

200708008A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：トキシコゲノミクス研究

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 19 年度 総括研究報告書

主任研究者 三高 俊広

平成 20 (2008) 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 外国人研究者招へい等事業(創薬基盤推進研究事業:トキシコゲノミクス研究推進事業)研究実績報告書及び外国人研究者によるレポート … 35

別紙 2 流動研究員 陳 其潔 研究実績報告書 … 45

別紙 3 委託業務報告書 … 55

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 … 111

III. 研究成果の別刷

**厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業:トキシコゲノミクス研究
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。平成17～19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) ホルモン異常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・18年度から引き続いて行われているため、19年度に限定して記載することは難しいが19年度の成果を中心に記載すると共に、新たに(3)の研究テーマの一環として、

(4) 小型肝細胞の増殖機序と肝ステム細胞から小型肝細胞を誘導する方法の確立の研究を行った。

(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。この研究は18年度にその多くのデータは出ていたが、論文としてまとめるためにデータを確定する実験を本年度においても行い、成果をまとめてJournal of Cellular Biochemistryに投稿し受理され、20年度に入るが出版されることが決定している。

(2) “ホルモン異常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

小型肝細胞を用いて薬物代謝を検討する場合、成熟化誘導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。その検討過程において凍結保存をした小型肝細胞では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遺伝子の発現が回復することがわかった。ここまでは18年度までの結果であるが、19年度は、甲状腺ホルモンがCYP2B1の発現に生理的にも必須のホルモンであるかどうか検討を行い、甲状腺切除ラットに甲状腺

ホルモン産生抑制作用のあるプロピルチオウラシル(6-propyl-2-thiouracil, PTU)を投与し低甲状腺ホルモン状態のラットにおいて、CAR及びCYP2B1の遺伝子・タンパク質発現が低下していることを見出した(論文投稿中)。この結果は、CYP2B1により代謝される薬剤等を甲状腺機能低下症の患者に使用すると血中濃度の上昇とその遷延などを引き起こす可能性があることを示している。また我々は、小型肝細胞の成熟化誘導に伴う遺伝子発現変動をGeneChipにより網羅的に解析した。成熟肝細胞と小型肝細胞で発現が異なる遺伝子が多数同定され、成熟化小型肝細胞はその中間の遺伝子発現プロファイルを示した。各細胞間での発現差を元に詳細にprobe数をカウントした結果、成熟肝細胞と小型肝細胞で発現差を示した遺伝子のほぼ全てにおいて成熟化小型肝細胞ではその中間の発現を示した。成熟化により発現上昇するprobeでは、CYPを含む代謝に関与する遺伝子が大部分を占めた。また、成熟化により発現低下する遺伝子には、小型肝細胞特異的遺伝子として見つかっているClaudin 4やAnnexin, Cytokeratin 7,19などが含まれており、加えて増殖に関係する遺伝子も多く含まれている。このことは、網羅的遺伝子解析の結果も成熟化誘導した小型肝細胞は、成熟肝細胞に近い遺伝子発現パターンを持つようになり、小型肝細胞の持つ未熟性や増殖能が減少・消失するようになることを示している。また我々は、高エストロゲン状態(妊娠類似状態)をIn Vitroで再現できるか検討している。成熟化誘導を行った小型肝細胞にエストロゲンを投与後、RNAを回収しGeneChipによる網羅的遺伝子発現解析を現在行っているところである。

(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。この結果は18年度にも報告した内容であるが、19年度も引き続き行い症例数を増やしている。その成果の一部を論文にまとめた(投稿中)。

(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。この結果は18年度に報告したものと同一であるが、19年度においても同様の実験を行い結果の検証を行っている。RILD社においてもヒト肝臓を全肝状態で入手することが困難になってきている現状であり、我々が札幌医科大学で行っている外科手術材料を用いた肝組織断片からヒト小型肝細胞を分離培養する方法を用いて現在ヒト小型肝細胞の分離を上海においても行っている。

(4) “小型肝細胞の増殖機序と肝stem細胞から小型肝細胞を誘導する方法の確立”に関して

(A) 小型肝細胞の増殖機序

小型肝細胞は、特異的遺伝子としてCD44を発現していることを我々は見出した(Kon J, et al. J. Hepatology, 2006)。CD44のリガンドの一つにヒアルロン酸があり、ヒアルロン酸コートした培養皿には小型肝細胞が接着し、無血清培養液中で選択的に増殖することを見出し報告した(Chen Q, et al. Nature Protocols, 2007)。この方法は、ヒト小型肝細胞の分離培養にも応用可能であることは、18年度の報告書にも記載した。増殖するラット小型肝細胞の遺伝子発現をGeneChipにより解析することにより、小型肝細胞の増殖にはFollistatinが重要な働きをしていることがわかった。成熟肝細胞は、自ら分泌するActivin Aにより増殖を抑制しているが、Follistatinは分泌されたActivin Aと結合することによりActivin Aの活性を抑制することがわかっている。小型肝細胞はFollistatin発現が高く、Activin Aの発現が抑えられているために強い増殖活性を示すことがわかった(論文準備中)。この研究成果は、ヒト小型肝細胞の増殖を促進させる培養方法の改善に寄与すると考えられる。

(B) 肝stem細胞から小型肝細胞を誘導する方法の確立

成体肝臓には、肝stem細胞として小型肝細胞の他にOval細胞が知られている。Oval細胞は肝化学発癌過程において一時的に出現する細胞でヒトにおいても重篤な障害肝に出現することが知られている。Oval細胞が肝細胞又は胆管上皮細胞に分化可能なことはわかっていたが、この細胞がどのような過程を経て肝細胞・胆管上皮細胞に分化するかは良くわかっていなかった。我々は、ラットの障害肝臓からOval細胞を分離・培養し肝細胞・胆管上皮細胞に分化させることに成功した。ガラクトサミン投与により誘導されたOval細胞が肝細胞に分化するときには、一旦CD44陽性の小型肝細胞に分化した後、成熟肝細胞に分化することがわかった。ヒト小型肝細胞を創薬のために用いるためには細胞数の確保が重要である。この研究成果は、病的肝臓から分離した小型肝細胞より未熟なstem細胞からも小型肝細胞を誘導することが可能であることを示唆している。

研究協力者

今純子 札幌医科大学がん研究所 助教

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

大柴秀和 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 薬物動態研究所所長

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、現実には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ことが可能、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。

- 19年度は以下の(1)～(4)の研究のうち(2)及び(4)を主に行った。
- (1) 毛細胆管へ分泌される代謝産物の同定方法の確立
 - (2) ホルモン異常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
 - (4) 小型肝細胞の増殖機序と肝stem細胞から小型肝細胞を誘導する方法の確立

B. 研究方法

研究項目(1)～(4)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

実験方法等については、18年度総括研究報告書に記載したものと同様であり、本年度は省略する。

(2) ホルモン異常状態における薬剤の代謝酵素遺伝子誘導発現の解析

(A) 小型肝細胞における CYP2B1 の発現調節機序の解析

実験方法に関しては、委託業務報告書(別紙3)に詳細を記載しているので省略する。

(B) 小型肝細胞の成熟化に伴う遺伝子変動の解析

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、小型肝細胞に加え、培養後に Matrigel 処理による成熟化を行った小型肝細胞の遺伝子発現を 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. 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、50xg、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 50xg、5

分間、4°C、150xg、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. 小型肝細胞の成熟化誘導

小型肝細胞の成熟化は、10 日間培養後に行った。培養皿から培養液を除き、培地で 1 mg/ml になるよう希釈した Matrigel (BD) を 60 mm 培養皿に 1 ml の割合で加え、CO₂ インキュベータ内で 30 分間静置した。その後培地を加えて引き続き 4 日間培養を行い、コロニーを回収した。

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 (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。

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 (Agilent) 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 (Affymetrix) 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。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) を用い、ユークリッド距離を採用して average linkage clustering により行った。

Gene Ontology (GO)に基づく解析は、Ermine J (University of British Columbia) ソフトウェアを用いた。発現変動を Probe 群に含まれる特定機能(GO)を持つ遺伝子の割合は Over-representation analysis に より算出した。

(3) ヒト小型肝細胞を効率よく分離培養する方法の確立

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。

実験方法等については18年度総括研究報告書に記載したものと同様であるので本年度は省略する。

(4) 小型肝細胞の増殖機序と肝ステム細胞から小型肝細胞を誘導する方法の確立

(A) 小型肝細胞の増殖機序

分離した細胞を 5×10^4 個/dish の密度でヒアルロン酸(1 mg/dish)をコートしたディッシュに播種した。培養液は下記のように調整した。

培養液:

DMEM/F12

- + 10 mM nicotinamide
- + 10 ng/ml Epidermal growth factor
- + 1 mM ascorbic acid 2-phosphatase
- + 20 mM HEPES
- + 25 mM NaHCO₃
- + 30 mg/L L-proline
- + 0.1% BSA
- + 10^{-7} M Dexamethasone
- +1x ITS-X (Insulin 10 mg/ml, Transferrin 5.5ug/ml, selenium 6.7 ng/ml, Ethanolamine)

+Antibiotics

(2) 小型肝細胞と成熟肝細胞 total RNA の調整:

上記の培養法で形成されたコロニーのみを Cell dissociation solution を用いて回収した。対照となる成熟肝細胞は(1)の灌流法で低速遠心した後の沈殿分画からパーコールを用いて分離した。Total RNA の分離は、RNeasy Midi Kit を用いて抽出を行った。抽出した RNA は RT-PCR に使用した。

(3) コロニーの数と表面蛋白発現の同定

肝細胞マーカーである CK8 及び小型肝細胞の表面蛋白 CD44 の発現は免疫染色法を用いて同定した。CK44 陽性のコロニー数を顕微鏡で計数した。

また、コロニーの肝細胞マーカーと肝細胞分化マーカーの遺伝子の発現を RT-PCR 法で同定した。

(4) 細胞増殖の同定

BrdU を培養した小型肝細胞に投与し、24 時間後に免疫染色し、BrdU 陽性細胞数をコロニーを構成する細胞数で割、細胞の増殖率を表した。

(5) 培養3日目と5日目に ActivinA 単独あるいは Follistatin と同時に培養液に添加し、7日目に固定、染色し、コロニーの数を数える。培養上清中の Follistatin 蛋白の産生量は ELISA で測定した。細胞質の Follistatin 蛋白の検出は蛍光免疫染色法で行った。培養5日目に抗 Follistatin 抗体で培養上清中の Follistatin を中和し、6日目に BrdU を小型肝細胞に取り込ませ、7日目に小型肝細胞を固定し、BrdU の免疫染色を行い labeling index を調べた。

(B) 肝ステム細胞から小型肝細胞を誘導する方法の確立

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、50xg, 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 50xg, 5分間、4°C、150xg, 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、50xg, 1 分間、4°C で遠心し、上清を回収した。さらに 50xg, 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、150xg, 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、150xg, 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。抗ラット 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 18 年度総括報告書に記載した。

5. マイクロアレイによる遺伝子発現解析

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、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。

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 (Agilent) 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 (Affymetrix) 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。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) を用い、ユークリッド距離を採用して average linkage clustering により行った。

Gene Ontology (GO)に基づく解析は、Ermine J (University of British Columbia) ソフトウェアを用いた。発現変動を Probe 群に含まれる特定機能(GO)を持つ遺伝子の割合は Over-representation analysis により算出した。

6. RT-PCR による遺伝子発現解析

2 µg 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 を用い、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 µg
10× Buffer	2 µl
5 mM dNTP mix	2 µl
50 µM Oligo dT primer	1 µl
逆転写酵素	2 µl
40 U/µl RNase Inhibitor	0.5 µl
Nuclease Free H ₂ O	to 20 µl

得られた cDNA 溶液 20 µl のうち 1 µl 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 を用い、以下に示す試薬を混合した。

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

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 µl に 1 µl の Loading Buffer を加えて攪拌し、0.5×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、各試料の遺伝子発現量を G3PDH 発現量で標準化し、成熟肝細胞の発現量を 1 とし、相対値化した。

C. 研究結果

19年度は以下の(1)～(4)の研究のうち(2)及び(4)について主に行ってきた。それぞれの研究成果を示す。

(1)毛細胆管へ分泌される代謝産物の同定方法の確立

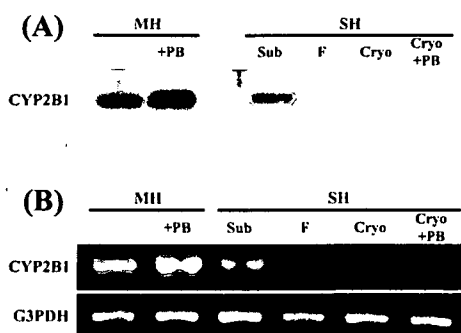
本研究は18年度にその多くのデータは出ていたが、論文としてまとめるためにデータを確定する実験を本年度においても行い、成果をまとめて Journal of Cellular Biochemistry に投稿し受理され、20年度に入るが出版されることが決定している。

(2)ホルモン異常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 CYP2B1 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(図1)。

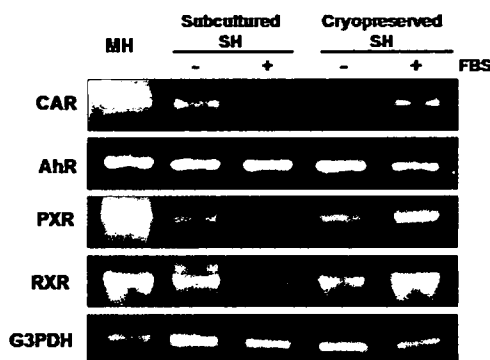
図1 凍結保存したラット小型肝細胞の CYP2B1 タンパク質 (A) と遺伝子発現 (B)



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2)。

図2 小型肝細胞における核内受容体の発現



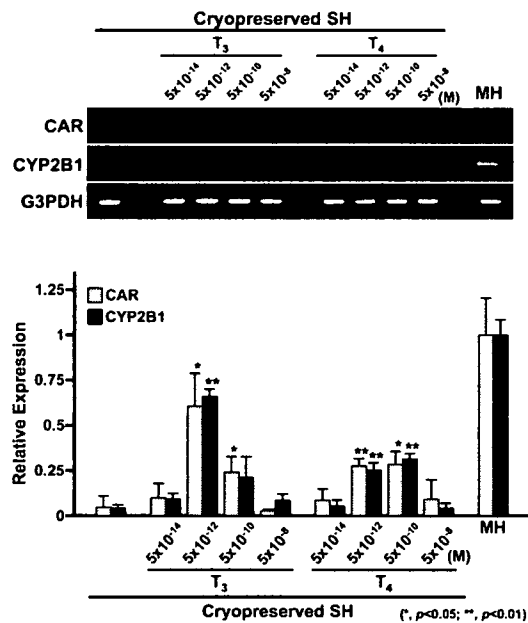
初代培養の小型肝細胞を subculture し培養した場合には CAR mRNA の発現は認められ、解凍直後の細胞には CAR タンパク質が存在していたので、凍結保存による CAR 遺伝子発現機構の異常が示唆された。培養細胞は凍結する前までは血清入りで培養し、再播種後は無血清培養していたので血清成分の影響を検討した。すると血清添加培養液では CAR の発現が再誘導された。他の核内受容体の発現に変化は無かった。

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3)。 T_4 においても $5 \times 10^{-12} - 5 \times 10^{-10}$ 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。

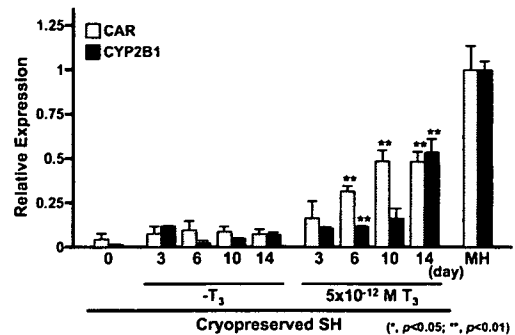
図3 凍結保存ラット小型肝細胞の CAR, CYP2B1 遺伝子発現に対する甲状腺ホルモンの影響



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4)。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っていることが示唆された。

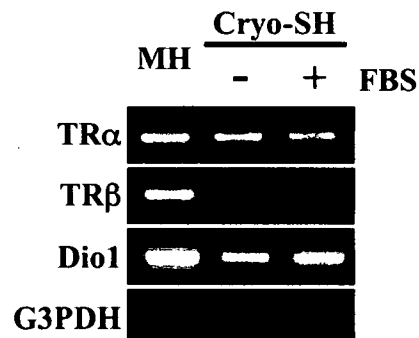
図4 凍結保存ラット小型肝細胞の培養における甲状腺ホルモン添加による CAR 及び CYP2B1 遺伝子の経時的発現変動



4. 甲状腺ホルモン受容体の発現と Deiodinase, type 1 遺伝子の発現解析

凍結保存後の小型肝細胞は、成熟肝細胞と同様に甲状腺ホルモン受容体 α 遺伝子は発現していたが、血清の有無にかかわらず甲状腺ホルモン受容体 β 遺伝子の発現はほとんど見られなかった(図4)。また小型肝細胞においても T_4 - T_3 変換酵素遺伝子 (Deiodinase, type 1) の発現は認められ、 T_3 , T_4 が成熟肝細胞と同様に作用していることが示唆された。

図4 凍結小型肝細胞における甲状腺ホルモン受容体及び Deiodinase の発現

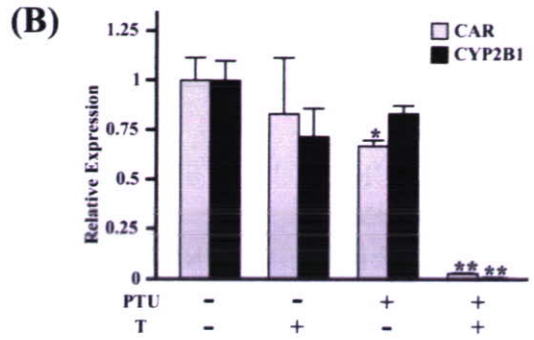
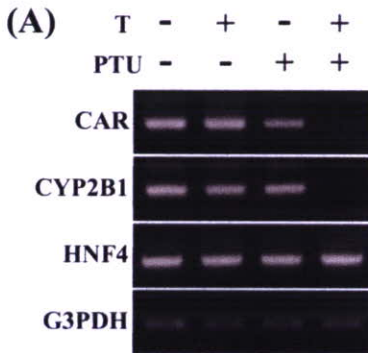


5. 甲状腺摘出ラットの肝細胞における CAR, CYP2B1 の発現解析

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

ト及び甲状腺切除後にさらに甲状腺ホルモン産生抑制作用のあるプロピルチオウラシル(6-propyl-2-thiouracil, PTU)を投与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。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が、PTU を投与したラットにおいては、CAR, CYP2B1 mRNA の発現はほとんど認められなかった(図5)。

図5 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) RT-PCR の結果、(B) (A)の結果を相対的に数値化した

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 程度の減少であったが、さらに PTU を投与したラットの血中濃度は検出限界以下となっていた(表1)。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ゼロにならないと CAR, CYP2B の発現は無くならないと考えられた。

表1 ラット血中甲状腺ホルモン (Thyroid hormone) 及び甲状腺刺激ホルモン (TSH) の濃度

Sample	Total T ₃ conc. (nM)	Total T ₄ conc. (nM)	TSH (μU/ml)
Normal rat	1.34±0.10	53.7±3.9	0.44±0.22
Thyroidectomized rat	0.35±0.05	<3.9	33.07±8.20
PTU treated rat	<0.15	<3.9	40.77±10.19
Thyroidectomized and PTU treated rat	<0.15	<0.39	48.16±21.78
Fetal Bovine serum	1.06±0.05	101.8±3.6	n.d.

(B) 小型肝細胞の成熟化に伴う遺伝子発現変動の解析

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

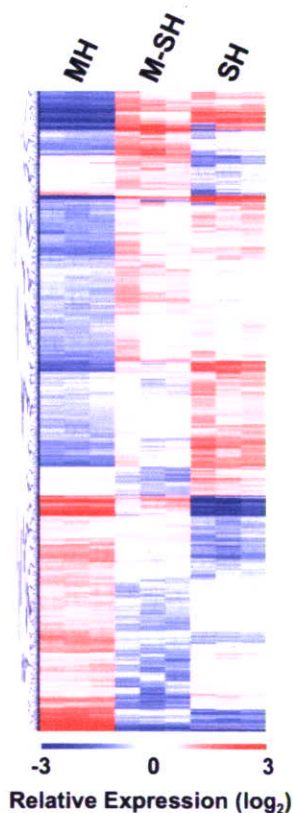
型を呈し同定可能になる。そのため生体内と培養という条件の違いによる遺伝子変化、また静止期の細胞と増殖期の細胞という条件の違いも考慮する必要がある。小型肝細胞は成熟肝細胞と比較して未熟な細胞であり、さらに無血清という限られた条件下で培養されるため、成熟肝細胞で発現するすべての薬剤代謝遺伝子を発現しているとは限らない。そのため、成熟

肝細胞と小型肝細胞、さらにはMatrigelによる成熟化を行った小型肝細胞について、その遺伝子発現の解析を行った。

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。解析は成熟肝細胞、10日間培養小型肝細胞、10日間培養後にMatrigel添加による成熟化を4日間行った小型肝細胞についてそれぞれ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 31,099 probe が存在し、そのうち 17,397 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 9,956 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6)。

図6 小型肝細胞、成熟化小型肝細胞、成熟肝細胞における発現プロファイルの比較



成熟肝細胞と小型肝細胞で発現が異なる遺伝子が多数同定され、成熟化小型肝細胞はその中間の遺伝子発現プロファイルを示した。各細胞間での発現差を元に詳細に probe 数をカウントした結果(表2)、成熟肝細胞と小型肝細胞で発現差を示した遺伝子のほぼ全てにおいて成熟化小型肝細胞ではその中間の発現を示した。本解析においては、小型肝細胞の成熟化に伴って発現変動する遺伝子に着目しているため、成熟化小型肝細胞と小型肝細胞で発現変動する遺伝子についてさらに解析した。

表2 各細胞間で発現変動を示した probe 数

1 st screening	Probe	2 nd screening	Probe
M-SH>MH	3,723	SH>M-SH	342
		M-SH>SH	681
		SH>MH	2,405
		MH>SH	22
MH>M-SH	2,829	SH>M-SH	797
		M-SH>SH	364
		SH>MH	9
		MH>SH	1,205
SH>M-SH	2,073	M-SH>MH	342
		MH>M-SH	797
		SH>MH	944
		MH>SH	58
M-SH>SH	1,991	M-SH>MH	681
		MH>M-SH	364
		SH>MH	143
		MH>SH	997
SH>MH	4,077	M-SH>MH	2,405
		MH>M-SH	9
		SH>M-SH	944
		M-SH>SH	143
MH>SH	2,292	M-SH>MH	22
		MH>M-SH	1,205
		SH>M-SH	58
		M-SH>SH	997

成熟化小型肝細胞での発現が小型肝細胞と比較して2倍以上である1,991probeを抽出し、階層クラスタリングを行った結果(図7左)、成熟肝細胞と成熟化小型肝細胞の発現が似ている遺伝子と成熟化小型肝細胞特異的な遺伝子が分類された。この中から、成熟肝細胞での発現が小型肝細胞と比較して2倍以上であ

る 997probe を抽出しさらに階層クラスタリング解析を行い(図7右)、成熟化に伴い発現上昇する遺伝子を同定した。

図7 成熟化に伴って発現上昇する遺伝子の抽出

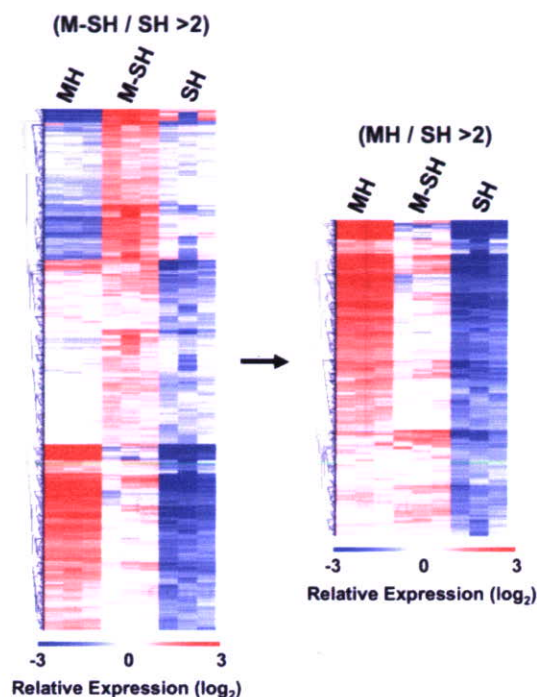
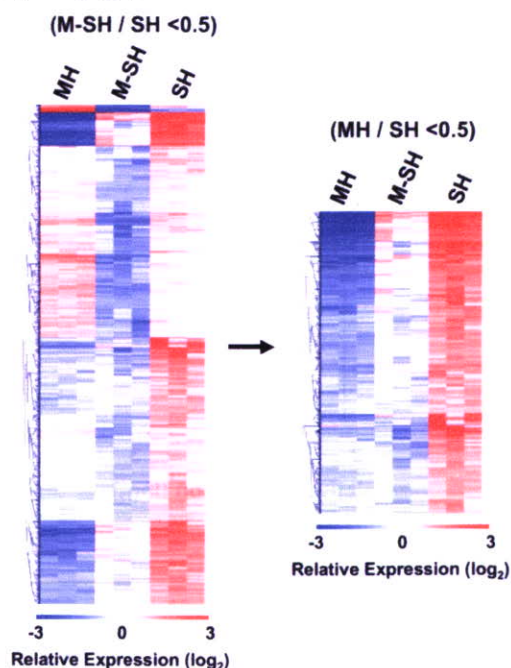


図8 成熟化に伴って発現低下する遺伝子の抽出



同様に、成熟化小型肝細胞での発現が小型肝細胞と比較して 1/2 以下である 2,073probe について階層クラスタリングを行い、(図8左)さらに成熟肝細胞での発現が小型肝細胞と比較して 1/2 以下である 944probe を抽出しさらに階層クラスタリング解析を行うことで(図8右)、成熟化に伴い発現低下する遺伝子を同定した。

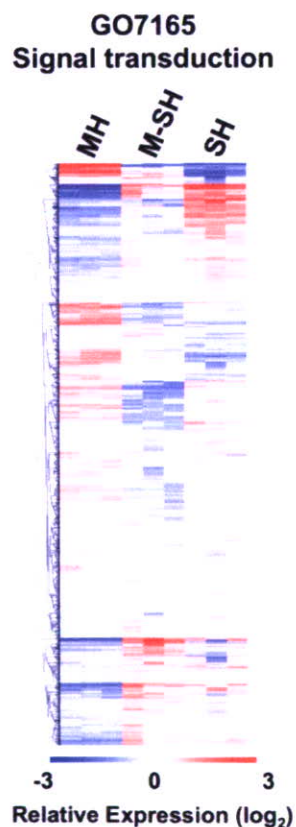
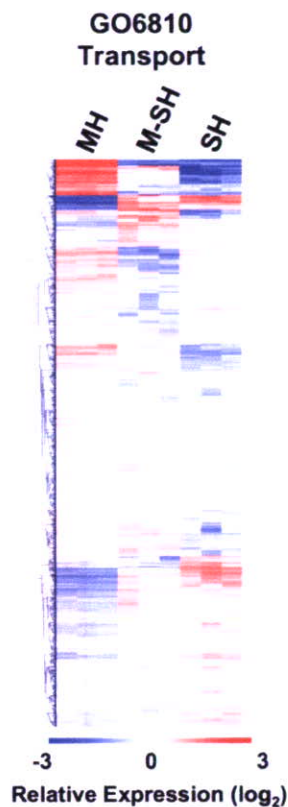
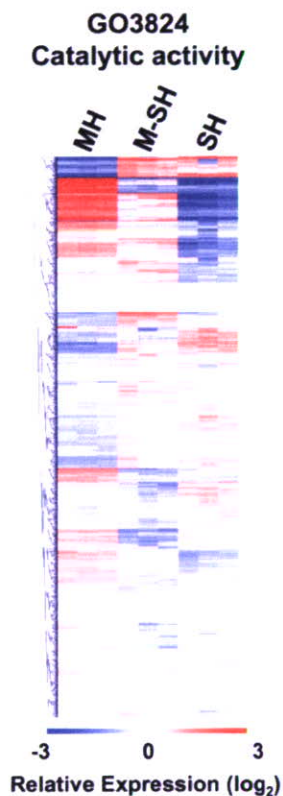
得られた遺伝子のうち、特に変動が激しい遺伝子(発現上昇…8 倍以上、発現低下…1/4 以下)についてリストアップを行った。成熟化により発現上昇する probe では、CYP を含む代謝に関与する遺伝子が大部分を占めた。また、成熟化により発現低下する遺伝子には、小型肝細胞特異的遺伝子として見つかった Claudin 4 や Annexin, Cytokeratin 7,19 が含まれていた。

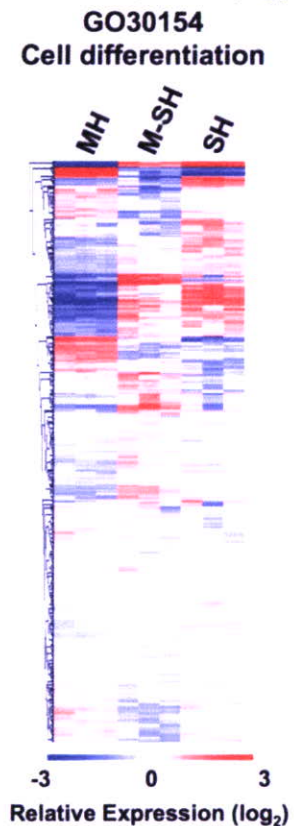
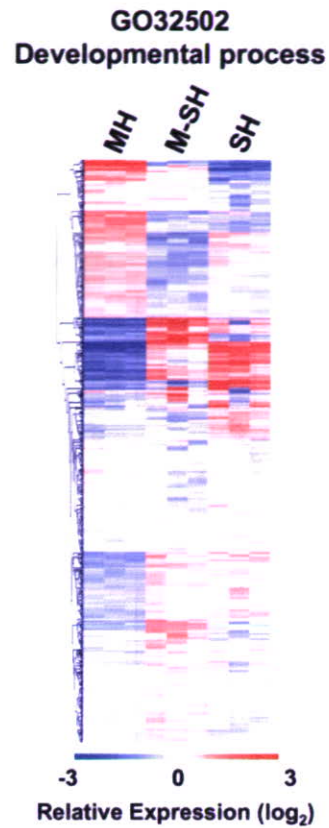
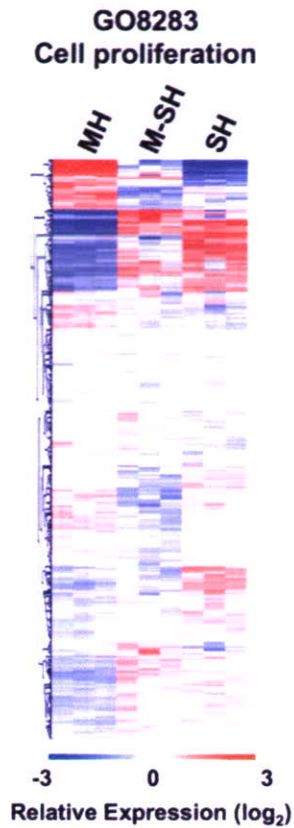
2. Gene Ontology に基づく遺伝子機能ごとの階層クラスタリング

成熟肝細胞、成熟化小型肝細胞、小型肝細胞のいずれかで発現している probe 群から、特定の機能に関する遺伝子を抽出し、階層クラスタリングを行った。その結果(図9)、Catalytic activity (GO: 3824)に含まれる遺伝子の多くが Matrigel 添加による小型肝細胞の成熟化に従い発現上昇し、成熟肝細胞と同等かそれに近い発現を示すことがわかった。Transport (GO:6810)も同様であったが、小型肝細胞の成熟化で発現上昇を示す遺伝子の割合は Catalytic activity よりも低かった。このことから、小型肝細胞の薬剤代謝機能そのものは成熟化によってかなり高くなっているが、代謝産物の排出機能に関しては通常の成熟化のみでは生体肝臓のレベルには達していないと考えられる。また、Signal transduction (GO:7165)や Cell differentiation (GO:30154)属する probe 群には成熟化小型肝細胞特異的に発現する遺伝子が多く含まれ、Cell proliferation (GO:8283)に属する probe 群には、成熟化

肝細胞において小型肝細胞と比較して発現低下する遺伝子が多く含まれた。このことは、小型肝細胞の成熟化に伴って多数のシグナル系が働き、細胞の分化や増殖抑制が起こっていることを示していると考えられる。

図9 特定の GO ごとの階層クラスタリング

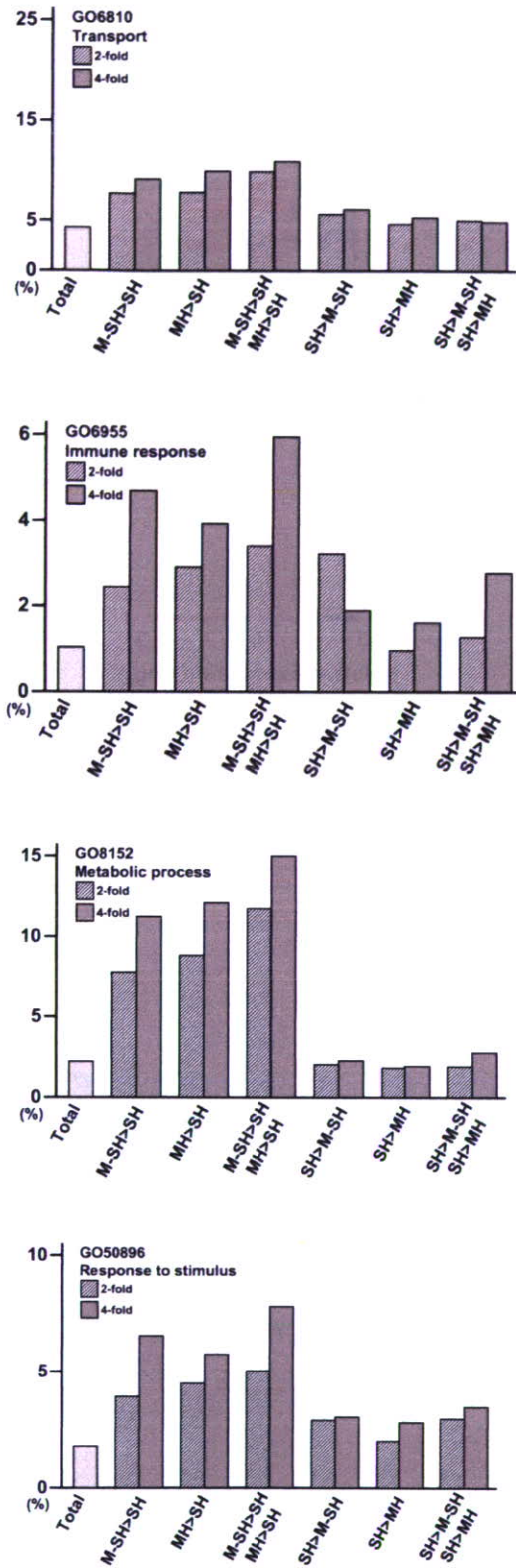




3. 発現変動により分類された probe に含まれる遺伝子の機能についての解析

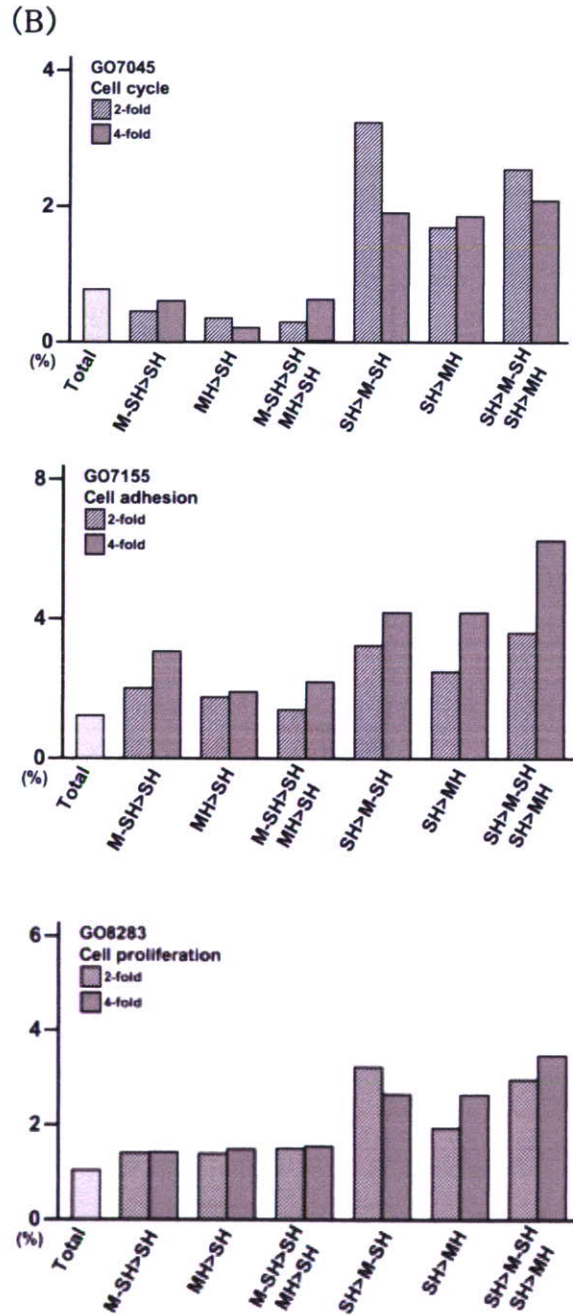
成熟肝細胞、成熟化小型肝細胞、小型肝細胞における発現変動から、**図10**に示す6種の条件により probe を分類した。この際、スクリーニングにおける発現比の threshold は2倍および4倍に設定した。得られた probe 群全体のうち、特定のGOに属する遺伝子の割合を算出し、グラフ化を行った。その結果、小型肝細胞で発現が低く、成熟化小型肝細胞および成熟肝細胞で発現が高い遺伝子には Transport (GO:6810), Immune response (GO:6955), Metabolic process (GO:8152), Response to stilumus (GO:50896)に関わる遺伝子が多く含まれることがわかった(**図10**)。

図10 発現変動により分類された Probe に含まれる遺伝子機能の解析 (A)

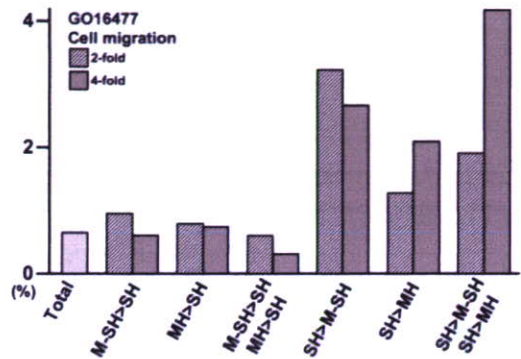
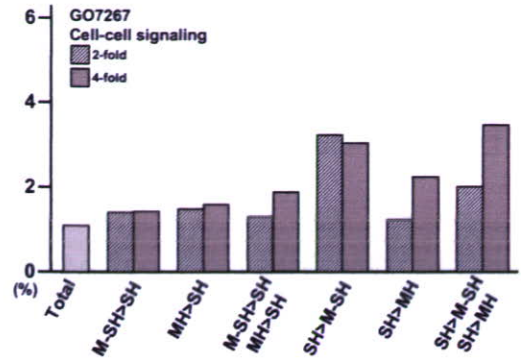
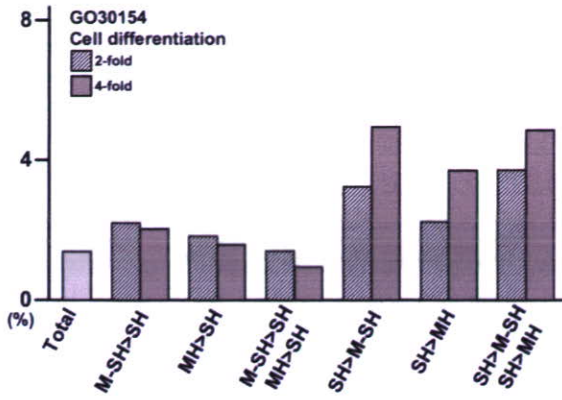


(GO:8283), Cell differentiation (GO:30154)に属する遺伝子の多くは、小型肝細胞で発現が低く、成熟化小型肝細胞や成熟肝細胞で発現が高いことがわかった(図11)。

図11 発現変動により分類された Probe に含まれる遺伝子機能の解析 (B)



一方、Cell cycle (GO:7045), Cell adhesion (GO:7155), Cell proliferation



また、小型肝細胞の成熟化で発現が低下する遺伝子群に特に多く含まれる遺伝子機能としては、Apoptosis (GO:6915), Signal communication (GO:7164), Cell-cell signaling (GO:7267), Cell migration (GO:16477)が見つかった(図12)。

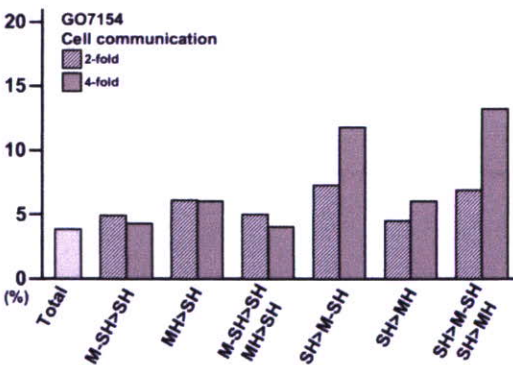
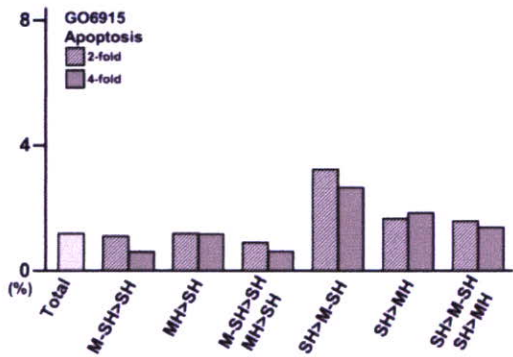
図12 発現変動により分類された Probe に含まれる遺伝子機能の解析

(3) ヒト小型肝細胞を効率よく分離培養する方法の確立

(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、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。この結果は18年度にも報告した内容であるが、19年度も引き続き行い症例数を増やしている。その成果

(C)



の一部を論文にまとめた(投稿中)。

(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

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。この結果は18年度に報告したものと同一であるが、19年度においても同様の実験を行い結果の検証を行っている。

RILD社においてもヒト肝臓を全肝状態で入手することが困難になってきている現状であり、我々が札幌医科大学で行っている外科手術材料からの肝組織断片からヒト小型肝細胞を分離培養する方法を用いる必要が出てきた。そのため外国人研究者招へい等事業にてRILD社CEOであり、上海復旦大学薬学部でもある Zhuohan Hu 教授及び若手研究者を招き、研究の打ち合わせや今後の共同研究の方針、若手研究者に対する手技の実地指導などを行った(別紙3)。帰国後、

RILD社において手術材料からヒト小型肝細胞の分離を行っている。

(4) 小型肝細胞の増殖機序と肝ステム細胞から小型肝細胞を誘導する方法の確立

(A) 小型肝細胞の増殖機序

小型肝細胞のヒアルロン酸コートディッシュにおける選択培養の結果:

ヒアルロン酸コートディッシュを用い、DMEM 血清存在下と DMEM/F12 血清非存在下の培養条件で培養 10 日目に CD44 陽性小型肝細胞のコロニー数を比較した。結果を図 13 で示す。DMEM/F12 血清非存在下で培養した場合、多くのコロニー形成が観察された。無血清培養では、CD44 陰性である上皮様細胞、星細胞などの非実質性細胞も認められたが、有血清培養より培養ディッシュあたりの割合が著しく低かった(表 3)。また RT-PCR の結果は、小型肝細胞は肝細胞マーカーである CK8 や肝分化機能を示すアルブミン、トランスフェリン、TAT、及び肝細胞分化に関わる転写因子の子 HNF4, C/EBP-alpha の発現は成熟肝細胞と同様に発現していることを示した。CD44 は小型肝細胞に特異的に発現していた(図 14)。

表 3 ヒアルロン酸コートディッシュにおけるコロニー形成の純度

Medium	CD44+ cells (%)	CD44- cells (%)
DMEM/F12-FBS (HA-coated dish)	84.5 ± 3.2	15.5 ± 3.2
DMEM+FBS (Normal dish)	64.1 ± 8.0	35.9 ± 8.0

CD44 が小型肝細胞の分化誘導や増殖に対してどのような作用をしているか不明であるが、この培養条件下では非実質細胞が少なく小型肝細胞コロニーの選択的増殖が見られることか

ら、従来のコラーゲンコートディッシュの使用や有血清培養より小型肝細胞の選択的培養に有用であると考えられた。以後の実験はこの培養方法を用いた。