

研究成果報告書

事業名（補助金名）： 基盤的研究開発育成事業（若手研究補助金）
研究開発テーマ名： 抗体を用いたヒト小型肝細胞の分離方法の開発
研究代表者名： 今 純子【札幌医科大学附属がん研究所分子病理病態学部門／助手】

目次

1. 背景・目的
2. 方法
 - (1) ヒト小型肝細胞の調整法
 - (2) マイクロアレイによる遺伝子発現解析
3. 結果・成果
 - (1) ヒト小型肝細胞の調整法
 - (2) マイクロアレイによる遺伝子発現解析
4. 考察
5. 今後の展望

1. 背景・目的

ラット肝細胞の初代培養を行うとクローナルに増殖する肝細胞が存在する。その細胞を小型肝細胞と言い、成熟ラット肝臓には約2%存在する。小型肝細胞は小型であるという以外、形態学的には成熟肝細胞と区別はつかないが、成熟肝細胞とほぼ同等の表現型を持ち、超微構造的にも肝細胞としての特徴を持っているため、肝前駆細胞であると考えられている。小型肝細胞は凍結保存が可能で6ヶ月以上の長期保存後も増殖する。高密度の培養や基底膜成分であるマトリグルを重層することで成熟化する。これは凍結保存後培養小型肝細胞についても同様で成熟化した細胞は薬物代謝酵素活性も持つことがわかっている。小型肝細胞の分離には成熟肝細胞との比重の違いを利用し、従来遠心分離法が用いられてきたが、小型肝細胞以外の細胞の混入も多かったため、小型肝細胞のみが得られ、なおかつ簡便な方法は存在しなかった。そこで申請者は成熟肝細胞と小型肝細胞の違いをDNAアレイを用いて解析し、小型肝細胞に多く発現し、かつ膜貫通領域を持つ遺伝子を検索した。その結果、CD44、D6.1A、BRI3の小型肝細胞特異的遺伝子を見出した。それぞれの抗体を入手または作成し、肝臓から小型肝細胞のみを分離することに成功した。また、CD44のリガンドのひとつであるヒアルロン酸をコートしたディッシュで培養を行うことにより、肝臓から小型肝細胞を高純度に分離できる系を確立した。そこで、申請者はラットで確立された単離方法及び培養を基にヒトの小型肝細胞の単離、培養につなげていくことを目標に本研究を行った。

2. 方法

(1) ヒト小型肝細胞の調整法

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なかの正常と思われる肝組織の一部を用いて、細胞を調整した。

〈札幌医科大学倫理委員会にて承認済み〉

①肝組織離断面に小血管の断端を見出し、同部より10ml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洗浄する。

前灌流液：

Ca, Mg-free Hanks balanced salt solution (HBSS)
+0.5 mM EGTA 500 ml

②Collagenase、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 (Wako)	200 mg
+DNase (Sigma)	8 mg

Digestion solution - 2 :

HBSS (pH7.4)	200 ml
+Collagenase	200 mg
+Dispase (合同酒精)	200 mg

③消化溶液内で組織を細切し cell suspension を作成する。

Centrifugation solution :

Hanks solution (pH7.4)
+ 0.5 • g/ml insulin
+ Antibiotics

④Cell 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培養液で培養する。培地交換を 2 ~ 3 日おきに行った。

培養液組成

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 ng/ml HGF
+ 10^{-7} M dexamethasone
+ Antibiotics

(2) 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 RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。

①F344 ラット（雄、8-10 週齢）を用いた。前灌流液（組成はヒトと同じ）及び下記の組成の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。

コラゲナーゼ含有灌流液

HBSS (pH7.4)	200 ml
+Collagenase (Wako)	200 mg

②細胞懸濁液を $50 \times g$ 、1 分間、4°Cで遠心し、沈殿を成熟肝細胞画分、上清を小型肝細胞画分として回収した。成熟肝細胞は $50 \times g$ 、1 分間、4°Cで遠心後、10%Percoll/HBSS 溶液で $50 \times g$ 、1.5 分間、4°Cで遠心し、沈殿を $50 \times g$ 、1 分間、4°Cで 2 回遠心し、生存率を測定した。細胞の懸濁には下記の洗浄液を用いた。

Hanks solution (pH7.4)

+ 0.5 • g/ml insulin
+ Antibiotics

③小型肝細胞画分はさらに $50 \times g$ 、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、 $50 \times g$ 、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、 $150 \times g$ 、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。

④さらに $50 \times g$ 、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 5×10^4 cells/ml の濃度で培養皿に播種した。

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 ng/ml HGF
+ 10^{-7} M dexamethasone

+ Antibiotics

- ⑥培養液は1日おきに交換し、10日間培養後、増殖した小型肝細胞及び②の成熟肝細胞から RNeasy Midi Kit (QIAGEN) を用いて RNAを得た。
- ⑤総 RNA 10・g を用いて Rat Genome 230 2.0 Array (GeneChip, Affymetrix) へ反応させた。
- ⑥小型肝細胞と成熟肝細胞の遺伝子発現を比較検討した。また有意に2倍以上発現差が認められた遺伝子については、Gene Ontologyに基づく遺伝子機能分類をオープンソフトウェア (EASE, <http://david.niaid.nih.gov/david/ease.htm>) を用いて行った。

3. 結果・成果

(1) ヒト小型肝細胞の調整法

- ①播種時の小型肝細胞の viability について

ヒト小型肝細胞を調整後トリパンブルーを用いて生存率を計測すると、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、播種した細胞が播種時より cluster を形成していた細胞の割合を計測した。表1で示すように、播種時には約90%の細胞が単独で存在していた。

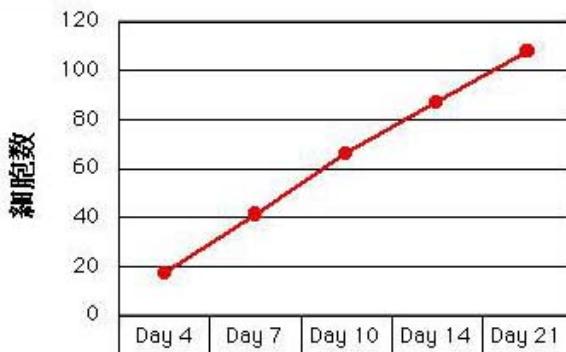
表1 細胞を播種後1日目の接着した細胞のシングル率

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非常に少なく、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。HGFを培地に添加(20ng/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、HGF(-) / (+) = 76.39 / 87.06 であった。

図1 ヒト小型肝細胞コロニー構成細胞数の変化



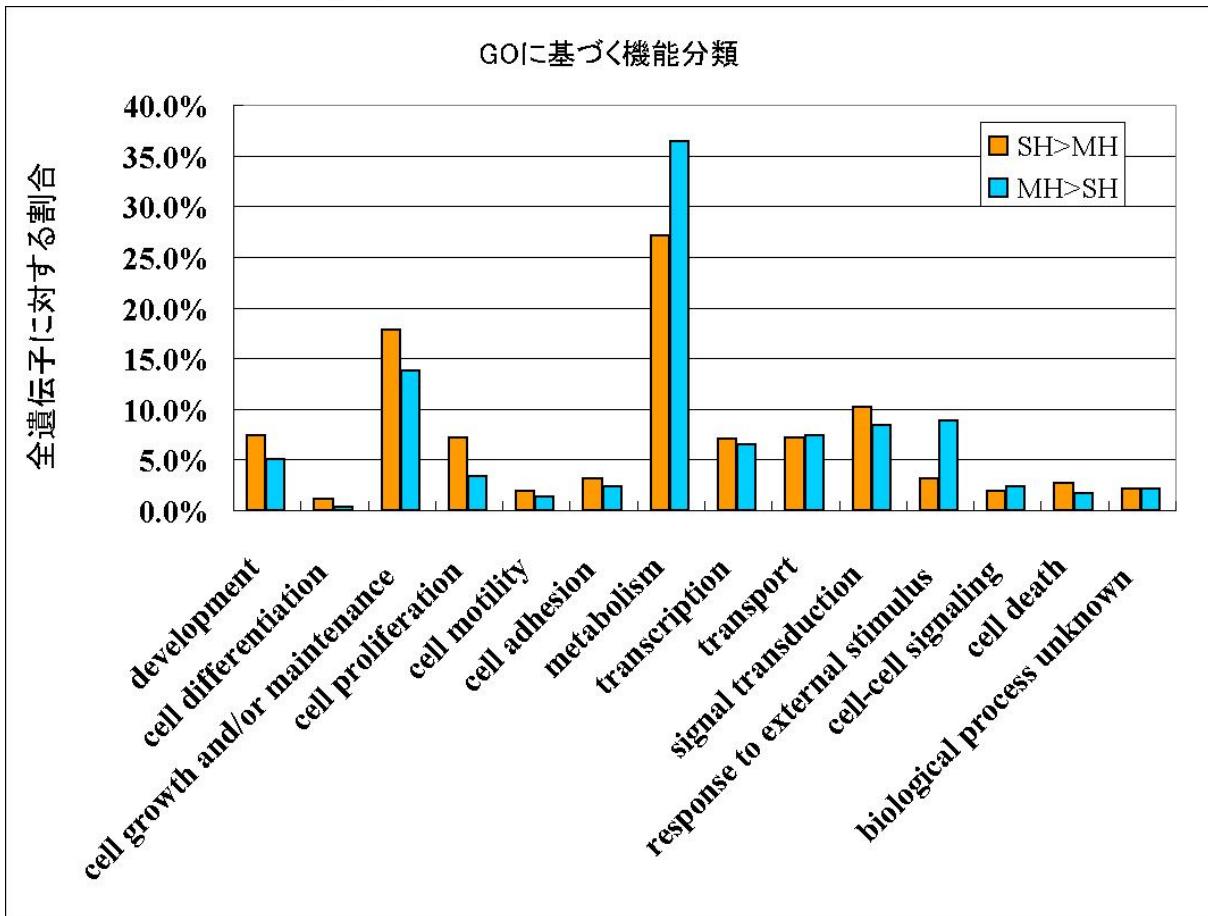
高濃度で播種した細胞をHGF添加培養液で培養した。計測したコロニーの平均値の推移を示す。

(2) マイクロアレイによる遺伝子発現解析

解析は小型肝細胞、成熟肝細胞それぞれ3例ずつを行い、t検定を行った後、それぞれの細胞に有意な発現の差を持つ遺伝子について解析を行った。すべての6反応のうち、用いたRNAと反応した遺伝子が4つ以上あるものについてt検定を行い、p<0.05で有意差があり、且つ小型肝細胞と成熟肝細胞の発現

比が2倍以上であるものを抽出した。その結果、小型肝細胞において発現が上昇した遺伝子数は992、成熟肝細胞で発現が高い遺伝子数は620であった。発現に差が認められた遺伝子について、Gene Ontology (GO)に基づく機能分類を行った(図2)。

図2 GOに基づく機能分類



4. 考察

(1) ヒト小型肝細胞の調整法

成熟肝細胞は従来の方法では粘度が高く遠心分離後の懸濁作業が困難であったのが、灌流液にDNaseIを新たに加えることにより、粘度がほとんどなくなり、作業が簡単にできるようになり、対照として用いるための成熟肝細胞が大量に得られるようになった。また、従来の方法ではコラゲナーゼとディスパーゼ含有の灌流液を留置針で注入後、更に組織を灌流液中でスターラーで混和していた。この方法は時間がかかる上に得られた細胞の生存率が低かったのが、今回検討した方法では時間が短縮された上に、生存率も高く、有用であった。

また培養皿については通常の培養皿、コラーゲンまたはヒアルロン酸をコートした培養皿を用いて予備実験を行ったが、ラットでみられるような小型肝細胞コロニーが出現したのは通常の培養皿とヒアルロン酸コート培養皿であった。更にこの両者を比較するとヒアルロン酸コート培養皿の方がコロニーの出現頻度が高く、コロニー当たりの細胞数が多いことがわかった。コロニー当たりの細胞数の計測にあたっては1個の細胞から増殖したことを示すために播種後1日目の細胞を調べたがほとんどが単独で存在していたことから今回認められた増殖は1個の細胞由来であることがわかった。

培養液に関してもヒト血清を加えることなく、DMEM/F12培地BSAなどを加えて使用することでコロニーの出現が認められた。更にHGFを添加するとコロニーの増殖が高まることから、ヒト小型肝細胞培養に必須であることが明らかとなった。

以上のことからヒアルロン酸コート培養皿とHGF添加無血清培地を組み合わせた使用がヒト小型肝細胞の選択的培養に有用であると考えられた。このメカニズムについてはヒアルロンレセプターの関与が考えられ、ラット小型肝細胞同様CD44の関与が示唆された。

(2) マイクロアレイによる遺伝子発現解析

Gene Ontology (GO)に基づく機能分類より小型肝細胞は、増殖に関連した遺伝子が多く発現している一方、成熟肝細胞は代謝に関連した遺伝子が多く発現していることがわかった。

小型肝細胞に発現が高い遺伝子のうち、表面マーカーとなりうる遺伝子を選択し、RT-PCR法を行い、mRNAの発現を調べることにより、ヒアルロン酸コート培養皿で培養した小型肝細胞特異的表面マーカーを同定し、正常肝臓に発現しているかを調べる。ラット正常肝臓で特異的発現が認められた遺伝子についてヒト小型肝細胞にも発現しているかを調べていく。

5. 今後の展望

本研究によりヒト小型肝細胞が効率よく調整できるようになった。更にHAディッシュとHGF添加無血清培地を組み合わせて用いることで小型肝細胞の良好な増殖が認められた。今後は小型肝細胞の成熟化やそれに伴うCYP450の発現や活性の測定、また小型肝細胞コロニーの凍結保存の検討を行う。また、ラットのマイクロアレイのデータを基にCD44以外にも表面マーカーになり得、かつ正常肝臓の細胞画分に存在するヒト小型肝細胞特異的遺伝子の検索を行っていく。