

無アルブミンラット肝細胞への分離正常肝細胞の移植

61570179

昭和63年度科学研究費補助金 (一般C) 研究成果報告書

平成元年3月

研究代表者 小川 勝洋

(旭川医科大学医学部教授)

は し が き

研究組織

研究代表者： 小 川 勝 洋 (旭川医科大学医学部教授)
研究分担者： 小山田 正 人 (札幌医科大学医学部助手)

研究経費

昭和61年度	1500千円
昭和62年度	200千円
昭和63年度	100千円
計	1800千円

研究発表

(1) 学会誌等

- ① Yokota, K., Ogawa, K., Mori, M., Nagase, S.
and Sato, K. :
Transplantation of putative preneoplastic hepatocytes
of analbuminemic rats in the livers of Sprague-Dawley
x analbuminemic hybrid rats.
Jpn. J. Cancer Res. (Gann) 78: 109-112 (1987)
- ② Yokota, K., Ogawa, K., Mori, M. and Nagase, S. :
Lack of albumin as a genotypic marker of preneoplastic
albuminemic rats hepatocytes transplanted within
albumin-positive liver.
Cancer Res. 48: 389-392 (1988)

- ③ 小川勝洋、辻 哲、横田欽一、池田 健、森 道夫：
モザイク動物の肝発癌研究への応用
J. Toxicol Pathol. 1: 61-66 (1988)

(2) 口頭発表

- ① Ogawa, K., Yokota, K., Mori, M., Nagase, S.:
Settlement of transplanted hepatocytes within the liver
of analbuminemic rats.
Proc. XIth Int. Cong. Electron Microscopy 11: 2933-2934
(1986)
- ② 小川勝洋、横田欽一、森 道夫、長瀬すみ：
無アルブミンラット(NAR) 肝内へのアルブミン産生細胞の移植
日病会誌75: 387 (1986)
- ③ 小川勝洋、横田欽一、森 道夫、長瀬すみ：
門脈より注入した正常肝細胞の無アルブミンラット肝内への生
着過程の電顕的観察
日癌記事45: 248 (1986)
- ④ 小川勝洋、横田欽一、森 道夫、長瀬すみ：
無アルブミンラット前癌肝細胞のアルブミン産生性ラット肝内
での生着とその推移
日癌記事46: 24 (1987)
- ⑤ 横田欽一、小川勝洋、森 道夫、長瀬すみ：
無アルブミンラット前癌肝細胞のアルブミン産生性ラット肝内
への移植 — 肝発癌過程の解析への遺伝的マーカーの導入
日病会誌76: 116 (1987)
- ⑥ 小川勝洋：
遺伝マーカーによる肝癌発生過程の解析
日病会誌77(補2): 22 (1988)

はじめに

分離肝細胞を同系動物に移植する試みはこれまで数多く行なわれており、脾臓¹⁾、前眼房²⁾、腹腔内³⁾、皮下脂肪組織⁴⁾ などには長期にわたって生着することが報告されている。肝臓内への移植の試みもいくつか行なわれており、Gunn ラット肝^{5, 6)} や Galactosamine 障害肝⁷⁾ へ正常肝細胞を移植することにより、明らかな症状の改善や延命効果があったとする報告が見られる。しかし、後者の実験では、必ずしも移植肝細胞が宿主肝に生着したとは限らず、酵素蛋白または小器官が宿主細胞に取り込まれて一時的に機能を発揮した可能性や肝細胞からの何らかの因子が宿主肝の再生を促進した可能性も考えられる⁸⁾。

一方、門脈血中には hepatotrophic factors が存在することや組織構造の点などから考えて、肝細胞は他組織よりも肝組織内に生着する方が機能を発揮する上で有利と考えられる。しかし、肝細胞が肝内に生着することを確認するためには移植細胞と宿主細胞とを区別するマーカーが必要となる。我々は、無アルブミンラット (NAR) の肝内にアルブミン産生肝細胞を注入して、アルブミンをマーカーとして移植後の運命を追跡した。

門脈内に注入した肝細胞の運命

NAR に 2/3 部分肝切除を行ない、手術直後にコラゲナーゼ法により分離した SD ラットの肝細胞を 2×10^6 ケを腸間膜静脈の末梢から注入した。NAR では加齢にともなってアルブミン陽性細胞が出現することが知られているため⁹⁾、宿主の NAR は週令 6 週の比較的若いものを使用した。注入後、様々な時間に肝を還流固定し、抗ラットアルブミン抗体による免疫染色により注入細胞を追跡した。注入後 2 時間目では大部分の注入肝細胞は門脈枝内で集塊をなして塞栓を形成していたが、一部は単一または少数の集団で類洞内に散在性に認められた。これらを電顕的に観察すると多くは球状に近い形態をとり、類洞壁との接触性は乏しかった。しかし、注入後 6 時間目ではこれらの肝細胞は接着面をもって類洞壁に接する傾向がみられ、電顕的には類洞内皮の一部が欠損して、そこに注入細胞が嵌り込んで、細胞質の一部が宿主肝細胞と接していた。しかも、類洞内皮の細胞突起が注入肝細胞の表面の一部被っている像も観察された。24 時間目では、門脈内、類洞内にアルブミン陽性肝細胞は見られず、肝細胞索内にのみ見られ、それらは正常肝細胞と同様に多角形を示していた。電顕的観察ではアルブミン陽性である以

外、宿主肝細胞との区別はなく、隣接細胞との間には毛細胆管及び tight junction が観察された。これらの観察の結果から、類洞内に移行したものは比較的短時間内に宿主の肝細胞索内に組み込まれることが明らかになった。

門脈内移植細胞の生着様式

肝細胞以外では、臍島細胞や悪性腫瘍細胞を門脈内に注入してその生着過程を調べた報告がある。例えば臍島細胞については門脈内で塞栓を形成し、その後、門脈内皮によって被われ、グリソン鞘内に取り込まれて生着する事が報告されている¹⁰⁾。また、門脈内に注入した腫瘍細胞は細胞の種類により一定のパターンで肝組織内に生着して転移巣を形成することが知られている¹¹⁾。このように細胞の種類により肝組織内への生着部位及び様式には明らかに違いがみられる。このような肝内生着のメカニズムには移植細胞と類洞内皮細胞、細胞外基質との反応が重要と考えられる。単層培養した血管内皮細胞上に腫瘍細胞を加えた場合、腫瘍細胞が細胞外基質に対して高い反応性を示すと、内皮細胞の細胞質突起が収縮し、その欠損部から腫瘍細胞が内皮下に侵入することが示されている。この時、細胞外基質の成分としては fibronectin、laminin、Type IV collagen が重要とされている。一方、肝の Disse 腔にはこれらの成分が豊富に含まれるとともに¹²⁾、肝細胞は培養条件でこれらの成分と強い親和性を示すことが知られている。したがって、類洞壁には肝細胞が類洞内皮を押し退けて Disse 腔に侵入しやすい条件がそろっているものと考えられる。

門脈内肝細胞移植法の応用

門脈内肝細胞移植法の応用については、1 つには肝不全や代謝疾患などの治療への実験モデルとしての可能性である。実際、上記のように肝不全や代謝疾患などに効果があったとする報告があるが、その作用は一時的なもので長期には有効でない。また、今回の SD ラットと NAR 間の移植は allogeneic な関係であり、長期生着することは期待しがたく、したがって実際の治療でも他の個体からの肝細胞を移植する場合には同様の問題があろう。

一方、近年遺伝子治療の目的で体細胞に遺伝子を組み込んで再び体内に移植し、生体内で遺伝子発現を行なわせようとする試みが行なわれている¹³⁾。肝特異酵素の欠損による先天性代謝疾患の場合には holoenzyme や代謝過程の再構築を必要とするため、同一個体から分離した肝細胞に遺伝子導入して再び体内に戻すこと

は有効な治療法になりうると考えられる¹⁴⁾。しかし、今後これを実現するためには生着効率を大幅に上げることや移植肝細胞を生体内で特異的に増殖させる手段など、多くの問題の解決が必要であろう。

門脈内移植法の今一つの応用は細胞の lineage を追跡することである¹⁵⁾。我々はこれまで homo NAR と hetero NAR (hetero NAR では無アルブミン血症は劣性遺伝のためアルブミン産生性である) の間で前癌肝細胞の移植を行ないアルブミンの有無をマーカーにして移植後の運命を追跡した。この場合には長期生着が可能であり、また、宿主にプロモーションを行なうことにより移植細胞は増殖してコロニーを形成する。この場合には移植細胞はどの様に形や形質を変えても遺伝マーカーを利用して検出できるため、前癌肝細胞の運命を追跡する上できわめて有効であった。

参考文献

- 1) Mito, M., Ebata, H., Kusano, M., Onishi, Y., Saito, T., Sakamoto, S. : Morphology and function of isolated hepatocytes transplanted into rat spleen. Transplantation 28: 499-505, 1979
- 2) Rao, M. S., Thorgeisson, S., Reddy, M. K., Lalwani, N. D., Evarts, R. E., Usman, M. I., Singh, B., Reddy, J. K. : Induction of peroxisome proliferation in hepatocytes transplanted into the anterior chamber of the eye. A model system for the evaluation of xenobiotic-induced effects. Am. J. Pathol. 124: 519-527, 1986
- 3) Demetriou , A. A., Whiting, J. F., Feldman, D., Levenson, S. M., Choudhurg, N. R., Mosciomi, A. D., Kram, M., Choudhurg, J. R. : Replacement of liver function in rats by transplantation of micro-carrier-attached hepatocytes. Science 233: 1190-1192, 1986
- 4) Jirtle, R. L., Michalopoulos, G. : A clonal assay in vivo parenchymal hepatocytes. In: Cell Clones: Manual of Mammalian Cell Techniques, C. S. Potten & J. H. Hendry (Eds.) Churchill Livingstone, Edin, London, Melbourne & N. Y. p. 139-151, 1985
- 5) Matas, A., Sutherland, D. E. R., Steffes, M. W., Mauer, S. M., Lowe, A., Simmons, R. L., Najarian, J. S. : Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasma bilirubin in Gunn rats. Science 192: 892-894, 1976

- 6) Groth, C. G., Arborgh, B., Bjorken, C., Sundberg, B., Lundgren, G. :
Correction of hyperbilirubinemia in the glucuronyl-transferase-deficient rat by intraportal hepatocyte transplantation. Transplant. Proc. 9: 313-316, 1977
- 7) Sommer, B. G., Sutherland, D. E., Matas, A. J., Simmons, R. L., Najarian, J. S. : Hepatocellular transplantation for treatment of D-galactosamine-induced acute liver failure in rats. Transplant. Proc. 11: 578-584, 1979
- 8) Makowka, L., Falk, R. E., Rotstein, L. E., Falk, J. A., Nossal, N., Langer, B., Blendis, L. M., Phillips, M. J. : Cellular transplantation in the treatment of experimental hepatic failure. Science 210: 901-903, 1980
- 9) Makino, R., Sato, S., Esumi, H., Negishi, C., Takano, M., Sugimura, T., Nagase, S., Tanaka, H. : Presence of albumin positive cells in the liver of analbuminemic rats and their increase on treatment with hepatocarcinogens. Gann 77: 153-159, 1986
- 10) Hart, T. K., Pino, R. M. : Pseudoislet vascularization. Induction of diaphragm fenestrated endothelia from the hepatic sinusoids. Lab. Invest. 54: 304-313, 1986
- 11) Nicolson, G. L. : Cancer metastasis. Organ colonization and the cell-surface properties of malignant cells. BBA. 695: 113-176, 1982
- 12) Martinetz-Hernandez, A. : The hepatic extracellular matrix. :
I. Electron immunohistochemical studied rat liver. Lab. Invest. 51: 57-74, 1984

- 13) Ledley, F. D. : Somatic gene therapy for human disease. : Background and prospects. Part 1. J. Pediat. 110: 1-8, 1987
- 14) Peng, H., Armentano, D., Mackenzie-Graham, L., Shen, R. F., Darlington, G., Ledley, F., Woo, S. L. C. : Retroviral-mediated gene transfer and expression of human phenylalanine hydroxylase in primary mouse hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 8146-8150, 1988
- 15) Yokota, K., Ogawa K., Mori, M., Nagase, S. : Lack of albumin as genotypic marker of preneoplastic analbuminemic rat hepatocytes transplanted within albumin-positive liver. Cancer Res. 48: 387-392, 1988