

外国人研究者によるレポート

Program Report

Program Name: Preparation of small primary hepatocytes by using small piece of tissue

Program Period: October 5th – 15th, 2007.

Program Team Members from China

- Dr. Zhuohan Hu, Male. 54 years old
Professor of Pharmacology, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai, China
Deputy Director, National Shanghai Center for Drug Safety Evaluation & Research
Managing Director, Research Institute for Liver Diseases (Shanghai) Co. Ltd

Role in the program: Directing the program and managing application of the hepatocytes in drug safety evaluation

- Dr. Dongying Qiu, Male. 38 years old
Associate Professor of Clinical Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai, China

Role in the program: on site treatment of donated liver tissue and application of small hepatocytes in clinical research.

- Mrs. Yanping Liao, 51 years old
Senior Technologist, School of Basic Medicine, Fudan University, Shanghai, China
Associate Laboratory Chief, Research Institute for Liver Diseases (Shanghai) Co. Ltd

Role in the program: Laboratory management for supporting this program.

- Mr. Yuchang Mao
Study Director, Research Institute for Liver Diseases (Shanghai) Co. Ltd.

Role in the program: Research project management and conduction.

Objective

To optimize the procedure for preparing small size primary hepatocytes from small piece of liver tissue, including handling, perfusion, digestion, purification and characterization, by comparing the procedures of Prof. Hu's laboratory and Prof. Mitaka's laboratory.

Significance

Primary Hepatocytes are very unique tools for estimating efficacy and safety of therapeutics. The challenges the researchers faced are that primary hepatocytes

can't be cultured for a long period, generally less than 5 days, and, therefore, they are not applicable for estimating efficacy and safety in case requiring multiple dosing more than 5 days.

Small size hepatocytes can reach this requirement and optimization of small size hepatocytes will be of significance.

Program Activities and Achievement

- October 5, 2007. Friday
Chinese team departed for Sapporo, Japan
- October 5, 2007. Friday. Sapporo Medical University
 1. Program brief meeting at Sapporo Medical University by Professors. Mitaka and Hu.
 2. Technical preparation for equipments and reagents by Prof. Mitaka's team and Prof. Hu's team.
 3. Laboratory operation: Prof. Mitaka's team demonstrated the procedures including animal handling, surgical operation, in situ perfusion, in situ digestion, purification, plating, observation of clone and characterization.
 4. Visiting supporting system of medical research at Sapporo Medical University, especially Medical Library and IT system.

Achievement

Chinese team learnt the technical difference during preparation of small size of hepatocytes between Prof. Mitaka's lab and Hu's lab. For examples, Prof. Hu's lab uses in vitro perfusion and digestion, and Prof. Mitaka's lab uses in situ perfusion and digestion. Such technical differences between two laboratories will contribute greatly to optimization of preparation of small hepatocytes.

- October 6, 2007. Saturday. Sapporo Medical University

A full day academy Mini workshop chaired by Prof. Mitaka and Prof. Hu, covering the following presentations

- Application of hepatocytes in drug safety evaluation in China: Challenges and Solutions by Dr. Zhuohan Hu
- Application of hepatocytes in clinical pharmacology at hospital setting: herb-drug metabolic interaction by Dr. Dongying Qiu
- Preparation of small hepatocytes by Mr. Yuchang Mao

Achievement:

Both teams exchanged their respective experiences in the projects related to preparation and application primary hepatocytes especially small hepatocytes, which made this visiting program more fruitful in terms of both bench working experience and academic projecting experience.

- October 7, 2007. Sunday. Sapporo Medical University / Sapporo City
 1. Summary Meeting between Prof. Mitaka and Prof. Hu
 - Both of them reviewed and discussed the previous and current cooperation between Sapporo and Shanghai.
 - Both of them proposed and agreed the future plan including Prof. Hu's inviting Prof. Mitaka to Shanghai for visiting his research facility and hospital.

2. City tour of Sapporo

Achievement: The summary meeting solidated the previous successful cooperation between Prof. Mitaka and Prof. Hu, and made the future one more feasible.

The Chinese team members got good opportunity to expose themselves to Sapporo during the city tour in term of Japanese culture and city characters.

- October 8 - 12, 2007. Monday - Friday. Sendai, Japan
 1. Chinese Team attended 8th Conference of International Society for Study of Xenobiotics. During the conference, Chinese team contributed 4 presentations as below

In Vitro Drug Metabolism and Interaction of Bioreductive Active Drug-629

Jianghong Zhang¹, Yizun Jin¹, Yuchang Mao², Yanrong Qiao², Jinxing Tan², Yanping Liao², and Zhuohan Hu²³

¹Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China; ²Research institute for Liver Diseases (Shanghai) Co, Ltd, Shanghai, 201203, China; ³School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China

Alternative Safety Evaluation Procedure for Imported Items: In Vitro Procedure using human and animal primary hepatocytes and liver microsomes

Ming Yang¹, Jieqi Lu¹, Jingxian Qiao², Yuchang Mao³, Yanrong Qiao³, Jinxing Tan³, Yanping Liao³, and Zhuohan Hu³⁴

¹Pudong Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau of China, Shanghai, China; ²Shanghai Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau of China, Shanghai, China; ³Research institute for Liver Diseases (Shanghai) Co, Ltd, Shanghai, China; ⁴School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai, China

In vitro Metabolic Pathway Identification for Herb Medicines – The Effects of Cytochrome P450 Isozyme CYP1A2, 2B6, 2C19, 2E1 and 3A4 on Efficacy of Ginkgo Extracts as Inhibition of PAF-activated Platelet Aggregation Using Human Cyropreserved Hepatocytes

QIU Dongying¹, MAO Yuchang², QIAO Yanyong², TAN Jinxin², CAI Yingyun¹
HU Zhuohan²³

¹Department of Geriatrics, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China, Shanghai, ²Research Institute for Liver Diseases (Shanghai) Co. Ltd, Shanghai, 201203, China, ³School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China

An In Vitro Porcine Live Preparation for Supporting Artificial Liver Dialysis – A Preliminary Study

Shumin Zhao¹, Yuchang Mao², Yanyong Qiao², Jinxin Tan², Ruiqi Zhang^{1*}, Zhuohan Hu^{2,3*}

¹Department of Infectious Diseases, Changzheng Hospital, Shanghai 200003, China, ²Research Institute for Liver Diseases (Shanghai) Co. Ltd, Shanghai, 201203, China, ³School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China)

2. As vice president CSSX and co-chair of 2008 Asia Pacific International Society for Study of Xenobiotics Meeting, Prof. Hu and his colleagues attended Joint Meetings of Japanese Society for Study of Xenobiotics (JSSX), Chinese Society for Study of Xenobiotics (CSSX), and Korean Society for Study of Xenobiotics (KSSX) and others. Discussed the academic cooperation and exchanging among JSSX, CSSX, KSSX and others and preparation of 2008 APISXX meeting in Shanghai, China.
3. Meeting with Dr. Ninomiya, General Manager of Institute of ADMET, Daiichi Pure Chemical Co. Ltd for summarizing the previous joint program and proposing future cooperation.

Achievement: Got great opportunity to exchange scientific experience with Japanese and international scientists, and got constructive and feasible suggestions for preparing 2008 APISXX Meeting in Shanghai, and solidated the cooperation with Daichi Pure Chemicals.

- October 13-14, 2007. Saturday-Sunday. Tokyo, Japan
- October 15, 2007, Monday. Back to Shanghai

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
流動研究員活用事業

研究実績報告書

研究実績報告書

1. 流動研究員氏名： 陳 其潔
2. 流動研究員 期間
平成17年10月1日～平成20年3月31日
3. 受入機関
名 称：札幌医科大学
所 在 地：札幌市中央区南一条西17丁目
4. 受入研究者
所 属：札幌医科大学医学部附属がん研究所
職 名：教授
氏 名：三高 俊広
5. 研究課題
“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
6. 研究活動の概要

平成18年4月1日より上記4の研究指導者の下において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課題に関し、特に血清非存在下で肝ステム細胞の増殖機構に関する研究を開始した。

着手後、主に二つのテーマに沿って、研究活動を遂行した。以下のように概す。

1、無血清培養により肝前駆細胞である小型肝細胞の選択培養法の確立

この研究の背景と目的：

日本では、終末期肝疾患の根治的治療法として肝移植となるが、しかし、ドナー不足で深刻な問題になりつつある。それを補うため、体外及び体内で肝細胞の再生に役立つ肝幹細胞の研究が必要とされている。今迄の教室の研究により、ラットの成体肝臓には組織肝前駆細胞の一種である小型肝細胞が存在していることが分かっている。この細胞の特徴は最終分化した肝細胞と同程度の分化能を持ち、なおかつ多数の娘細胞を生み出す能力をもっている。培養系においても通常の成熟肝細胞の培養に比較して小型肝細胞は極めて高い増殖能を持ち、薬物代謝酵素活性を長期間維持している。最近、正常ラット肝臓とガラクトサミンで引き起こされた急性肝障害モデルから分離した小型肝細胞表面には成熟肝細胞に発現しないCD44が特異的に発現していることを見出した。

CD44はリンパ球の活性化やホーミング現象に関わるだけでなく上皮細胞と細胞外マトリックス(extracellular matrix; ECM)との接着、細胞運動、細胞から細胞への様々なシグナル伝達に関わることが解明されてきている。肝臓の細胞外マトリックスの中でCD44とリガントになっているのは主にヒアルロン酸、コラーゲン及びフィブロネクチンである。肝障害の場合、血清中に遊離したヒアルロ

ン酸が検出できることから、これらの物質は小型肝細胞の誘導にはなんらかの役割を果たしているのではないかと考えられる。

従来、小型肝細胞を培養皿上で増殖させようとする場合、血清の存在は必須と考えられてきた。しかし、肝前駆細胞を体内に移植しその増殖と分化を研究する場合、また薬物代謝研究を進めるに当たって細胞の品質の均一性や安定性などを考慮すると無血清で培養することが望ましいと考えられる。以上より、わたしは小型肝細胞が血清非存在下で増殖可能かどうかを検討した。

研究方法：

(1) 小型肝細胞の分離と培養：

8~12 週齢の成熟雄 F344 ラット (チャールズリバー) を実験に用いた。前灌流液 (EGTA) 及び酵素灌流液 (Collagenase 130-140 unit/ml を含有する HANK' S 液) を経門脈で灌流し、細胞洗浄液 (HANK' S 液, Insulin 500ng/ml, 抗生物質添加) にて肝細胞を懸濁した。細胞懸濁液を 50 xg, 1 分間, 4°C で遠心し、上清を小型肝細胞分画として回収した。それをさらに 2 回遠心し、沈殿した細胞を除いた後、50 xg, 5 分間, 4°C の遠心で沈殿した細胞を細胞洗浄液に懸濁する操作を 3 回、150 xg, 5 分間, 4°C の遠心で沈殿した細胞を細胞洗浄液に懸濁する操作を 3 回行った。最後に 50 xg, 5 分間, 4°C の遠心で沈殿した細胞を培養液に懸濁した。

分離した細胞を 5×10^4 個/dish の密度でヒアルロン酸 (1mg/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 或いは DMEMF12 (Sigma) 培地に以下の物質を添加した。

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

1xITS-X (10 µg/ml Insulin + 5.5 µg/ml Transferrin + 6.7 ng/ml selenium + 2 µg/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 と DNA マイクロアレーに使用した。

(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。

結果：

ヒアルロン酸コートディッシュを用い、DMEM 血清非存在下と 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、DMEM/F12 血清非存在下で培養した場合コロニーの数が多く観察された。

(図 1 で示す) 無血清の培養系では 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 1)

図 1. 血清存在と非存在下で小型肝細胞コロニーの形成

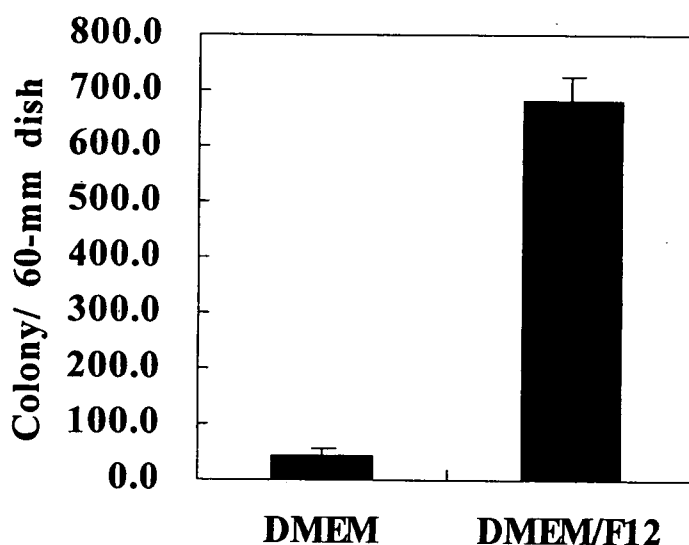
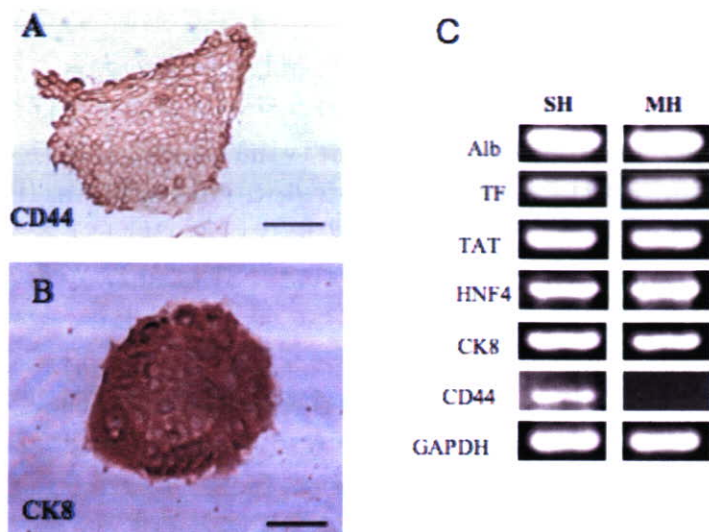


表 1 ヒアルロン酸コートディッシュにおけるコロニー形成の純度

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

また、小型肝細胞は肝細胞マーカーである CK8、アルブミン、トランスフェリン及び肝細胞分化に関わる分子 HNF4, TAT, C/EBP-alpha の発現は成熟肝細胞に比べ、大きな差はなかったことに対し、CD44 は小型肝細胞でのみ発現は検出された。(図 2)

図2. 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



考察と結論：

本研究の結果より、小型肝細胞はヒアルロン酸でコートしたディッシュにおいて、血清非存在下でも増殖可能であることが分かった。血清非存在下においても小型肝細胞は CK8, アルブミンなどの肝細胞マーカーばかりか肝分化機能を担う TAT や CYP 遺伝子の発現も認められた。さらに増殖しているときには小型肝細胞特異的遺伝子の CD44 や D6. 1A, BRI3 も発現しており、ヒアルロン酸上で無血清培養において増殖する小型肝細胞もこれまでの培養方法で示してきた特徴を維持していることが確かめられた。

本研究により確立した培養方法を用いることで小型肝細胞をほぼ純粋に分離培養することが可能になった。当教室では、正常ヒト肝臓からの小型肝細胞を分離培養する研究も平行して行われている。本方法を用いることで正常ヒト肝組織から小型肝細胞をほぼ純粋に分離培養することができるようになった（論文投稿中）。本研究の成果は、ヒト小型肝細胞を効率的に分離培養する方法の開発に寄与することに繋がったと考えている。

この研究結果は英文紙 Nature protocol 2(5) 1197-1205 (2007) に掲載された。

2、無血清培養では Follistatin (FST) が小型肝細胞の増殖を促進する

背景：

上記の無血清培養系を用い、小型肝細胞の網羅的な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 Follistatin 遺伝子の発現が高かったことを見いだした。Follistatin は卵泡液から分離した 288~315 のアミノ酸からなる糖タンパク質である。TGF- β ファミリーの一員である Activin とともに、下垂体から分泌するゴナドトロピン (FSH) に対し、負と正の調節に関与している。Activin は構造上には Inhibin (Inh) と β 鎖を共有している。哺乳類では ActA, B, AB, C, E という五つの亜型を有し、ActAB 以外にはホモダイマーからなっている。こ

の中では良く研究されたのは ActivinA であり、卵巣を始め、心臓、脳、骨格筋、肝臓などの組織にも検出した。胎生発生、骨形成、造血、細胞死に関与することが報告された。

肝臓では肝実質細胞に発現し、肝細胞の増殖を抑制し、肝臓の大きさを保つ作用を持っている。また、類洞形成促進、伊東細胞のコラーゲン産生を促進すると報告されている。ラットの部分肝切除モデルに ActivinA (ActA) を投与すると肝細胞の増殖を抑制したと報告された。逆にこのモデルに Follistatin (FST) を投与すると肝細胞の増殖を促進した。また、肝細胞の元代培養では FST を添加すると増殖因子による肝細胞の増殖に相乗効果が得られた。FST は ActA がその受容体との結合部位に結合することより、ActA の受容体への結合を阻止し、その作用を制御すると言われた。FST と ActA の作用はバランスを保ちながら、肝細胞の再生に関与している。一方、人では急性肝炎などの患者では血清中の FST と ActA の上昇が見られ、FST と ActA の比率も正常より高くなっている。

このような報告から、FST と ActA が肝再生に関与することが分かり、わたしは FST と ActA に着目し、これらの物質が小型肝細胞の増殖にどのように関与しているかを検討した。

方法：

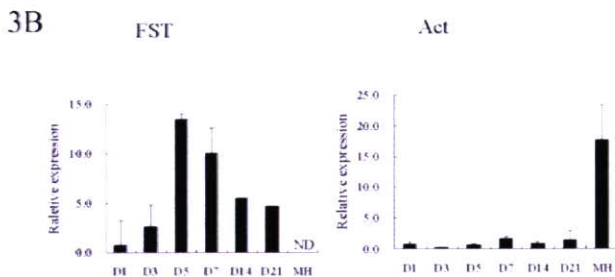
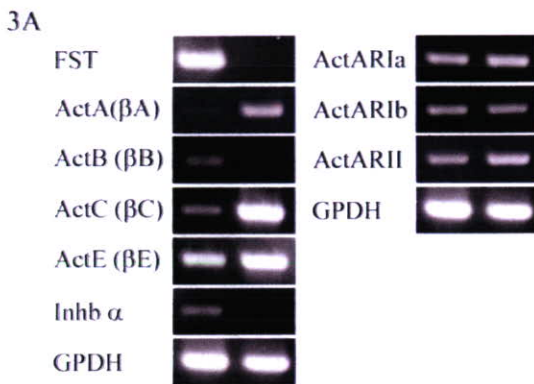
- (1) 小型肝細胞の分離と培養は上記と同様。成熟肝細胞は上記 1 の灌流法で低速遠心した後の成熟肝細胞分画からパーコールを用いて分離した。
- (2) 小型肝細胞と成熟肝細胞 total RNA の調整：
上記の培養法で形成されたコロニーと分離した成熟肝細胞からの分離は、RNeasy Midi Kit を用いて Total RNA を抽出した。抽出した RNA は RT-PCR と real time PCR に使用した。
- (3) FST 蛋白の同定
分離した小型肝細胞を 5×10^4 /ml ヒアルロン酸コートディッシュに播種し、培養 D1 から D21 までの上清を回収し、ELISA キット (R&D Cat. DFN00) で FST 産生量を測定した。形成された小型肝細胞のコロニーを 95% アルコールで固定し免疫染色法で細胞質中の FST 蛋白と細胞表面蛋白 CD44 との共発現を検出する。
- (4) 細胞増殖の同定
BrdU を培養した小型肝細胞に取り込み、24 時間後に免疫染色し、BrdU 陽性細胞がコロニーを構成する細胞数での割合 (BrdU labeling index) で細胞の増殖率を表す。
- (5) Follistatin と ActivinA によりコロニー形成と増殖に対する作用
培養三日目と五日目に ActivinA 単独あるいは Follistatin と同時に培養液に添加し、七日目に免疫染色し CD44 陽性である小型肝細胞コロニーの数を測定する。培養五日目に抗 Follistatin 抗体で培養上清中の Follistatin を中和し、六日目に BrdU を小型肝細胞に取り込ませ、七日目に小型肝細胞を固定し、BrdU labeling index で小型肝細胞の増殖能を表した。

結果：

1. 小型肝細胞及び成熟肝細胞における FST, Activin 及びその受容体の遺伝子発

現

図 3A、3B で示すように、培養 10 日の小型肝細胞では FST を始め、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。さらに小型肝細胞において FST と ActA mRNA の経時的な発現をリアルタイム PCR で調べたところ、FST mRNA の発現は培養 24 時間後から検出でき、小型肝細胞が増殖を開始する三日から高くなり、五日目にピークを迎え、その後やや減少傾向であったが、ActA mRNA の発現は培養 1 日目から培養 21 日まで低いレベルのままであった。



2. 小型肝細胞における FST 蛋白の同定

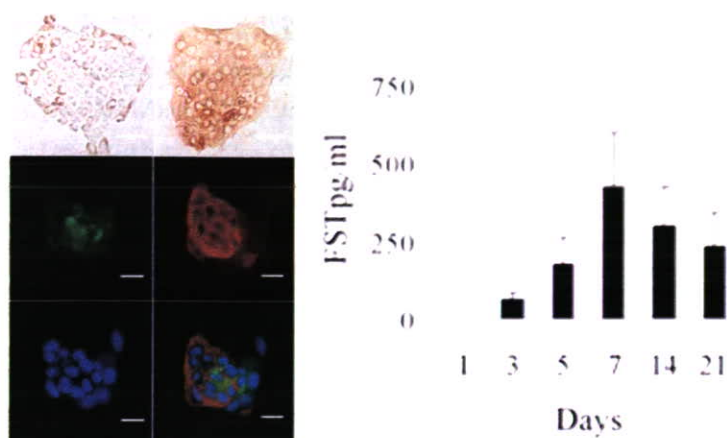
まずは蛍光免疫染色法で培養 7 日目に CD44 特異的に発現する小型肝細胞には同時に FST 蛋白も発現したことが証明された (図 4)。

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。その結果、培養上清には三日目から FST 蛋白を検出し始め、培養 7 日目にピークに達した。

(図 5 で示す) 21 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。

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。

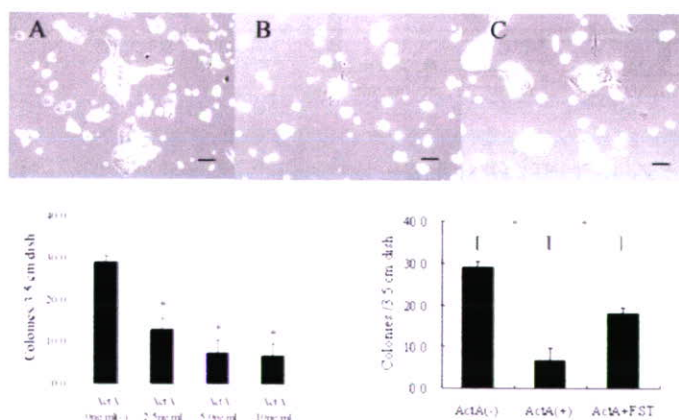
図4 FST蛋白の同定と産生



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 10ng/ml 単独, あるいは FST 100ng/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5で示す)

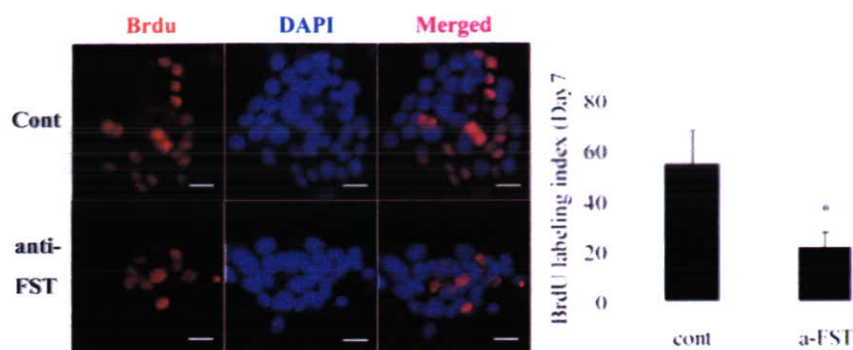
図5 ActA は小型肝細胞コロニーの形成を抑制する



4. FST は小型肝細胞の増殖に関与する

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 を取り込ませて、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6)。

図6 FST を中和することより小型肝細胞の増殖能は抑制された



考察：

本研究は、FST が肝前駆細胞である小型肝細胞の無血清培養における増殖に関与していることを明らかにした。

FST は卵泡液から分離した蛋白質である。ActA 作用と違って、主に下垂体からの性腺刺激ホルモン (FSH) に対して負の調節を示している。最近の研究では FST と ActA との結合部位はちょうど ActA が ActA 受容体との結合部位と一致し、それにより ActA の作用を阻害すると言われている。

これまで FST の肝細胞に対する増殖促進効果は、部分肝切除モデルラットに対し FST を投与したり、初代肝細胞の培養に FST を添加することより、証明されてきたが、肝前駆細胞である小型肝細胞に対する作用は明らかにされていない。今回の研究結果から小型肝細胞は成熟肝細胞に比べ、FST mRNA を高く発現するとともに細胞質中に FST 蛋白の産生が認められ、培養液中に分泌されていることも確認された (図 3、4)。また、分泌された Follistatin を中和抗体で中和すると小型肝細胞の増殖能は抑制された (図 6)。このような結果から小型肝細胞は内因性の FST を産生することより自身の増殖を促進していると考えられる。一方、肝細胞の増殖を抑制する ActA に関して、小型肝細胞は成熟肝細胞と違って、培養 1 日目から 21 日目まで ActA 遺伝子の発現は低いままであった。ActA の受容体遺伝子の発現は成熟肝細胞に比べ変化はなかった (図 1) ことから、小型肝細胞の増殖が ActA 感受性低下によるものでないことは明らかである。残念ながら ActA 蛋白測定法はないため、小型肝細胞から産生された FST が直接 ActA 蛋白と結合しているかどうかは証明することはできなかった。しかしながら、ActA 遺伝子の発現低下が小型肝細胞の高い増殖能の維持に重要な役割を担っていることは間違いないと言える。

また、小型肝細胞の培養系に外から ActA を加えると、コロニーの形成能が著しく低下し、この抑制作用は FST を同時に加えることより阻害されたことから、間接的に FST は ActA と拮抗しながら、小型肝細胞の増殖を促進していることが示唆された。

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。小型肝細胞における FST の産生制御と作用機序について更なる研究を行う必要がある。

研究発表

【論文発表】

Qijie Chen, Junko Kon, Hidekazu Ooe, Kazunori Sasaki, Toshihiro Mitaka Selective Proliferation of Rat Hepatic Progenitor Cells in Serum-free Culture (Nature protocols, 2007.May.01 1197-1205)

【学会発表】

1. 大栄秀和, 陳其潔, 今純子, 三高俊広: ラット小型肝細胞の無血清培養と遺伝子発現解析。第13回肝細胞研究会 旭川 平成18年6月30日
2. 佐々木寿誉, 今純子, 陳其潔, 大栄秀和, 大島秀紀, 三高俊広: 成人肝組織から小型肝細胞の分離と無血清培養。第13回肝細胞研究会 旭川 平成18年6月30日
3. 陳其潔, 今純子, 大栄秀和, 佐々木寿誉, 三高俊広: 小型肝細胞におけるFollistatinとActivinAの役割。第6回日本再生医療学会 横浜 平成19年3月13日
4. 今純子, 大栄秀和, 陳其潔, 佐々木寿誉, 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序の解析。第6回日本再生医療学会 横浜 平成19年3月13日
5. 三高俊広, 佐々木寿誉, 今純子, 陳其潔, 大栄秀和, 柴田稔人, 水口轍, 平田公一: ヒト肝前駆細胞の分離と無血清培養の確立。第6回日本再生医療学会 横浜 平成19年3月13日
6. 陳其潔, 今純子, 大栄秀和, 佐々木寿誉, 三高俊広: 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 鹿児島 2007年6月22-23日

委託業務報告書

測定結果報告書

GeneChip を用いたラット小型肝細胞における遺伝子発現解析結果

2008年3月14日
株式会社 環境研究センター

1. 測定試料

試料	略称	検体数
ラット成熟肝細胞由来 total RNA	MH	3
肝切除後ラット成熟肝細胞由来 total RNA	PH-MH	3
新生児ラット成熟肝細胞由来 total RNA	NB-MH	3
培養小型肝細胞由来 total RNA	SH	3
成熟化後培養小型肝細胞由来 total RNA	M-SH	3
CD44 陽性細胞由来 total RNA	CD44 ⁺	3
CD44, Thy1 陽性細胞由来 total RNA	CD44 ⁺ /Thy1 ⁺	3
Thy1 陽性細胞(D-Gal 投与後 3 day)由来 total RNA	Thy1 ⁺ (3d)	3
Thy1 陽性細胞(D-Gal 投与後 2 day)由来 total RNA	Thy1 ⁺ (2d)	3
合計		27

2. 測定項目

- 1) GeneChip による遺伝子発現の測定と統合
- 2) 全データの階層クラスタリング
- 3) 肝細胞マーカー遺伝子の発現解析
- 4) Gene Ontology に基づく発現変動遺伝子の機能解析
- 5) 小型肝細胞、CD44 陽性細胞特異的遺伝子の抽出
- 6) 特定の機能に関与する遺伝子発現データの抽出
- 7) 経時的発現変動を示す遺伝子の抽出
- 8) Pathway 解析

<GeneChip による遺伝子発現の測定と統合>

GeneChip による測定は NB-MH, M-SH, およびに CD44⁺/Thy1⁺について行う。測定に必要な RNA 濃度、RNA 純度を試料が満たしているかどうかチェックを行う。試料中の RNA 濃度は分光光度計を用いて測定し、OD₂₆₀=1 のときに 40 ug/ml として RNA 濃度を決定する。また、OD₂₆₀/OD₂₈₀ より RNA 試料の精製度を確認し、さらに Bioanalyser 2100(Agilent) を用いて 28S/18S rRNA の分解度をチェックする。チェックをクリアした RNA から GeneChip One-Cycle Target Labeling and Control Reagents(Affymetrix)を使用して標識 cRNA を合成する。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(Affymetrix)にハイブリダイズを行う。アレイスキャナーで取り込んだ 9 検体のデータと、昨年測定した MH, PH-MH, SH, CD44⁺, Thy1⁺(3d), Thy1⁺(2d)の 18 検体のデータをまとめ、RMA 法を用いて標準化を行う。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、各試料における陽性 Probe をカウントする。得られた全ての結果のうち、Affymetrix control probe および全種類の試料で Negative と判断された Probe

の結果を除く。

<全データの階層クラスタリング>

各試料における遺伝子発現プロファイルを比較分類するために、階層クラスタリングを行う。いずれかの試料間において2倍以上の発現変動を示した Probe を Excel 上でスクリーニングし、これら Probe の発現量を用いて階層クラスタリングを行う。発現量の値を \log_2 スケールに変換したのち、全試料の平均値からの差を算出して相対発現値とする。解析は 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 により行う。

<肝細胞マーカー遺伝子の発現解析>

発現が認められた 20,593probe の中から、肝細胞機能マーカー、Cytochrome P450 (CYPs)、肝細胞関連転写因子、増殖関連遺伝子、肝幹細胞マーカーを選出し、各検体における発現量を抽出する。結果は \log_2 スケールに変換した発現の絶対値、および相対値で示す。発現の相対値は、全試料における発現の平均値からの差を \log_2 スケールにして算出する。ヒートマップは MeV ver. 4.0 で作成する。また、解析を行うマーカー遺伝子の probe ID および遺伝子名は添付資料に示す。

<小型肝細胞、CD44 陽性細胞特異的遺伝子の抽出>

小型肝細胞および CD44 陽性細胞において特異的な発現を示す遺伝子を抽出する。全データから、以下の条件(1)に合致する Probe を Excel 上でスクリーニングし、全試料での相対発現値をもとに MeV ver.4.0 にて階層クラスタリングを行う。さらに、その遺伝子の中から条件(2)に合致する Probe を抽出する。この Probe 中から遺伝子名が確定しているもののみを選び、heat map を作成する。

(スクリーニング条件)

条件(1)

- ・ 小型肝細胞試料 3 検体の平均発現量が成熟肝細胞の 4 倍以上である
- ・ CD44 陽性細胞試料 3 検体の平均発現量が成熟肝細胞の 4 倍以上である

条件(2)

- ・ 小型肝細胞試料と CD44 陽性細胞の平均発現量が Thy1+(3d)の 4 倍以上である
- ・ 小型肝細胞試料と CD44 陽性細胞の平均発現量が Thy1+(2d)の 4 倍以上である

<小型肝細胞、CD44 陽性細胞特異的遺伝子候補の RT-PCR による発現解析>

解析によって得られた小型肝細胞、CD44 陽性細胞特異的遺伝子候補のうち、下に示す遺伝子について RT-PCR を行い、実際に特異的な発現を示すかどうか確認する。

Secretin Receptor	Myb-like 1
Growth arrest specific 6	ALEX 2
CD24	HGF activator inhibitor
CK20	KLF 5
D6.1A	KLF 6
EpCAM	GATA 6
Claudin 7	LIM and CRD1
Ets variant gene	Sox 4
Jagged 1	Sox 9
Mesothelin	

(1) 逆転写反応

MH, PH-MH, NB-MH, SH, CD44⁺, Thy1⁺(3d), Thy1⁺(2d)の7試料(各1検体)のRNAを用いて解析を行う。試料のうち2 µgの全RNAからoligo-dT Primerを用いてcDNAを合成する。反応にはOmniScript RT Kit(Qiagen)を用いる。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う。

- Total RNA 2 µg
- 10× Buffer 2 µl
- 5 mM dNTP mix 2 µl
- 50 µM Oligo dT primer (Invitrogen) 1 µl
- 逆転写酵素 2 µl
- 40 U/µl RNase Inhibitor 0.5 µl
- Nuclease Free H₂O to 20 µl

(2) PCR

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する。反応にはFermentus社のTaq polymeraseを用いる。以下に示す試薬を混合する。

- cDNA solution 1 µl
- 10× Buffer 2.5 µl
- 25 mM MgCl₂ 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 (Fermentus) 0.25 µl
- H₂O to 25 µl