

(A) RT-PCR 法を用いたトランスポーター遺伝子の発現解析。Eizai 高ビリルビン尿症ラット (EHBR) は、成熟肝細胞も小型肝細胞のいずれにも Mrp2 遺伝子を発現していないことを確認した。(B) 免疫細胞染色写真を示す。(a) 抗 Mrp2 抗体(緑色) (b) 抗 Mrp3 抗体(赤色) (c) 抗 5'-nucleotidase 抗体(緑色) で染めた結果を示す。毛細胆管面に Mrp2 タンパク質が発現していないことを確認した。(C) EHBR 由来の小型肝細胞コロニーを用いて $[^3\text{H}]$ -estradiol-17 β -D-glucuronide の毛細胆管構造からの回収を試みたが、コントロールと有意差は無かった。

この結果は、小型肝細胞が成熟化し毛細胆管のネットワークが拡大するに従い、毛細胆管内に排泄され、蓄積する基質量が増していることを示している。

7. Mrp2 欠損ラット小型肝細胞を用いた有機アニオン排泄実験

小型肝細胞コロニー内に形成された毛細胆管内にMRP2タンパク質を介して本来に排泄されているかを検討するために、先天的に Mrp2 遺伝子を欠損しているラット (Eizai hyperbilirubinemic rat)を用いて6. と同様の実験を行った。

図8にその結果を示す。図8A は、Eizai rat 肝細胞に Mrp2 遺伝子が発現していないことを確認した RT-PCRの図である。図8B は Mrp2 タンパク質(図8Ba)が小型肝細胞(図8Bb)に発現していないことを示している。培養液内に投与された $[^3\text{H}]$ -estradiol-17 β -D-glucuronide を Excretion buffer により回収を試みたが図8C で示すようにコントロールと差は無く、 $[^3\text{H}]$ -estradiol-17 β -D-glucuronide が毛細胆管内に分泌されていないことがわかつ

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

(A) 小型肝細胞の遺伝子発現解析

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、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てきた。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可能になる。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。これまでに成熟肝細胞、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わかった Thy1 陽性細胞などの遺伝子発現を解析した。

1. GeneChipによる遺伝子発現解析と階層クラスタリング

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、2/3 部分肝切除後の成熟肝細胞、CD44 陽性細胞、Thy1 陽性細胞 (D-gal 投与後 2 日目と 3 日目) についてそれぞれ 3 例ずつ行い、全体のデータを RMA 法にて標準化した。

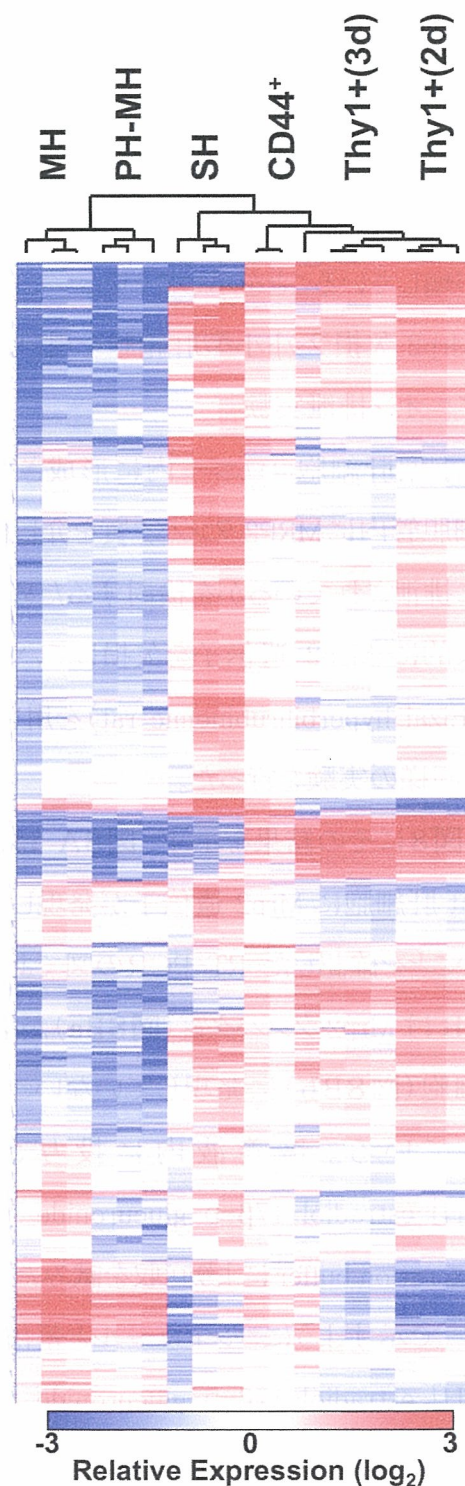
マイクロアレイ上には 31099 probe が存在し、そのうち 22006 probe はいずれかのサンプルにおいて発現が認められた。このうち 12942 probe においては、いずれかのサンプル間での発現差が 2 倍以上であり、このデータを用いて階層クラスタリングを行った(図 9)。今回解析を行ったサンプルは、成熟肝細胞のグループと CD44, Thy1 陽性細胞の 2 つのクラスターに大きく分かれ、小型肝細胞は CD44, Thy1 陽性細胞のクラスターに含まれた。

2. Volcano plot によるサンプル間遺伝子発現プロファイルの比較

発現が認められた probe について、発現比と p value を算出して Volcano plot を行い、各サンプル間における遺伝子発現の差を検討した(図 10)。小型肝細胞、

CD44 陽性細胞、及び Thy1 陽性細胞を成熟肝細胞と比較した結果、発現上昇を示した probe 数は発現低下した probe 数よりもいずれも多かった。

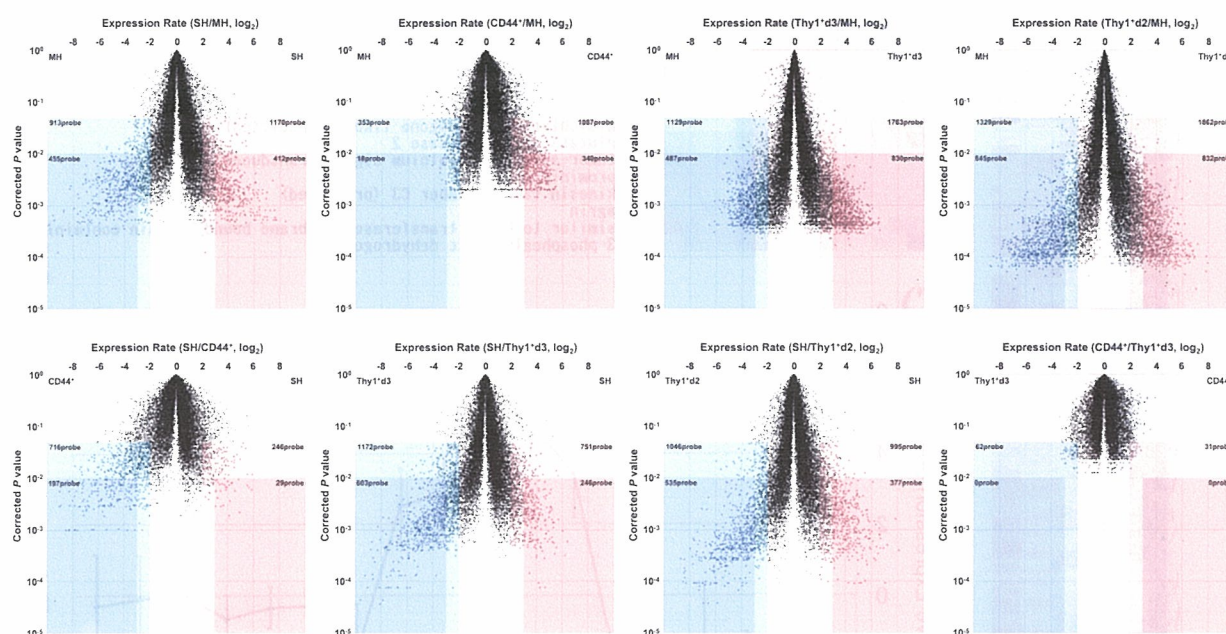
図9 階層クラスタリング解析



また成熟肝細胞と比較して発現に有意差を示す probe 数は Thy1 陽性細胞 (D-gal 投与後 2 日目) で多く、Thy1 陽性細胞 (D-gal 投与後 3 日目)、小型肝細胞、CD44 陽性細胞の順で少なくなることがわかった。小型肝細胞と CD44 陽性細胞、Thy1 陽性細胞を比較した結果、小型肝細胞

の発現プロファイルは CD44 陽性細胞と非常によく似ており、Thy1 陽性細胞とはかなり異なっていることが確認された。また CD44 陽性細胞と Thy1 陽性細胞は非常によく似た発現プロファイルを示すことも明らかになった。

図10 Volcano plot 解析

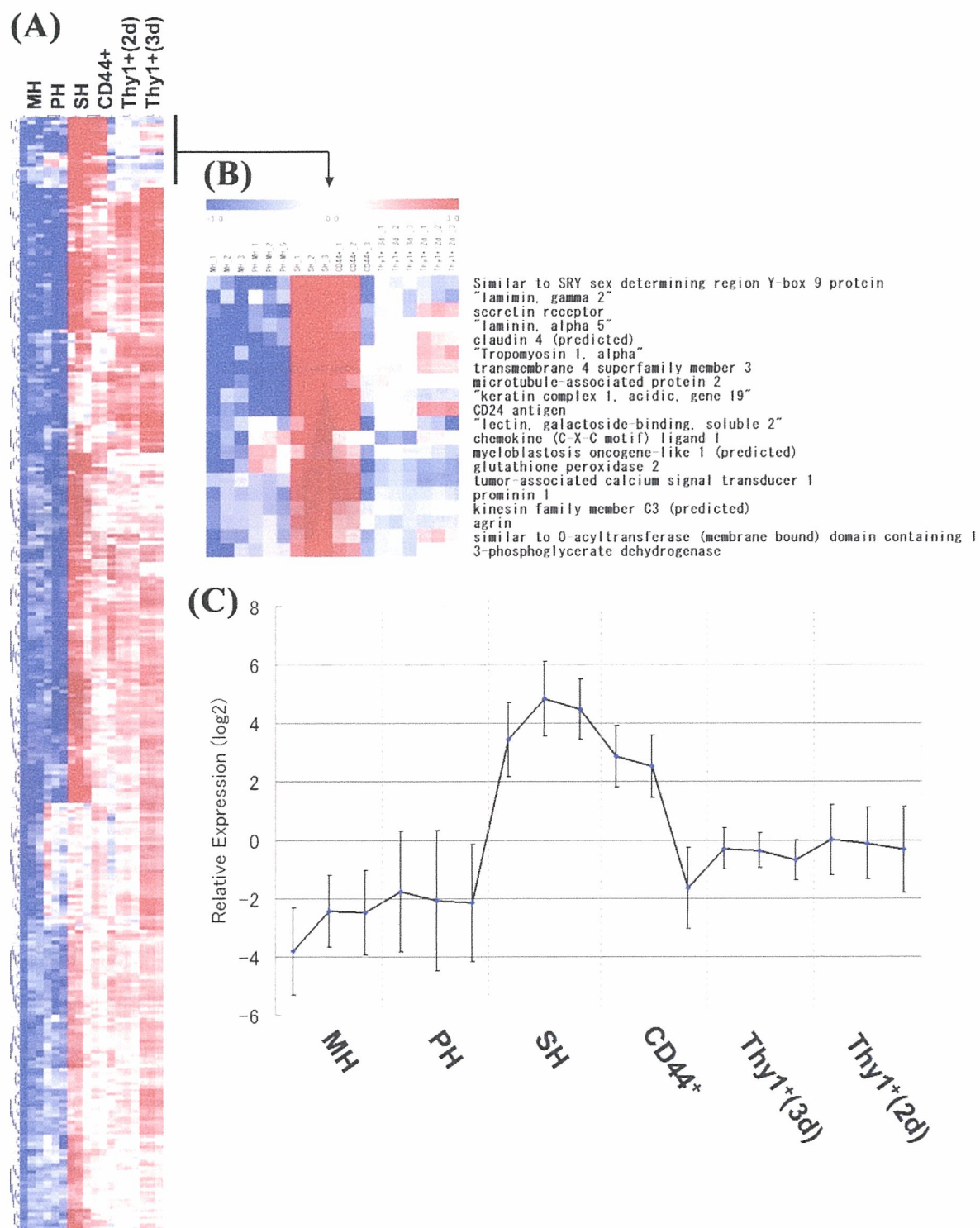


3. Gene Ontology に基づく発現変動遺伝子の機能解析

各サンプルにおいて、全サンプルの平均発現量と比較して 4 倍以上の発現を示した遺伝子を発現変動遺伝子とし、これらの遺伝子に多く含まれる遺伝子機能 (GO term, Biological Process) をリストアップした (別紙 4 参照)。成熟肝細胞において高

い発現を示す遺伝子には代謝に関与するものが多く含まれ、小型肝細胞では細胞成長や組織の発達に関与する遺伝子の多くが発現上昇していた。CD44, Thy1 陽性細胞では血球系で機能する遺伝子が発現上昇していたが、特に Thy1 陽性細胞では細胞運動に関与する遺伝子が強く発現していることが明らかになった。

図11 クラスタリング解析を用いた小型肝細胞／CD44 陽性細胞に特異的に発現している遺伝子の同定



4. 小型肝細胞、CD44 陽性細胞特異的遺伝子の抽出

小型肝細胞、CD44 陽性細胞の両方において、平均発現量と比較して 4 倍以上

の発現を示した probe を抽出し、クラスタリングを行い(図 11A)、そこから Thy1 陽性細胞での発現が低い probe クラスタを抽出してリストアップした(図 11B)。このクラスタは 20 遺伝子で構成されており、小型肝細胞特異的遺伝子として同定されている D6.1A や、laminin, EpCAM, claudin 等の細胞外マトリックスや細胞接着に關与する遺伝子が含まれていた。また、このクラスタの平均発現量は、成熟肝細胞と比較して約 32~64 倍、Thy1 陽性細胞と比較して約 8~16 倍であった(図 11C)。

5. 特定の機能に關与する遺伝子発現データの抽出

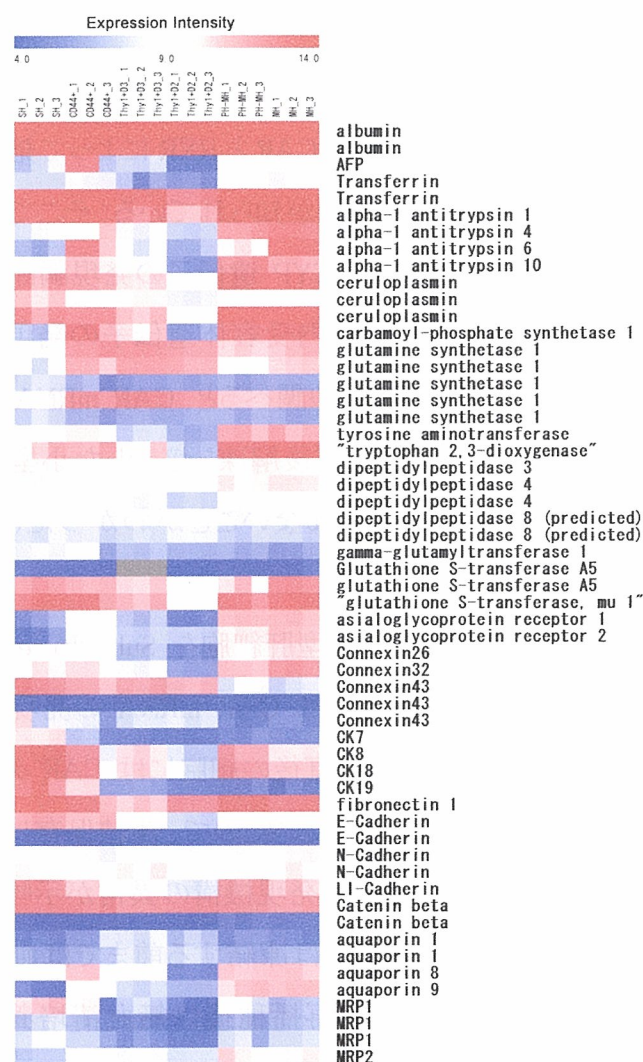
GeneChip に配置されている遺伝子から、肝細胞機能に關与する遺伝子(56 probes)、チトクロム P450 (67 probes)、を選出し、各細胞における発現量の比較を行った。

肝細胞分化機能に關与する遺伝子(図 12)の多くは、小型肝細胞においても成熟肝細胞と同様の発現を示したが、いくつかの遺伝子に關しては発現が低下していた。また CD44 陽性細胞、Thy1 陽性細胞(D-gal 投与 3 日目)においても多くの肝細胞マーカーが発現していたが、Thy1 陽性細胞(D-gal 投与 2 日目)ではそれらのうちいくつかが発現していないことが明らかになった。

チトクロム P450(図 13)については、小型肝細胞においてはほとんど発現してい

ないが、これは培養を行った結果と考えられる。CD44 陽性細胞、Thy1 陽性細胞(D-gal 投与 3 日目)では、成熟肝細胞と比較すると弱い、いくつかの CYP が発現していることがわかった。さらに、Thy1 陽性細胞(D-gal 投与 2 日目)では CYP はほとんど発現していないことも示された。

図 12 肝細胞分化機能に關与する遺伝子の発現



(B) 小型肝細胞における CYP2B1 の発現調節機序の解析

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が相似している必要がある。そのため、成熟化誘導を行った小型肝細胞における遺伝子発現を十分に検討しておく必要がある。しかしながら、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わかり、その原因をまず検討する必要がある。

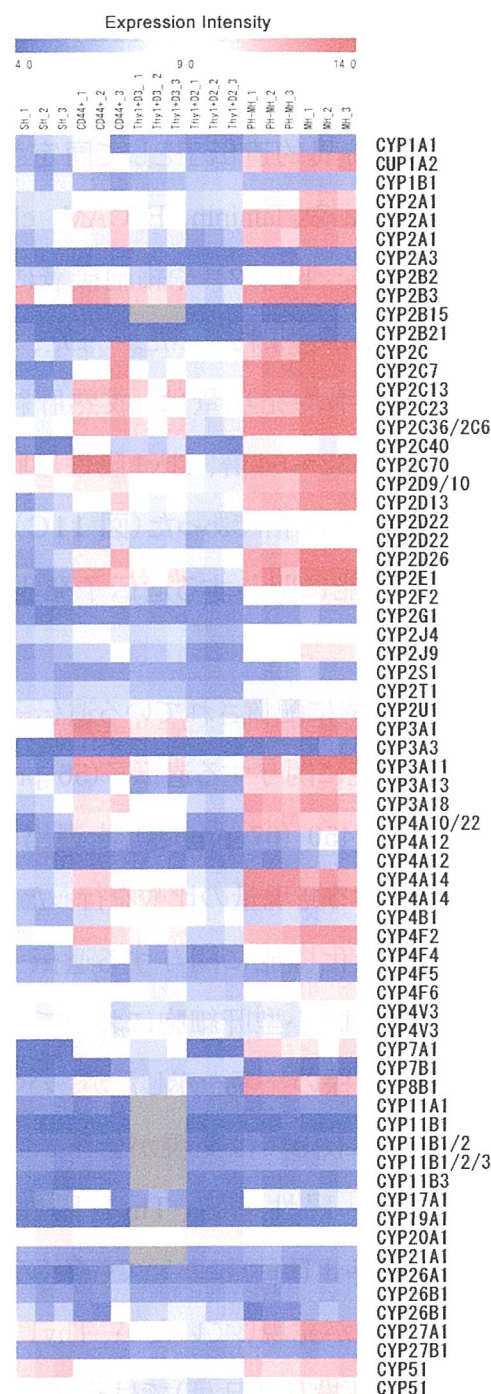
1. ラット小型肝細胞の核内受容体の発現解析

肝細胞における CYP2B1 遺伝子は、核内受容体である CAR と RXR によって発現が調節されることが知られている。そこで肝細胞に発現し、CYP 遺伝子の発現調節に関係している核内受容体遺伝子の発現を RT-PCR 法により調べると、CAR mRNA の発現が凍結保存後解凍し培養した小型肝細胞では見られないことがわかった(図 14)。

初代培養の小型肝細胞を Subculture し培養した場合には CAR mRNA の発現は認められ、解凍直後の細胞には CAR タンパク質が存在していたので、凍結保存による CAR 遺伝子発現機構の異常が示唆された。培養細胞は凍結する前までは血清入りで培養し、再播種後は無血清培養していたので血清成分の影響を検討した。すると血清添加培養液では CAR の発現が再誘導された。他の核内受容体の発現に

変化はなかった。

図 13 チトクロム P450 遺伝子の発現



2. 甲状腺ホルモン添加条件下におけるラット小型肝細胞の CAR, CYP2B1 の発現解析

CAR 遺伝子の上流域に存在する転写因

子の結合部位を検索すると甲状腺ホルモン受容体の結合部位 (TRE, thyroid hormone response element) が存在することがわかった。そこで培養液中に甲状腺ホルモンを添加して凍結保存した小型肝細胞を培養すると、血液中に存在する主要な甲状腺ホルモン活性分子である T_3 は 5×10^{-12} M の濃度で最も CAR 遺伝子の発現を誘導した(図 15)。 T_4 においても 5×10^{-12} - 5×10^{-10} M の濃度で誘導が見られた。これは、ラット血液中に含まれるフリーの甲状腺ホルモン濃度にほぼ等しく、CAR

遺伝子の発現維持に甲状腺ホルモンが重要であることがわかった。

図14 小型肝細胞における核内受容体の発現

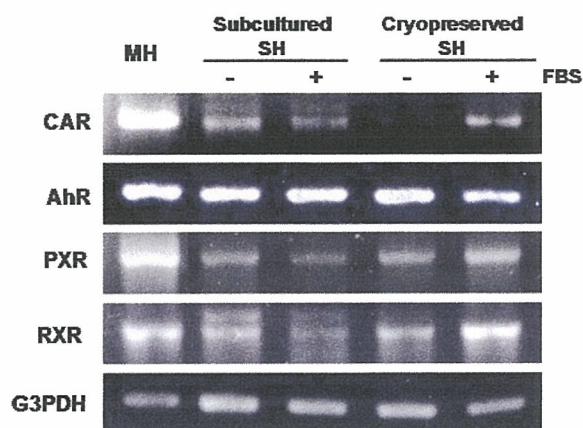


図15 凍結保存ラット小型肝細胞の CAR, CYP2B1 遺伝子発現に対する甲状腺ホルモンの影響

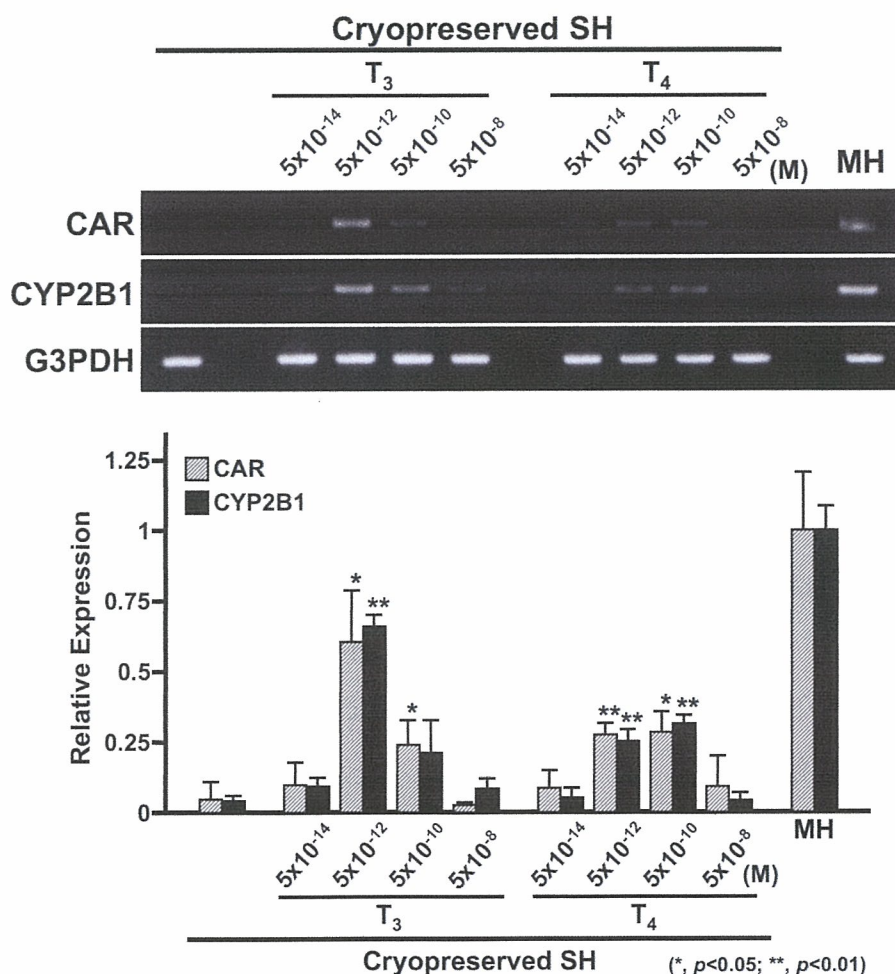
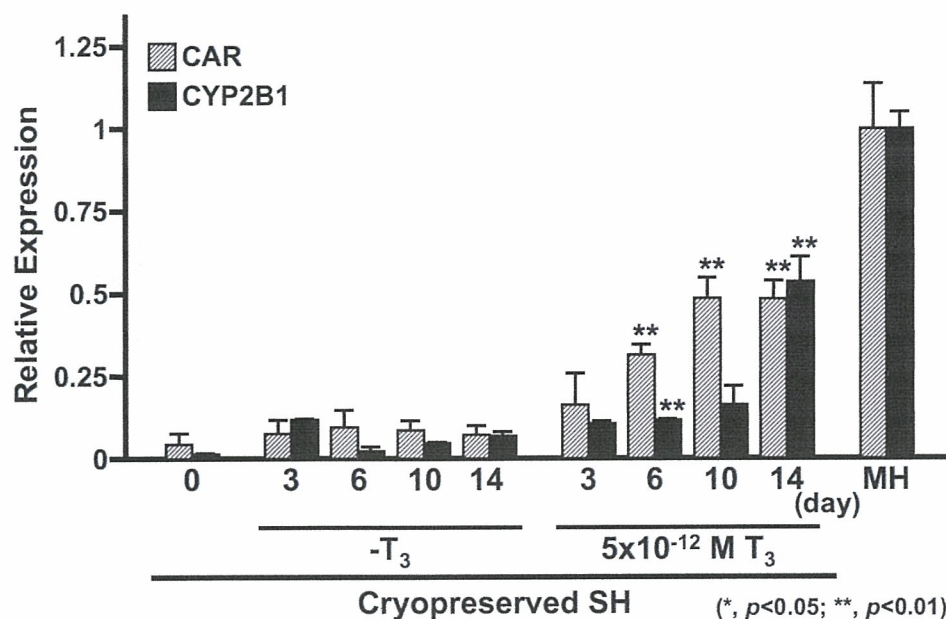


図16 凍結保存ラット小型肝細胞の培養における甲状腺ホルモン添加による CAR 及び CYP2B1 遺伝子の経時的発現変動



3. 甲状腺ホルモン添加条件下における CAR, CYP2B1 の経時的発現解析

甲状腺ホルモン(T_3)を添加した無血清培地で凍結保存後の小型肝細胞を培養して CAR, CYP2B1 mRNA の経時的発現を RT-PCR 法にて検討した(図 16)。CAR, CYP2B1 mRNA の発現は、培養経過と共に大きくなり成熟肝細胞における発現レベルまで近づいた。培養経過と共に小型肝細胞の成熟化も起こっていることが示唆された。

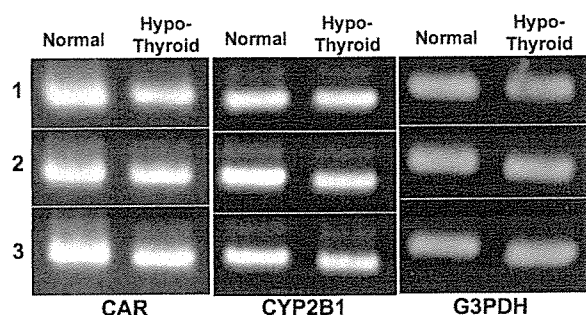
4. 甲状腺摘出ラットの肝細胞における CAR, CYP2B1 の発現解析

生体においても同様の現象が見られるかどうか検討を行った。人為的に甲状腺機能低下症を起こすために手術により甲状

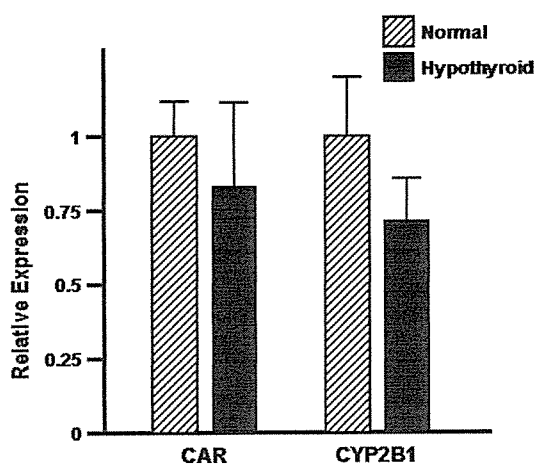
腺を摘出したラットから成熟肝細胞を採取し、CAR, CYP2B1 mRNA の発現を RT-PCR 法により検討した(図 17A)。甲状腺摘出ラットにおいて明瞭な CAR, CYP2B1 mRNA の発現低下は認められなかった(図 17B)。甲状腺摘出ラットの血清中甲状腺ホルモン濃度を測定すると、正常値の約 1/4 程度はまだ存在していた。非常に低濃度の甲状腺ホルモンでも誘導能を示すという実験結果を考慮すると、生体においては血中濃度がほとんど 0 にならないと CAR, CYP2B の発現は無くならないと考えられる。

図17 甲状腺摘出ラットの肝細胞における CAR 及び CYP2B1 遺伝子の発現

(A)



(B)



(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1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レ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1 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。培養14日目において32個以上の細胞からなるコロニーを増殖するヒト小型肝細胞コロニーと考えた。一

個の細胞から増殖したと考えると 5 回以上 分裂したと計算される。

図18 ヒト小型肝細胞の増殖とコロニー形成の位相差顕微鏡写真

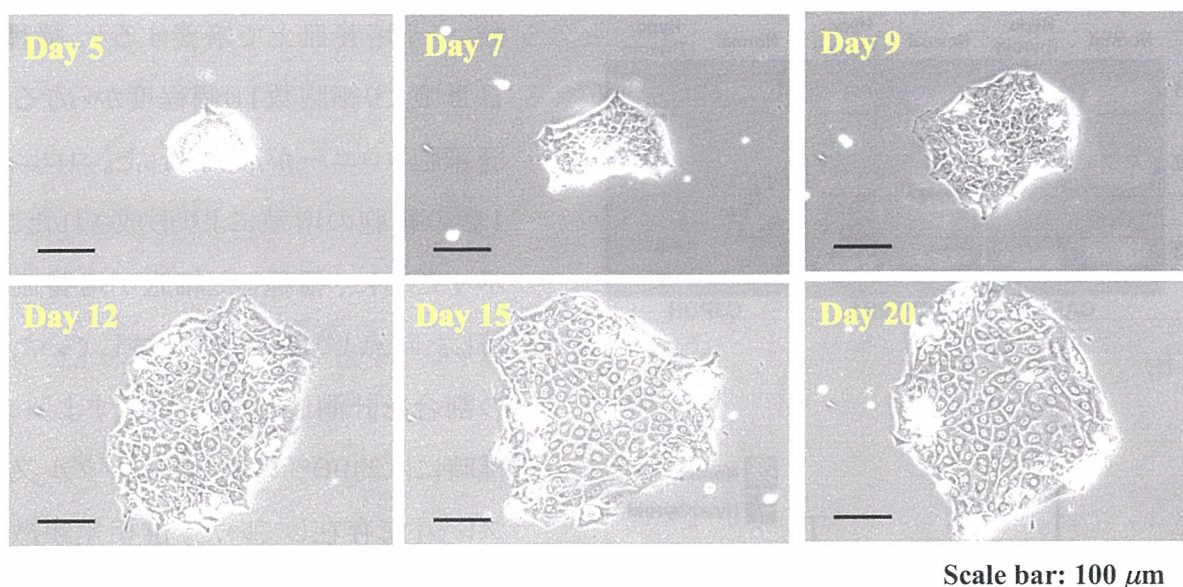


図18は、同一コロニーを位相差顕微鏡で経時的に観察し、写真に撮ったものである。

- 1) 高濃度 (5×10^4 cells/ml) で播種した場合、低濃度 (5×10^3 cells/ml) 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18)。
- 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19は、高濃度で播種した細胞をHGF添加培養液で培養した時に出現し、増殖したコロニーの平均細胞数の推移を示す。

表 2 は、コロニー構成細胞数の平均値を示している。培養14日目に32個以上の細胞からなるコロニーは、それ以降も増殖を続け、21日目には平均100個の細胞からなるコロニーを形成するようになる。しかしながら、その後多くのコロニーはそれ以上大きくはならず、アポトーシスで死んで

いく細胞が増え、コロニー数も減少した。

図19 ヒト小型肝細胞の増殖

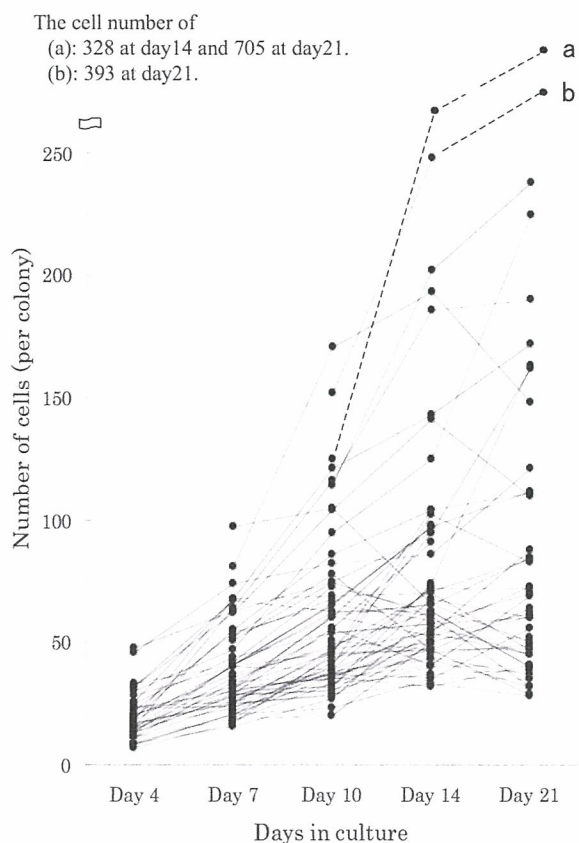


表2 ヒト小型肝細胞コロニー構成細胞数の変化

Days in culture	4	7	10	14	21
Average	19.9	38.6	59.0	79.0	101.5
± S.D.(cells/colony)	± 9.7	± 18.0	± 31.7	± 54.0	± 115.7

Day2でDishに生着している細胞: 平均967個/cm²

Day10で≥10cellsのcolony: 平均19個/cm²

コロニーを形成する能力を有する小型肝細胞の割合は
播種した細胞全体の 約 0.038 % (約 1/2630)
生着した細胞全体の 約 2.0 % (約 1/51)

上の計算式は、培養 2 日目に接着した細胞数に対して 10 日目の時点で 10 個以

上の均一な細胞からなる集団をコロニーとして定義した時に、コロニーを形成する能力を持つ細胞の頻度を示している。培養 2 日目の時点で約 90%の細胞は 1〜2個で接着しているのでコロニーは一個の細胞由来と推定すると、接着した細胞の約 2%がコロニーを形成する能力を有していると考えられる。

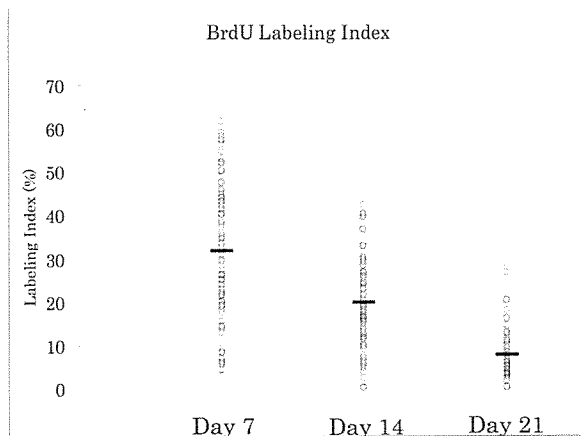
4. Labeling Index (LI)

5×10⁴ cells/cm² で播種した細胞から出現した小型肝細胞コロニーに対して、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19.6%であった(表3)。またコロニー間における LI の値は 0%~42.2%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(図20)。

表3 ヒト小型肝細胞コロニーにおける BrdU 陽性細胞の割合 (LI: Labeling Index)

Culture Period	Day 7	Day 14	Day 21
カウントした総コロニー数	91	81	66
1コロニーあたりの平均細胞数	26.3±11.9	63.2±39.3	94.9±72.5
全体のLI (%)	31.7±15.6	19.6±10.0	7.5±5.9
コロニーごとのLI分布 (%)	2.9~61.5	0~42.2	0~28.4

図20 ヒト小型肝細胞コロニーにおける
BrdU 陽性細胞の割合の分布



4. 培養ヒト小型肝細胞の遺伝子発現解析

培養 14 日目の小型肝細胞コロニーより total RNA を回収し、RT-PCR 法を用いて検討した(図21)。肝分化機能の中で最も重要な血清タンパク質の遺伝子発現を見ると、アルブミン、トランスフェリン、アルファ-1アンチトリプシン、フィブリノーゲンなど発現しており、またアンモニア代謝に重要なグルタミン合成酵素の発現も認められた。薬物代謝酵素の中でも重要なチトクロム P450 の多くも発現していた。肝分化機能の発現調節に重要な転写因子の HNF3 α , HNF4 α , C/EBP α , C/EBP β の発現も見られることから成熟肝細胞と同様な機序で肝分化機能発現が調節されていることが示唆された。また胆管上皮細胞のマーカーでもあるサイトケラチン(CK)7, 19 の発現が発現しており、ラット小型肝細胞特異的遺伝子として同定された CD44, BRI3,

D6.1A(CO-029)も発現していることからラット小型肝細胞と同様に肝前駆細胞としての能力を持つ細胞であると考えられる。

5. ヒト小型肝細胞の特徴－蛍光免疫細胞染色による解析

抗ヒト抗体を用いて増殖してくるコロニーの細胞の特徴を解析した(図22)。遺伝子発現解析で発現が認められた遺伝子でその発現タンパク質に対する抗体が入手可能なもののうち代表的な抗体を用いた結果を示す。抗アルブミン、トランスフェリン、CK8は肝細胞に特異的に発現しているタンパク質であり、CK19 は胆管上皮細胞に発現している。CD44 は我々がラット小型肝細胞に特異的に発現している遺伝子として同定したものである。ほぼすべてのヒト小型肝細胞は、肝細胞及び胆管上皮細胞どちらのマーカータンパク質も発現しているばかりか、小型肝細胞特異的タンパク質も発現しており、成熟肝細胞とは異なる特徴を持っている細胞であることが示された。

6. 培養ヒト小型肝細胞によるアルブミン分泌

培養しているヒト小型肝細胞の培養液中に分泌されているアルブミン量を測定した(図23)。小型肝細胞コロニーの多くが増大していた培養21日目までは培養経過と共にアルブミン量は増加傾向にあったが、それ以降は分泌量が低下していくようであった。この結果は、小型肝細胞の増殖が

停止するコロニーが増えてきたことと一致する。

図21 ヒト小型肝細胞の遺伝子発現

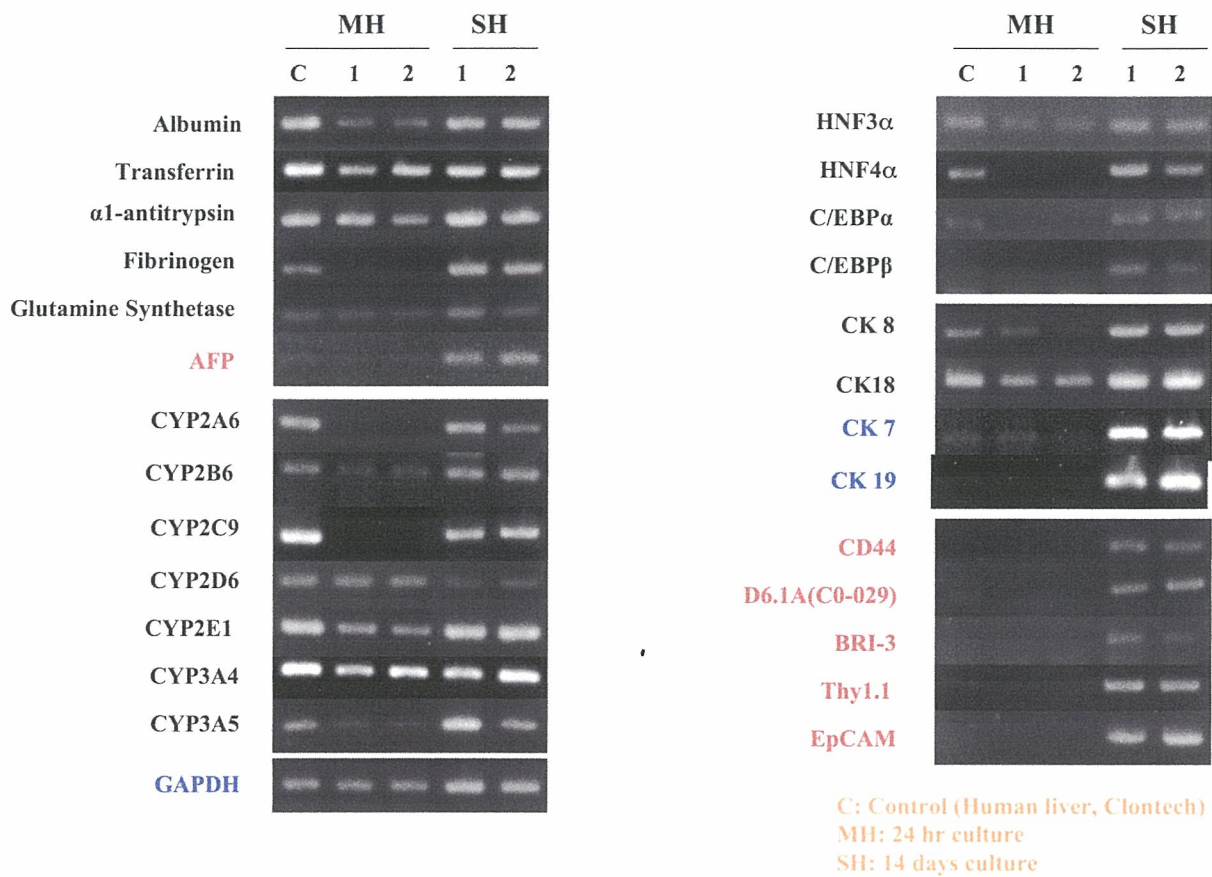
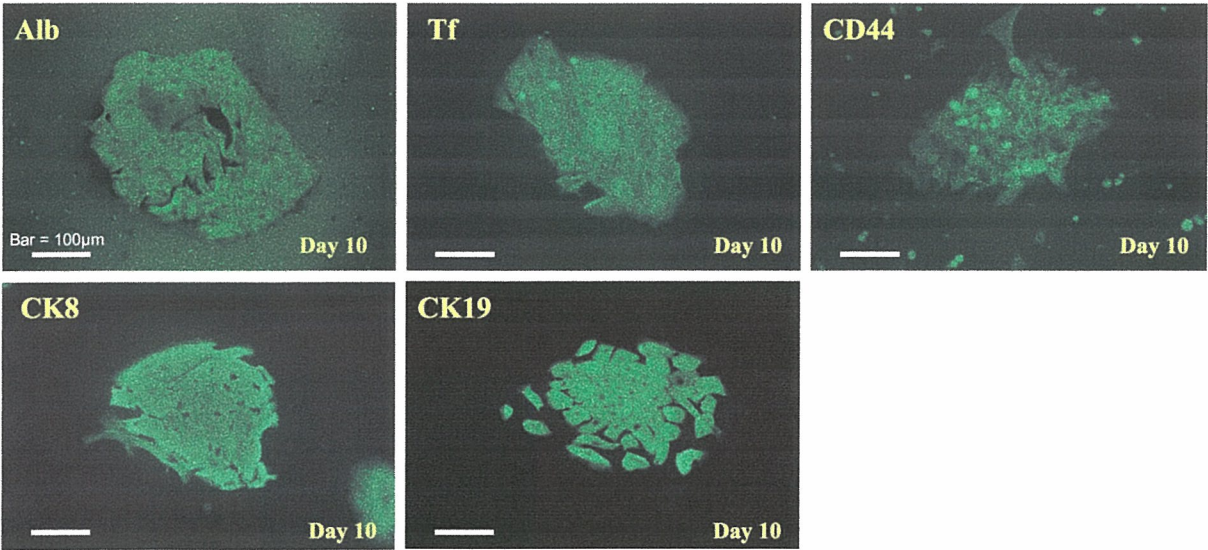
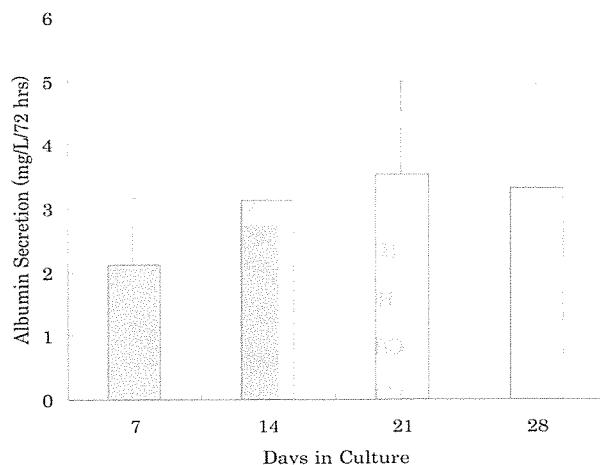


図22 ヒト小型肝細胞の蛍光免疫細胞染色写真



Alb, albumin; Tf, transferrin; CK, cytokeratin

図23 ヒト小型肝細胞のアルブミン分泌



7. 網羅的遺伝子発現解析

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、ヒト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ところであるが、遺伝子解析に用いる程の RNA 量を確保できる症例が限られており、結果を示すことができるほどの十分な症例数が確保できていない。

(B) 中国上海市のRILD社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存率を調べたところ約 59% であった。方主任研究員とのディスカッションより、中国

における施行方法と若干の違いがあったため、中国における方法に準じて行ったところ、生存率は約 76% まで上昇した。

2. 凍結小型肝細胞の培養

1 で融解した細胞を 24 穴培養プレートに 0.7×10^6 細胞/ml の濃度で播種した。培養液に通常我々がラット小型肝細胞の培養時に使用する培養液 (10% FBS 添加) 及び無血清 DMEM/F12 を用いた。10% FBS を添加した細胞は、培養プレートへ接着を認めたが、小型肝細胞の増殖像は認められなかった。また無血清 DMEM/F12 を使用した細胞は培養プレートへの接着をほとんど認めなかった。

凍結細胞を融解後、播種し、薬物代謝酵素 Cytochrome P450 1A2 及び 3A4 の活性を調べた。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し、培養した。

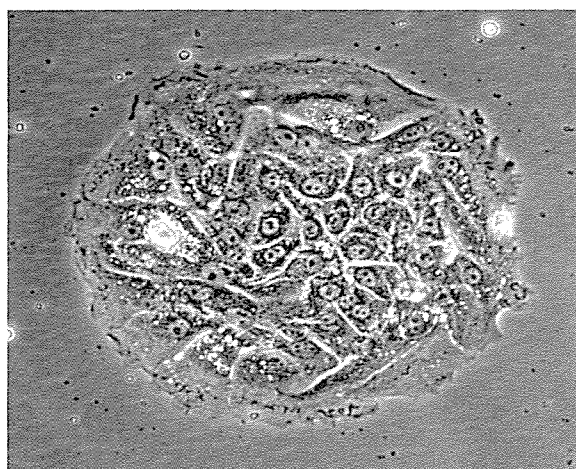
＜平成 17 年度厚生労働科学研究萌芽的先端医療技術推進研究事業・トキシコゲノクス分野・外国人研究者招へい事業により招へいされた外国人研究者・方 思詩主任研究員との共同研究＞

3. 分離した細胞をヒアルロン酸コートしたプレートに播種した後、空輸し培養

RILD 社内で 2 日間培養した小型肝細胞分画の細胞は札幌到着時付着していた細胞総数は播種時に比較しかなり減少していた。ヒト小型肝細胞培養用培養液に交

換し培養を続けると図24で示すようなコロニー形成が認められた。最大 30 個程度の細胞からなるコロニーが Well 毎に数個見られた。

図24 中国から入手した細胞由来のヒト
小型肝細胞コロニー



培養 12 日目に見られた小型肝細胞コロニー

D. 考察

(1) 毛細胆管へ分泌される代謝産物の同定 方法の確立

本年度は、17年度に大まかに得られていた結果の再現性の確認とより詳細な解析を行った。ラット小型肝細胞を培養し、増殖させた後で基底膜成分の細胞外基質(商品名 Matrigel)を投与すると小型肝細胞の成熟化を急速に誘導することができる。成熟化した小型肝細胞コロニーには毛細胆管が良く発達する。胆汁酸やビリルビンの肝細胞内への取り込みや排出には様々な有機アニオントランスポーターが関与している。それらのタン

パク質は細胞膜に局限して発現し、胆汁酸やビリルビンを血中からの取り込み、細胞内での代謝経路、胆汁中への排泄とその方向性を決めている。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。In Vitro で閉鎖系であるために発現してきたと考えられるMrp3は、小型の形態をとっているときにはよく発現していたが、成熟化し組織化した細胞ではほぼ消失していた。これらの結果は、盛り上がり類肝組織を形作っている小型肝細胞は生体内の肝細胞と同等に成熟化していることを示唆している。RT-PCRの結果もその結果を反映しており、免疫染色できなかった他のトランスポータータンパク質も生体内での発現様式と同様にこの類肝組織でも発現していると推測できる。一方、肝毛細胆管膜側存在する Mdr1b (multiple drug resistance 1b)、Bcrp (breast cancer resistance protein)は、mRNA レベルで培養初期には成熟肝細胞以上の発現を示すが、成熟化に伴い発現の低下傾向を認めた。これらのトランスポーターは、臓器を問わずに幹細胞と考えられている side-population (SP) 細胞に発現していることから、小型肝細胞も幹細胞の一種であることを示唆している所見かもしれない。

これらのトランスポーターの遺伝子・タンパク質発現を裏付けるようにビリルビンや蛍光物質で胆汁中に排出されることが知られている Fluorescein diacetate (FD)を培養液中に添加すると毛細胆管中に排出され、嚢胞様構造内に蓄積されていくことを確認した。この結果は、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ことを示しており、培養皿内に小肝組織が形成されたことを証明するものである。その上で毛細胆管中に排出された代謝産物を同定するために、毛細胆管と嚢胞様構造から細胞を傷害することなく胆汁を回収する方法を検討した。キレート剤と低濃度のトリプシンの併用により、細胞障害せずに培養液中に添加し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。有機アニオントランスポーターを介して肝細胞中に取り込まれ、Mrp2などを介して毛細胆管中に排出されることが知られている放射線ラベルした Estron sulfate を培養液中に投与すると、Estron sulfate の取り込み量は類肝組織の量に依存していた。つまり類肝組織の形成が十分ではないと取り込まれる Estron sulfate の総量は少なく、また取り込みにも時間がかかった。加えて正常では発現していない類洞側面の排出トランスポーターの Mrp3が成熟化していない小型肝細胞によく発現しているため、毛細胆管内に排泄されるばかりではなくMrp3を介して培養液中にも排泄される。そのため毛細胆管内から基質の

回収を試みてもコントロールとの差がはっきりしなかった。よく発達した類肝組織が多い培養では取り込みも早く、取り込み総量も多かった。そのことは培養経過と共に類肝組織が増加するに従い、Estron取り込みが増えることからわかる。放射線ラベルした Estradiol 17 β -D-glucuronide のような特異性の高い基質を用いて毛細胆管中に分泌されたEstradiolの回収を試みると、類肝組織がよく発達するにつれ毛細胆管中に排泄され、嚢胞状形態をとる毛細胆管に蓄積するEstradiolが増えるため、Excretion buffer投与により毛細胆管からEstradiolを回収することが可能になったと考えられる。

このような極性を持った肝細胞を培養皿上に作ろうという試みは世界中で行われている。初代培養ラット肝細胞をコラーゲンゲルにサンドイッチすることで極性を持った肝細胞を作ったと報告があるが、トランスポーター蛋白質の発現などの検討は十分に行われておらず、また毛細胆管内から排泄物を回収できると報告されているが、回収される量はきわめて少ない。またMDCK細胞株に遺伝子を導入することにより、トランスポーターを人為的に発現させ、細胞内移送の極性を作らせた細胞もあるが、特定のタンパク質を強制発現している実験系のため、生体内の代謝物の Sorting 機構を正しく反映しているかどうか疑問である。我々が開発した小型肝細胞の成熟化による類肝組織は、凍結保存した小型

肝細胞からも作成することが可能であり、長期間(一ヶ月以上)その機能を維持できる。このようなAssay系は世界で類を見ない。薬剤が肝細胞内でどのように代謝されるか、この実験系を用いることで動物生体を使うことなく推測することができると考えられる。

(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、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てきた。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。これまでに成熟肝細胞、2/3 部分肝切除術後の再生期の肝細胞、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 により解析してきた。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が相似している必要がある。そのため、成熟化誘導を行った小型肝細胞における遺伝子発現を十分に検討しておく必要があった。しかしながら、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わかり、その原因をまず検討する必要があった。これまでに CYP2B1 遺伝子の発現を調節している核内受容体の CAR の発現低下が凍結保存した細胞を培養する起こることがわかった。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(10^{-12} M オーダー)の甲状腺ホルモンを培養液に加えることで CYP2B1 遺伝子の発現を誘導できることがわかった。外科手術により甲状腺を摘出したラットにおいては、明らかな CYP2B1、CAR 遺伝子の発現低下は認められなかった。それらのラットの血中甲状腺ホルモン濃度は正常の 1/4 程度であった。我々の実験結果では正常濃度の 1/10 程度の量でも CYP2B1、CAR 遺伝子の発現を認めることから、生体内では極端にホルモン濃度が減少しない限り CYP2B1 の発現には影響を与えないのかもしれない。

れない。

(3) ヒト小型肝細胞を効率よく分離培養する方法の確立

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、大腸癌の肝転移や胆管癌などによって肝臓の部分切除を行う必要があった患者のうち、ウイルス性肝炎などの背景疾患の無い患者に限定し、十分なインフォームドコンセントを実施した上で施行された肝切除術の摘出組織中の正常と思われる肝組織の一部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。肝細胞培養において良く用いられるコラーゲンをコートした培養皿を使用するとこのような小型肝細胞の選択的な増加を認めないことから、ヒアルロン酸に対する特異的な受容体がヒト小型肝細胞に発現していることが考えられる。小型肝細胞に特異的に発現する CD44 はその受容体ではあるが播種時には発現していない。小型肝細胞以外の細胞の多くはヒアルロン

酸コート培養皿に接着しなかった事実を考えると、CD44 以外の受容体の発現か、他の接着因子により接着すると推測できる。小型肝細胞コロニーの頻度は、播種した細胞総数の約 0.04% であるがそのうちの 20% 程が上皮細胞であるので、上皮細胞画分の 0.2% 程度が小型肝細胞であると推測される。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上がることがわかった。RT-PCR 法を用いて肝細胞の分化機能に関係する遺伝子の発現を調べると、アルブミンやトランスフェリン、フィブリノーゲンなどの分泌タンパク質をはじめ、肝細胞のマーカーと考えられる CK8 や 18 も発現していた。本研究に最も重要でその発現が望まれる薬物代謝酵素のチトクロム P450 の各分子種及び、それらの肝分化機能発現に関係が深い転写因子の HNF3 α , HNF4 α , C/EBP α , C/EBP β の発現も見られた。またラットと同様に小型肝細胞に特異的と考えられる CD44 や BRI3, D6.1A を発現していた。これまで 16 例以上のヒト症例から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は認められた。しかしながらコロニーの出現頻度は症例により大きく異なった。ヒト小型肝細胞コロニーの出現頻度には、背景疾患や治療による肝臓の状態と手術時に肝血流を遮断してから組織を確保するまでの温阻血時間が大きな影響を与えることがわかつ

てきた。

(B) RILD 社より心臓死後に分離された小型肝細胞画分の細胞を入手し、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。これまでに試みた方法は、凍結保存した成熟肝細胞と小型肝細胞画分の細胞、低温で空輸した細胞懸濁液、コラーゲンコートまたはヒアルロン酸コートしたプレートに播種しすぐに輸送した細胞及び中国において 2 日間培養後に空輸した細胞などについてコロニーの出現頻度を検討した。上海で分離してから札幌にある当教室まで輸送するのに少なくとも 48 時間かかった。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。今後は RILD 社において小型肝細胞を培養し、小型肝細胞コロニーの凍結保存を行って札幌に輸送する方法の開発に取り組む予定である。

E. 結論

ヒト小型肝細胞は比較的新鮮な正常ヒト肝組織が入手可能ならば、通常の肝細胞分離操作を行い、低速遠心により沈殿した成熟肝細胞を除いた上清画分の細胞をヒ

アルロン酸コート培養皿に播種することにより、選択的に増殖させることができる。接着した細胞の約 2% は小型肝細胞コロニーを形成し、3 週間で約 100 倍に増えることを考えると、得られた肝組織がある程度の大きさであれば相当数の小型肝細胞を回収できる。現在検討中ではあるが、ラット小型肝細胞では長期間の凍結保存が可能なのでヒト小型肝細胞も凍結保存できれば、試験研究用に供給と考えられる。

小型肝細胞は成熟化するとほぼ生体内の肝細胞と同様の代謝機能を発揮することができ、また形成された毛細胆管内に胆汁を分泌することができる。さらに形成させた毛細胆管から胆汁を回収する方法を確立したので、In Vitro で薬剤の代謝・排泄機序を解析可能になったと考えられる。今後は、実際に使われている薬剤を用いて実証する予定である。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 吉川大和、三高俊広. 肝再生とラミニン $\alpha 1$ 鎖. *Surgery Frontier*, **13**(2), 93-95 (2006)
2. Nagaya M, Kubota S, Suzuki N, Akashi K, Mitaka T. Thermoreversible gelation polymer induces the emergence of hepatic stem cells in a partially injured rat

- liver. *Hepatology*, **43**(5), 1053-1062 (2006).
3. Kon J, Ooe H, Oshima H, Kikkawa Y, Mitaka T. Expression of CD44 in rat hepatic progenitor cells. *J. Hepatology*, **40**(1), 90-98 (2006)
 4. Ooe H, Kon J, Miyamoto S, Oozone Y, Ninomiya S, Mitaka T. Cytochrome P450 expressions of cultured rat small hepatocytes after long-term cryopreservation. *Drug Metabolism and Disposition*, **34**(10), 1667-1671 (2006)
 5. Nobuoka T, Mizuguchi T, Oshima H, Shibata T, Kimura Y, Mitaka T, Katsuramaki T, Hirata K. Portal blood flow regulates volume recovery of the rat liver after partial hepatectomy: Molecular evaluation. *Eur Surg Res*, **38**(6), 522-532 (2006)
 6. Chen Q, Kon J, Ooe H, Sasaki K, Mitaka T. Selective proliferation of rat hepatocyte progenitor cells in serum-free culture. *Nature Protocols*, in press (2007)
2. 学会発表
1. 深澤一知、橋本渉、須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫. 「初代培養ラット胆管上皮細胞の管腔ネットワーク形成」第45回日本生体医工学会大会、2006年、日本生体医工学会誌、44巻.
 2. 今純子、大島秀紀、佐々木寿誉、三高俊広. 「ラット小型肝細胞を中心とした肝前駆細胞の分化・増殖の解析」第42回日本肝臓学会総会、京都、2006年5月25日、肝臓、47巻 (Supplement 1)、A115、2006年
 3. 三高俊広. 教育講演「幹細胞を用いた組織・臓器再生—肝から学ぶ—」第3回泌尿器科再建再生研究会、2006年6月3日、札幌
 4. 大島秀紀、大栄秀和、今純子、佐々木寿誉、平田公一、三高俊広. 「小型肝細胞・類肝組織による有機アニオン輸送モデルの検討」第42回日本肝臓学会総会、京都、2006年5月25日、肝臓、47巻 (Supplement 1)、A209、2006年
 5. 市戸義久、塩田博之、関康夫、久保木芳徳、田畑泰彦、三高俊広. 「マイクロチタン繊維 Scaffold による bFGF 徐放と骨再生」「ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会、2006年6月22, 23日、札幌
 6. 今純子、大島秀紀、佐々木寿誉、三高俊広. 「肝前駆細胞の増殖及び分化機構の解析」第13回肝細胞研究会、旭川、2006年6月30日
 7. 佐々木寿誉、今純子、陳其潔、大栄秀和、大島秀紀、柴田稔人、水口徹、信岡隆幸、木村康利、桂巻正、平田公一、三高俊広. 「成人ヒト肝組織から分離した