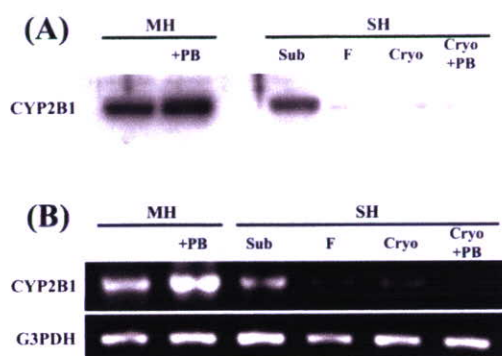


## (2) ホルモン異常状態における薬剤の代謝酵素遺伝子誘導発現の解析

### (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 CYP2B の活性が誘導されないことがわかり、その原因をまず検討する必要があった(図9)。

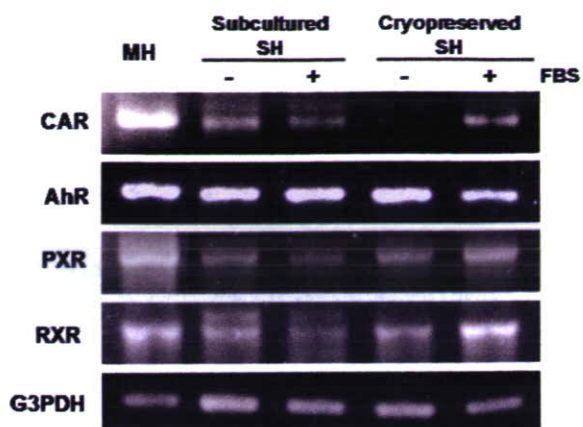
図9 凍結保存したラット小型肝細胞の CYP2B1 タンパク質 (A) と遺伝子発現 (B)



### 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与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10)。

図10 小型肝細胞における核内受容体の発現

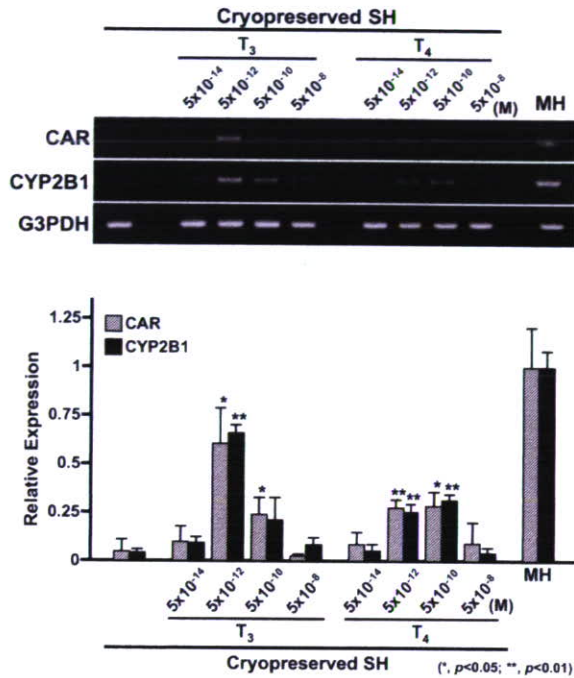


初代培養の小型肝細胞を subculture し培養した場合には CAR mRNA の発現は認められ、解凍直後の細胞には CAR タンパク質が存在していたので、凍結保存による CAR 遺伝子発現機構の異常が示唆された。培養細胞は凍結する前までは血清入りで培養し、再播種後は無血清培養していたので血清成分の影響を検討した。すると血清添加培養液では CAR の発現が再誘導された。他の核内受容体の発現に変化は無かった。

### 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 遺伝子の上流域に存在する転写因子の結合部位を検索すると甲状腺ホルモン受容体の結合部位 (TRE, thyroid hormone response element) が存在することがわかった。そこで培養液中に甲状腺ホルモンを添加して凍結保存した小型肝細胞を培養すると、血液中に存在する主要な甲状腺ホルモン活性分子である  $T_3$  は  $5 \times 10^{-12}$  M の濃度で最も CAR 遺伝子の発現を誘導した(図11)。 $T_4$  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。

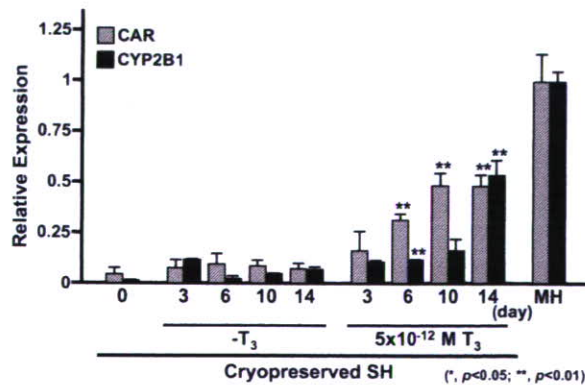
図11 凍結保存ラット小型肝細胞の CAR, CYP2B1 遺伝子発現に対する甲状腺ホルモンの影響



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<sub>3</sub>)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12)。CAR, CYP2B1 mRNA の発現は、培養経過と共に大きくなり成熟肝細胞における発現レベルまで近づいた。培養経過と共に小型肝細胞の成熟化も起こっていることが示唆された。

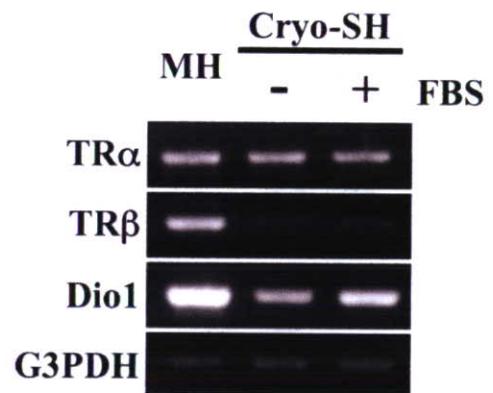
図12 凍結保存ラット小型肝細胞の培養における甲状腺ホルモン添加による CAR 及び CYP2B1 遺伝子の経時的発現変動



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13)。また小型肝細胞においても T<sub>4</sub>-T<sub>3</sub>変換酵素遺伝子 (Deiodinase, type 1) の発現は認められ、T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> が成熟肝細胞と同様に作用していることが示唆された。

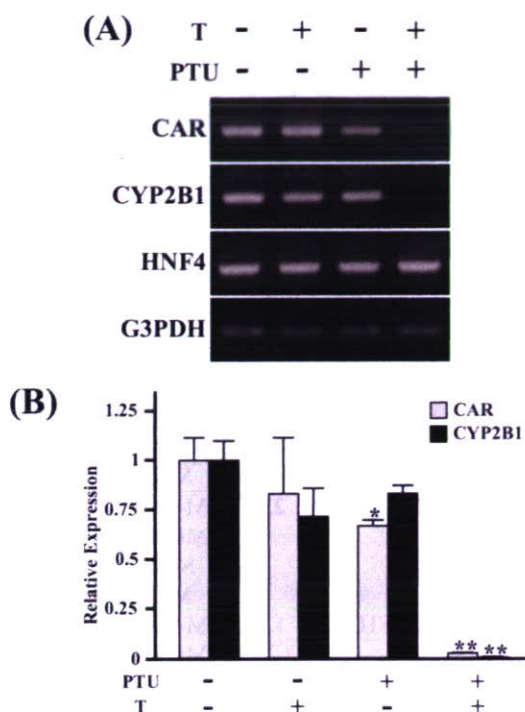
図13 凍結小型肝細胞における甲状腺ホルモン受容体及び Deiodinase の発現



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ラット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14)。

図14 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



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 の発現は無くなると考えられた。

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

Sample	Total T <sub>3</sub> conc. (nM)	Total T <sub>4</sub> 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

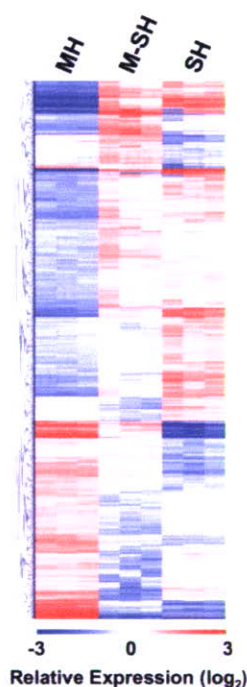
薬剤投与によるラット小型肝細胞の遺伝子発現を GeneChip (Affymetrix 社) により解析するために、正常成熟肝細胞と小型肝細胞の遺伝子発現の差異を詳細に検討してきた。小型肝細胞は生体内の正常ラット肝臓では同定できず、培養することによって初めて小型肝細胞としての表現型を呈し同定可能になる。そのため生体内と培養という条件の違いによる遺伝子変化、また静止期の細

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。

## 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15)。

図15 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。

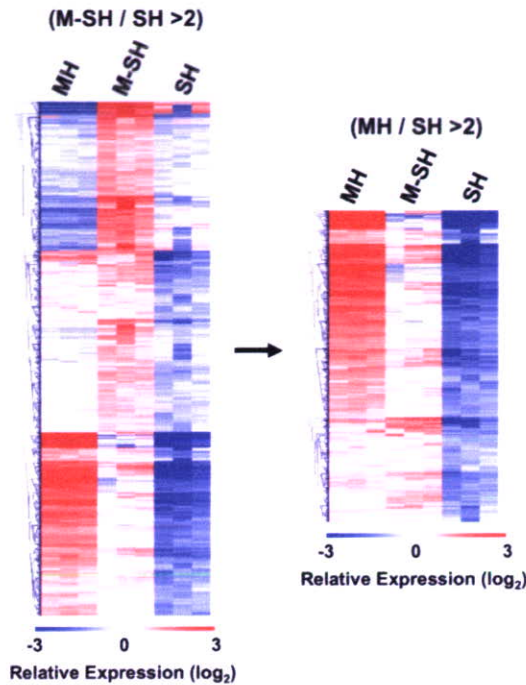
表2 各細胞間で発現変動を示したprobe数

1 <sup>st</sup> screening	Probe	2 <sup>nd</sup> 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16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16右)、成熟化に伴い発現上昇する遺伝子を同定した。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17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17右)、成熟化に伴い

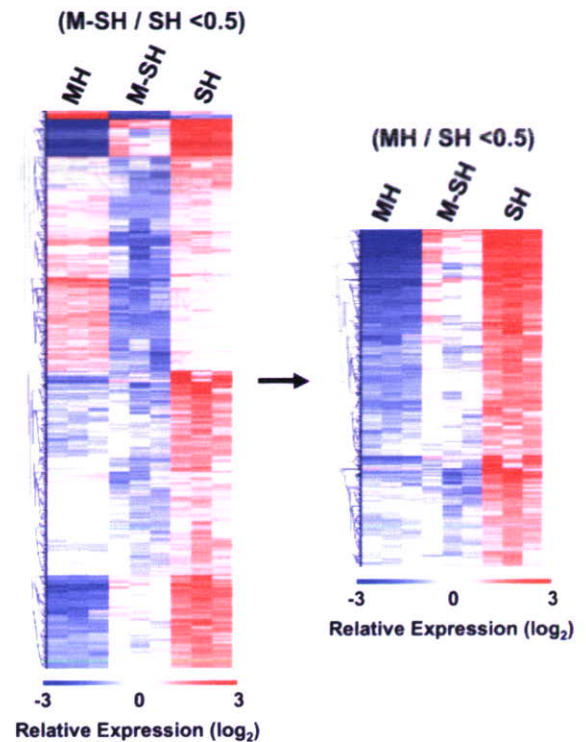
発現低下する遺伝子を同定した。

図16 成熟化に伴って発現上昇する遺伝子の抽出



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 倍差以上、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ている Claudin 4 や Annexin, Cytokeratin 7,19 が含まれていた。

図17 成熟化に伴って発現低下する遺伝子の抽出

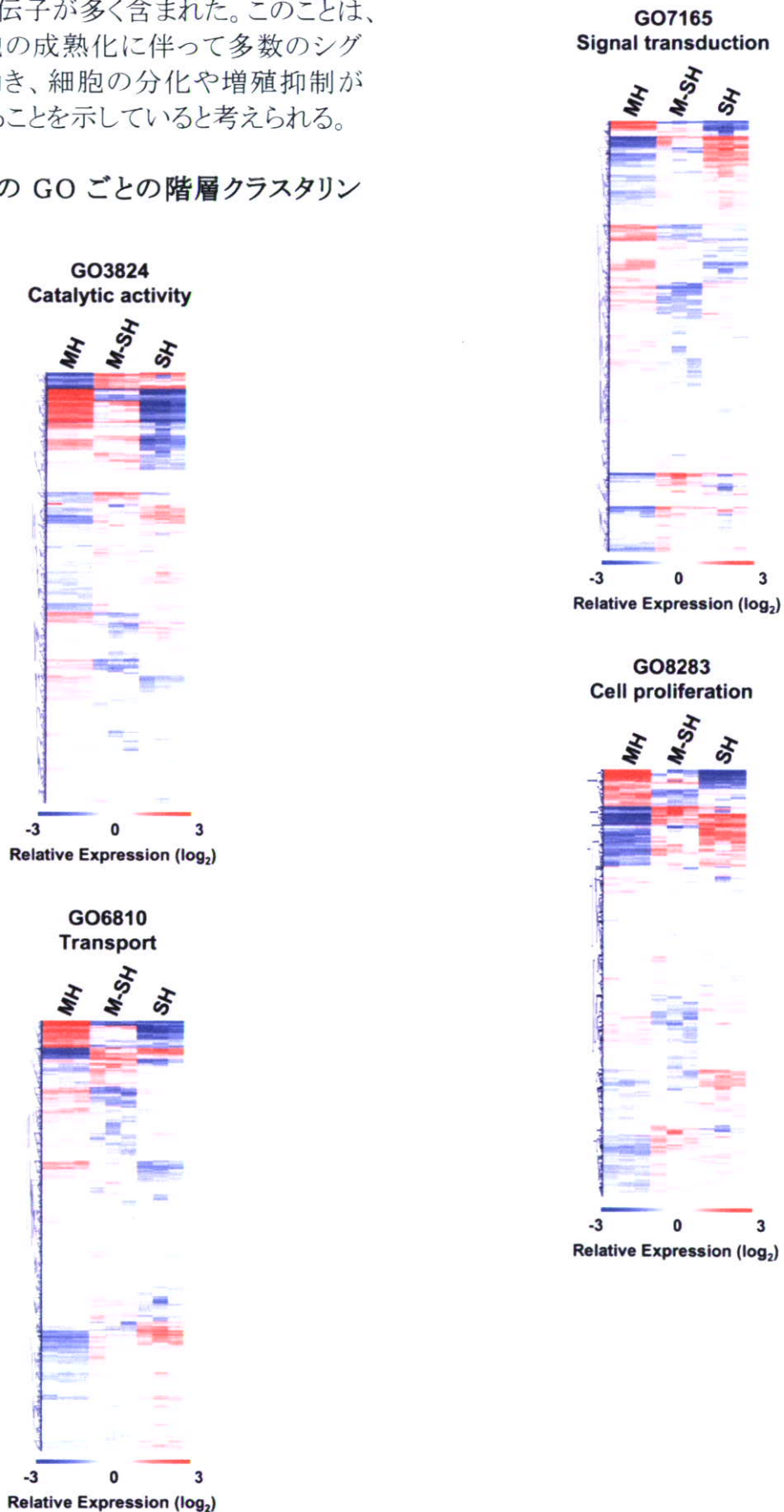


## 2. Gene Ontology に基づく遺伝子機能ごとの階層クラスタリング

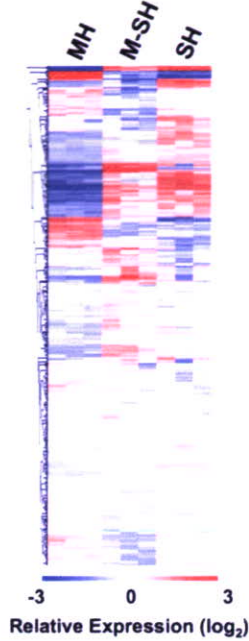
成熟肝細胞、成熟化小型肝細胞、小型肝細胞のいずれかで発現している probe 群から、特定の機能に関する遺伝子を抽出し、階層クラスタリングを行った。その結果(図18)、Catalytic activity (GO: 3824)に含まれる遺伝子の多くが Matrigel 添加による小型肝細胞の成熟化に従い発現上昇し、成熟肝細胞と同等かそれに近い発現を示すことがわかった。Transport (GO:6810)も同様であったが、小型肝細胞の成熟化で発現上昇を示す遺伝子の割合は Catalytic activity よりも低かった。このことから、小型肝細胞の薬剤代謝機能そのものは成熟化によってかなり高くなっているが、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。

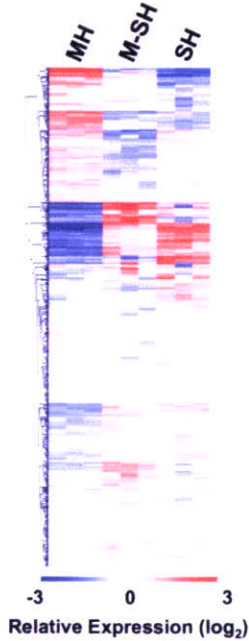
図18 特定の GO ごとの階層クラスタリング



**GO30154**  
**Cell differentiation**



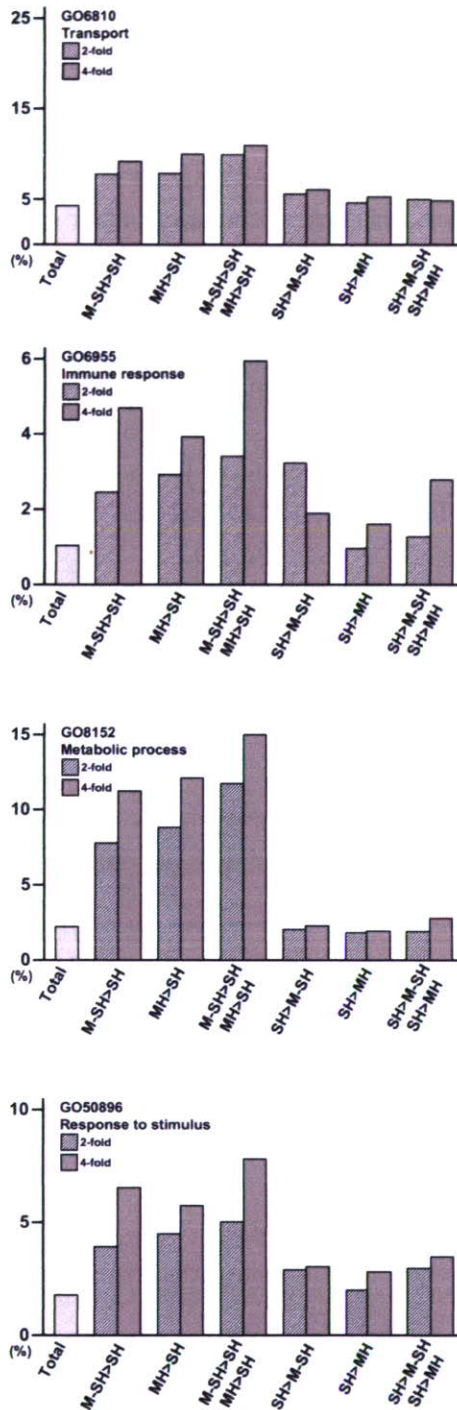
**GO32502**  
**Developmental process**



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

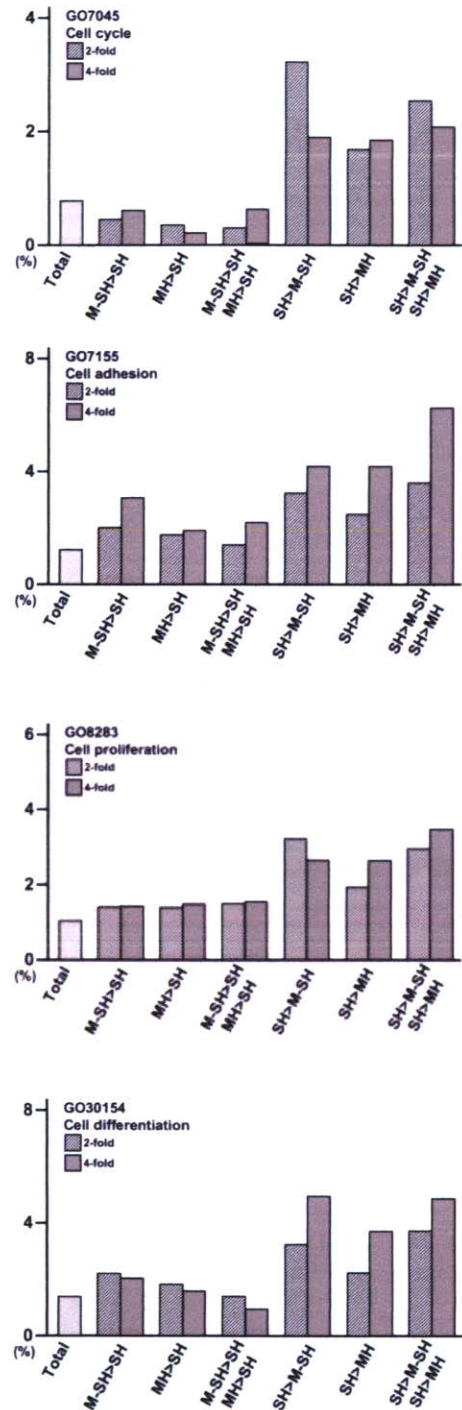
成熟肝細胞、成熟化小型肝細胞、小型肝細胞における発現変動から、図 19 に示す 6 種の条件により probe を分類した。この際、スクリーニングにおける発現比の threshold は 2 倍および 4 倍に設定した。得られた probe 群全体のうち、特定の GO に属する遺伝子の割合を算出し、グラフ化を行った。その結果、小型肝細胞で発現が低く、成熟化小型肝細胞および成熟肝細胞で発現が高い遺伝子には Transport (GO:6810), Immune response (GO:6955), Metabolic process (GO:8152), Response to stimulus (GO:50896)に関わる遺伝子が多く含まれることがわかった(図 19)。

図19 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)



一方、Cell cycle (GO:7045), Cell adhesion (GO:7155), Cell proliferation (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20)。

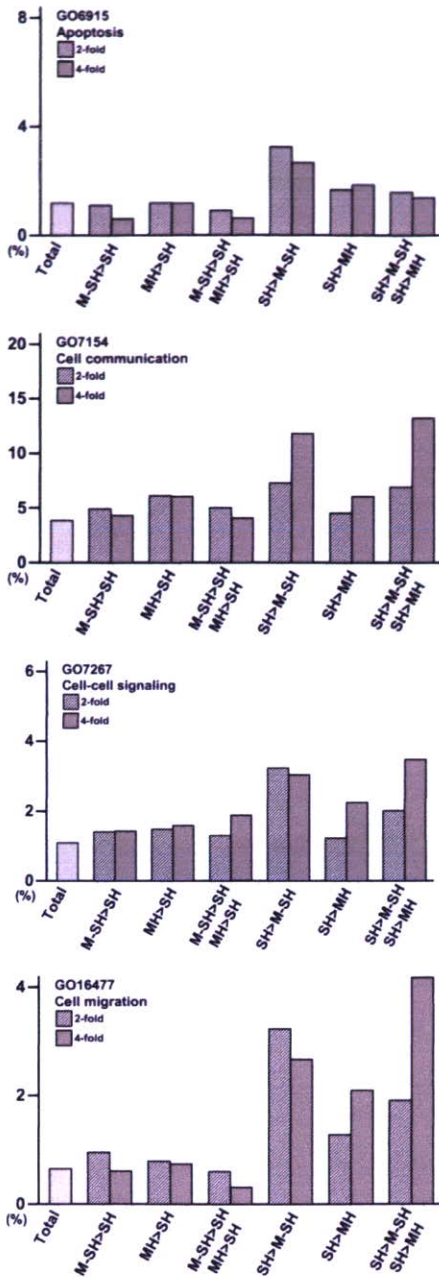
図20 発現変動により分類された Probe に含まれる遺伝子機能の解析(B)



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21)。



図21 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(C)



**(3) ヒト小型肝細胞を効率よく分離培養する方法の確立**

**(A) 手術により摘出された正常肝組織からの分離**

1. 播種時の小型肝細胞の viability について  
細胞数計測時にトリパンブルーを用いて生存率を調べたところ 91.1%であった。現在の肝組織灌流によるヒト小型肝細胞調整法を用いることで生細胞を採取できることがわかった。

2. 播種直後における小型肝細胞間の cluster 形成について

ヒト肝組織より分離した細胞をヒアルロン酸コート培養皿上で培養すると、播種後4日目頃より細胞数10個程度からなる小型肝細胞コロニーが形成された。コロニーが1個の細胞の増殖により形成されたことを示すために、播種した細胞が培養皿に接着した時点より cluster を形成していた細胞の割合を計測した。表3で示すように、播種時には約90%の細胞がシングル又はダブルットで存在していた。位相差顕微鏡を用いて経時的に同一細胞を観察した結果も集塊を作っている細胞群から小型肝細胞が増殖してくることは認めなかった。

表3 細胞を播種後一日目の接着した細胞のシングル率

細胞数	1-2	3-4	5-8	>9
割合 (%)	89.7	9.2	1.1	0

3. コロニー構成細胞数の推移について

無血清下培養では、血清存在下の場合と比較して非実質細胞の発育がほとんどなく、肝細胞コロニーの観察が容易であった。培養皿にはあらかじめマーキングしておき、追跡が可能であったコロニーの構成細胞数を計測した。培養14日目において32個以上の細胞からなるコロニーを増殖するヒト小型肝細胞コロニーと考えた。一個の細胞から増殖したと考えると5回以上分裂したと計算される。

1) 高濃度 ( $5 \times 10^4$  cells/ml) で播種した場合、低濃度 ( $5 \times 10^3$  cells/ml) と比較して明らかに大きなコロニーが観察され、計測した結果もコロニー構成細胞数が多く、大きなコロニーが形成される傾向にあった(図22)。

2) HGF(-)培養後14日目においてコロニー1つあたりの平均細胞数を比較すると、低濃度/高濃度=24.0/76.4 であった。低濃度においては細胞数のピークが培養10日目であるコロニーが多いのに対し、高濃度の方では培養21日目においても増殖を続け

ているコロニーが多く観察された。

3) HGF を培地に添加(20 ng/ml)した場合、コロニー数およびコロニー構成細胞数の増加が認められた。培養14日目における HGF 添加の有無によるコロニー構成細胞数の平均を比較すると、低濃度では HGF (-)/(+) = 24.0/49.24、高濃度では HGF

(-)/(+) = 76.39/87.06 であった。

図23は、高濃度で播種した細胞をHGF添加培養液で培養した時に出現し、増殖したコロニーの平均細胞数の推移を示す。

図22 ヒト小型肝細胞の増殖とコロニー形成の位相差顕微鏡写真

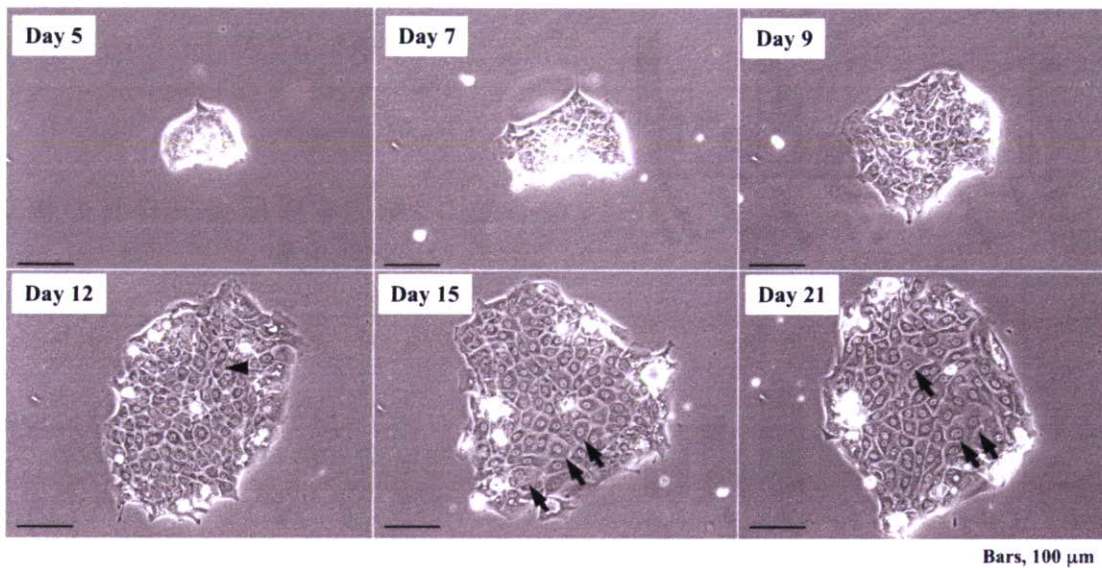


図22は、同一コロニーを位相差顕微鏡で経時的に観察し、写真に撮ったものである。矢印は、成熟化したヒト小型肝細胞

図23 ヒト小型肝細胞の増殖

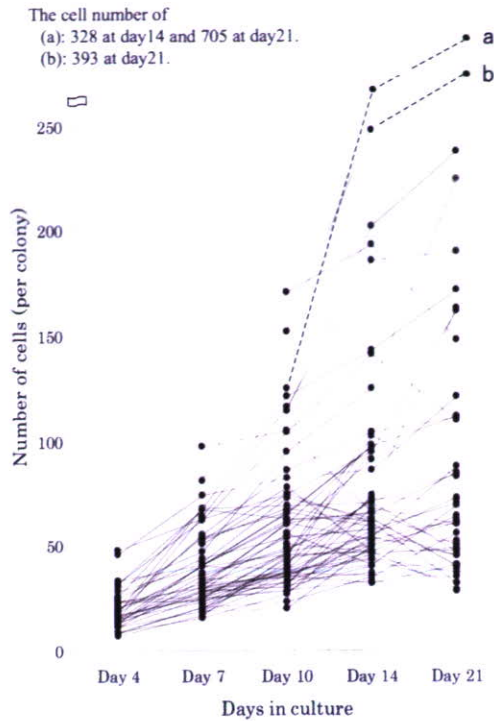


表4は、コロニー構成細胞数の平均値を示している。培養14日目に32個以上の細胞からなるコロニーは、それ以降も増殖を続け、21日目には平均100個の細胞からなるコロニーを形成するようになる。しかしながら、その後多くのコロニーはそれ以上大きくはならず、アポトーシスで死んでいく細胞が増え、コロニー数も減少した。

表4 ヒト小型肝細胞コロニー構成細胞数の変化

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

Day2でDishに生着している細胞: 平均967個/cm<sup>2</sup>  
 Day10で≥10cellsのcolony: 平均19個/cm<sup>2</sup>

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

上の計算式は、培養2日目に接着した細胞数に対して10日目の時点で10個以上の均一な細胞からなる集団をコロニーとして定義した時に、コロニーを形成する能力を持

つ細胞の頻度を示している。培養2日目の時点で約90%の細胞は1-2個で接着しているのでコロニーは一個の細胞由来と推定すると、接着した細胞の約2%がコロニーを形成する能力を有していると考えられる。

#### 4. Labeling Index (LI)

5×10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>で播種した細胞から出現した小型肝細胞コロニーに対して、培養13日目にBrdU(40 μM)を添加、24時間後に細胞を固定した。抗BrdU抗体を用いて染色し、BrdU陽性核を有する細胞を計測し、LIを計算したところ平均19.6%であった(表5)。またコロニー間におけるLIの値は0%~42.2%とばらつきがみられた。コロニーを形成する小型肝細胞の増殖能に差があることがわかった(図24)。

図24 ヒト小型肝細胞コロニーにおけるBrdU陽性細胞の割合の分布

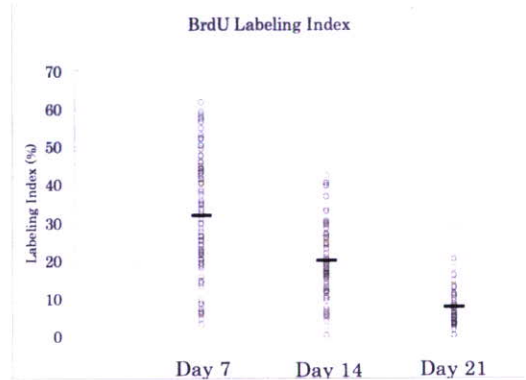


表5 ヒト小型肝細胞コロニーにおけるBrdU陽性細胞の割合(LI: Labeling Index)

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

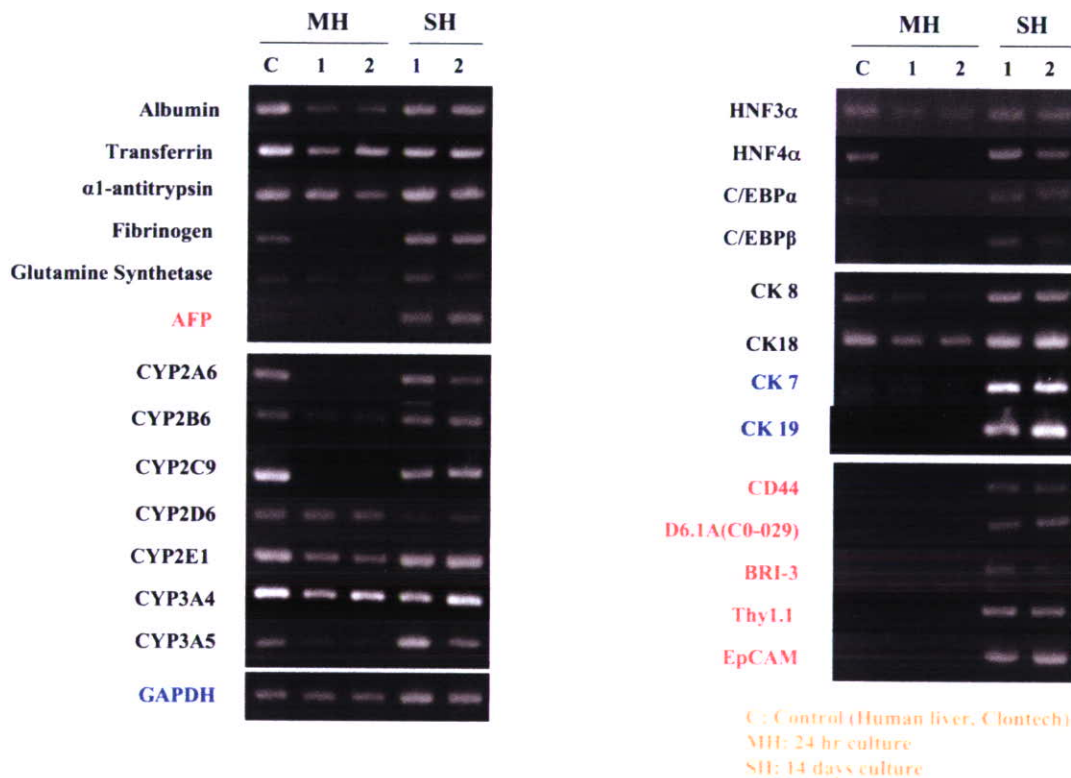
#### 4. 培養ヒト小型肝細胞の遺伝子発現解析

培養14日目の小型肝細胞コロニーよりtotal RNAを回収し、RT-PCR法を用いて検討した(図25)。肝分化機能の中で最も重要な血清タンパク質の遺伝子発現を見ると、アルブミン、トランスフェリン、アルファ1アンチ

トリプシン、フィブリンノーゲンなど発現しており、またアンモニア代謝に重要なグルタミン合成酵素の発現も認められた。薬物代謝酵素の中でも重要なチトクロム P450 の多くも発現していた。肝分化機能の発現調節に重要な転写因子の HNF3 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$ , C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  の発現も見られることから成熟肝細胞と同様な機序で肝分化機能発現が調節さ

れていることが示唆された。また胆管上皮細胞のマーカーでもある Cytokeratin (CK) 7, 19 の発現が発現しており、ラット小型肝細胞特異的遺伝子として同定された CD44, BRI3, D6.1A(CO-029)も発現していることからラット小型肝細胞と同様に肝前駆細胞としての能力を持つ細胞であると考えられる。

図25 ヒト小型肝細胞の遺伝子発現



### 5. ヒト小型肝細胞の特徴—蛍光免疫細胞染色による解析

抗ヒト抗体を用いて増殖してくるコロニーの細胞の特徴を解析した(図26)。遺伝子発現解析で発現が認められた遺伝子でその発現タンパク質に対する抗体が入手可能なもののうち代表的な抗体を用いた結果を示す。抗アルブミン、トランスフェリン、サイトケラチン(CK)8は肝細胞に特異的に発現しているタンパク質であり、CK19は胆管上皮細胞に発現している。CD44は我々がラット小型肝細胞に特異的に発現している遺伝子として同定したものである。ほぼすべてのヒト小型肝細胞は、肝細胞及び胆管上皮細胞

どちらのマーカータンパク質も発現しているばかりか、小型肝細胞特異的タンパク質も発現しており、成熟肝細胞とは異なる特徴を持っている細胞であることが示された。

### 6. 培養ヒト小型肝細胞によるアルブミン分泌

培養しているヒト小型肝細胞の培養液中に分泌されているアルブミン量を測定した(図27)。小型肝細胞コロニーの多くが増大していた培養21日目までは培養経過と共にアルブミン量は増加傾向にあったが、それ以降は分泌量が低下していくようであった。この結果は、小型肝細胞の増殖が停止するコロニーが増えてきたことと一致する。

図26 ヒト小型肝細胞の蛍光免疫細胞染色写真

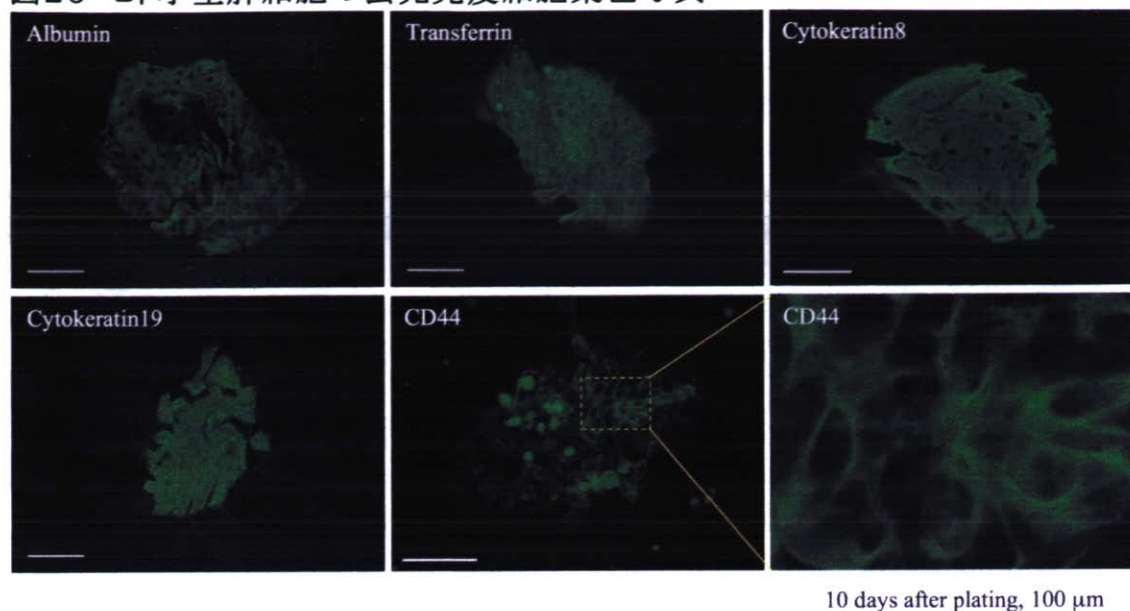
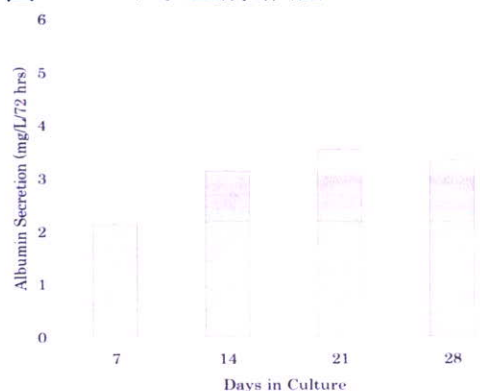


図27 ヒト小型肝細胞のアルブミン分泌



## 7. 網羅的遺伝子発現解析

高い増殖能を有する細胞の遺伝子学的特徴を得る目的で、ヒト小型肝細胞および成熟肝細胞それぞれの分画から総 RNA を抽出し、GeneChip (Affymetrix) による解析を現在行っているところであるが、遺伝子解析に用いる程の RNA 量を確保できる症例が限られており、結果を示すことができるほどの十分な症例数が確保できていないのが現状である。

## (B) 中国上海市のRILD社より提供されたヒト小型肝細胞分画

### 1. 凍結小型肝細胞の融解法

RILD 社から凍結小型肝細胞が液体窒素保存状態で札幌医科大学へ輸送された。

凍結チューブを 37°C 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 59% であった。方主任研究員とのディスカッションより、中国における施行方法と若干の違いがあったため、中国における方法に準じて行ったところ、生存率は約 76% まで上昇した。

### 2. 凍結小型肝細胞の培養

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

凍結細胞を融解後、播種し、薬物代謝酵素 Cytochrome P450 1A2 及び 3A4 の活性を調べた。同時に小型肝細胞の培養を行った。24 穴培養プレートに細胞を播種し、培養した。

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

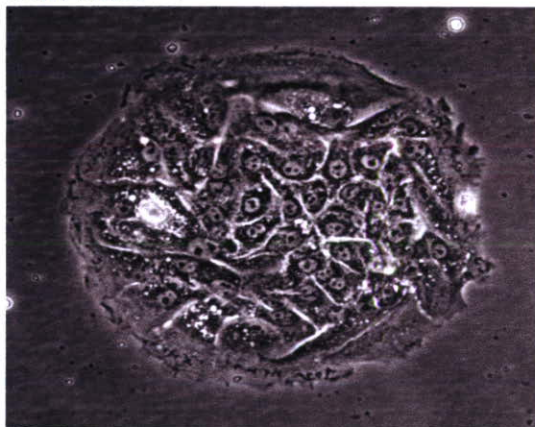
究員との共同研究>

### 3. 分離した細胞をヒアルロン酸コートしたプレートに播種した後、空輸し培養

RILD 社内で 2 日間培養した小型肝細胞分画の細胞は札幌到着時付着していた細胞総数は播種時に比較しかなり減少していた。ヒト小型肝細胞培養用培養液に交換し培養を続けると図 28 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。

<平成 19 年度厚生労働科学研究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・外国人研究者招へい等事業により招へいされた外国人研究者 Zhuohan Hu(上海復旦大学薬学部・教授) 研究実績報告書においても報告している>

図 28 中国から入手した細胞由来のヒト小型肝細胞コロニー



培養 12 日目に見られた小型肝細胞コロニー

## (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 29 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 6)。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 30)。

表6 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。

図29 血清存在と非存在下で小型肝細胞コロニーの形成

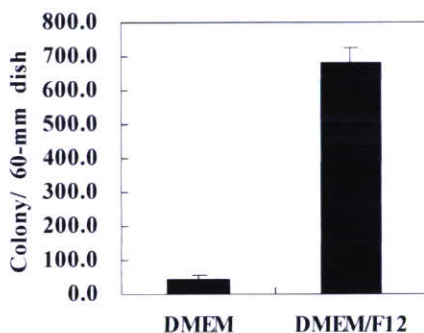
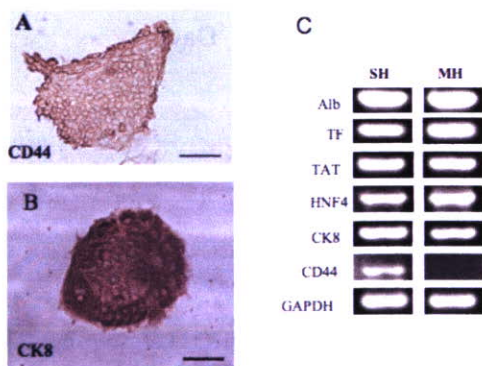


図30 ヒアルロン酸コートディッシュで無血清培養した小型肝細胞のマーカー



### 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。

図31 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

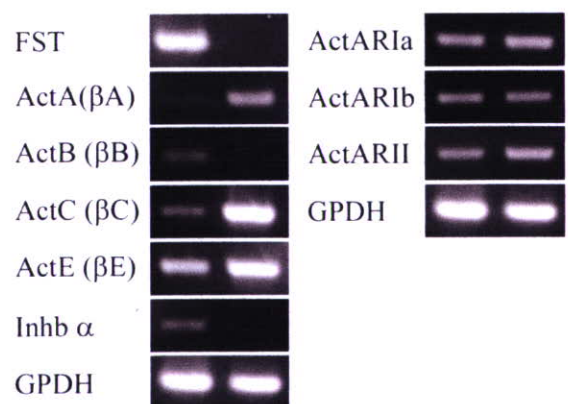
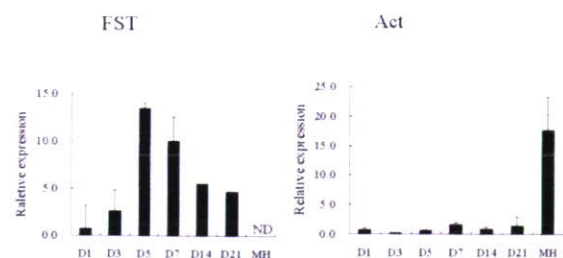


図32 小型肝細胞における FST 及び ActivinA mRNA 発現の経時的な変化

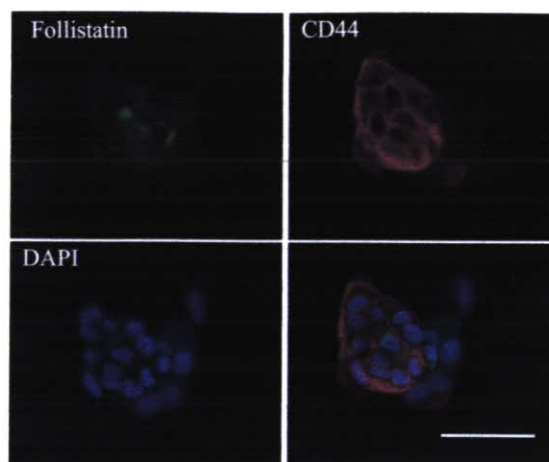


その結果、図31、32で示すように、小型肝細胞ではFST とActB 及びInhb mRNA の発現が認められたが、成熟肝細胞ではこれらの発現は認められなかった。反対に成熟肝細胞ではActA、C、E mRNA の発現が高かったが、小型肝細胞ではこれらの遺伝子の発現は低かった。Act 受容体の発現は小型肝細胞と成熟肝細胞では大きな差はなかった。さらにFST とActA mRNA の経時的な発現を調べたところ、FST mRNA の発現は培養 24 時間後検出し始めその後培養 21 日まで経時的に増加したのに対し、ActA mRNA の発現は培養 24 時間後から低下し、培養 21 日まで低いレベルが保たれた。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。

## 2. 小型肝細胞における FST 蛋白の同定

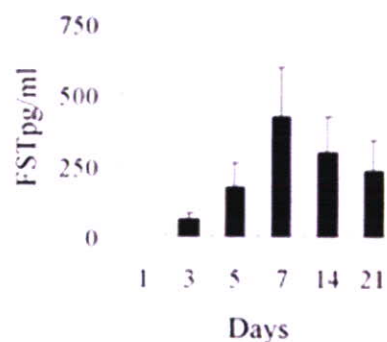
まずは蛍光免疫染色法で培養 7 日目に CD44 特異的に発現する小型肝細胞には同時に FST 蛋白も発現したことが証明された(図33)。

図 33 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34)。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。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。

図34 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

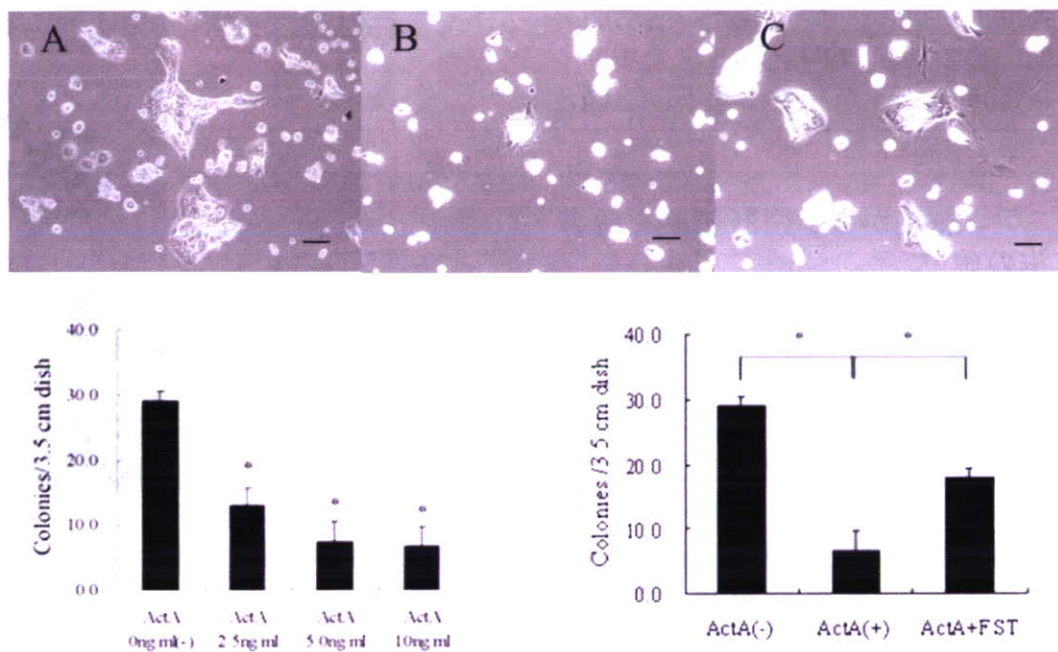
ActA の作用を検討するために、小型肝細胞の培養3日と5日目にActA 10 ng/ml



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

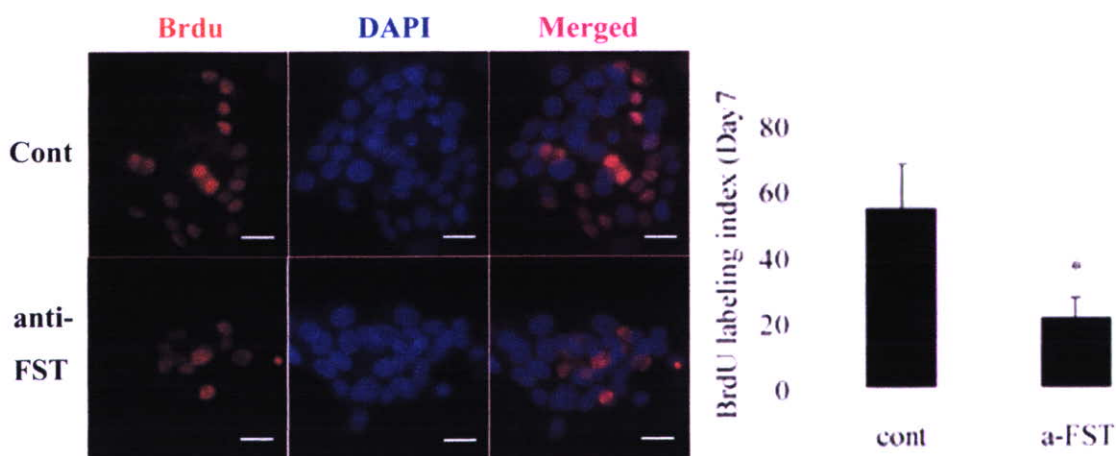
一数は対照群と同レベルまで回復した。ここでデータを示していないが、ActA 添加により上清中 FST の産生量は有意に減少した。この結果から ActA が小型肝細胞の増殖を抑制することが示唆された(図 35)

図35 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36 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36)。

#### (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37-39)。

図37 小型肝細胞における CD44 遺伝子の発現

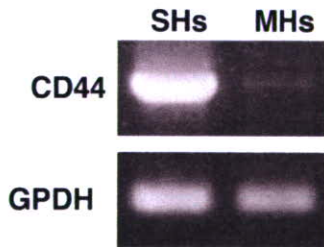


図38 小型肝細胞の培養経過と CD44 遺伝子発現

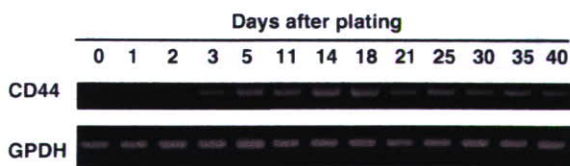
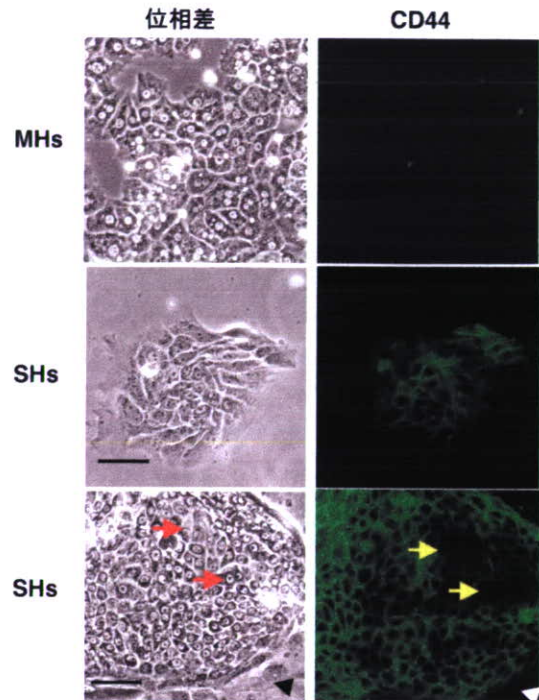


図 39 小型肝細胞コロニーにおける CD44 タンパク質の発現



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)

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40、41)。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42)。

図40 CD44v6 の発現

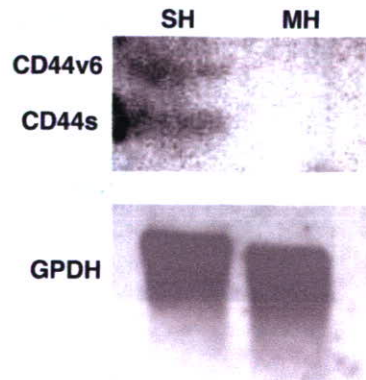


図41 小型肝細胞コロニーにおける CD44v6 タンパク質の発現

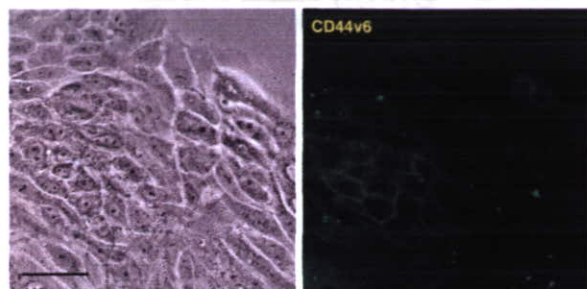
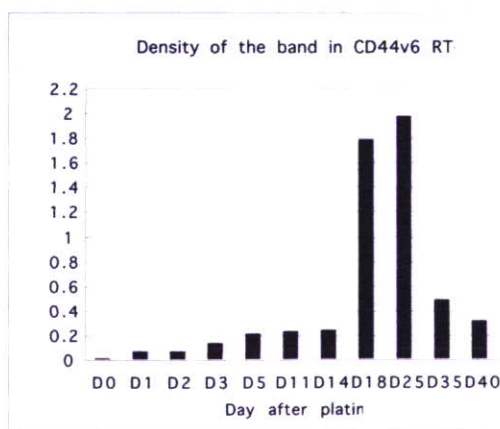
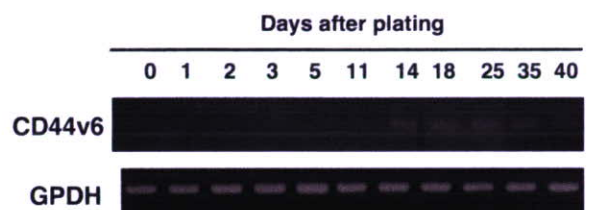


図42 小型肝細胞の培養経過と CD44v6 遺伝子発現



## 2. ラット肝臓における CD44 陽性肝細胞の出現

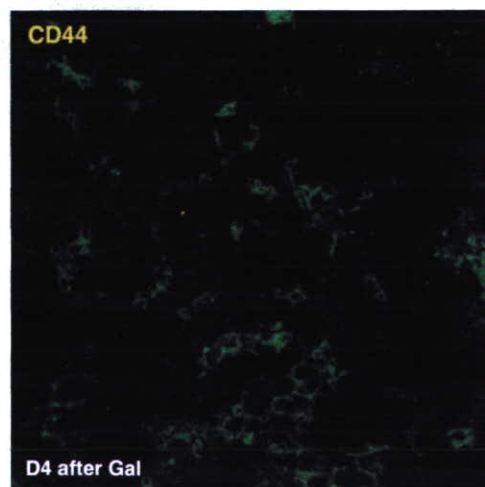
CD44 タンパク質は、成熟ラット肝臓において胆管上皮細胞膜にその発現を認めるが、小葉内に CD44 陽性肝細胞は存在せず、2/3部分肝切除による再生刺激を加えても陽性肝細胞は出現しない。様々な肝障害時に出現することが確認され、肝幹細胞と考えられている細胞に Oval 細胞がある。

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43)。

図43 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

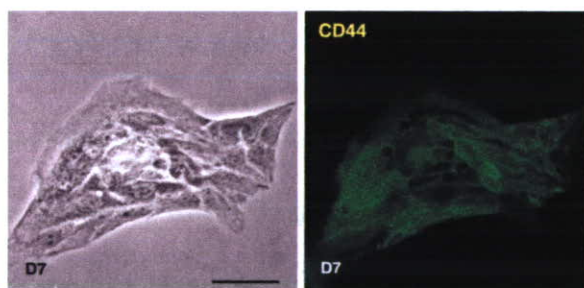


Oval 細胞のマーカーとして Thy1 を、小型肝細胞のマーカーとして CD44 を用いた。Thy1 陽性細胞は、GalN 投与後 2 日目からグリソン鞘周囲に多数出現し、5 日目にはほとんど消失する。一方、CD44 陽性肝細胞は 3 日目から Thy1 陽性細胞の出現部位より小葉内寄りに認められ、4 日目にその数は最大になり 6 日目にはほぼ消失した。また、3-4 日目には Thy1, CD44 を共に発現している細胞が認められた。この結果は、GalN 投与障害肝に出現する小型肝細胞が CD44 を発現しており、Thy1 陽性 Oval 細胞が CD44 陽性小型細胞を介して肝細胞に分化す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

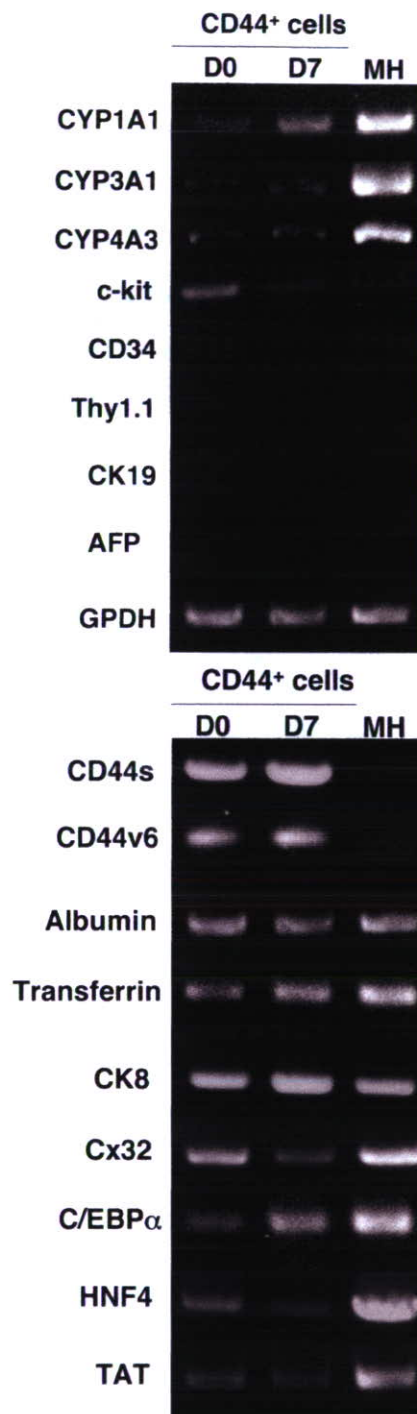
次に障害肝に出現した CD44 陽性細胞が In vitro で小型肝細胞コロニーを形成するかどうか検討した。GalN 投与後 4 日目の肝臓からコラゲナーゼ灌流法を用いて細胞を分離した。CD44 陽性細胞を培養皿に播種し、小型肝細胞が増殖する条件で培養を行なうと、生着した細胞の中から CD44 陽性小型肝細胞コロニーが出現した(図44)。

図44 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45 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