

図13 血清存在と非存在下で小型肝細胞コロニーの形成

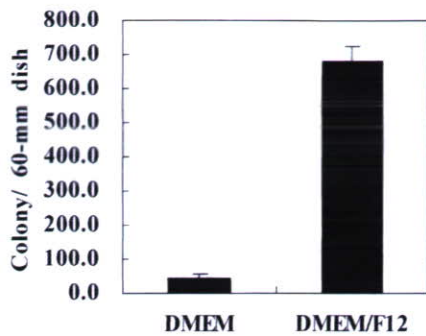
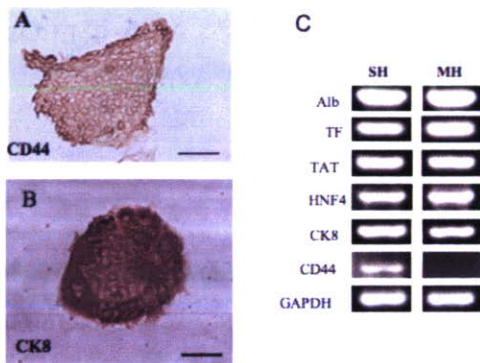


図14 ヒアルロン酸コートディッシュで無血清培養した小型肝細胞のマーカー



### 小型肝細胞における Follistatin, ActivinA の役割

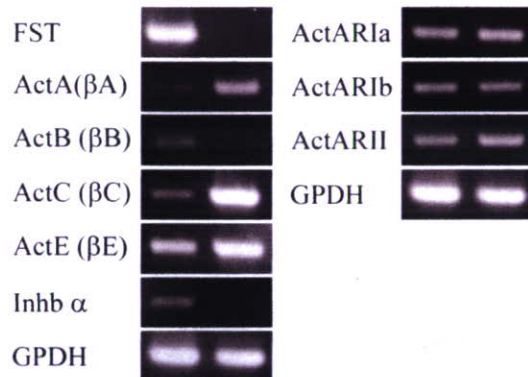
#### 1. 小型肝細胞における FST, ActA 及びその受容体の遺伝子発現

小型肝細胞の遺伝子解析を行ったところ、成熟肝細胞に比べ、小型肝細胞では ActA 遺伝子の発現が低く、FST 遺伝子の発現が高かったことから、これらの物質が小型肝細胞の増殖に関与するかどうかを調べるために、まず成熟肝細胞と培養10日の小型肝細胞から RNA を抽出し FST, Activin 各亜型及び受容体の遺伝子レベルの発現を RT-PCR で調べた。

その結果、図15, 16で示すように、小型

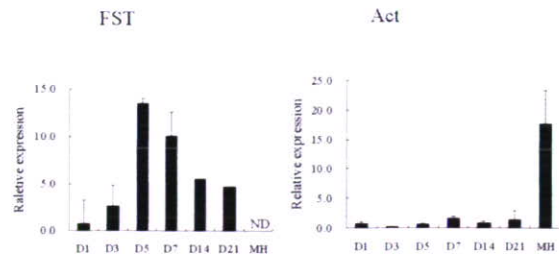
肝細胞では FST と ActB 及び Inhb mRNA の発現が認められたが、成熟肝細胞ではこれらの発現は認められなかった。反対に成熟肝細胞では ActA, C, E mRNA の発現が高かったが、小型肝細胞ではこれらの遺伝子の発現は低かった。Act 受容体の発現は小型肝細胞と成熟肝細胞では大きな差はなかった。

図15 培養 10 日目の小型肝細胞における FST, Activin 及びその受容体 mRNA の発現



さらに FST と ActA mRNA の経時的な発現を調べたところ、FST mRNA の発現は培養24時間後検出し始めその後培養21日まで経時的に増加したのに対し、ActA mRNA の発現は培養 24 時間後から低下し、培養21日まで低いレベルが保たれた。特に小型肝細胞がコロニーを形成し、盛んに増殖する7日目に FST mRNA の発現が増加されることから、FST は小型肝細胞の増殖に関与しているのではないかと示唆された。実際 FST 蛋白の分泌があるかどうか次の実験で調べた。

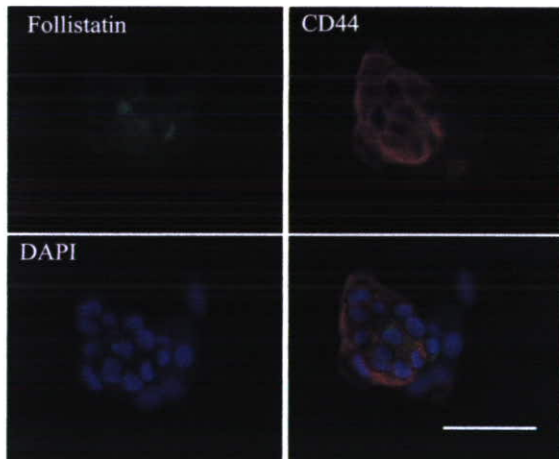
図16 小型肝細胞における FST 及び ActivinA mRNA 発現の経時的な変化



## 2. 小型肝細胞における FST 蛋白の同定

まずは蛍光免疫染色法で培養 7 日目に CD44 特異的に発現する小型肝細胞には同時に FST 蛋白も発現したことが証明された(図17)。

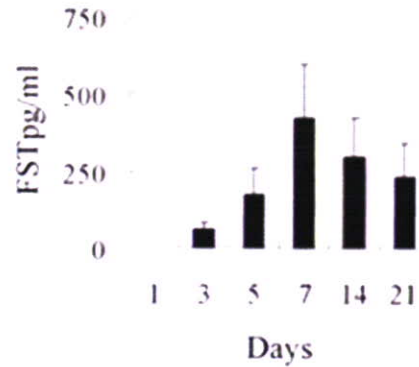
図 17 小型肝細胞に発現する Follistatin



さらに ELISA 法で小型肝細胞の培養上清中の FST 蛋白を測定した(図18)。その結果、培養上清には3日目から FST 蛋白を検出し始め、培養 7 日目にピークに達した。2

1日目までの産生量は7日目に比べ有意差はないが、減少傾向が認められた。

図18 培養液中の Follistatin 分泌量

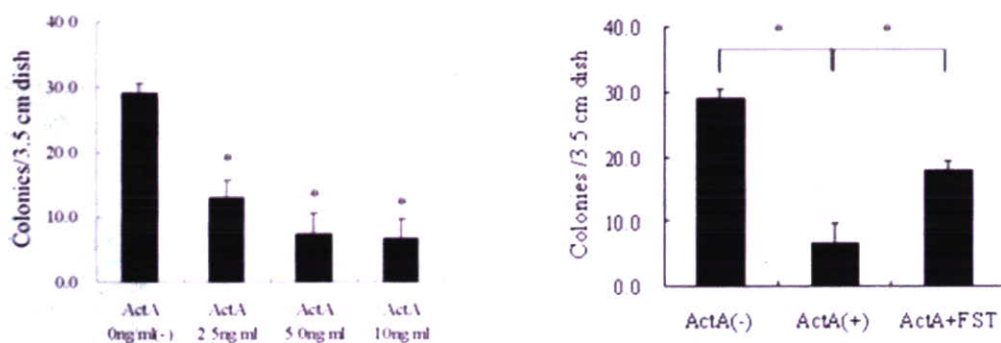
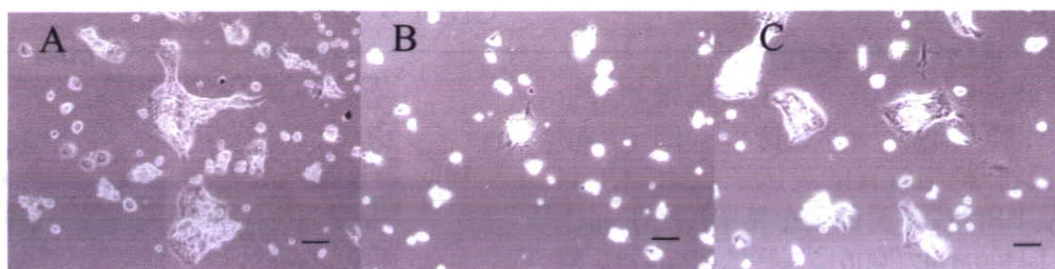


ActA の蛋白検出について残念ながらラットに対する抗体がないため、ActA 蛋白の産生があるかどうかを確認できなかった。

## 3. ActA は小型肝細胞のコロニー形成に対する抑制作用

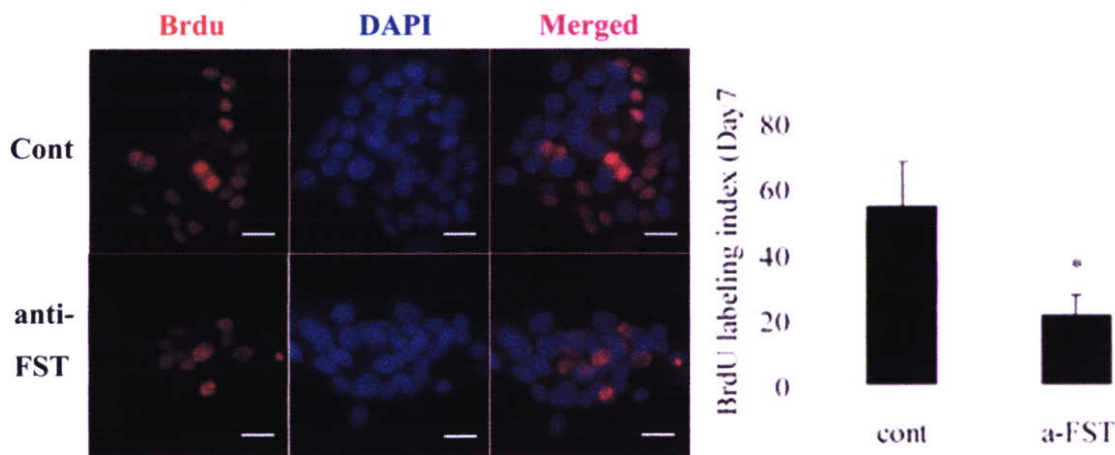
ActA の作用を検討するために、小型肝細胞の培養3日と5日目に ActA 10 ng/ml 単独, あるいは FST 100 ng/ml と同時に添加したり、7日目に形成された CD44 陽性コロニー数を数えた。その結果、添加した ActA の量依存的に、コロニーの数が抑制された。また、FST と ActA が同時に添加すると、ActA 添加により抑制されたコロニー数は対照群と同レベルまで回復した。ここでデータを示してないが、ActA 添加により上清中 FST の産生量は有意に減少した。この結果から ActA が小型肝細胞の増殖を抑制することが示唆された(図19)。

図19 小型肝細胞コロニーに対する ActA の作用



(A)コントロール、(B)10 ng/ml Activin A を培養液に添加、(C)Activin A 投与と同時に100 ng/ml Follistatin を投与した。

図20 抗 Follistatin 抗体による小型肝細胞の増殖抑制



#### 4. FST の小型肝細胞増殖抑制効果

FST はどのように小型肝細胞の増殖に関与するかを調べるため、培養5日目に抗 FST 中和抗体を投与し、培養上清に産生された FST を除去し、6日目に BrdU 40 nM を投与した。7日目にコロニーの BrdU 陽性細胞数を数え、それぞれコロニー毎の細胞数

との割合で BrdU labeling index を計算した。BrdU labeling index でコロニーの増殖能を評価した。その結果、FST を除去した場合、BrdU labeling index が有意に低下した(図20)。

(B) 肝stem細胞から小型肝細胞を誘導する方法の確立

1. 小型肝細胞特異的遺伝子の同定

小型肝細胞の遺伝子発現の網羅的解析を行い、膜貫通ドメインを持つ遺伝子の中から小型肝細胞特異的遺伝子として CD44、D6.1A、BRI3 の 3 遺伝子を見出した(Kon J, et al. J Hepatol, 2006)。特にヒアルロン酸レセプターの一つである CD44 タンパク質は、小型肝細胞が増殖を始めると共に細胞膜に限定して発現し、成熟化すると消失する(図21-23)。

図21 小型肝細胞における CD44 遺伝子の発現

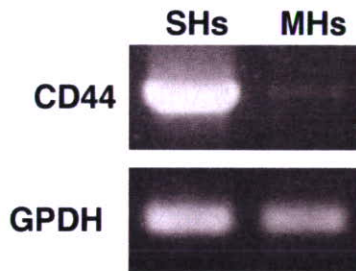
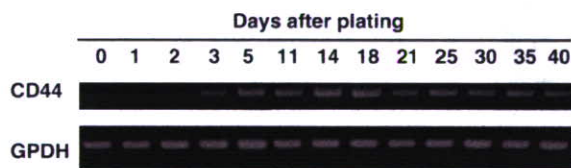
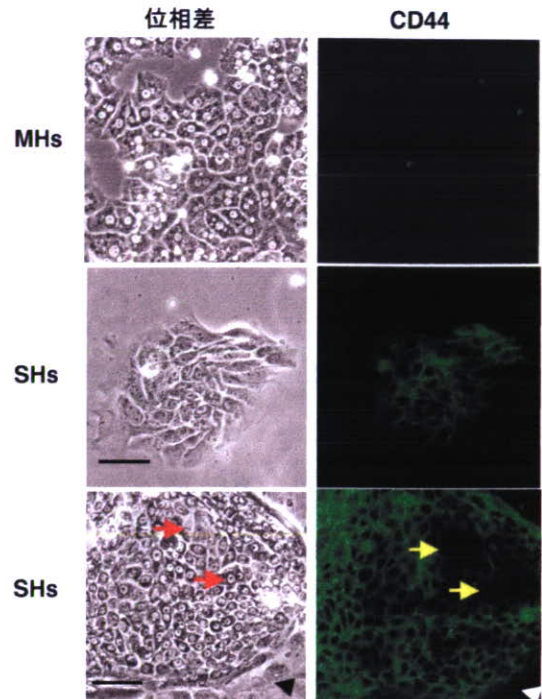


図22 小型肝細胞の培養経過と CD44 遺伝子発現



CD44には、standard form (CD44s)の他に10種の variant form (CD44v1-v10)があり、ラット小型肝細胞は standard form と v6 を発現している(図24, 25)。CD44v6は、CD44s に遅れて発現し、成熟化過程において CD44s 発現が減少する時に一時的に高まり、成熟化すると共に消失する(図26)。

図23 小型肝細胞コロニーにおける CD44 タンパク質の発現



小型肝細胞は培養経過と共に一部の細胞は成熟化し、CD44 の発現は消失する(矢印)

図24 CD44v6 の発現

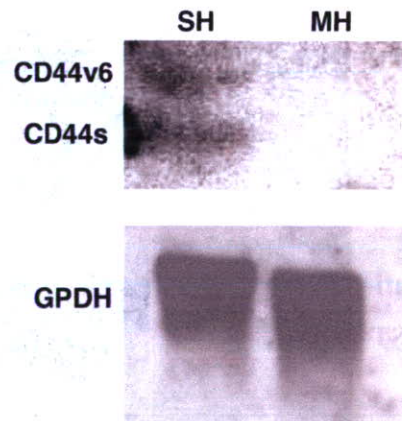


図25 小型肝細胞コロニーにおける CD44v6 タンパク質の発現

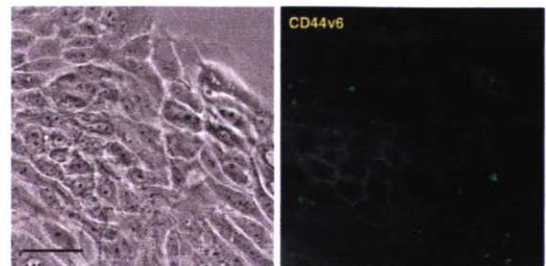
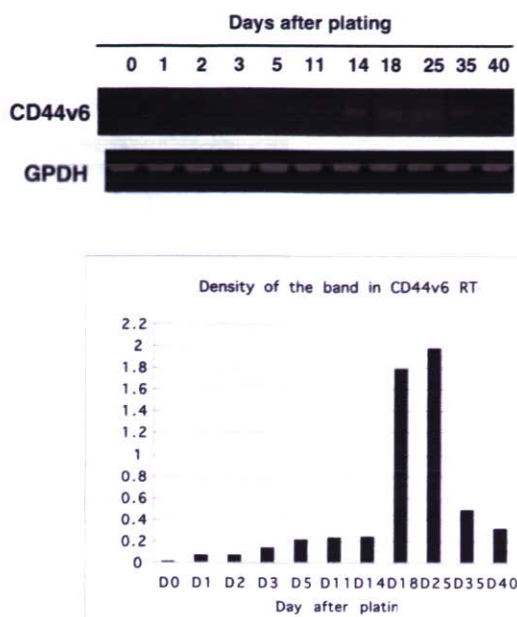


図 26 小型肝細胞の培養経過と CD44v6 遺伝子発現



## 2. ラット肝臓における CD44 陽性肝細胞の出現

CD44 タンパク質は、成熟ラット肝臓において胆管上皮細胞膜にその発現を認めるが、小葉内に CD44 陽性肝細胞は存在せず、2/3部分肝切除による再生刺激を加えても陽性肝細胞は出現しない。様々な肝障害時に出現することが確認され、肝幹細胞と考えられている細胞に Oval 細胞がある。

Oval 細胞は、胆管上皮細胞と表現型の一部が共通しており、胆管と毛細胆管を結合するヘリング管 (Canal of Hering) の細胞と形態的に類似することから、ヘリング管由来と考えられている。障害肝においては、Oval 細胞の出現は一時的で、その消失に呼応するかの如く好塩基性の細胞質を有する小型の肝細胞がその部位に出現することが知られている。

ラットに D-Galactosamine (GalN) を投与すると中心静脈周囲の肝細胞壊死による急性肝炎が起こる。障害の程度と回復にかかる日数は GalN の投与量により異なるが、10 日ほどで肝再生は終了する。ラット 100g 体重当たり 75mg を腹腔内投与した場合の肝再生過程においては、2 日目に Oval 細胞

が出現する。3 日目より好塩基性の細胞質を有する小型肝細胞が現れると Oval 細胞が次第に減少し、5 日目を過ぎると小型肝細胞も徐々に成熟肝細胞に置き換わり肝再生が終了する。

正常ラット肝臓から分離し、培養した小型肝細胞 (In vitro) と、従来から障害肝に見出されていた小型肝細胞 (In Vivo) は由来が同じではないかと考え実験を行った。最初に GalN 投与後の障害肝に出現する小型肝細胞が CD44 を発現しているかどうか免疫組織法にて検討した (図 27)。

図 27 ガラクトサミン投与ラット肝臓に出現した CD44 陽性肝細胞

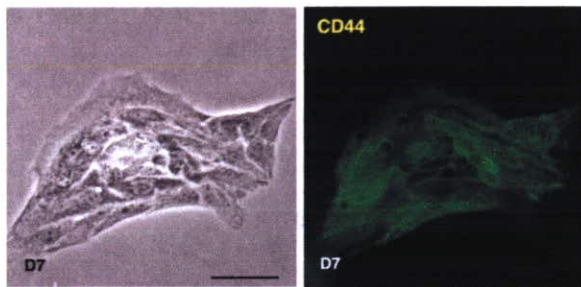


Oval 細胞のマーカーとして Thy1 を、小型肝細胞のマーカーとして CD44 を用いた。Thy1 陽性細胞は、GalN 投与後 2 日目からグリソン鞘周囲に多数出現し、5 日目にはほとんど消失する。一方、CD44 陽性肝細胞は 3 日目から Thy1 陽性細胞の出現部位より小葉内寄りに認められ、4 日目にその数は最大になり 6 日目にはほぼ消失した。また、3-4 日目には Thy1, CD44 を共に発現している細胞が認められた。この結果は、GalN 投与障害肝に出現する小型肝細胞が CD44 を発現しており、Thy1 陽性 Oval 細胞が CD44 陽性小型細胞を介して肝細胞に分化する可能性を示唆していた。

### 3. 障害肝から分離した小型肝細胞

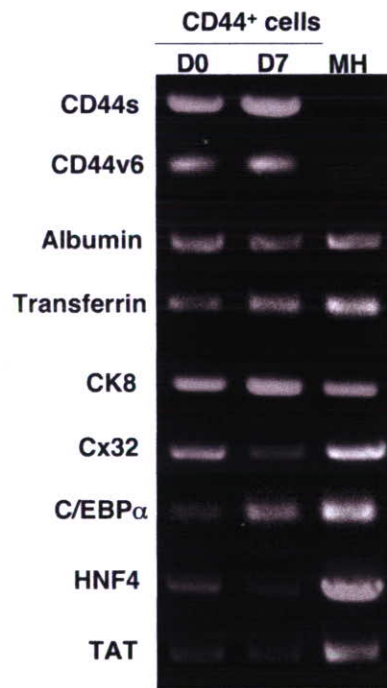
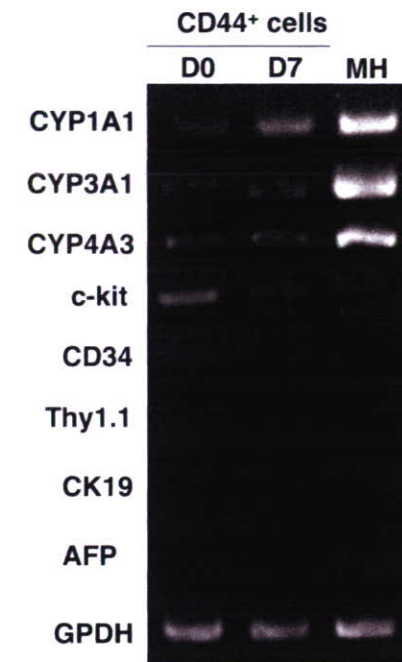
次に障害肝に出現した CD44 陽性細胞が In vitro で小型肝細胞コロニーを形成するかどうか検討した。GalN 投与後 4 日目の肝臓からコラゲナーゼ灌流法を用いて細胞を分離した。CD44 陽性細胞を培養皿に播種し、小型肝細胞が増殖する条件で培養を行なうと、生着した細胞の中から CD44 陽性小型肝細胞コロニーが出現した(図 28)。

図 28 ガラクサミン投与ラット肝臓から分離した CD44 陽性細胞から出現した小型肝細胞コロニー



コロニーを形成する細胞の遺伝子発現を検討すると、正常ラット肝臓由来の小型肝細胞と同様の発現パターンを示し(図 45)、障害肝に出現する CD44 陽性細胞 (In Vivo) は、これまで報告してきた小型肝細胞 (In vitro) と同等の細胞であると考えられた。

図 29 CD44 陽性コロニーを構成する細胞の遺伝子発現

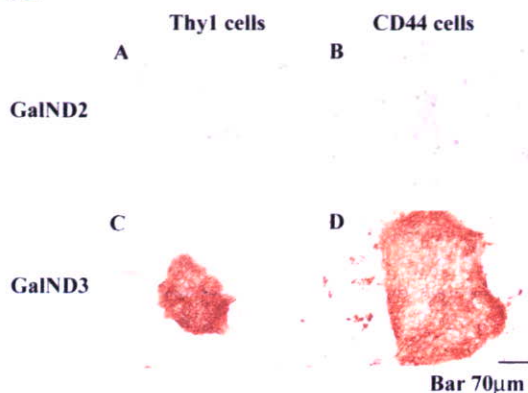


### 4. 肝stem細胞から小型肝細胞への分化

Thy1 陽性 Oval 細胞が CD44 陽性小型肝細胞を介して肝細胞へ分化するかどうかを検討するために、GalN 投与後 2, 3, 4 日目の肝臓から抗 Thy1 及び CD44 抗体を用いて細胞をソートし、培養した。2 日目から分離

した Thy1 細胞は上皮細胞コロニーをほとんど形成しなかったが、3 日目から分離した Thy1 陽性細胞の中から数は少ないが CD44 陽性小型肝細胞コロニーが出現した (図30)。

図30 肝stem細胞から小型肝細胞への分化



分離した細胞を10日間培養した。

4日目の細胞から出てきた小型肝細胞は、3日目のものより明らかに大きなコロニーを形成したが、その大きさは3日目から分離した CD44 陽性細胞が作るものとほぼ同じであった。2日目から分離した CD44 陽性細胞はコロニーを作らず、4日目から分離したものが、最も多くのまた大きなコロニーを形成した (Kon J 他、論文投稿中)。Thy1 陽性細胞が上皮様の形態をとりコロニーを形成して増殖するときは、すべての細胞に CD44 が発現していた。この結果は、Thy1 陽性細胞の一部に肝幹細胞としての能力を持つ細胞がいて、CD44 陽性小型肝細胞を介して肝細胞へ分化することを示している。

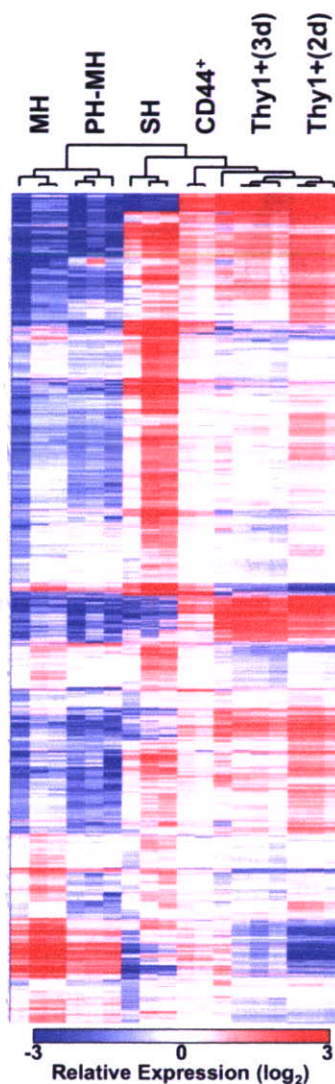
## 5. 小型肝細胞のマイクロアレイによる遺伝子発現解析

### 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 31,099 probe が存在し、そのうち 22,006 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 12,942 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31)。

図31 階層クラスタリング解析



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。

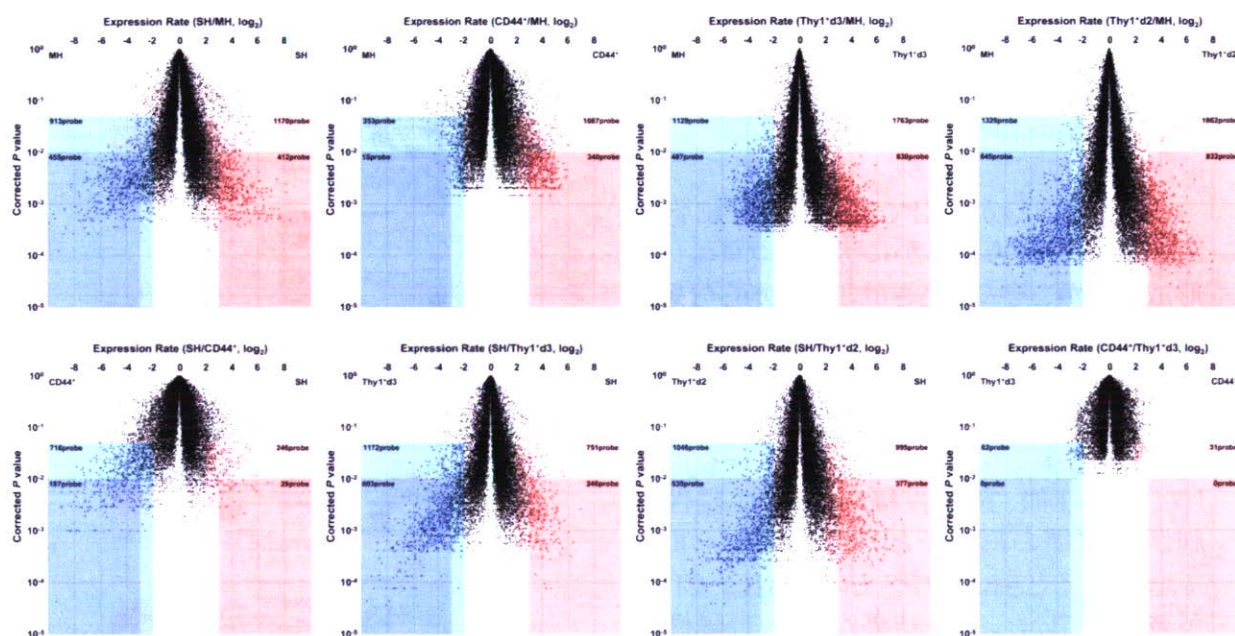
## 2) Volcano plot によるサンプル間遺伝子発現プロファイルの比較

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32)。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。

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32 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(平成18年度総括研究報告書に記載)。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。

## 4) 小型肝細胞、CD44 陽性細胞特異的遺伝子の抽出

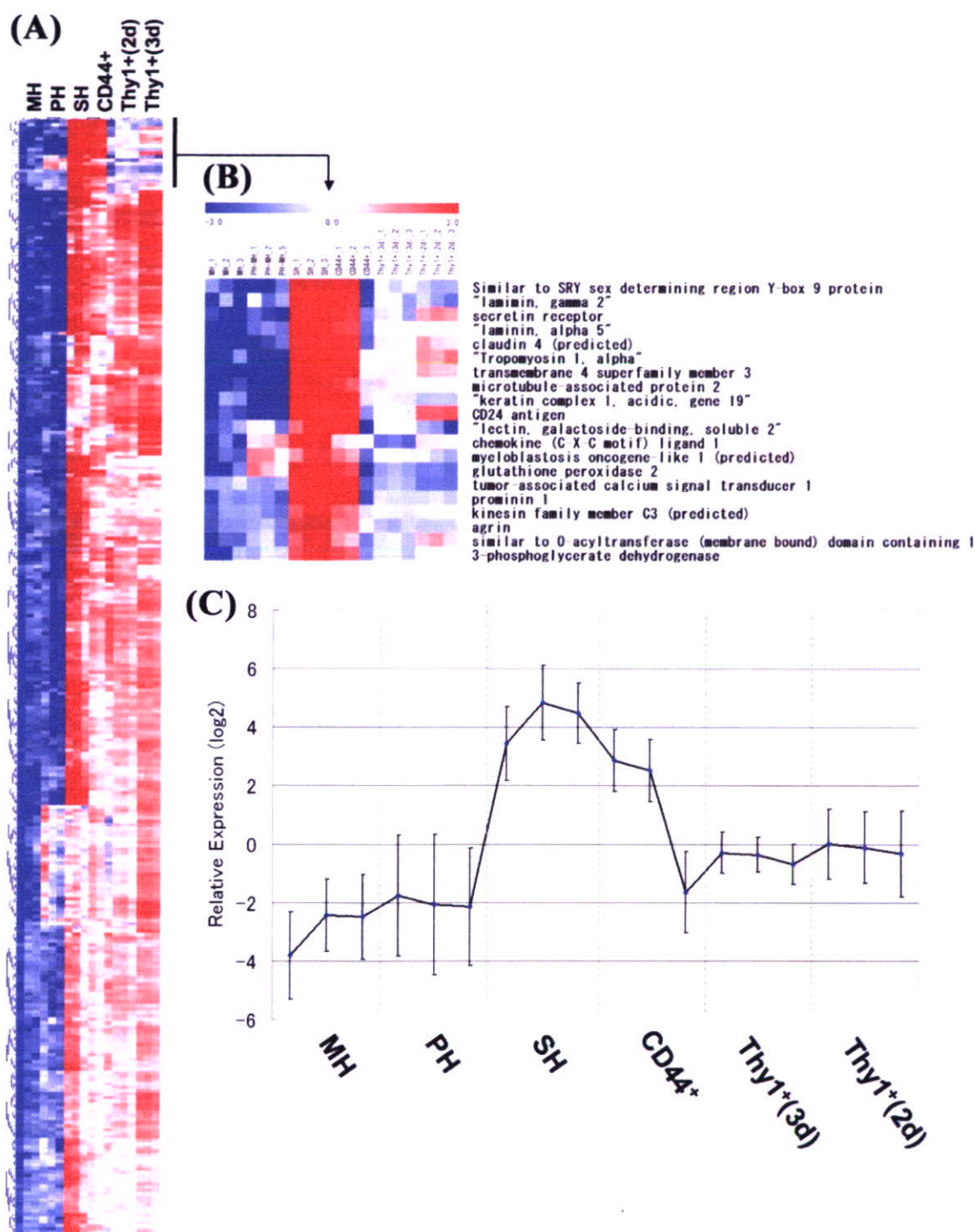
小型肝細胞、CD44 陽性細胞の両方において、平均発現量と比較して4倍以上の発現を示した probe を抽出し、クラスタリングを行い(図33A)、そこから Thy1 陽性細胞での発現が低い probe クラスタを抽出してリストアップした(図33B)。このクラスタは



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関与する遺伝子が

含まれていた。また、このクラスターの平均発現量は、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33C)。

図33 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

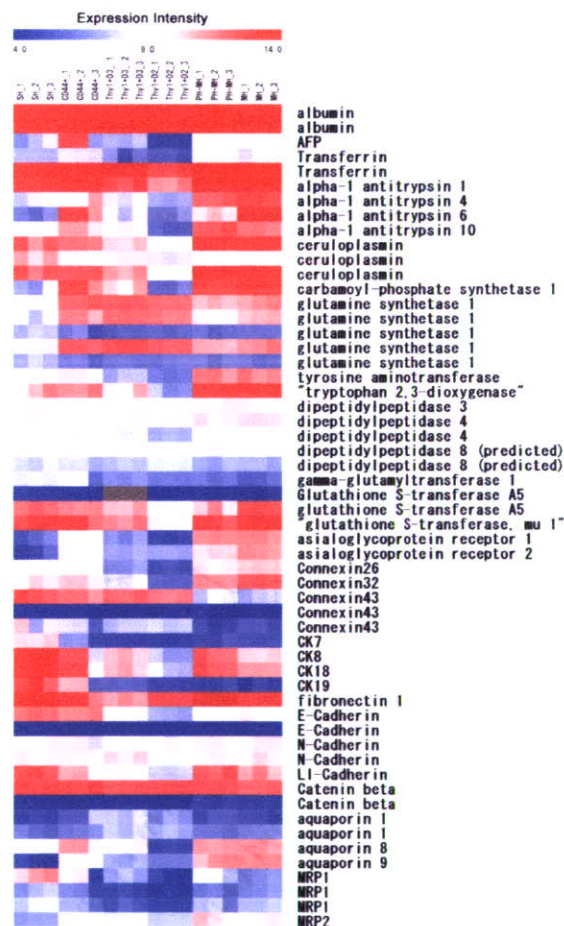


5) 特定の機能に関する遺伝子発現データの抽出

GeneChip に配置されている遺伝子から、肝細胞機能に関する遺伝子(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。

肝細胞分化機能に関する遺伝子(図34)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関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。

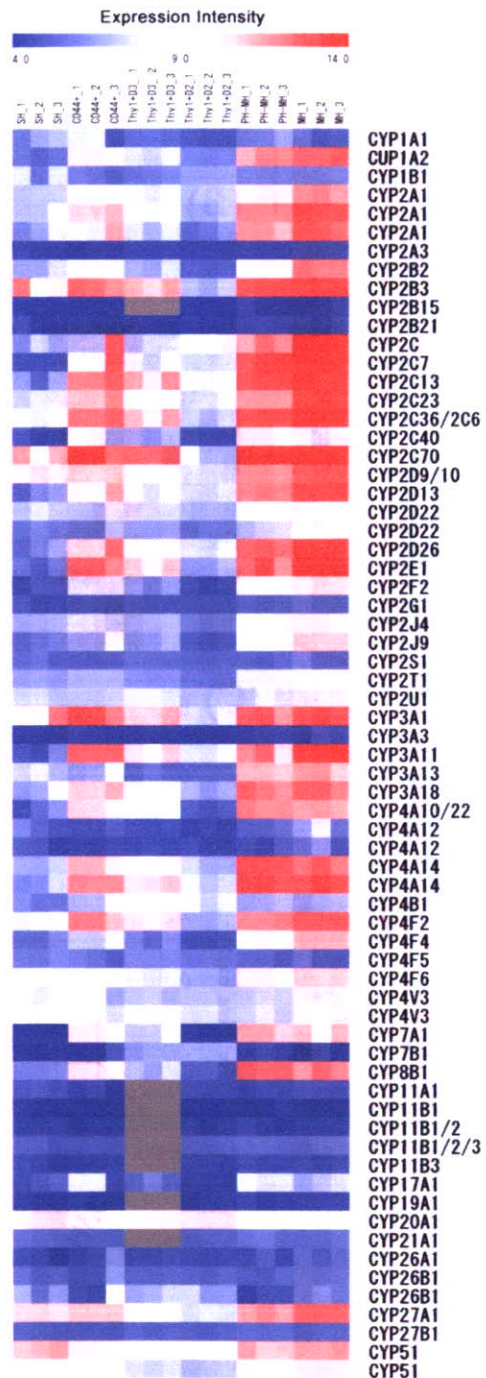
図34 肝細胞分化機能に関する遺伝子の発現



チトクロム P450(図35)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35 チトクロム P450 遺伝子の発現



## 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

18年度総括研究報告書に記載に記載したのと同様である。

### (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

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き起こり、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。In Vitro の条件でのみ起こる人工的な現象ではなく、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ことを証明するための実験を行った。

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を作成した。甲状腺切除ラットに PTU を投与すると 2 週間ほどで全てのラットが衰弱死した。そのため PTU 投与後 1 週間以内の比較的元気なラットで肝細胞の CAR 及び CYP2B1 の遺伝子・タンパク質の発現を検討すると、どちらの遺伝子もほとんど発現していなかった。血中の甲状腺ホルモン量は、検出限界以下になっていた。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。これらの結果は論文にまとめ投稿中である。また、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。

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。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。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いている 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**

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) 18年度総括研究報告書に記載に記載したのと同様である。

(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。

近年中国 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。そのため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を用いた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。今後は、RILD 社及び上海復旦大学との共同研究を積極的に進め、ヒト小型肝細胞の効率的な分離培養方法と大量培養方法を確立することにより、ヒト小型肝細胞の安定供給に道をつけたいと考えている。

### **(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 年度総括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 の発現が高く、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) 肝ステム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、肝ステム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。

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。しかしながら、Matrigel などの細胞外基質で処理することにより、小型肝細胞は、成熟化し、生体内

の成熟肝細胞に近い遺伝子の発現をするようになること、また小型肝細胞に特異的に発現していた遺伝子の発現が減少・消失することから、In Vitro で長期間成熟肝細胞を培養するシステムを確立できたと考えている。

## 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。また、小型肝細胞は、Follistatin 投与により成熟化が抑えられ、増殖が促進することもわかっている。培養条件の改善によりさらに多くの小型肝細胞を確保することが期待できる。さらに肝 stem 細胞から小型肝細胞を誘導する方法の確立は、病的肝臓から分離した stem 細胞からもヒト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おり、小型肝細胞の新たなソースとなりうると考えられる。中国 RILD 社との共同研究から、心臓死した患者肝臓から分離した細胞からも小型肝細胞を分離することが可能であることがわかった。現在、ドナー肝として使用できなかった肝臓は研究用として肝細胞などが分離され、世界中で分配又は市販されている。小型肝細胞は、成熟肝細胞を分離する際に破棄されていた画分にも存在することがわかっている。廃棄物から有用成分を回収することは経済効率を考えると、また得られる小型肝細胞の絶対数を考えてもすぐにも検討すべきことと考えている。

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、試験研究用や細胞バンクに供給できると考えられる。

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ことも可能になった。薬剤の多くが肝細胞内で代謝され、胆汁中にその代謝産物が排泄される。この In Vitro 解析システムを使えば、代謝経路などが不明な化学物質などを投与し、排泄された胆汁を回収し代謝産物の分析をすることで代謝経路を推測できるようになる。

つまり創薬研究に必須の ADME が動物個体を用いることなく、In Vitro で解析できるシステムが構築できたことを意味している。このことはまた、世界中に高まっている動物保護運動により使用が難しくなっている実験動物の数を激減させることに繋がると考えている。

## F. 健康危険情報

無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

著書・総説

今 純子、三高俊広. 「小型肝細胞を用いた肝細胞移植」遺伝子医学 MOOK 別冊「進みつつける細胞移植治療の実際」印刷中、2008.

三高俊広、今純子、大柴秀和、市戸義久. 肝再生過程における小型肝細胞の役割. 移植、43(1)、印刷中 (2008)

原著論文

1. Chen Q, Kon J, Ooe H, Sasaki K, Mitaka T. Selective Proliferation of Rat Hepatocyte Progenitor Cells in Serum-free Culture. Nature Protocols, 2(5), 1197-1205 (2007)
2. Kikkawa Y, Sasaki T, Nguyen MT, Nomizu M, Mitaka T, Miner JH. The LG1-3 tandem of laminin a5 harbors the binding sites of Lutheran/B-CAM and a3b1/a6b1 integrins. J Biol Chem,

282(20), 14853-60 (2007)

3. Oshima H, Kon J, Ooe H, Hirata K, Mitaka T. Functional Expression of Organic Anion Transporters in Hepatic Organoids Reconstructed by Rat Small Hepatocytes. J Cell Biochem, in press (2008)

### 2. 学会発表

国内学会

1. 今純子、佐々木寿誉、三高俊広. 「ラット肝障害モデルにおける肝前駆細胞の分化・増殖の解析」第43回日本肝臓学会総会、肝臓48巻 Supplement (1)、A130、2007年5月30日、東京(口演)
2. 三高俊広. 肝前駆細胞の選択的培養方法の確立とヒト細胞への応用. 第14回肝細胞研究会、2007年6月22-23日、鹿児島(口演)
3. 大柴秀和、今純子、三高俊広. ラット小型肝細胞の CAR 及び CYP2B1 発現における甲状腺ホルモンの必要性. 第14回肝細胞研究会、2007年6月22-23日、鹿児島(ポスター)
4. 粕谷淳一、浅見裕之、須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫. 類洞内皮細胞と小型肝細胞を用いた共培養モデルの評価. 第14回肝細胞研究会、2007年6月22-23日、鹿児島(口演)
5. 深澤一知、橋本渉、須藤亮、三高俊広、池田満里子、谷下一夫. コラーゲンゲルサンドイッチ法を用いた初代培養ラット胆管上皮細胞の胆管様構造形成. 第14回肝細胞研究会、2007年6月22-23日、鹿児島(ポスター)
6. 田母神龍、須藤亮、池田満里子、三高俊広、谷下一夫. 「小型肝細胞の3次元積層化のためのポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体を用いた生体吸収性微孔薄膜のデザイン」. 第14回肝細胞研究会、2007年6月22-23日、鹿児島(ポスター)
7. 今純子、大柴秀和、市戸義久、三高俊広. 「肝障害モデルラットにおける肝前

駆細胞の分化機構」日本病理学会カンファレンス 2007 旭川、2007 年 7 月 27 日、旭川(ポスター)

8. 大栄秀和、陳其潔、今純子、三高俊広. 「ラット小型肝細胞の網羅的遺伝子発現解析」日本病理学会カンファレンス 2007 旭川、2007 年 7 月 27 日、旭川(ポスター)
9. Yamato Kikkawa, Toshihiro Mitaka, Motoyoshi Nomizu. Identification of B-CAM/Lutheran binding site on laminin alpha5 chain. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5, 2007, Yokohama (Poster)
10. 市戸義久、今純子、大栄秀和、陳其潔、三高俊広. 「肝前駆細胞の分化機構の解析」第 7 回日本再生医療学会総会、2008 年 3 月 13 日、名古屋(口演)
11. 大栄秀和、陳其潔、今純子、三高俊広. 「網羅的遺伝子発現解析によるラット小型肝細胞の増殖能および成熟化能の検討」第 7 回日本再生医療学会総会、2008 年 3 月 13 日、名古屋(口演)
12. 大島秀紀、三高俊広、今純子、大栄秀和、水口徹、平田公一. 「ラット肝前駆細胞 small hepatocyte-like progenitor cell における分化、再生機序の検討」第 7 回日本再生医療学会総会、2008 年 3 月 13 日、名古屋(口演)

#### シンポジウム・特別講演等

1. 陳其潔、今純子、大栄秀和、佐々木寿誉、三高俊広. シンポジウム1肝細胞の分化・増殖とシグナル伝達「Follistatin 産生によるラット小型肝細胞の増殖」第 14 回肝細胞研究会、2007 年 6 月 22 日、鹿児島
2. 今純子、大栄秀和、陳其潔、市戸義久、三高俊広. シンポジウム2肝幹細胞研

究の現況と展望「肝前駆細胞の分化機構の解析」第 14 回肝細胞研究会、2007 年 6 月 23 日、鹿児島

3. 三高俊広、今純子. 「肝再生過程における小型肝細胞の役割」シンポジウム 2 「再生医療の break through」第 34 回日本臓器保存生物医学会定期学術集会、2007 年 11 月 16 日、札幌(北大学術交流会館)、Organ Biology, 14(3), 220(36), 2007
4. Mitaka T. In vitro hepatic tissue formation by hepatic stem/progenitor cells. 慶應義塾大学国際シンポジウム「細胞のマイクロナノバイオエンジニアリング」2008 年 3 月 12 日、東京

#### 国際学会

1. Kon J, Sasaki K, Oshima H, Mitaka T. Analysis of differentiation of hepatic progenitor cells derived from severely injured rat livers. The 58<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association of the Study of Liver Diseases, Nov 2-6, 2007, Boston, MA, USA, Vol.46, No.4(Suppl), 803A.
2. Mitaka T., Sasaki K, Kon J, Chen Q, Ooe H, Oshima H, Mizuguchi T, Hirata K. Selective proliferation of human hepatocyte progenitor cells in combination with hyaluronic acid and serum-free medium. The 58<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association of the Study of Liver Diseases, Nov 2-6, 2007, Boston, MA, USA, Vol.46, No.4 (Suppl), 802A.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当案件なし

[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



[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

1. 招へいされた外国人研究者

所属・職名(和文):上海復旦大学薬学部・教授

(英文): School of Pharmacy, Shanghai Fudan University

氏名(和文):ゾーハン フー

(英文): Zhuohan Hu

2. 招へい申請者

所属・職名:札幌医科大学医学部附属がん研究所分子病理病態学部門・教授

氏名:三高 俊広

3. 受入研究者

所属・職名:札幌医科大学医学部附属がん研究所分子病理病態学部門・教授

氏名: 三高 俊広

4. 招へい期間:平成19年10月5日～平成19年10月15日(11日間)

5. 研究課題:ヒト肝前癌細胞の分離培養方法の確立とその細胞特性解析及び創薬研究における革新的技術の開発

6. 研究活動の概要

10月 5日(金):札幌医科大学がん研究所分子病理病態学部門研究室において、Hu 教授とその随行教員 3 名及び三高と当教室研究員 4 名の紹介後、各研究者の研究内容について簡単に紹介した。

10月 6日(土):札幌医科大学がん研究所会議室において、「ヒト小型肝細胞を効率よく分離培養する方法の確立」の共同研究に関して、終日研究会議を行う。

10月 7日(日):札幌及び上海の両教室間の今後の共同研究に関する Discussion を行う。その後、札幌市内において文化交流を行う。

10月 8日(月)–12日(金):

- 仙台で開催された”8<sup>th</sup> Conference of International Society for Study of Xenobiotics”に参加し、薬物動態学研究の世界における研究状況について知識を深めるとともに研究発表を行い、世界の研究者と Discussion を行い、今後の研究をどのように発展させるかについて貴重な意見交換が行われた。
- CSSX(中国薬物動態学会)副会長及び 2008 Asia Pacific International Society for Study of Xenobiotics (APISSX) Meeting の共同開催者として、中国薬物動態学会(CSSX)、韓国薬物動態学会(KSSX)及び日本薬物動態学会(JSSX)などが共催する会議に出席し、2008APISSX の開催に備えて関係者と Discussion を行った。
- 第一化学薬品株式会社薬物動態研究所二宮真一所長と今後の研究の方向性及び共同研究の打ち合わせ

10月13日(土)–14日(日):東京に移動し、東京観光を行い、休息を取る。

10月15日(月):成田空港より帰国

## 7. 研究課題の成果

国内及び国外において薬物動態の研究には新鮮また凍結肝細胞が用いられている。薬剤や化学物質の作用機序や薬物動態を調べる目的で薬物代謝酵素活性などが測定されている。それらの研究のために初代培養肝細胞やトランスポーター遺伝子を導入した細胞株を用いて研究を行っている研究室が多いが、初代培養肝細胞は培養経過と共に高度な分化機能と考えられているアミノ酸代謝酵素活性や薬物代謝酵素活性、特にチトクロームP450の活性が急速に低下することが知られている。また肝細胞膜の極性も失われるため毛細胆管が形成されないばかりか、細胞内での物質の代謝機構、ソーティング機構も正常細胞とは異なっていると考えられる。また、遺伝子導入すると細胞内のホメオスタシスが正常とはかなり異なることが予想され、生体内で起こりうる機序を推定するにはまだ十分な方法とは言い難い。

本報告書の受け入れ研究室である札幌医科大学医学部附属がん研究所分子病理病態学専門ではラット及びヒト小型肝細胞の研究を行ってきた。小型肝細胞は成体肝臓に存在する肝細胞中に数パーセントの割合で存在し、肝細胞としての機能を保持し、かつ増殖力の高い肝前嚢細胞である。ラット小型肝細胞は、星細胞などの肝非実質細胞との共培養により分泌された細胞外基質の作用により、また基底膜成分からなるEHS gelなどの添加により成熟肝細胞へと分化させることが可能である。成熟化した小型肝細胞は、チトクロームP450等、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発現誘導することができる。また成熟化した小型肝細胞は、培養液面(類同膜面)には有機アニオントランスポーターであるOATPやNTCPなどが発現しており、細胞間には毛細胆管が形成され、毛細胆管面にはMDRやMRP2、BSEPなどの排泄トランスポータータンパク質が局在し、生体内の肝細胞と同等に血中から毛細胆管へと方向性を持って薬剤などを吸収・代謝・排泄可能である。更に小型肝細胞は凍結保存が可能であり、1年以上凍結保存した小型肝細胞でも凍結前と同様な機能を維持している。我々は、小型肝細胞を用いることによって上記の問題を解決できると考えている。

厚生労働科学研究費補助金などによる研究成果として我々は、ラット小型肝細胞をほぼ純粋に分離培養できる方法を開発した。ラット小型肝細胞は、特異的遺伝子としてCD44を発現していることを見出し、そのリガンドであるヒアルロン酸と無血清培養液を用いると小型肝細胞を主に増殖させることが可能であることがわかった。この方法を応用することにより、正常ヒト肝臓から分離した細胞の中からヒト小型肝細胞をほぼ純粋に分離培養する方法を確立した。しかしながら、日本ではヒトの肝臓及び正常組織を入手するのは極めて難しいのが現状である。欧米とは異なり移植不適応のドナー肝臓を用いて研究することはできない。また肝臓疾患により手術が行われた患者から、診断等に用いられない部分の肝臓を入手するには、大腸癌などの肝臓移植症例や胆管癌の場合などに限られ、その頻度は大学病院においても極めて少ない。薬物動態に関してもラットなど齧歯類とヒトとは必ずしも同じではないことが知られているため、ヒト肝細胞を用いて研究することは極めて重要である。従って恒常的にヒトの肝臓が入手できると今後の研究も飛躍的に亢進すると思われる。

中国上海のResearch Institute for Liver Diseases (Shanghai, RILD社)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。従来調整していたのは凍結保存した成熟肝細胞であったが、成熟肝細胞では融解後薬物代謝酵素活性が急減することから、解凍後早急に使用することが必須となる。そこで、第一化学薬品株式会社及び当教室との共同研究により増殖し、且つ長期培養可能なヒト小型肝細胞をヒト肝臓より分離培養する方法を確立することが提案され、共同研究を始める運びとなり、2年前RILD社より実際に肝細胞を調製し研究しているFang先生を招へいし、RILD社におけるヒト幹細胞研究について学ぶと共に、当教室のラット小型肝細胞培養法を教え、RILD社においてヒト小型肝細胞の分離培養する方法の確立するために共同で実験を行ってきた。今回、Hu教授を招へいし、Fudan

大学での研究を紹介していただくと共に、共同研究であるヒト小型肝細胞の中国における研究状況の説明と今後の共同研究の具体的な方法を Discussion し、確認するのが目的であった。また上海において研究を進めていく上で実際に研究を行う若い研究者に当教室の分離培養の方法を直接教え、Detailを理解実験を行ってもらえるようにすることも目的であった。

これまでの共同研究の結果について Discussion を行った。Hu 教授が実際にヒト肝細胞を用いる研究を行っている 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。その研究施設を用いてヒト小型肝細胞画分の調整を行った。肝臓は HBV、HCV、及び HIV ウィルス陰性のものを用いている。本研究に関しては上海市倫理委員会、第一化学薬品株式会社倫理委員会、札幌医科大学倫理委員会にて承認済みの元で行われている。

当教室で開発した小型肝細胞分離方法に準拠して RILD 社においてヒト小型肝細胞分画が採取され、それを RILD 社がヒト成熟肝細胞を凍結保存する方法を用いて凍結保存し、液体窒素保存状態で札幌医科大学に輸送した。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プルーを用いて生存率を調べたところ約60%であったが、RILD 社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を実施したところ生存率は上昇した。融解した細胞を播種し、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 を用いて培養した。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。培養した小型肝細胞の増殖は認められず、薬物代謝酵素活性も測定できなかったことから小型肝細胞分画の凍結保存による輸送は難しいという結論に達した。

次に、分離した細胞を培養皿に一旦播種し、細胞の生着を確認した後、札幌に空輸する方法を試みた。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。

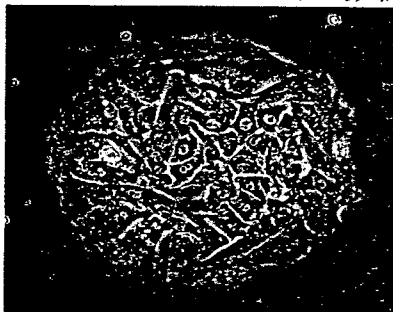


図1培養 12 日目に見られた小型肝細胞コロニー

ヒト小型肝細胞は培養皿に接着すると分離培養が可能であることがわかったのでこの方法を発展させることとした。また小型肝細胞はコロニーの状態では、凍結保存が可能であることがラットを用いた研究でわかっているので上海においてヒト小型肝細胞を培養し、コロニーができた状態で剥離し、凍結保存する実験を試みることで合意した。

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について Discussion があり、今後は、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必要があるとの認識で一致し、その分離方法を教授することとした。札幌医科大学で実際に分離を行っている外科医の柴田医師から説明と実技が中国若手研究者に示された。Hu 教授らは、上海に戻り我々の方法を用いて上海医科大学病院において手術した肝臓の一部正常部分を用いて小型肝細胞の分離培養技

術の向上に努めている。

今後は、RILD 社及び Fudan 大学との共同研究を積極的に進め、ヒト小型肝細胞の効率的な分離培養方法と大量培養方法を確立することにより、ヒト小型肝細胞の安定供給に道をつけたいと考えている。

Hu 教授及び若手研究者を交えた Meeting を行った。また仙台で開催された国際薬物動態学会において Hu 教授らは3演題を発表し、この分野の国際的な研究者との Discussion を行い、我々の共同研究を進める上での最新の研究情報を得ることができた。

第一化学薬品株式会社薬物動態研究所二宮真一所長と、中国 RILD 社と札幌医科大学間の細胞の輸送を仲介することなどについて話し合いが行われた。また今後の薬物動態研究について Discussion を行った。

8. 外国人研究者のレポートは別紙のとおりである。