

抗体を用いたヒト小型肝細胞の分離方法の開発

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]

背景・目的

小型肝細胞は成熟ラット肝臓に存在する増殖力旺盛な細胞である。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。小型肝細胞の効率良い分離法を開発するために成熟肝細胞と小型肝細胞の遺伝子発現の違いをマイクロアレイを用いて解析し、3種の小型肝細胞特異的遺伝子を見い出した。これらの抗体を用いて小型肝細胞のみを分離することに成功した。そこで、申請者はラットで確立された分離法をヒト小型肝細胞にも適用することを目標に本研究を行った。

内容・方法

ヒトにおいては手術で切除した肝臓の正常部分を札幌医科大学第一外科学講座の協力のもとに得、実験に使用するのが現状であり、ラットのように効率のよい灌流を行うのは難しい。そのため、まずヒトの標本から効率よく細胞を調整するための検討を行った。従来使用していたコラゲナーゼ、ディスパーゼに加え、DNaseIを用いた。

ラット小型肝細胞特異的遺伝子CD44、D6.1A、BRI3の発現は小型肝細胞の増殖時に認められるため、肝障害モデルラットを作製し、予め小型肝細胞の増殖が惹起された肝臓から抗体を用いて小型肝細胞を単離した。ヒトでは正常肝臓を使用することからラットと同様に抗体を用いた単離を行うのは難しいと考えられた。そこで、ラットでCD44のリガンドであるヒアルロン酸を塗布した培養皿(HAディッシュ)及びDMEM/F12を基にした無血清培地を用いてラット小型肝細胞を含む画分を播種・培養すると小型肝細胞が増殖を続ける傾向にあることを見出している。この方法をヒトにおいても検討した。

結果・成果

ヒト標本を扱うにあたり、十分なインフォームドコンセントを行った。得られた標本から上述した灌流液を用いて灌流後、遠心分離を行い、小型肝細胞画分と成熟肝細胞を調整した。その結果、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、作業が簡単に行えるようになった。これまでには成熟肝細胞がほとんど得られなかつたが、この方法により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つたが、今回検討した方法では時間が短縮された上、生存率も高く、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%であり、この方法は有用であった。このようにして調整したヒト小型肝細胞を種々のディッシュに播種した。使用したのは通常の細胞培養用のディッシュ(N)、それにコラーゲン(collagen)またはヒアルロン酸(HA)をそれぞれコートした3種のディッシュを用いた。播種後、10日間培養し、形態観察を行った。その結果、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NとHAディッシュであった。更にNとHAディッシュを比較するとHAディッシュの方がコロニーの出現頻度が高いことがわかった。以上のことからHAディッシュは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。

次に培養液の検討を行った。医療応用を考える上で培養液の無血清化が必須となる。そこで、従来のDMEMを基にアミノ酸や微量成分が豊富なF-12のはいったDMEM/F12培地を用いた。この培地にNicotinamide、アスコルビン酸、EGF、ITS、デキサメサゾン、抗生素質、BSAを加えた。更にこの培地へのHGFの添加効果を調べた。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。

ヒト小型肝細胞特異的遺伝子を検索するためにHAディッシュ上で培養したヒト小型肝細胞及び対照として成熟肝細胞からRNAを調整し、マイクロアレイ解析を行った。これについては解析中である。しかし、ヒトに先駆けてHAディッシュ上で培養したラット小型肝細胞についての解析を行った。この解析結果からわかったHAディッシュ培養小型肝細胞に発現が高い遺伝子についてRT-PCR法にて実際のmRNAの発現を調べている。

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ディッシュを用いることで小型肝細胞の増殖が認められた。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。