

200708008B

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 17 年度～19 年度 総合研究報告書

主任研究者 三高 俊広

平成 20 (2008) 年 4 月

目次

I. 総合研究報告

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

資料 別紙一覧 … 57

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 … 59

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
総合研究報告書

「肝stem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。本研究事業により(1)～(4)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

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。本研究成果はJournal of Cellular Biochemistryに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

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。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。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。その結果、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。さらに成熟化により発現上昇する遺伝子の大部分が、CYPを含む代謝に関与する遺伝子であり、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遺伝子が多く含まれていた。

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) 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 年度も引き続き症例数を増し、その成果の一部を論文にまとめた(投稿中)。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。

(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。

(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

(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) 肝ステム細胞から小型肝細胞を誘導する方法の確立

我々は、ラットの障害肝臓から肝ステム細胞 (Oval 細胞) を分離・培養し肝細胞に分化させることに成功した (Kon J, et al. J Hepatol, 2006)。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ステム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、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。

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 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。

本研究事業では以下の(1)～(4)の研究を主に行った。

- (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

これまでの研究成果について報告する。

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

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、平成 18 年度総括研究報告書(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 18 年度総括報告書(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に、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) 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

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、2000xg、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Bioanalyser2100 (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

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 mg/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 18 年度総括報告書に記載した。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(18 年度総括報告書に記載)。

(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画分の調整を依頼し、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(18 年度総括報告書に記載)

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 Cytochrome P450 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 は平成 18 年度総括研究報告書(別紙1)に記載した。

(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手術は、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 Bioanalyser2100 (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 μ l に 1 μ l 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 として相対値化した。

C. 研究結果

本研究事業は主に以下の(1)～(4)の研究を行ってきた。それぞれの研究成果を示す。

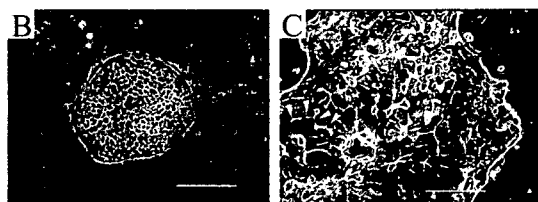
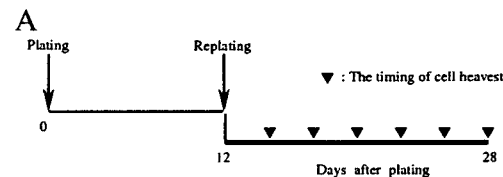
(1) 毛細胆管へ分泌される代謝産物の同定方法の確立

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。

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)。

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

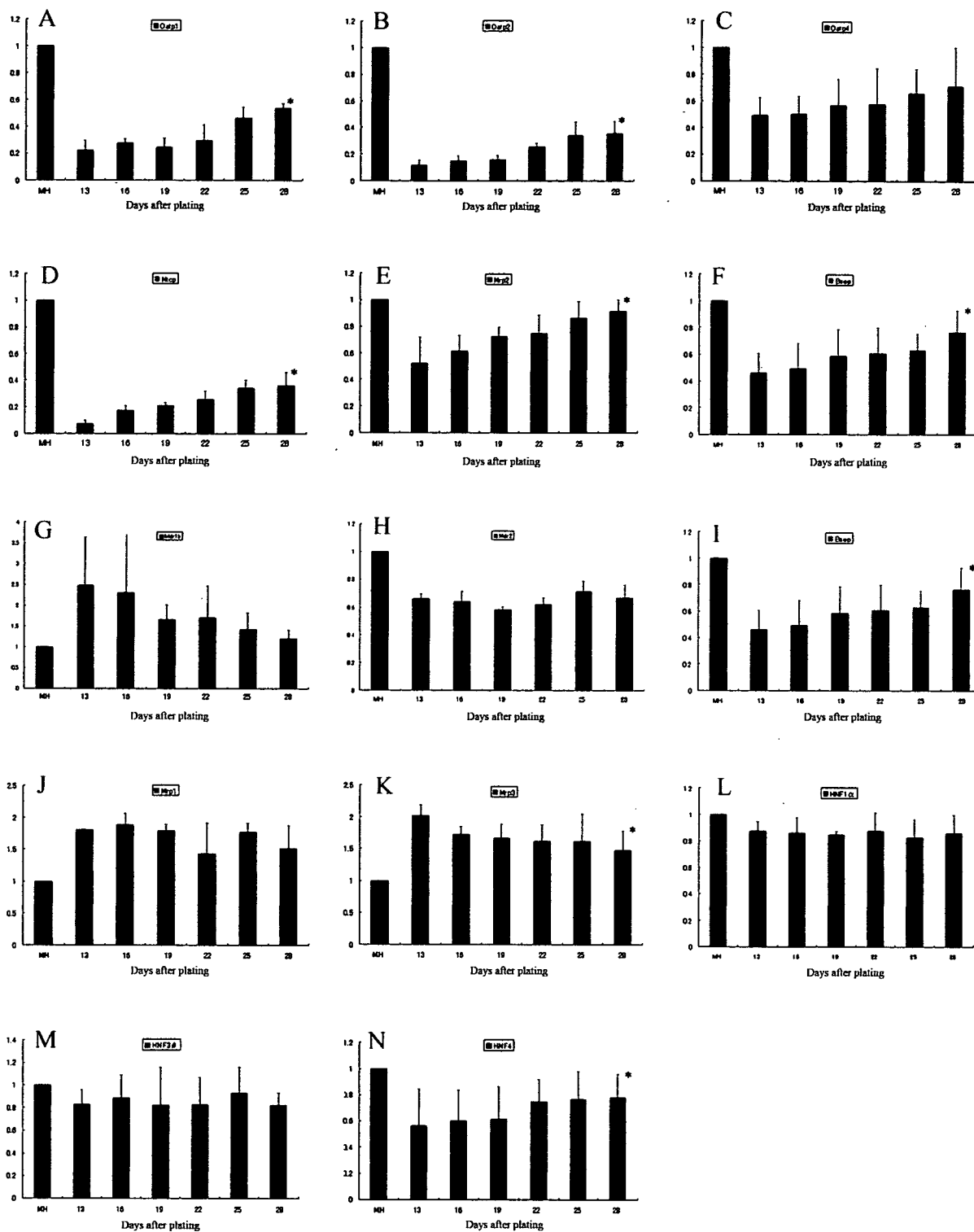
ビリルビン、胆汁酸輸送に関わるトランスポ

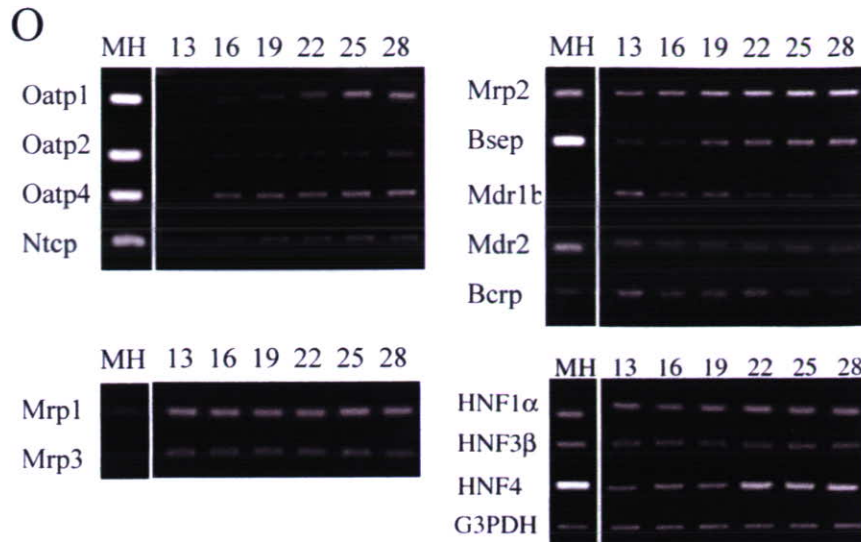
ーターとして、肝類洞側取り込み型トランスポーターである Oatp (organic anion transporting polypeptide)ファミリー、Ntcp (Na taurocholate cotransporting polypeptide)、および肝毛細胆管側排出型トランスポーターMrp2 (multiple resistance associated protein 2)と Bsep (bile salt export pump)は、小型肝細胞の成熟化に伴い mRNA レベルでの発現の上昇を認めた(図2)。再播種した小型肝細胞は、当初成熟肝細胞では類洞側膜に発現している取り込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。

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





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)。

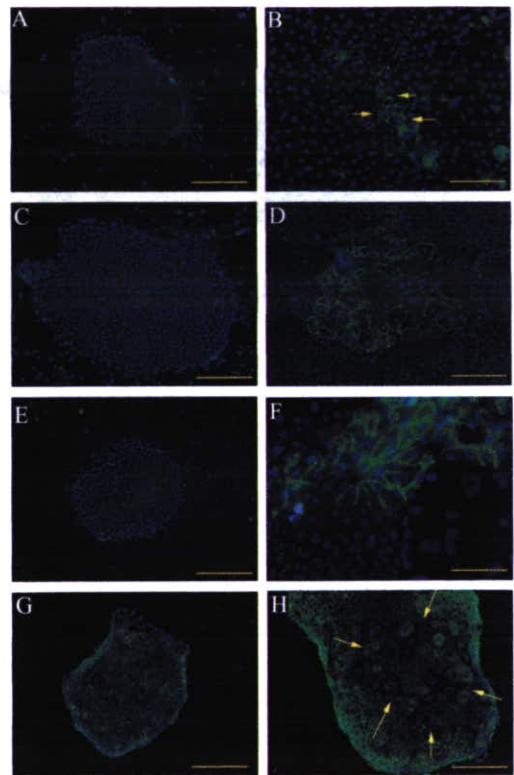
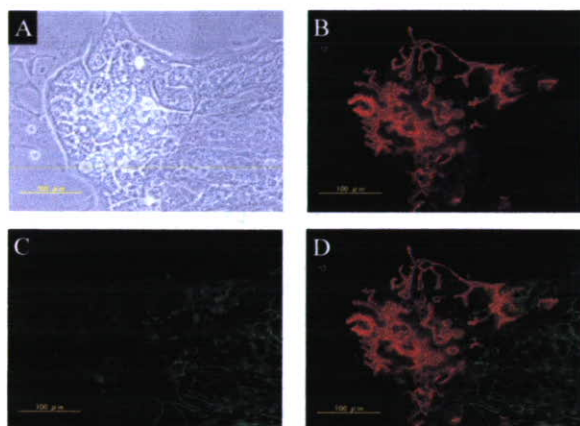


図3 ラット小型肝細胞におけるトランスポータータンパク質の蛍光免疫細胞染色写真

(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。

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。 ^3H -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 OATP 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 ^3H -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 ^3H -Estron 3-sulfate の取り込み

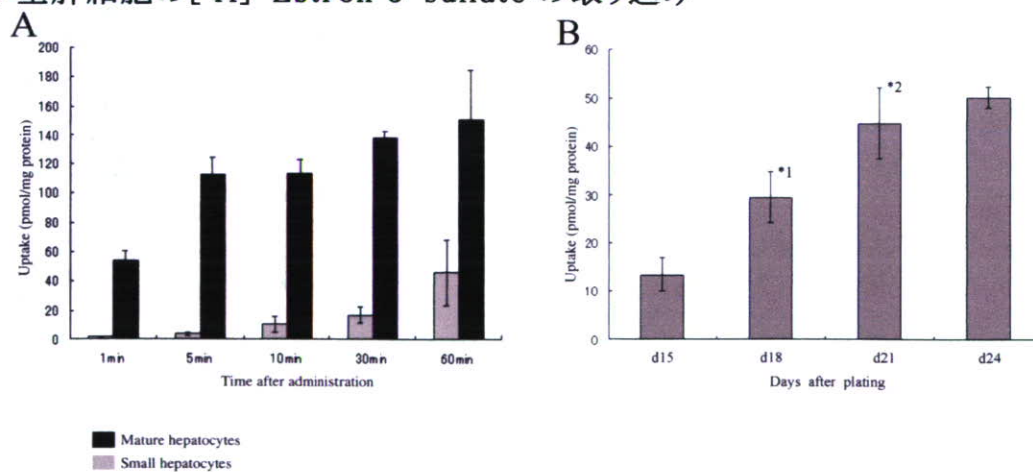
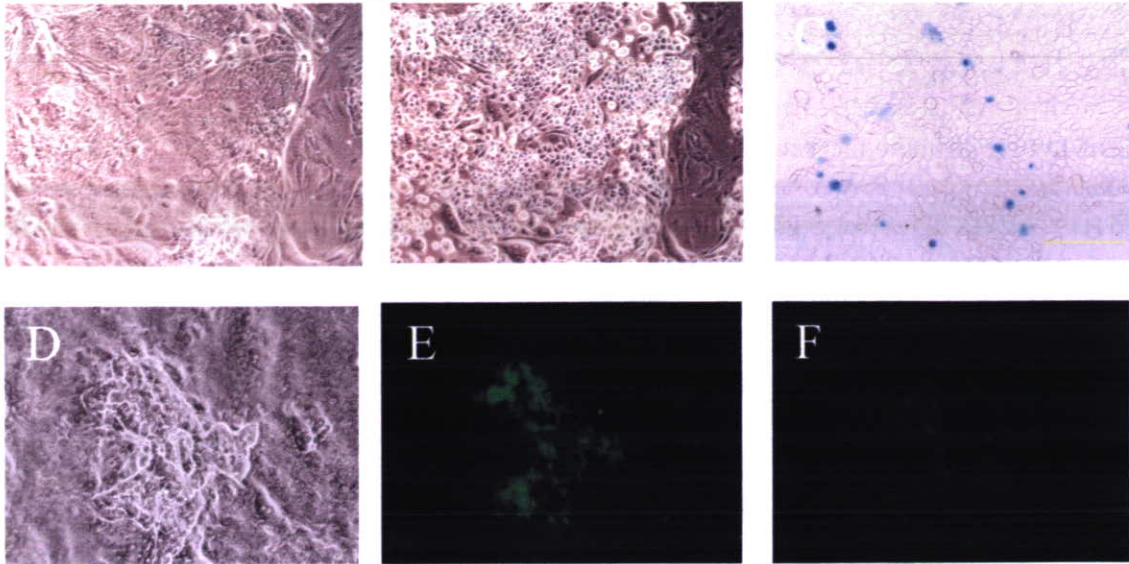


図6 小型肝細胞コロニーに対する Excretion buffer の影響



(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

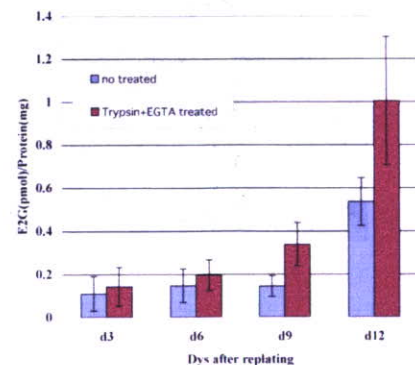
小型肝細胞コロニーに Excretion buffer を加えると、約10分後より細胞間結合が緩くなり、細胞間が開き、細胞が丸みをおびるようになった(図6A, B)。細胞死に伴う変化ではないことを確認するために、これら形態変化を生じた細胞をトリパンブルーで生体染色した。図6Cで示すようにほとんどの細胞は生きており、形態変化が細胞死に伴うことではないことを確認した。あらかじめ培養液に Fluorescein Diacetate (FD) を投与し、毛細胆管に Fluorescein を排泄させ、貯留させた類肝組織に同処理を行うことにより、Fluorescein の毛細胆管内からの溶出を認めた(図6D-F)。

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- 17β -D-glucuronide のうち、Excretion buffer を加えることによって回収された基質量と、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 $[^3\text{H}]$ -estradiol- 17β -D-glucuronide の回収



毛細胆管構造から回収された $[^3\text{H}]$ -estradiol- 17β -D-glucuronide の量は培養経過に伴い増大した。

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。

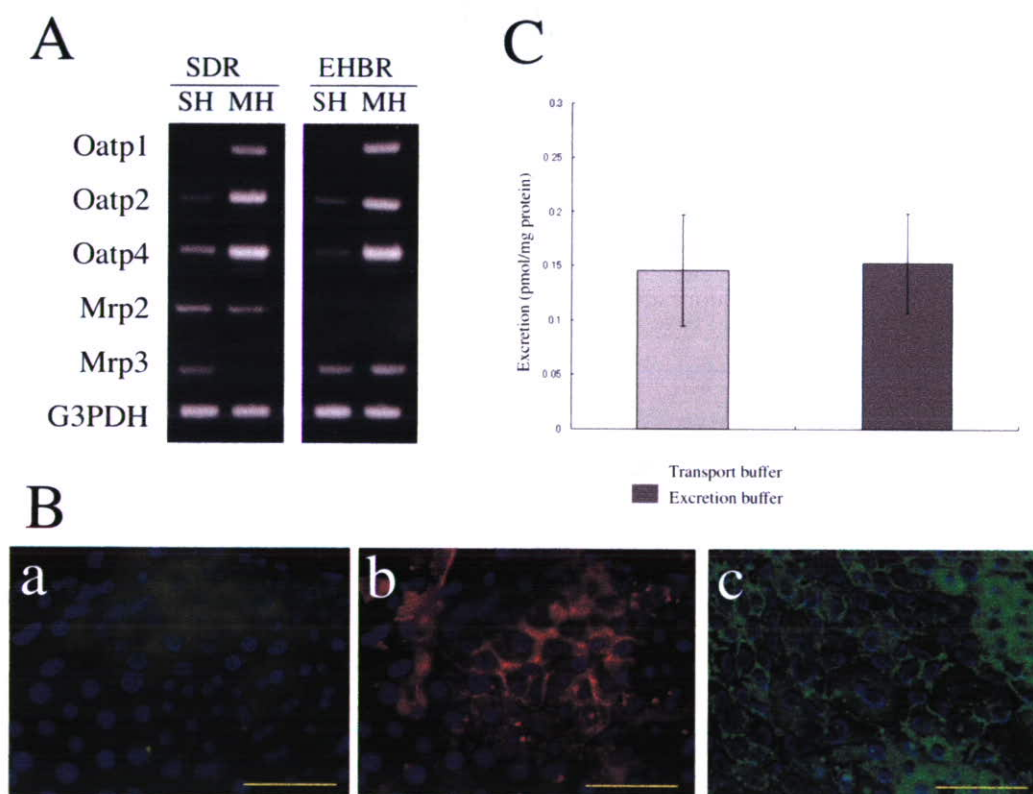
7. Mrp2 欠損ラット小型肝細胞を用いた有機アニオン排泄実験

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当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った。

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



(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。