン酸コートしたプレートに播種し、培養した場合にのみ小型肝細胞コロニーが出現した。凍結保存した細胞を播種しても小型肝細胞コロニーの出現は認めず、一般的な方法で凍結保存しても小型肝細胞を回収できないことがわかった。

研究協力者

今純子 札幌医科大学がん研究所 助手
陳其潔 同 流動研究員
大島秀紀 同 研究生
佐々木寿誉 同 研究生
大栄秀和 同 訪問研究員
高松みのり 同 訪問研究員
平田公一 札幌医科大学医学部 教授
水口徹 同 講師
吉川大和 東京薬科大学薬学部 講師
二宮真一 株式会社第一化学薬品 部長

A. 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。そのため、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ている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することもできる。さらにこの小型肝細胞は長期間凍結保存後も凍結前と同様な機能を維持している。我々の研究は、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のが可能になる。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。

本研究の目的は、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。

平成18年度は主に以下の(1)～(3)の研究を行ってきた。

- (1) 毛細胆管へ分泌される代謝産物の同定方法の確立
- (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

それぞれの研究は、17年度から引き続いて行われているため、18年度に限定して記載することは難しいが18年度の成果を中心に記載する。

B. 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。動物実験については、札幌医科大学動物実験委員会の承認を受け、動物実験指針に基づいて実験を行っている。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 1×10^5 cells/mlの濃度で培養皿に播種した。

Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM)
+10% FBS
+10 mM nicotinamide
+1 mM ascorbic acid 2-phosphate
+10 ng/ml EGF
+0.5 mg/L insulin
+ 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)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時点で、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、培養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) に記載したものをを用いた。

- 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 を用いて総 RNA を抽出し、半定量 RT-PCR 法で解析を行った。使用した Primer は表 2 (別紙1) に記載した。

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 $[^3\text{H}]$ 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。

Transport buffer: 116 mM NaCl
+5.3 mM KCl
+1.1 mM KH_2PO_4
+0.8 mM MgSO_4 ,
+1.8 mM 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 Buffer 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 1 μg 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、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 FD 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 β -D-glucuronide を用いて排泄実験を行った。小型肝細胞コロニー培養液中に基質を加えた 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 Buffer 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 1 μg 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。

$P < 0.05$ をもって有意差があるとした。

(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、本年度は成熟肝細胞、2/3 部分肝切除術後の再生期の肝細胞に加えて、重度の肝障害を受けた肝臓では小型肝細胞特異的遺伝子である CD44 を発現している肝細胞が出現することから、生体内における小型肝細胞としての CD44 陽性肝細胞、小型肝細胞に分化することが知られている肝幹細胞の Oval cells

(Thy1 陽性細胞)などの遺伝子発現を GeneChip により解析した。

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 5×10^4 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。2/3 部分肝切除を行ったラットから分離培養した成熟肝細胞は、術後 24 時間目に前述の方法と同様に回収した。甲状腺切除手術及び偽施術は、7 週齢のラットに対して行い、2 週間後に成熟肝細胞を採取した。

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 を加え、CO₂ 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. CD44, Thy1 陽性細胞の採取

体重 150~200 g の F344 雄ラットに

D-galactosamine (75 mg/ 100 g 体重)を腹腔内投与し、2 日目、3 日目に Thy1 陽性細胞を、4 日目に CD44 陽性細胞を採取した。肝臓から上記の方法と同様に細胞懸濁液を調整し、50 x g, 1 分間、4°C で遠心し、上清を回収した。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、150 x g, 5 分間、4°C の遠心で沈殿した細胞を、2 mM EDTA と 0.5% BSA を含む PBS に懸濁した。抗 Thy1 抗体 (2 mg/ml) または抗 CD44 抗体 (625 ng/ml) を加えて 30 分間インキュベートしたのち、150 x g, 5 分間、4°C で遠心し、細胞を 2 mM EDTA と 0.5% BSA を含む PBS に懸濁した。抗マウス IgG microbeads (MACS) を加え、MidiMACS separation unit を用いて細胞を分離した。

4. RNA の調整

ラット小型肝細胞及び成熟肝細胞から RNeasy Midi Kit 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。使用した Primer は表 2 (別紙1)に記載した。

5. 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。RNA は Bioanalyser 2100 を用いて 28S/18S rRNA のチェックを行ってから、GeneChip One-Cycle Target Labeling

and Control Reagents を使用して標識 cRNA を合成した。cRNA はテストアレイによる前実験を行ったのちに、Rat Genome 230 2.0 Array (GeneChip, Affymetrix) にハイブリダイゼーションを行った。各細胞について 3 匹のラットから細胞を分離し実験を行い、全てのデータをまとめ RMA 法を用いて標準化を行った。3 検体のうち 2 検体以上で "Positive" と判断された probe を発現陽性とした。得られた全ての結果のうち、Affymetrix control probe および全種類の細胞で発現陰性と判断された probe の結果を除き、発現データとした。この結果から、各細胞間における発現比や *P* value (Benjamini-Hochberg) の算出を行った。階層クラスタリングと結果の可視化は MeV ver. 4.0 (Multi Experiments Viewer; TM4 software) を使い、ユークリッド距離を採用して average linkage clustering により行った。

6. RT-PCR による遺伝子発現解析

2 μ g の総 RNA から oligo dT Primer を用いて cDNA を合成した。反応には OmniScript RT Kit を使い、以下に示す試薬を混合して 37°C で 1 時間逆転写反応を行った。

Total RNA	2 μ g
10 \times Buffer	2 μ l
5 mM dNTP mix	2 μ l
50 μ M Oligo dT primer	1 μ l
逆転写酵素	2 μ l
40 U/ μ l RNase Inhibitor	0.5 μ l

Nuclease Free H₂O to 20 μ l

得られた cDNA 溶液 20 μ l のうち 1 μ l を用いて PCR を行い、目的の遺伝子断片を増幅した。反応には Fermentus 社の Taq polymerase を使い、以下に示す試薬を混合した。

cDNA solution	1 μ l
10x Buffer	2.5 μ l
25 mM MgCl ₂	2 μ l
10 mM dNTP mix	0.5 μ l
10 μ M Sense primer	2.5 μ l
10 μ M Anti-sense primer	2.5 μ l
DNA Taq polymerase	0.25 μ l
BSA	0.25 μ l
H ₂ O	to 25 μ l

反応はサーマルサイクラーを用いて以下のプログラムで行った。使用するプライマー、アニーリング温度、サイクル数及び増幅される DNA 断片の大きさは表に示した。

Denature 94°C, 1 min

↓

Denature 94°C, 30 second

Annealing x°C, 30 second

Extension 72°C, 1 min

x cycle

↓

Extension 72°C, 5 min

Stop 4°C

PCR 産物 5 μ l に 1 μ l の Loading Buffer を加えて攪拌し、0.5 \times TAE-1%アガロース-エチジウムブロマイドゲルにアプライし

て電気泳動を行った。泳動バッファーには 0.5×TAE を用い、100V で 30 分間泳動を行った後、ゲルをトランスイルミネーター上で観察し写真撮影を行った。写真をデジタルデータとして取り込み、増幅された遺伝子断片の蛍光強度を画像解析ソフトで数値化した。シグナル強度はバンドを含む領域から算出された蛍光強度から、バンド上部の領域から算出されたバックグラウンド蛍光強度を引いた値とし、各試料の CAR, CYP2B1 発現量を G3PDH 発現量で標準化し、成熟肝細胞の発現量を 1 として相対値化した。

(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。

(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。

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 200 mg
 +DNase 8 mg

Digestion solution – 2:

HBSS (pH7.4) 200 ml
 +Collagenase 200 mg
 +Dispase 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。

Centrifugation solution:

Hanks solution (pH7.4)
 +0.5 µg/ml Insulin
 +Antibiotics

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。

5. 細胞数の計測を施行後、 5×10^4 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。

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
+ 10^{-7} M dexamethasone
+ Antibiotics
±10 ng/ml HGF

これまでの実験で用いた肝組織の背景は表4(別紙1)に記載した。本研究に関しては札幌医科大学倫理委員会にて承認済みである(別紙2)

(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

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分画の調整を依頼し、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。本研究に関しては札幌医科大学倫理委員会にて承認済みである(別紙3)

1)細胞分離と処置

1. 灌流により、肝臓細胞画分を得る。
2. 遠心操作により小型肝細胞画分を得る。
3. 1×10^7 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。
5. 同時に小型肝細胞の培養を行った。24 穴培養プレートにヒアルロン酸をコートし、下記の組成の2種類の培養液を用いて培養した。

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

•DMEM / Ham 's F12 (DMEM/F12)
+ 20 mM HEPES
+ 0.1% BSA
+ ITS-X
+ 10 mM nicotinamide
+ 1 mM ascorbic acid 2-phosphate
+ 10 ng/ml EGF

+ 10^{-7} M dexamethasone
+ Antibiotics
± 10 ng/ml HGF

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 colony 数及び colony 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) 蛍光免疫細胞染色

- ① 培養皿の medium を除去、PBS にて洗浄した後 70%エタノールにて 15 分間固定。
- ② 再度 PBS にて洗浄後、10%Block Ace /PBS を用いて Blocking 施行(室温 60 分)。
- ③ Block Ace を除去し PBS にて洗浄後に、一次・二次抗体を用いて染色施行。
- ④ 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) ラベリングインデックス(Labeling index: LI)の算出方法

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。

免疫細胞染色(DAB法)

- ① サンプル抽出 24 時間前に BrdU を (final 40 μ M) dish の medium 内に添加する。
- ② 24 時間後に medium を除去、PBS にて洗浄した後 70%エタノールにて 15 分間固定。
- ③ 再度 PBS にて洗浄後、10%Block Ace /PBS を用いて Blocking 施行(60 分)
- ④ Block Ace を除去し PBS にて洗浄後、一次・二次抗体を反応させる。
- ⑤ PBS にて再度洗浄後、定法どおり VECTASTAIN ABC kit を用いて酵素処理し、DAB reaction にて coloring する。
- ⑥ グリセロールを用いて mounting を行い、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。使用した Primer は表3 (別紙1)に記載した。

C. 研究結果

18年度は主に以下の(1)～(3)の研究を行ってきた。

(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、囊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

(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。

それぞれの結果を示す。

図1

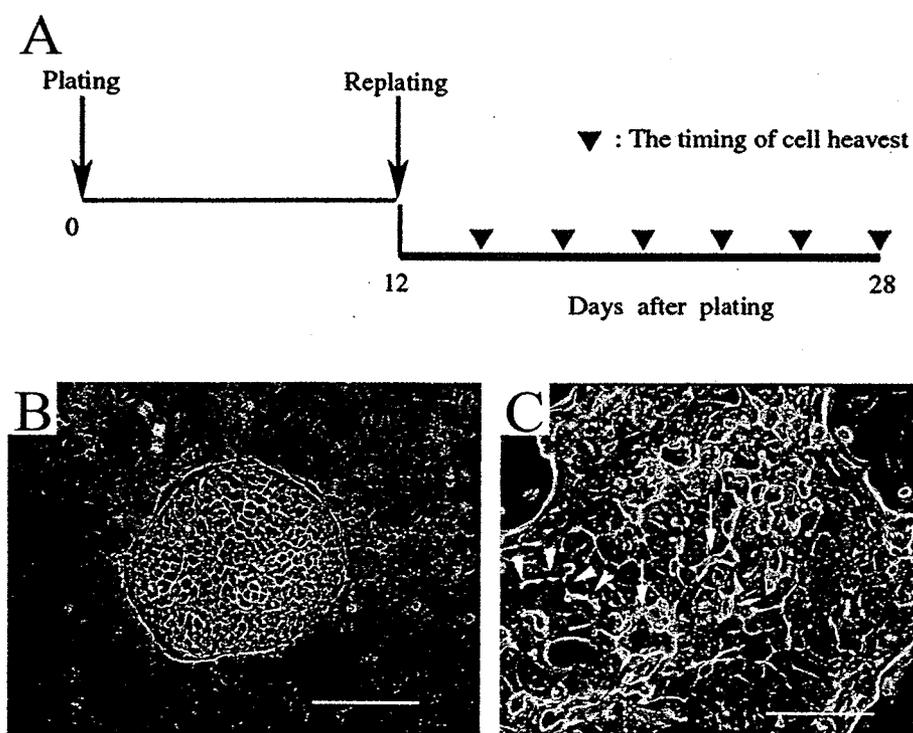
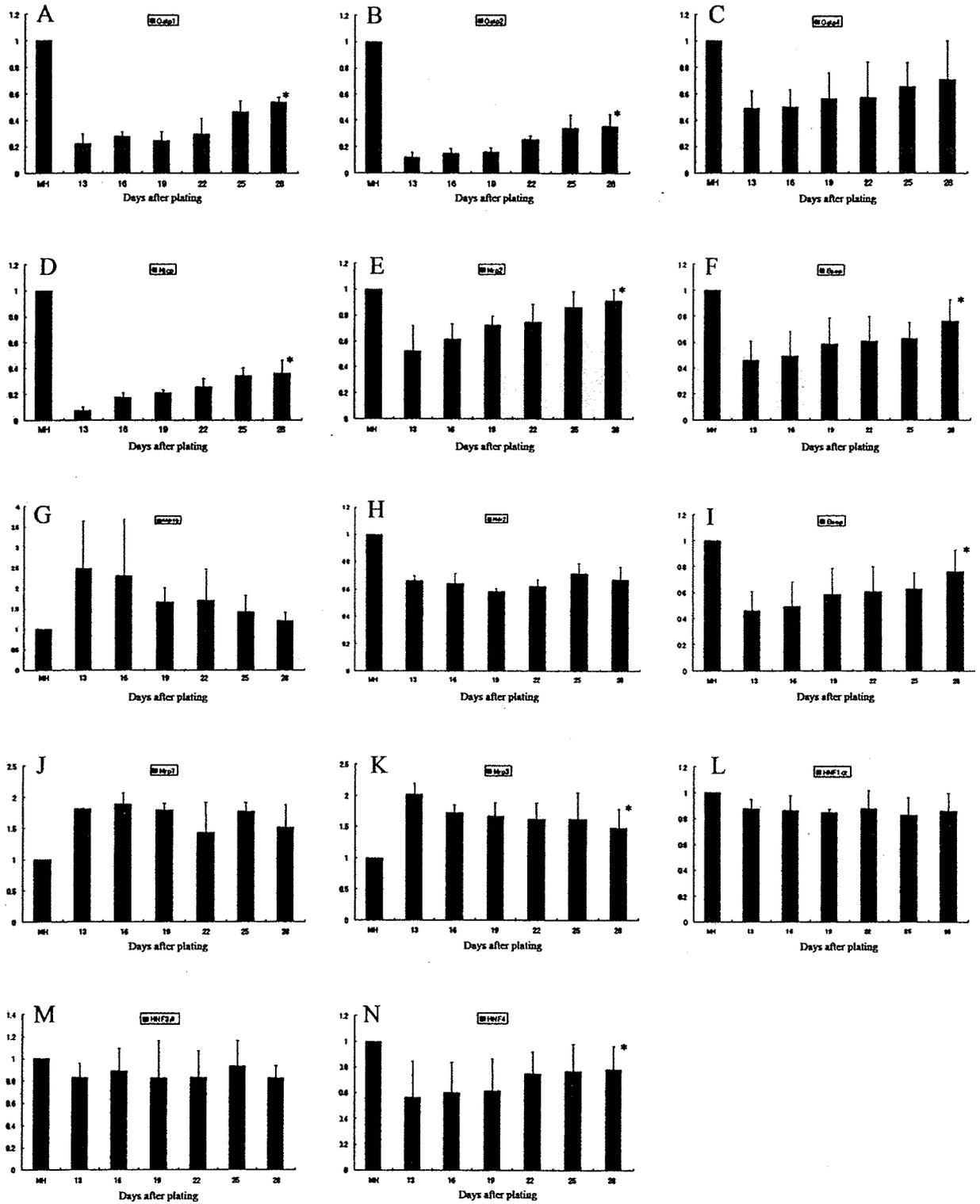
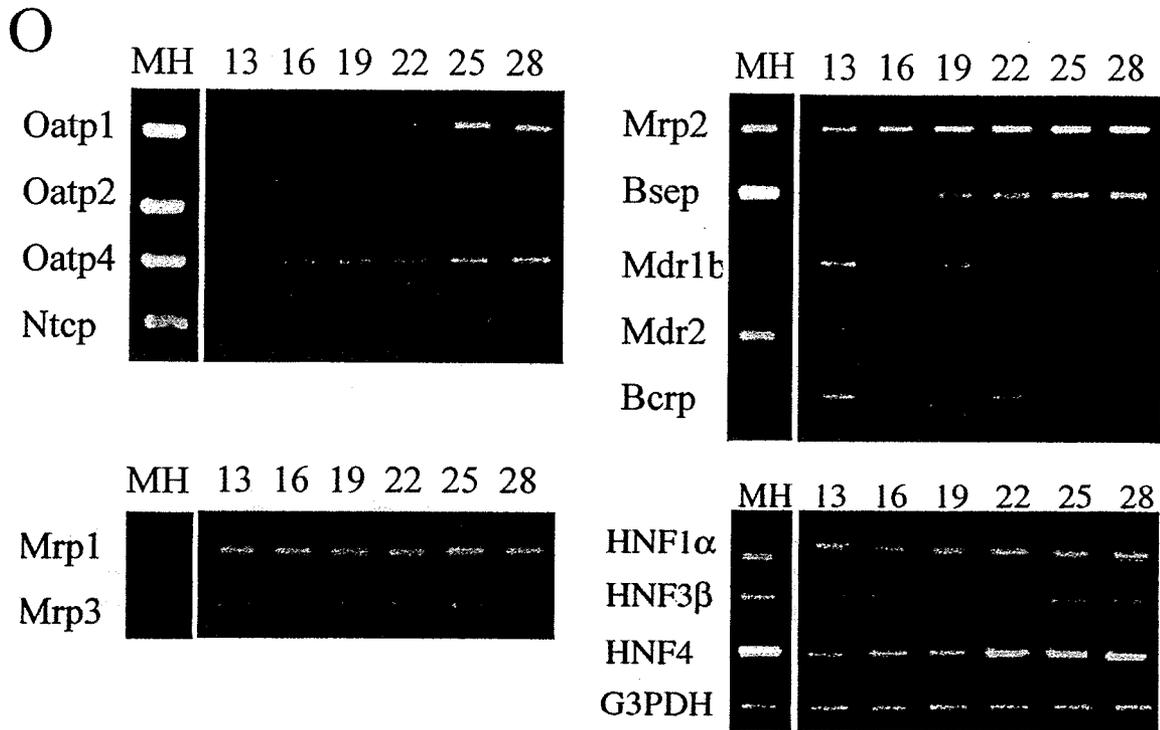


図2 ラット小型肝細胞の成熟化とトランスポーターの発現





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)。

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。

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。

3. 小型肝細胞コロニーの免疫細胞染色

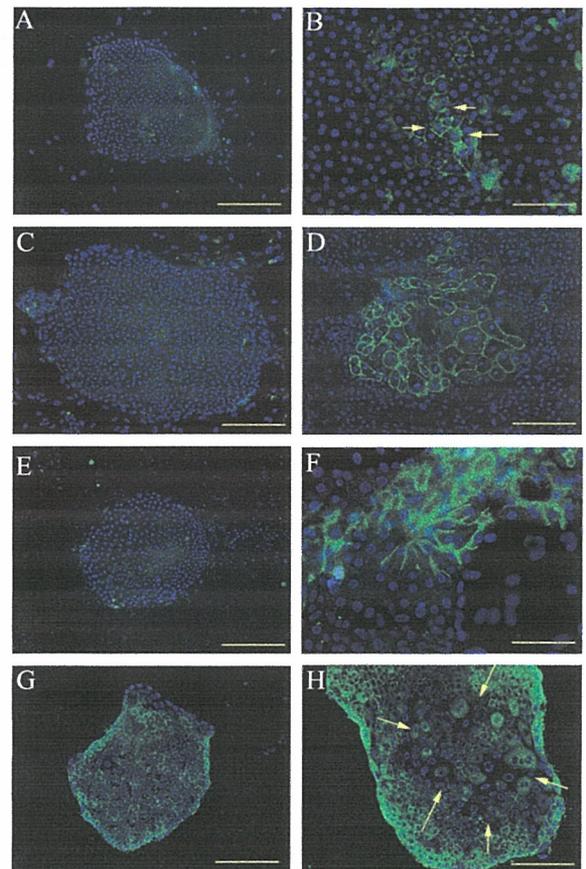
肝類洞側膜に存在する有機アニオン取り込みトランスポーターである Oatp2 は、小型肝細胞が小型の形態を保ち、増殖し続けている時には細胞膜上での発現を認めないが、成熟化し大型化すると類洞側細胞膜上に出現し始め、盛り上がった細胞のように成熟化が進むと類洞側膜上にさらに強く染まるようになった(図3A-D)。

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。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3E,F)。

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3G, H と図4)。

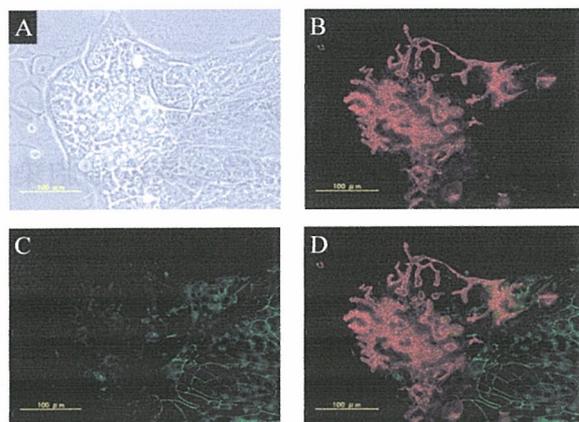
図3 ラット小型肝細胞におけるトランスポータータンパク質の蛍光免疫細胞染色写真



(A,C,E,G) 単層で増殖中の小型肝細胞コロニー (B,D,F,H) 盛り上がり成熟化したコロニーを示す。(A,B) Oatp1: 矢印は細胞膜に Oatp1 タンパク質が発現していることを示している。(C,D) Oatp2,

(E,F) Mrp2, (G,H) Mrp3 矢印は大型化した小型肝細胞ではMrp3タンパク質の発現が消失していることを示している。

図4 ラット小型肝細胞コロニーにおけるMrp2とMrp3タンパク質の蛍光免疫細胞染色写真



培養 24 日目の小型肝細胞コロニー。(A)位相差顕微鏡写真。(B) Mrp2(赤色)。(C) Mrp3(緑色)。(D) Merge した写真

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。 $[^3\text{H}]$ -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5A)。小型肝細胞培養経過と肝細胞内 $[^3\text{H}]$ -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5B)。

図5 小型肝細胞の $[^3\text{H}]$ -Estron 3-sulfate の取り込み

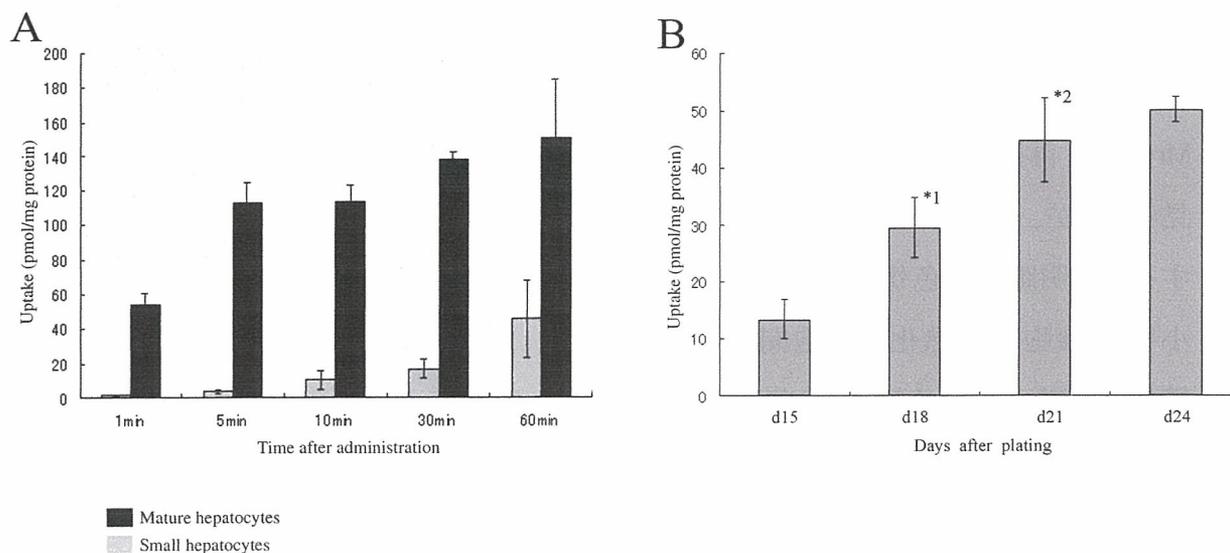
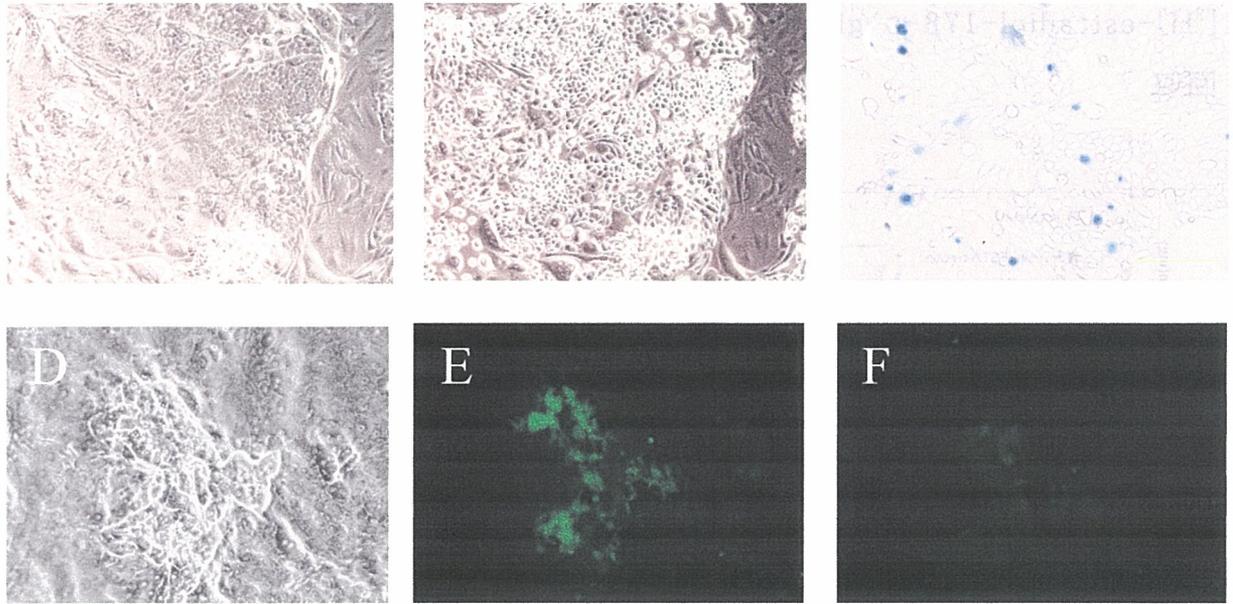


図6 小型肝細胞コロニーに対する Excretion buffer の影響



(A-D)位相差顕微鏡写真。(E,F)蛍光顕微鏡写真。Excretion buffer を投与する前(A)と後(B)。Excretion buffer を投与し、20 分後にトリパンブルーを投与し細胞死を確認。青く染まっている核は死細胞を示す。(D-F)同一コロニーを示す。Fluorescein Diacetate を投与し、Fluorescein が毛細胆管構造内に分泌されているのを確認してから Excretion buffer を投与した。処置後 20 分の写真。Fluorescein が毛細胆管構造からほぼ完全に消失していることがわかる。

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6A, 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6C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。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、

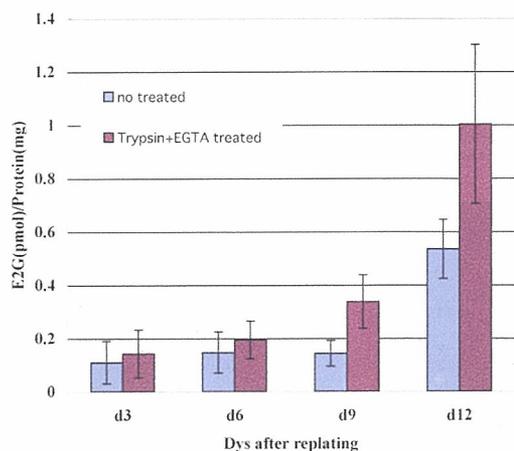
Fluorescein の毛細胆管内からの溶出を認めた(図6D-F)。

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 $[^3\text{H}]$ -estradiol-17 β -D-glucuronide 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7)。

図7 毛細胆管に排泄された
[³H]-estradiol-17β-D-glucuronide の
回収

経過に伴い増大した。



毛細胆管構造から回収された
[³H]-estradiol-17β-D-glucuronide の量は培養

図8 Eizai 高ビリルビン尿症ラットにおける肝細胞膜トランスポーターの発現

